


UNIVERSIDAD DE CHILE  
Facultad de Ciencias Básicas  
y Farmacéuticas

"ACIDOS HIDROXAMICOS EN CEREALES  
Y SUS EFECTOS SOBRE AFIDOS"



VICTOR H. ARGANDOÑA C.

UCH-FC  
MAG-B  
A686

"ACIDOS HIDROXAMICOS EN CEREALES  
Y SUS EFECTOS SOBRE AFIDOS"

Tesis  
presentada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Magister en Ciencias Biológicas con mención en  
Botánica

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas

por

VICTOR HUGO ARGANDOÑA CORTES

Mayo - 1983

Profesor Patrocinante: Dr. Luis J. Corcuera P.

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas  
Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por el candidato:

VICTOR HUGO ARGANDOÑA CORTES

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para optar al Grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Botánica.

Patrocinante de Tesis

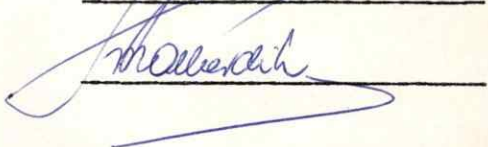
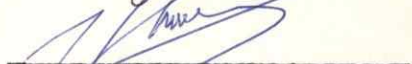
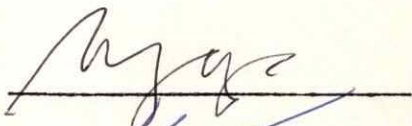
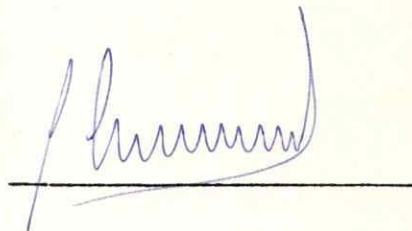
Dr. Luis Corcuera P.

Comisión Informante de Tesis

Dra. Mary T. Kalin Arroyo

Dr. Juan Garbarino

Dra. Miren Alberdi L.



A mis padres

A mis hijos

## AGRADECIMIENTOS

Al DR. LUIS CORCUERA P. por su permanente orientación,  
crítica y enseñanza en la realización de esta Tesis.

Al DR. HERMANN NIEMEYER M. por sus valiosas sugerencias.

A los integrantes y amigos del Laboratorio de Fisiología  
Vegetal y Físicoquímica Orgánica.

## INDICE DE MATERIAS

	Pág.
LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XV
1. INTRODUCCION	1
1.1. Problemas causados por los áfidos de los cereales.	1
1.2. Las especies de áfidos de los cereales presentes en Chile.	2
1.3. Medidas que tienden a disminuir el daño de una plaga.	4
i) Uso de pesticidas	4
ii) Control biológico	5
iii) Control cultural	6
iv) Uso de variedades resistentes	6
1.4. Mecanismos de defensa de las plantas.	6
i) Defensa estructural	6
ii) Defensa bioquímica	8
Compuestos pre-infeccionales	8
a) Prohibitinas	8
b) Inhibitinas	10
Compuestos post-infeccionales	10
a) Fitoalexinas	
b) Glicósidos	

	Pág.
1.5. Acidos hidroxámicos en Gramíneas	12
i) Descubrimiento de los ácidos hidroxámicos en Gramíneas.	12
ii) Aspectos químicos de los ácidos hidroxámicos de Gramíneas.	15
Algunos métodos utilizados para determinar ácidos hidroxámicos.	16
a) Dilución isotópica.	16
b) Espectroscopía en infrarojo.	16
c) Espectrofotofluorometría.	16
d) Absorción colorimétrica del complejo Acido hidroxámico-FeCl <sub>3</sub> .	17
e) Cromatografía gas líquida y espectrometría de masa.	17
Estabilidad de los ácidos hidroxámicos.	17
iii) Aspectos biológicos de los ácidos hidroxámicos.	18
a) Rol en la destoxificación de herbicidas.	18
b) Rol en la nutrición mineral de la planta.	18
c) Rol en la resistencia de plantas a infecciones.	19
1.6. Objetivos	
2. MATERIALES Y METODOS GENERALES	24
2.1. Germinación de las semillas	24
2.2. Preparación de los extractos y cuantificación de los ácidos hidroxámicos.	24
2.3. Cultivo de los áfidos.	25
2.4. Ensayos de infestación.	26

	Pág.
2.5. Obtención de DIMBOA.	26
2.6. Obtención de 2- $\beta$ -O-D-glucosil-DIMBOA	27
2.7. Ensayos de alimentación de áfidos con dietas artificiales.	27-
2.8. Registro eléctrico de la conducta de un áfido durante la ingestión de una dieta.	30
3. RESULTADOS	33
3.1. Concentración de los ácidos hidroxámicos en Gramíneas.	33
3.2. Concentración y distribución de los ácidos hidroxámicos en diferentes órganos de <i>Triticum durum</i> L cv SNA-3.	33
3.3. Variación del contenido de ácidos hidroxámicos con la edad de la planta.	35
3.4. Concentración de ácidos hidroxámicos en hojas de <i>Triticum durum</i> cv SNA-3 de diferentes edades.	38
3.5. Contenido de ácidos hidroxámicos y susceptibilidad de diferentes especies de Gramíneas de 7 días de edad a <i>Metopolophium dirhodum</i> (Walker).	40
3.6. Contenido de ácidos hidroxámicos y susceptibilidad de variedades de trigo a <i>Schizaphis graminum</i> (Rondani).	42
3.7. Efecto de la edad de la planta sobre el contenido de ácidos hidroxámicos en centeno y trigo y su susceptibilidad a <i>Metopolophium dirhodum</i> .	42
3.8. Tasa de crecimiento de poblaciones de <i>Metopolophium dirhodum</i> en función de la concentración de los ácidos hidroxámicos en las plantas.	44



	Pág.
3.9. Efecto del DIMBOA incorporado a hojas de cebada en la susceptibilidad a <i>M. dirhodum</i> .	47
3.10. Efecto del contenido de ácidos hidroxámicos de las hojas de plantas de cebada y trigo en la distribución de <i>S. graminum</i> en ellas.	49
3.11. Efecto del DIMBOA en la sobrevivencia de tres especies de áfidos de los cereales.	51
3.12. Mortalidad de ninfas de <i>S. graminum</i> alimentados con dietas artificiales con diferentes concentraciones del DIMBOA.	51
3.13. Conducta y mortalidad de áfidos sometidos a la alternativa de elegir dietas con o sin DIMBOA.	54
3.14. Mortalidad de <i>S. graminum</i> expuestos a diferentes concentraciones del DIMBOA por un período de 12 horas.	56
3.15. Registro eléctrico de la ingestión de dietas con DIMBOA.	58
3.16. Tiempo de ingestión de dietas con diferentes concentraciones del DIMBOA.	58
3.17. Efecto del DIMBOA y del DIMBOA-Glc en la sobrevivencia de áfidos alimentados con dietas artificiales.	61
3.18. Efecto del DIMBOA y del DIMBOA-Glc en el índice de reproducción de los áfidos.	61
3.19. Efecto del DIMBOA-Glc en la alimentación de los áfidos.	64
3.20. Efecto del DIMBOA y del DIMBOA-Glc en la sobrevivencia de áfidos expuestos a dietas con diferentes concentraciones de los compuestos por un período de 12 horas	64
3.21. Efecto de la cisteína sobre la actividad biológica del DIMBOA.	66

	Pág.
3.22. Efecto de la cisteína sobre la desaparición del DIMBOA en dietas y en solución tampón.	68
3.23. Actividad biológica de los productos de descomposición del DIMBOA.	71
3.24. Sobrevivencia de áfidos expuestos a dietas con MBOA.	71
4. DISCUSION	74
5. CONCLUSIONES	80
6. BIBLIOGRAFIA	81

## LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Composición de una dieta artificial.	29
Tabla 2	Concentración de los ácidos hidroxámicos en algunas especies y variedades de Gramíneas.	34
Tabla 3	Concentración de los ácidos hidroxámicos en raíz, hojas y coleóptilos de <i>Triticum durum</i> .	36
Tabla 4	Concentración de los ácidos hidroxámicos en las diferentes hojas de plantas de <i>Triticum durum</i> .	39
Tabla 5	Susceptibilidad y concentración de los ácidos hidroxámicos en Gramíneas de 7 días de edad al áfido <i>Metopolophium dirhodum</i> (Walker).	41
Tabla 6	Susceptibilidad y concentración de ácidos hidroxámicos de variedades de trigo a <i>Schizaphis graminum</i> (Rondani).	43
Tabla 7	Efecto de la cisteína sobre la desaparición del DIMBOA en dieta y en solución tampón.	70
Tabla 8	Efectos de la cisteína, DIMBOA y de los productos de descomposición del DIMBOA sobre <i>Schizaphis graminum</i> .	72

## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Fig 1	Metabolitos secundarios preinfeccionales que se encuentran en plantas y que reducen o inhiben el desarrollo de patógenos.	9
Fig 2	Metabolitos secundarios post-infeccionales producidos por plantas cuando son infestadas por algún patógeno.	11
Fig 3	Estructuras de Benzoxazinonas y Benzoxazolinonas presentes en Gramíneas.	13=
Fig 4	Sistema utilizado para extractos de cultivo artificial de áfidos de los cereales.	28
Fig 5	Diagrama del mecanismo eléctrico utilizado para el estudio de la ingestión de dietas por los áfidos.	31
Fig 6	Variación del contenido de ácidos hidroxámicos en relación a la edad de una planta de <i>Triticum durum</i> .	37
Fig 7	Efecto de la edad de la planta sobre el contenido de ácidos hidroxámicos en <i>Secale cereale</i> y <i>Triticum durum</i> y su susceptibilidad al áfido <i>Metopolophium dirhodum</i> (w).	45
Fig 8	Tasa de crecimiento de una población de <i>M. dirhodum</i> en función de la concentración de ácidos hidroxámicos en <i>Secale cereale</i> y <i>T. durum</i> .	46
Fig 9	Efecto del DIMBOA incorporado a las hojas de <i>Hordeum distichum</i> en la susceptibilidad a <i>M. dirhodum</i> .	48
Fig 10	Efecto del contenido de los ácidos hidroxámicos presentes en hojas de <i>T. durum</i> y <i>H. distichum</i> en la distribución de <i>Schizaphis graminum</i> en ellas.	50

		Pág.
Fig 11	Sobrevivencia de 3 especies de áfidos de los cereales alimentados con diferentes concentraciones del DIMBOA en la dieta.	52
Fig 12	Mortalidad de <i>S. graminum</i> alimentados con dietas con diferentes concentraciones de DIMBOA.	53
Fig 13	Conducta y mortalidad de áfidos sometidos simultáneamente a dietas con y sin DIMBOA.	55
Fig 14	Efecto en la mortalidad de áfidos expuestos a dietas con diferentes concentraciones de DIMBOA por un período de 12 horas.	57
Fig 15	Registro eléctrico de la ingestión de dietas con DIMBOA por un áfido.	59
Fig 16	Tiempo de ingestión de dietas con diferentes concentraciones de DIMBOA.	60
Fig 17	Efecto del DIMBOA y DIMBOA-Glc en la sobrevivencia de <i>S. graminum</i> alimentados con dietas artificiales.	62
Fig 18	Efecto del DIMBOA y DIMBOA-Glc en el índice de reproducción de <i>S. graminum</i> alimentados con dietas artificiales.	63
Fig 19	Efecto del DIMBOA-Glc en el tiempo de alimentación de <i>S. graminum</i> .	65
Fig 20	Sobrevivencia de <i>S. graminum</i> sometidos a dietas con diferentes concentraciones de DIMBOA o DIMBOA-Glc durante 12 horas y luego trasladados a dietas sin los compuestos.	67
Fig 21	Efecto del DIMBOA sobre <i>S. graminum</i> alimentados con dietas con y sin cisteína.	69
Fig 22	Sobrevivencia de áfidos expuestos a dietas con MBOA.	73

## RESUMEN

Los cultivos de gramíneas son afectados por áfidos, pues ellos succionan la savia del tejido vegetal, lesionándolo y dejándolo propenso a la infección por bacterias y hongos patógenos y porque transmiten virus. El propósito de esta tesis es determinar si los ácidos hidroxámicos cíclicos (Hx) presentes en algunos cereales constituyen un mecanismo de defensa de los cereales contra los áfidos.

Se observó que la concentración de los Hx variaba en las diferentes especies y variedades de gramíneas estudiadas. Los Hx no fueron detectados en *Hordeum distichum* L., mientras que en *Zea mays* L. la concentración llegó hasta 8 mmoles/kg de peso húmedo. Se encontró Hx en coleoptilos, hojas y raíces. La mayor concentración se encontró en las hojas, pero no se detectaron en los frutos. Los Hx empiezan a ser detectados en las hojas alrededor de 24 horas después de la germinación, alcanzaron un máximo al cuarto día de edad y luego disminuyeron progresivamente.

Al infestar *H. distichum*, *Z. mays*, *Triticum aestivum* y *Triticum durum* con *Metopolophium dirhodum* (Walker) o *Schizaphis graminum* (Rondani) se observó que la reproducción de los áfidos fué menor en aquellas variedades que tenían mayor concentración de Hx. Estas correlaciones se obtuvieron también al infestar plantas de la misma especie pero de edades diferentes.

El número de áfidos presentes en cada hoja se correlacionó inversamente con el contenido de Hx en ellas. La concentración de estos compuestos fué mayor en las hojas más nuevas y disminuyó a medida que la hoja envejeció. Esto sugirió que la distribución vertical de *S. graminum* en las plantas de trigo, estaría relacionada con el contenido de estos compuestos en las hojas.

Estos resultados dieron apoyo a la hipótesis que la susceptibilidad de gramíneas a la infestación por áfidos es afectada por la concentración de Hx en la planta. Esta interpretación fué avalada por los resultados obtenidos en ensayos de alimentación de áfidos con dietas artificiales. En estas condiciones el DIMBOA, el Hx más abundante en extractos de maíz y trigo, causó efectos deletéreos sobre *M.*

*dirhodum* y *S. graminum* en concentraciones similares a las encontradas en las plantas. Cuando se alimentaron diversas especies de áfidos con dietas con diferentes concentraciones de DIMBOA, al cabo de 48 horas de iniciado el ensayo, se obtuvo un 50% de sobrevivencia para *S. graminum* y *M. dirhodum* en dietas con concentraciones 0.4 y 1.5 mM, respectivamente. La sobrevivencia de *Rhopalosiphum maidis* (Fitchii) no fué afectada por el DIMBOA en concentraciones de hasta 2 mM.

Con el propósito de estudiar si el DIMBOA actúa sobre los áfidos como un compuesto repelente o como un compuesto tóxico, se expusieron ninfas de *S. graminum* a dietas que contenían DIMBOA desde 0 hasta 8 mM por 12 horas y luego se

transfirieron a dietas sin DIMBOA. Los porcentajes de mortalidad al cabo de 27 horas fueron 0, 2, 35, 72 y 23% para DIMBOA 0, 2, 4, 6 y 8 mM respectivamente. Las curvas de mortalidad en función del tiempo para DIMBOA 6 y 8 mM fueron parecidas a la de los áfidos sometidos a ayuno. Resultados similares se obtuvieron con DIMBOA-Glc (Glc = glucósido), el Hx presente en los tejidos intactos. Experimentos de alimentación controlados electrónicamente mostraron que el DIMBOA disminuyó al tiempo de alimentación de los áfidos. Estos resultados sugirieron que el DIMBOA actuaría contra áfidos de los cereales a través de un efecto predominantemente repelente a concentraciones altas y un efecto predominantemente tóxico en concentraciones bajas.



## ABSTRACT

Cereal aphids damage crops because they extract nutrients from the tissues, injuring the latter them and increasing the susceptibility of the plant to pathogens. The purpose of this thesis is to determine whether hydroxamic acids (Hx) from some cereals are plant resistance factors to aphids.

Hx concentration varied in different species and cultivars. Hx were not detected in *Hordeum distichum* L. In *Zea mays* L. the concentration may reach up to 8 mmoles/kg of fresh weight. Hx were present in leaves, coleoptiles and roots. Hx were found to be absent from the fruits and became detectable around the second day after germination, reaching a maximum by the fourth day, to decrease afterwards.

In infestation experiments of *H. distichum*, *Z. mays*, *Triticum aestivum* and *Triticum durum*, reproduction of *Metopolophium dirhodum* (Walker) and *Schizaphis graminum* (Rondani) was reduced in those plants with a higher content of Hx in their leaves. The number of aphids on the leaves was inversely correlated with the Hx content of the same leaves.

These results suggested that susceptibility of gramineae may be affected by the Hx content of the plant. This hypothesis was supported by feeding experiments with aphids reared on artificial diets. DIMBOA, the most abundant Hx in maize and wheat extracts, had deleterious effects on several

species of aphids in concentrations similar to those found in plants. Survival and reproduction rates of aphids of *M. dirhodum* and *S. graminum* decreased by about 50% in 48 hrs at 0.4 and 1.5 mM DIMBOA, respectively. Survival of *Rhopalosiphum maidis* (Fitchii) was not affected by up to 2 mM DIMBOA.

To determine whether DIMBOA acted as a toxicant or as a feeding deterrent, *S. graminum* nymphs were exposed to diets with 0 to 8 mM DIMBOA for 12 hours. The aphids were then transferred to diets without DIMBOA. Nymph mortality after 27 hours was 0, 2, 35, 72 and 23% for DIMBOA 0, 2, 4, 6 and 8 mM DIMBOA, respectively. Mortality curves for 6 and 8 mM DIMBOA were similar to those of aphids subjected to fasting. Similar results were obtained for DIMBOA-Glc (Glc = glycosyl), the Hx present in intact tissues. Electronically monitored experiments showed that the presence of DIMBOA decreased mean diet ingestion time. These results suggest that Hx at higher concentrations acts predominantly as feeding deterrents. At lower concentrations the compounds would be ingested causing toxic effects.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Problemas causados por áfidos de los cereales.

Los áfidos, constituyen plagas en plantas de maíz, trigo, centeno, cebada, avena (Campos y Charlín, 1976; Etchégaray, 1975; Apablaza y Tiska, 1973; Latteur, 1970). Los áfidos, obtienen su alimento introduciendo sus estiletes, preferentemente en el tejido parenquimatoso, aunque algunas especies lo hacen en los tejidos floemáticos (Auclair, 1963). Al introducir sus estiletes, los áfidos provocan una herida en la cual pueden desarrollarse hongos y bacterias. También inyectan saliva y toxinas en el tejido vegetal (Miles, 1972). Por ello, los áfidos pueden transmitir enfermedades virales, como el enanismo amarillo (Tollenar y Hepp, 1972; Oswald y Houston, 1951). El virus permanece en el pulgón, el cual puede infestar plantas durante toda su vida. La infestación de la planta por áfidos comienza con la llegada de áfidos alados, los cuáles originan una rápida sucesión de generaciones partenogénicas de hembras ápteras, las que pueden constituir una plaga. Las hembras pueden ser aladas, o ápteras. Las primeras se pueden apreciar al comienzo y al final de la infestación. En el período intermedio predominan hembras ápteras (van Emden., 1972).

Los áfidos de los cereales tienen entre 4 y 5 instares (estados entre mudas) en su desarrollo y el tiempo para llegar a adultos varía entre 4,5 y 15 días, de acuerdo a las condiciones de la planta en que viven y de la temperatura ambiente (Dean, 1974; Wyatt y Brown, 1977). Las formas hibernantes de algunas especies son las adultas y pueden durar casi un año.

#### 1.2. Las especies de áfidos de los cereales presentes en Chile.

Los áfidos de los cereales son plagas introducidas al país. En Chile las especies más importantes son las siguientes: *Metopolophium dirhodum* (Walker) "pulgón verde pálido" (Apablaza et al., 1973), *Sitobion avenae* (Fabricius) "pulgón verde oscuro o patas negras" (Zúñiga, 1967), *Rhopalosiphum maidis* (Fitchii) "pulgón del maíz", *Rhopalosiphum padi* (L.) "pulgón de la avena", *Schizaphis graminum* (Rondani) "pulgón verde de los cereales", *Sitobion africanum* (H.R.L.) (Apablaza y Tiska, 1973; González et al., 1973; Guerrero y Lamborot, 1979).

Estas especies cambian de huésped e hibernan en malezas, rosas silvestres y cultivadas. En la zona de Santiago las poblaciones de áfidos empiezan a aumentar desde fines de Septiembre, para llegar al máximo entre Octubre y Noviembre, luego decrecen para llegar a un mínimo en los meses de invierno (Carrillo y Mellado, 1975).

Cuando poblaciones de *S. graminum*, *Macrosiphum avenae* (Fabricius) o *R. maidis* parasitan plántulas de cebada, éstas se marchitan rápidamente para luego morir; en cambio, en trigos o centenos los áfidos no alcanzan a desarrollar grandes poblaciones. Los áfidos cuando se ubican en plantas muy jóvenes pueden provocar la muerte, en cambio, cuando se ubican en plantas de estado de desarrollo más avanzados de crecimiento, provocan, principalmente, una disminución en el peso del grano (Apablaza y Robinson, 1967).

Estudios realizados sobre el ataque de *M. dirhodum* y otros áfidos a diferentes variedades de trigo, permiten suponer que éstas afectan diferentemente el desarrollo de las poblaciones de áfidos (Nault y Styer, 1972; Wensler, 1962). Las variedades de cereales difieren en su susceptibilidad a 5 especies de áfidos de los cereales.

Observaciones realizadas en cuanto a una distribución vertical de los áfidos en la planta de trigo (Smith, 1966), sugieren que *M. dirhodum* prefiere las hojas de más edad en estado no senescentes (Latteur, 1971). Por ello se supone que, el daño provocado por especies de áfidos como *M. dirhodum* podría ser inferior a otras especies que prefieren tejidos más jóvenes y en plena actividad fisiológica (Watt, 1979).

La dinámica poblacional de las diferentes especies de áfidos de los cereales varía fuertemente en función del clima, de la planta huésped y de las condiciones del cultivo. Heathcote (1970) constató que, las capturas de áfidos de los cereales durante 9 años en 2 localidades del este de Inglaterra variaban no sólo de año sino también en cada estación. Dean (1974), constató que la longevidad y fecundidad de *S. avenae*, *M. dirhodum* y *R. padi*, mantenidos sobre cebada, dependían de la temperatura. La longevidad de *S. avenae*, varía inversamente con la temperatura, desde 25 a 100 días, ~~Esto~~ se debe a los cambios en la longitud de los períodos pre y post reproductivos. *M. dirhodum* sobrevive menos que *S. avenae* pero más que *R. padi* en condiciones invernales.

Dean (1974), observó que, *M. dirhodum* en cámaras de cultivo sobre 20° aumentaba la velocidad de desarrollo, *R. padi* lo hacía a partir de los 25°, pero sobre los 30° las ninfas empezaban a morir. Para *R. maidis* las mejores temperaturas para su desarrollo oscilan entre 25 y 29°C (Etchegaray, 1975).

### 1.3. Medidas que tienden a disminuir el daño de una plaga.

i) Uso de pesticidas. Es uno de los métodos más usados para controlar pestes, porque tiene una acción rápida y efectiva sobre la plaga. Un tipo de tratamiento

consiste en recubrir la semilla con un insecticida y cuando la planta crece, el pesticida es trasladado a las hojas provocando toxicidad en los áfidos. El efecto dura entre 30 y 40 días (Campos y Charlín, 1976). Otras formas consisten en aplicar el pesticida directamente al follaje y al suelo en forma de gránulos, para que la planta lo absorba y quede protegida. Algunos problemas del uso de pesticidas es que ellos son tóxicos a otros organismos, deben ser utilizados en grandes dosis, tienen un efecto residual y su uso continuo provoca una selección de organismos resistentes.

ii) El control biológico. Consiste en utilizar los enemigos naturales de las plagas, con el propósito de disminuir su potencial reproductor. Esto requiere tener grandes cantidades de ellos y liberarlos en el momento oportuno, lo que involucra una infraestructura que es de alto costo.

En Chile se han descrito varios depredadores de áfidos, por ejemplo del orden Coleoptera, familia Coccinellidae, las especies: *Eriopsis connexa*, *Adalia bipunctata*, *Coccineta eryngii*. También se han descrito del orden Diptera, familia Syrphidae, las especies: *Allograpta pulchra*, *Allograpta hortensis*, *Surphus similis*; de la familia Cecidomyiidae las especies *Aphidoletes cucumeris*, *Aphidoletes aphidimiza*.

Se ha estimado que los depredadores controlan entre un 15 y 30% de los áfidos de las sementeras de trigo (Chile, INIA 1971). Carrillo y Mellado (1975) señalan que el hongo *Entomophthora aphidis* puede controlar sobre un 90% a la población de áfidos.

iii) Control cultural. Consiste en variar la época de siembra con el objeto de escapar del ataque de una plaga cuando el cultivo es muy susceptible. Sin embargo, un adelanto o atraso en la siembra de trigo puede disminuir los rendimientos debido a factores, tales como, disminución de la humedad aprovechable, aumento de temperatura y cambios del fotoperíodo.

iv) Uso de variedades resistentes. Es una de las medidas más interesantes porque la planta se encuentra protegida contra la acción de patógenos por uno o varios factores propios durante toda o parte de su vida. Se trata, por lo general, de barreras físicas que impiden la penetración del patógeno, o bien, barreras bioquímicas que son tóxicas o repelentes a él.

#### 1.4. Mecanismos de defensa de las plantas.

i) Defensa estructural. Las plantas poseen estructuras definidas que dificultan o impiden la penetración, proliferación o alimentación del patógeno, tales



como, la calidad y cantidad de cera y cutícula que cubren a las células epidérmicas (Martín, 1964) la estructura de su pared celular, el tamaño, ubicación y forma de los estomas y lenticelas.

Otro tipo de defensa estructural es aquella que se forma en respuesta a la infección. Estas defensas involucran cambios en los tejidos, paredes celulares y citoplasma (Royle, 1976). La defensa histológica consiste en formar zonas suberificadas o lignificadas que impiden el avance del patógeno (Samuel, 1927); también se pueden formar capas de absición, tilosas, gomas, etc. (Struckmeyer *et al.*, 1954). La pared puede actuar como mecanismo de defensa, engrosándose en las células epidérmicas y subepidérmicas, y también formando una vaina engrosada alrededor de las hifas de algunos hongos (Agrios, 1978).

La reacción hipersensitiva constituye un mecanismo de defensa eficaz contra diversos patógenos. En esta reacción la célula vegetal responde a la infección necrotisándose en su totalidad y liberando sustancias tóxicas al patógeno. De esta manera se detiene el avance del patógeno, pues se inhibe su desarrollo y se le priva de alimento (Agrios, 1978).

Las principales evidencias sobre la participación de estructuras de las plantas en resistencia a depredadores son simples correlaciones entre la presencia de estas estructuras y la resistencia a patógenos.

ii) Defensa bioquímica. Este mecanismo de defensa puede consistir en la presencia o ausencia de una sustancia o grupo de sustancias en la planta huésped que interfiere con el crecimiento y multiplicación del patógeno (Jansen *et al.*, 1977). Tales condiciones pueden existir antes que el patógeno ataque o aparecer en el momento de la infección (Harborne, 1976, 1977).

#### Compuestos pre-infeccionales.

a) Prohibitinas. En las plantas se encuentran metabolitos tales como, terpenos, quinonas y fenoles, que reducen o inhiben totalmente el desarrollo de los patógenos. Comúnmente estos tejidos son resistentes a alguna enfermedad (Farkas y Kiraly, 1962; Geissman y Cront, 1969; Knott y Kumar, 1972). Por ejemplo, los catáfilos más externos de ciertas variedades de cebolla contienen grandes cantidades de ácido protocaté- quico y catecol (Fig. 1). Estos son tóxicos a esporas de *Colletotricum circinans*. Por ello, estas variedades de cebolla son resistentes al hongo (Angell *et al.*, 1930; Link y Walker, 1933). En algunas variedades de *Hordeum vulgare* se han encontrado compuestos fenólicos, tales como las hordatinas A y B. (Fig. 1), que tendrían una función defensiva contra el hongo *Helminthosporium sativum* (Stoessl, 1967; Smith y Best, 1978).

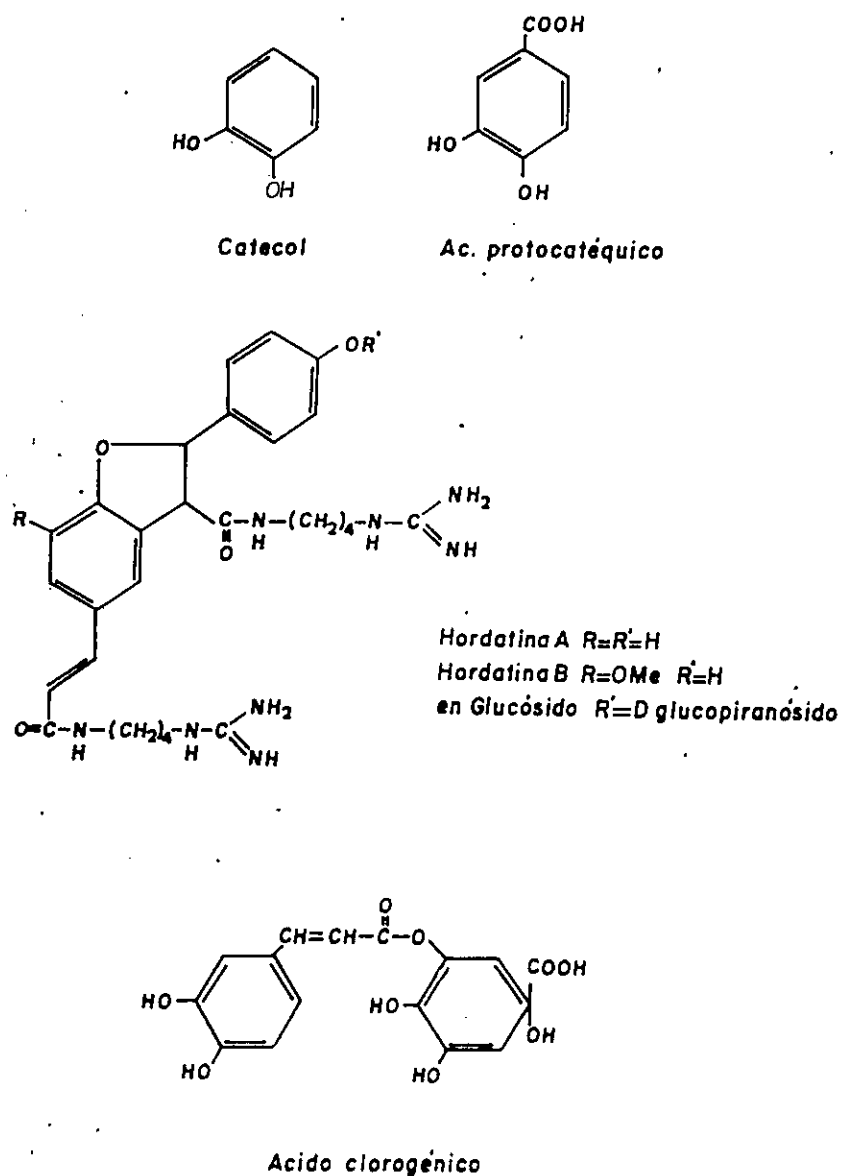


Fig. 1 Metabolitos secundarios pre infeccionales que se encuentran en plantas y que reducen o inhiben el desarrollo de patógenos.

b) Inhibitinas. Son metabolitos tóxicos que aumentan su concentración después de la infección. Por ejemplo, cuando ciertas variedades de papas son infestadas con esporas del hongo *Phytophthora infestans*, aumenta la concentración del ácido clorogénico (Fig. 1) en los tejidos del vegetal que, de esta manera se hacen resistentes al hongo (Agrios, 1978).

Compuestos post-infeccionales.

a) Fitoalexinas. Ingham (1972) define como fitoalexinas a aquellos compuestos antimicrobianos, ausentes en tejidos sanos, que son sintetizados a partir de precursores lejanos después de la infección.

Se ha aislado de tejidos vegetales un gran número de compuestos considerados como fitoalexinas (Malmerg y Theander, 1980). Algunos de estos compuestos están representados en la Fig. 2. La pisatina es un derivado pterocarpánico producido por *Pisum sativum* (L.) cuando es infectada por el hongo *Monillinia fructicola*. La faseolina se encuentra en *Phaseolus vulgaris* (L.), luego de ser infestada por *Rhizoctonia solani* o *Fusarium solani*.

b) Glucósidos que por hidrólisis liberan compuestos tóxicos. En algunas especies vegetales se encuentran altas concentraciones de glucósidos (Knott y Kumar, 1972), los que por la acción enzimática liberan un

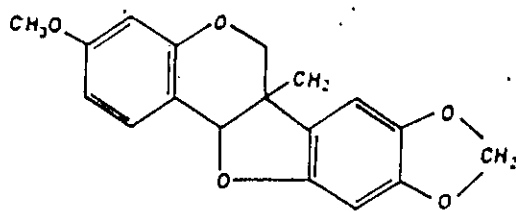
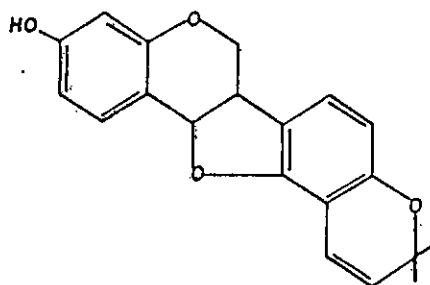
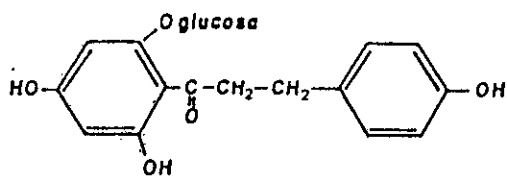
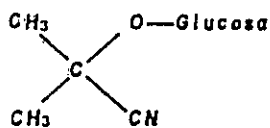
*Pisatina**Faeoflina**Floridzina**Glucósido cianogénico*

Fig. 2 Metabolitos secundarios post infeccionales producidos por plantas cuando son infestadas por algún patógeno.

compuesto tóxico cuando el patógeno destruye el tejido vegetal. Por ejemplo, la dhurrina (Fig. 2) (Gorz *et al.*, 1979), presente en las vacuolas de *Sorghum bicolor* (Linn), actúa como defensa del sorgo contra el hongo patógeno *Stemphylium loti* (Saunders y Conn, 1978) e insectos depredadores. El mecanismo defensivo descrito es el siguiente: el insecto daña el tejido vegetal rompiendo la compartimentalización tisular y celular. De esta manera entran en contacto el glucósido cianogénico (dhurrina) y una  $\beta$ -glucosidasa. La hidrólisis enzimática del glucósido libera una cianhidrina que posteriormente genera un compuesto tóxico, como es el HCN.

En ciertas variedades de manzana resistentes a hongos, se encuentra un compuesto fenólico llamado flóridzina, el cual se hidroliza a floretina, que luego se oxida hasta llegar a una quinona de alta toxicidad (Agrios, 1978).

#### 1.5. Ácidos hidroxámicos en Gramíneas.

i) Descubrimiento de los ácidos hidroxámicos. Koyama *et al.* (1955) aislaron la 6-metoxi-benzoxazolinona (MBOA, Fig. 3) en raíces de varias especies del género *Coix*, llamándolo coixol. En el mismo año, Virtanen y Hietala, encontraron en plántulas de centeno (*Secale cereale* L.) un factor antifúngico, identificándolo como 2(3)-benzoxazolinona (BOA). Posteriormente en 1956

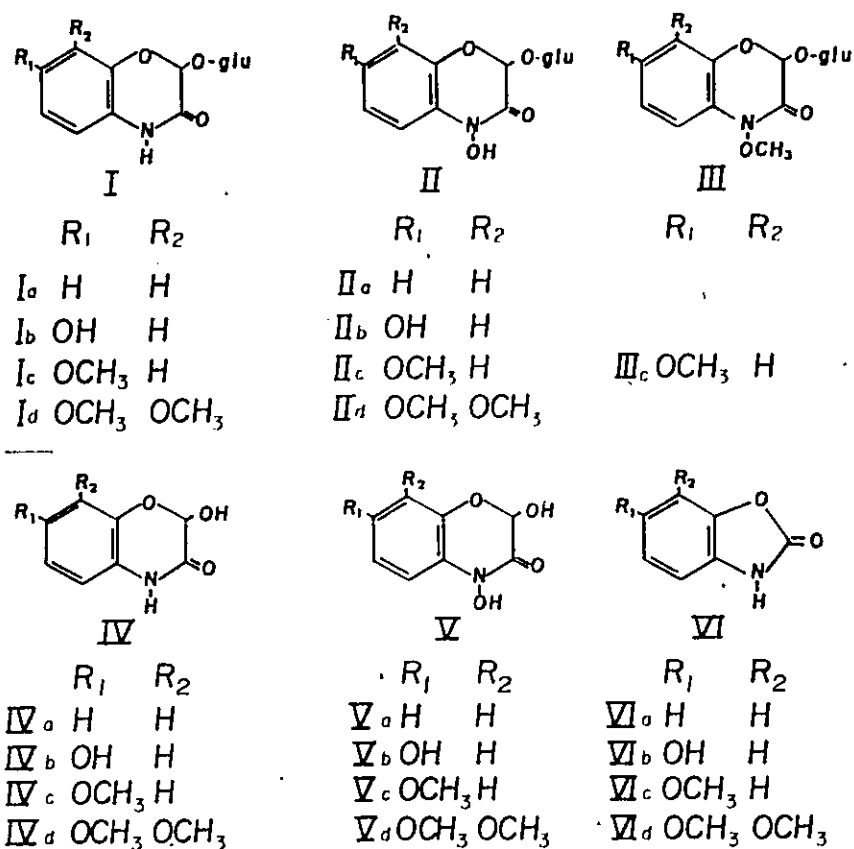


Fig. 3 Estructuras de Benzoxazinonas y Benzoxazolinonas presentes en extractos de gramíneas. DIBOA Va, DIMBOA Vc, DIM<sub>2</sub> Vd, DIBOA-Glc IIa, DIMBOA-Glc IIc, BOA VIa, MBOA VIc. DIM<sub>2</sub>BOA-Glc IIId.

encontraron otro factor semejante al anterior en plántulas de maíz (*Zea mays* L.) y fué identificado como 6-metoxi-2(3)-benzoxazolinona (MBOA, Fig. 3). Wahlroos y Virtanen (1959) informaron que los precursores de estos factores de resistencia correspondían a glucósidos de ácidos hidroxámicos cíclicos. Virtanen y Hietala (1960), propusieron que estos glucósidos se hidrolizaban enzimáticamente cuando el tejido vegetal del maíz o del trigo eran dañados, originando las agluconas, las cuáles se descomponían posteriormente a los carbamatos correspondientes.

La estructura del precursor de MBOA fué identificada como el ácido hidroxámico 2-(2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona)- $\beta$ -D-glucopiranósido (DIMBOA-Glc). En el centeno se identificó el precursor de DIBOA como la 2-(2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona)-glucopiranósido (DIBOA-Glc) (Hietala y Virtanen, 1960; Virtanen y Hietala, 1959). Estas estructuras se muestran en la Fig. 3.

Tipton *et al.* (1967) cromatografiaron en capa fina extractos etéreos de plántulas de maíz revelando la presencia de pequeñas cantidades de material que daba positivo el test de  $\text{FeCl}_3$ , con un  $R_f$  igual al obtenido por Virtanen *et al.* (1955) cuando utilizó centeno.

El análisis de los espectros UV mostró que uno de los compuestos correspondía al BOA. El otro compuesto



correspondía a 2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-(4H)-ona (DIMBOA), la cual se encontraba acompañada de una lactama. Posteriormente Hofman y Hofmanova (1969) propusieron la estructura de la lactama: 2-(2,7)-dihidroxi-1,4-(2H)-benzoxazin-3(4H)-ona  $\beta$ -D glucopiranosido. Esta lactama se encuentra en plántulas de maíz en cantidades menores en un orden de magnitud<sup>1</sup> que el  $\beta$ -D glucósido del DIMBOA. La lactama fué aislada por filtración en gel usando Sephadex G-10 y recristalizada posteriormente con alcohol etílico.

En 1971, Hofman y Masojidkova, sugirieron que el DIMBOA, y presumiblemente otras agluconas, no existirían en el maíz como tales, ya que cuando se inhibe la acción de las glicosidasas en el proceso de extracción, se obtiene solamente el glucopiranosido del DIMBOA.

En 1974, Hofman y Masojidkova, informaron la presencia de otro glucósido que se encuentra en el maíz identificándolo como el 2(2-hidroxi-7,8-dimetoxi-1,4-benzoxazin-3-ona)- $\beta$ -D-glucósido.

ii) Aspectos químicos de los ácidos hidroxámicos.

Algunos métodos utilizados para la determinación de ácidos hidroxámicos. Para cuantificar los ácidos hidroxámicos cíclicos como DIMBOA o su glucósido se han utilizado varios métodos que incluyen la degradación de los ácidos hidroxámicos a benzoxazolinonas en solución acuosa.

a) Klun y Brindley (1966) utilizaron el método de dilución isotópica que consistía en marcar BOA con  $^{14}\text{C}$ , el cual se aislaba posteriormente del tejido vegetal, luego se realizaba una cromatografía en placa y por último, se medía la benzoxazolinona obtenida cuantificando la radioactividad obtenida y a través de espectroscopía U.V.

b) Scism *et al.* (1974) utilizaron un método que determinaba las benzoxazolinonas por espectroscopía en infrarojo en extractos de maíz. La cuantificación se realizaba midiendo la absorbancia de las benzoxazolinonas a 5,5  $\mu$ .

c) Bowman *et al.* (1968) determinaron la concentración de ácidos hidroxámicos a través de la espectro-foto-fluorometría, consistía en extraer los compuestos con éter a partir de un tejido vegetal homogenizado y pasar el residuo a través de una columna de alúmina. El fluido fué medido espectro-fluorométricamente y los valores fueron comparados con una curva estandar. Todos estos métodos estaban basados en la degradación de los hidroxamatos a benzoxazolinonas. Sin embargo, Woodward *et al.* (1978) informaron que la descomposición de 2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona, en solución acuosa era no cuantitativa y que ella dependía, tanto del pH como de la temperatura. Por ello es conveniente utilizar métodos que midan directamente las

agluconas o los glucósidos.

d) Long *et al.* (1974) informaron sobre un método rápido para estimar la concentración de hidroxamatos cíclicos (DIMBOA) en extractos de maíz, éste se basaba en la absorción colorimétrica del complejo formado por el ácido hidroxámico y el  $FeCl_3$ .

e) Woodward *et al.* (1979a y 1979b) identificaron y cuantificaron 1,4-benzoxazin-3-onas en extractos de maíz por cromatografía gas líquida y espectrometría de masa. Ellos separaron tres ácidos hidroxámicos cíclicos: DIBOA (Va), DIMBOA (Vc), DIM<sub>2</sub>BOA (Vd) y sus respectivas lactamas; HBOA (IVa), 8OH HBOA (IVb) y HMBOA (Fig. 3), compuestos como trimetil siliados (TMS) de extractos de maíz (IVc).

Estabilidad de los ácidos hidroxámicos cíclicos de Gramíneas. Los ácidos hidroxámicos son inestables en soluciones acuosas. Brendenberg *et al.* (1962), informaron que la descomposición del DIMBOA exhibe una cinética de pseudo primer orden, con respecto al sustrato. Además, demostraron que esta descomposición dependía del pH. En las descomposiciones del DIBOA y del DIMBOA informaron de la formación cuantitativa de los productos, las benzoxazolinonas BOA y MBOA, respectivamente (Wahlroos y Virtanen, 1959; Honkanen y Virtanen, 1961).

Woodward *et al.* (1978) estudiaron la descomposición del DIMBOA en soluciones tampones acuosas entre pH 5 y pH.7,5 y a temperaturas entre 20° y 80°, informando que los rendimientos de MBOA a partir de DIMBOA dependían de la temperatura, del pH y de la presencia de otros solutos.

iii) Aspectos biológicos de los ácidos hidroxámicos.  
Rol de destoxificación de herbicidas derivados de la S-triazina. Se ha observado que distintos híbridos de maíz responden diferencialmente a la simazina y a la atrazina, compuestos de acción herbicida, lo cual sería debido a una hidrólisis no enzimática de estos compuestos provocada por la presencia de altas concentraciones de DIMBOA o de DIMBOA-Glc. El producto obtenido, hidroxí-simazina, no tiene acción fitotóxica. Basado en esta información se ha sugerido que esta resistencia del maíz a la simazina está relacionada, en parte, con este mecanismo de destoxificación en donde DIMBOA o su DIMBOA-Glc actuarían como catalizadores (Hamilton, 1964; Tipton *et al.*, 1971).

Rol en la nutrición mineral de la planta. Los ácidos hidroxámicos producidos por microorganismos tienen un rol en el metabolismo del Fe (Neilands, 1967, 1981). Se ha pensado que el DIMBOA-Glc existente en plantas de maíz también podría afectar al metabolismo del Fe

en la planta. Tipton y Buell (1970), determinaron las constantes de estabilidad para los complejos entre  $\text{Fe}^{+3}$  y DIMBOA-Glc y DIMBOA. Aunque los valores que se obtuvieron fueron inferiores a los ácidos trihidroxámicos de microorganismos, fueron a su vez, más altos que aquellos obtenidos para el complejo entre  $\text{Fe}^{+3}$  y el ácido cítrico, el cual ha sido informado como el más importante en la absorción y transporte de Fe en las plantas superiores. Dabed *et al.* (1983) determinaron las constantes de formación de complejos entre cationes bivalentes, tales como, Cu(5,4), Ni(4,5), Zn(4,2), Mn(3,4) y Ca(3,0). El análisis de las constantes de formación de complejos entre los cationes estudiados y DIMBOA o ácido cítrico, a las concentraciones y pH de interés biológico, sugieren que el DIMBOA y otros ácidos hidroxámicos en gramíneas podrían participar en la nutrición mineral como agentes quelantes; sin embargo, es necesario determinar la concentración de los ácidos hidroxámicos y de los ácidos orgánicos a nivel de compartimiento tisular y celular.

Rol en la resistencia de plantas a infecciones. Virtanen y Hietala (1955) identificaron las benzoxazolinonas de las hojas de centeno como un factor antifúngico implicado en la resistencia de las plantas a la

infección por *Fusarium nivale*. También se ha demostrado que las benzoxazolinonas inhiben el crecimiento de *Xanthomas stewartii* (Whitney y Mortimore, 1961); *Penicillium chrysogenun* (Beck y Smissman, 1961; Beck y Stauffer, 1957); *Diplodia zae* (Loomis et al., 1957); *Gibberella zae*, *Rhizopus stolonifera* (Beck y Stauffer, 1957); *Sclerotinia trifoliorum* (Virtanen y Hietala, 1955). Además, se ha observado que inhiben el crecimiento de insectos, tales como, *Blatella germanica*, *Prodenia cridania* y de bacterias como *Staphylococcus aureus* (Virtanen et al., 1957).

Beck y Smissman (1957, 1961), realizaron un estudio de las propiedades inhibitorias de benzoxazolinonas. Para ello utilizaron 50 análogos del benzoxazol y fenoles afines, usando el taladrador del maíz, *Ostrinia nubilalis* (Hbn) y *Penicillium chrysogenun* como organismos de muestra. Encontraron que, la inhibición del crecimiento fúngico dependía de 2 características estructurales de la molécula: 1° la presencia de un grupo liposoluble en el núcleo bencénico y 2° la presencia de un grupo nitro o amino adyacente a un hidroxilo fenólico. Se comprobó que, la actividad antifúngica no mejoraba con la presencia de un anillo oxazol. La actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *Ostrinia nubilalis* fué estrechamente asociada con la presencia de un grupo oxazol o tiazol.

Los compuestos fenólicos tuvieron poca actividad. La benzoxazolinona y la 6-metoxibenzoxazolinona encontradas en extractos de varias especies de gramíneas juegan un importante rol en la resistencia de plantas a insectos (Klun *et al.*, 1967), hongos (Long y Dunn, 1975; Long *et al.*, 1978; Elnaghy y Linko, 1962; Elnaghy y Shaw, 1966) y bacterias (Corcuera *et al.*, 1978). La actividad biológica de estos compuestos ha sido medida como inhibición del crecimiento de insectos o patógenos vegetales.

Beck y Stauffer (1957) encontraron que además del MBOA existían otros 2 posibles factores de resistencia en el maíz. Uno de ellos, al igual que el MBOA, era soluble en éter y el otro soluble en agua. MBOA fué el que se encontró en mayor concentración, y sería el principal responsable de la resistencia al crecimiento de larvas *O. nubilalis*. Estos 3 factores fueron separados cromatográficamente.

Klun y Brindley (1966) analizaron 11 híbridos de maíz, cuantificando el MBOA mediante dilución isotópica.

En un bio-ensayo este compuesto mostró ser un inhibidor de la pupación de *O. nubilalis*, cuando estaba en una concentración de 0,5 mg por gramo de dieta. Klun *et al.* (1967) probaron que el DIMBOA en dietas artificiales no sólo provocaba una inhibición del desarrollo de *O. nubilalis*, sino también un 25% de mortalidad.

Klun y Robinson (1969), encontraron que la concentración de DIMBOA y de DIBOA en la raíz de maíz era mayor que en el tallo y que en las hojas. También la concentración difería en cada híbrido. Debido a la alta concentración encontrada en la planta embriónica sugirieron que estos dos compuestos podrían tener un rol fisiológico en el crecimiento del maíz. La concentración de DIBOA en todos los híbridos analizados fué menos de un décimo que la concentración de DIMBOA.

Los áfidos constituyen plagas en los cereales. Uno de los métodos para disminuir el daño consiste en cultivar variedades resistentes. Por los antecedentes expuestos los Hx presentes en algunas especies de cereales, podrían ser un factor de resistencia a áfidos en las plantas. Sin embargo, se desconocen sus propiedades alelopáticas contra estos insectos.

1.6. Los objetivos de este trabajo son:

1. Estudiar el contenido, concentración y distribución de ácidos hidroxámicos en los diferentes órganos de las plantas de trigo y su variación con la edad.
2. Determinar la relación entre susceptibilidad de algunos cereales a la infestación por *Metopolophium dirhodum* y *Schizaphis graminum* y la concentración de ácidos hidroxámicos en ellas.



3. Estudiar los efectos de DIMBOA y DIMBOA-Glc de áfidos alimentados con dietas artificiales.

## 2. MATERIALS Y METODOS GENERALES

2.1. Germinación de semillas. Las semillas de cebada (*Hordeum distichum* L. cv Union, Cruzat), centeno (*Secale cereale* L. cv Emerald, Schlager) y maíz (*Zea mays* L. cv LH Rinconada) fueron obtenidas del Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Chile. Las semillas de *Triticum aestivum* L. cv Huenufen, Candalfen, Budifen, Loncofen, Antufen, Mexifen, Naofen, Sonka, Likay, Melifen, Capelle, Aurifen, Manelle, Centrifen, Cajeme; *T. durum* L. cv Quilafen, SNA-1, SNA-2, SNA-3, SNA-4, *Triticale* cv 951-978 y *Z. mays* cv T125-222, fueron donadas por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Sociedad Nacional de Agricultura, Santiago. Las semillas fueron colocadas en maceteros con tierra, a temperaturas entre 25 - 29° C y se regaron con agua potable.

2.2. Preparación de los extractos y cuantificación de los ácidos hidroxámicos.

El tejido vegetal fué homogenizado en agua, y filtrado a través de gasa. El extracto obtenido fué ajustado a pH 3 con HCl. 1N y se centrifugó a 8.500 g por 5

minutos. El residuo sólido fué descartado y el sobrenadante fué fraccionado con éter dietílico (extracto: éter, 1:2 v/v). Se repitió el fraccionamiento 3 veces con la fase acuosa. Luego se evaporó el éter a sequedad, obteniendo un residuo que fué usado para cuantificar los ácidos hidroxámicos.

Cuantificación de ácidos hidroxámicos. Los ácidos hidroxámicos forman un complejo azul con el reactivo  $\text{FeCl}_3$  (50 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 500 ml de etanol y 5 ml de HCl 1.5M). La concentración en los tejidos fué determinada por comparación de la absorbancia de los extractos con una curva hecha con DIMBOA ( $\lambda$  max = 590 nm,  $\epsilon_{590} = 1315$ ). Los valores de ácidos hidroxámicos representan equivalentes de DIMBOA.

Se ha probado que, las cantidades de ácidos hidroxámicos en diferentes variedades de maíz, determinadas por el método del reactivo de cloruro férrico no son significativamente diferentes a las cantidades determinadas por cromatografía de Gas-líquido (Woodward *et al.*, 1979b).

- 2.3. Cultivo de áfidos. Especies de *M. dirhodum* (Walker), *S. graminum* (Rondani) y *R. maidis* (Fitchii) fueron colectadas en los campos de cultivo cerca de Santiago. La determinación de las especies de áfidos (Homóptera: Aphidae) que se encuentran en cereales en Chile, se

realizó de acuerdo a las claves de Carrillo y Zúñiga (1974), Campos y Charlin (1976) y Guerrero y Lamborot (1979).

Los áfidos fueron reproducidos en plantas de cebada, dentro de una caja de paredes de tul, bajo luz permanente en el laboratorio. Cada 5 ó 6 días se colocaron maceteros con plantas nuevas y se retiraron los maceteros con plantas marchitas.

- 2.4. Ensayos de infestación. Cereales de diferentes especies y edades, cultivados en maceteros con tierra y en condiciones de invernadero con temperaturas que oscilan entre 23 y 27°, fueron infestadas con áfidos de una especie determinada. Las plantas infestadas se mantuvieron dentro de cajas de paredes de tul. Al cabo de un período de tiempo se midió el crecimiento poblacional de los áfidos.
- 2.5. Obtención de DIMBOA. Se sembró maíz en tierra de jardín con temperaturas entre 25 y 28° y regadas con H<sub>2</sub>O potable, bajo luz artificial permanente. A los 7 días de edad se cosecharon las hojas de plántulas y se molieron, agregando agua destilada. El macerado fué filtrado a través de gasa y enfriado. El extracto se llevó a pH 3, con HCl 1N. Luego fué extraído con éter dietílico y se repitió el fraccionamiento 2 veces más con la fase acuosa. La fase acuosa

finalmente se descartó. Los extractos etéreos fueron evaporados a sequedad.

El residuo sólido fué lavado 2 ó 3 veces con pequeñas cantidades de una mezcla cloroformo-metanol (95:5, v/v), y lavado rápidamente con un pequeño volumen de acetona. El residuo fué disuelto en acetona, se agregó hexano hasta que comenzó la precipitación de DIMBOA, el cual fué separado por centrifugación. Se tomaron espectros UV del DIMBOA en etanol absoluto (Cary 17;  $\lambda$  máx = 262 nm); ( $\epsilon$  = 10.000), NMR en acetona deuterada (Varian T60;  $\tau$  6,2 ppm (3H, singlete),  $\tau$  4,28 ppm (1H, singlete) y de masas (ión molecular m/e 211)

2.6. Obtención del 2- $\beta$ -O-D-glucósido de DIMBOA. DIMBOA-Glc se obtuvo de extractos acuosos de hojas de plántulas de *Z. mays*, pasando los extractos a través de una columna de SP-Sephadex-Fe (Queirolo *et al.*, 1981).

2.7. Ensayos en dietas. Los áfidos experimentales fueron ubicados en una caja de vidrio (Fig. 4) semejante a las cajas de cultivo descritas por Mittler y Dadd (1962, 1963, 1965) y la dieta fué ubicada entre 2 membranas de Parafilm M que cubren la abertura superior de la caja de cultivo. La abertura inferior se cerró con gasa. Las cajas se ubicaron sobre una placa perforada a 28° y luz permanente. La dieta (Tabla I) se

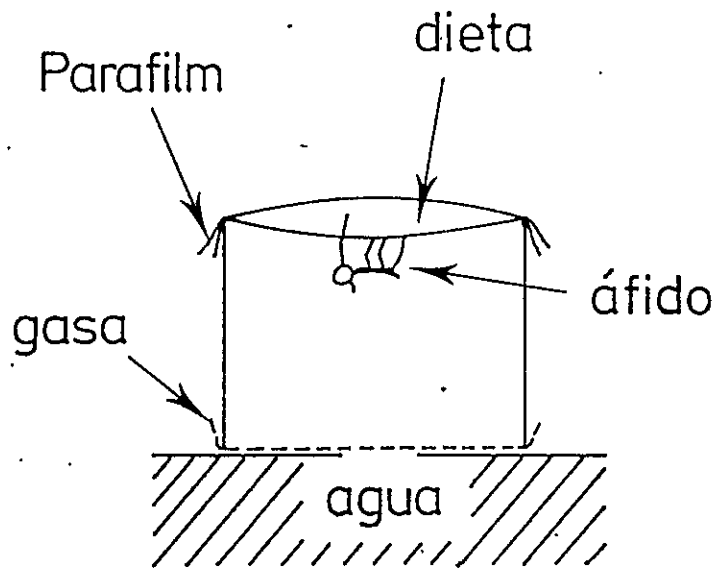


Fig. 4 Sistema utilizado para el cultivo artificial de áfidos de los cereales.

TABLA I. Composición de la dieta artificial para áfidos de los cereales.

Compuesto agregado	Cantidad <sup>a</sup>
Arginina	100 mg
Alanina	400 mg
Ac. Aspártico	50 mg
Cisteína	50 mg
Histidina	100 mg
Metionina	100 mg
Serina	100 mg
Treonina	200 mg
Leucina	200 mg
Cloruro de Colina	250 mg
i-Inositol	10 mg
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	200 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200 mg
Sacarosa	30 g
HCL 1M. NaOH 1N para ajustar a pH 5.5	

<sup>a</sup>. Estas son las cantidades agregadas a 100 ml de agua destilada.

preparó basándose en las utilizadas por Dadd y Krieger (1967) y Auclair (1965). El volumen utilizado en cada caja osciló entre 0,4 y 8,8 ml. Este se renovó cada 48 horas junto con las membranas de Parafilm M.

2.8 Registro eléctrico de la conducta de un áfido con respecto a la ingestión de una dieta. El procedimiento y las especificaciones usadas en el registro eléctrico están previamente descritos por Campbell *et al.*, (1982). Las dietas con diferentes concentraciones de DIMBOA fueron preparadas justo antes de ser utilizadas en los ensayos. La dieta (300  $\mu$ l) fué ubicada en una tapa plástica sobre la cual se ubicó una membrana de Parafilm. Un hilo de platino fué insertado a través de la capa plástica en la dieta sirviendo como un electródo de llegada de voltaje. Otro electrodo de platino se soldó en la región dorsal del abdomen del áfido cerrando de esta manera el circuito (Fig. 5). Las interpretaciones dadas a las diferentes formas de ondas registradas durante el ensayo se basaron en los estudios hechos por Mc Lean y Kinsey (1964), Mc Lean y Weigt (1968) y Mc Lean (1970) sobre las ondas de formas semejantes obtenidas en ensayos con el áfido del guisante, *Acyrthosiphon pisum* (Harris) cuando era alimentado con dietas artificiales. El



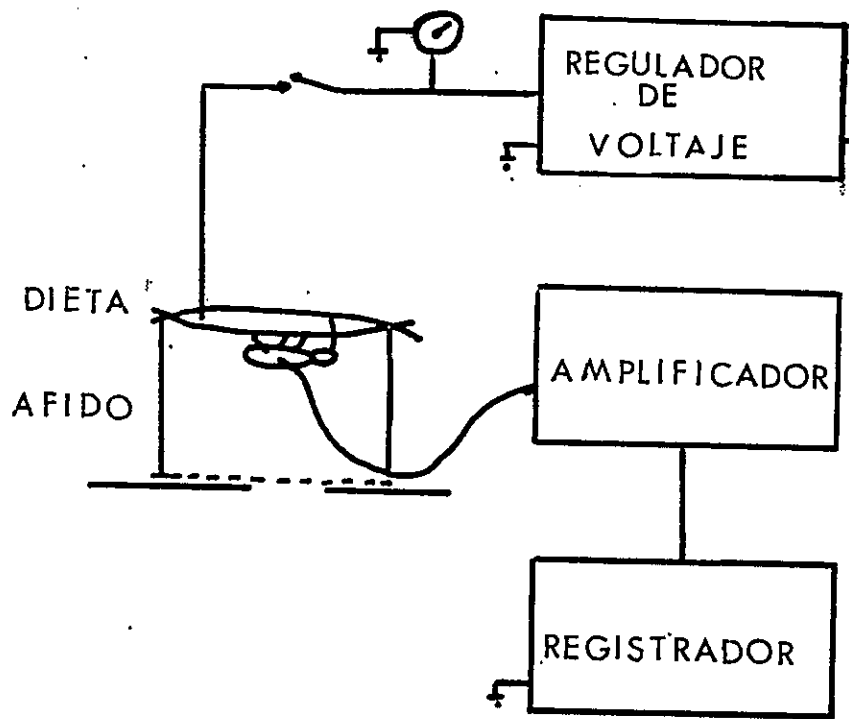


Fig. 5 Diagrama del mecanismo electrónico utilizado para el estudio de la ingestión de dieta por los áfidos.

análisis se basó en la duración de las ondas I (ingestión) ondas S (salivación), y ayuno (línea basal).

Los experimentos presentados en las figuras 15 y 16 fueron ejecutados por el Dr. Bruce C. Campbell a petición de nuestro laboratorio.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Concentración de ácidos hidroxámicos en cereales.

Con el propósito de examinar la presencia de los ácidos hidroxámicos en cereales se pusieron a germinar semillas de las diferentes especies y cultivares de gramíneas en bandejas con vermiculita esterilizada, humedecida con H<sub>2</sub>O destilada en una estufa a 28° ± 1 en oscuridad. Se regó diariamente con agua destilada. Al cabo de 8 días se cuantificaron los ácidos hidroxámicos en los extractos foliares de acuerdo a la técnica descrita en los materiales y métodos. Los resultados se exhiben en la Tabla 2. Se encontró gran variabilidad en la concentración de ácidos hidroxámicos en las diferentes especies de cereales desde niveles no detectables como en avena y cebada, hasta sobre 1.300 mg/kg pf. como en un cultivar de trigo y otro de centeno. Además, la concentración varió en los cultivares de una misma especie.

#### 3.2. Concentración y distribución de ácidos hidroxámicos en diferentes órganos de *Triticum durum* L. var. SNA-3.

Se sembró *T. durum* cv SNA-3 en bandejas con vermiculita, se dejaron en condiciones de invernadero a 28° ± 3

TABLA 2. Concentración de ácidos hidroxámicos en Gramíneas

Espece	Cultivar	Acidos hidroxámicos mg/kg pf. $\pm$ EE	<sup>a</sup>
<i>Triticum durum</i>	SNA-3	1.319 $\pm$ 15	
	SNA-4	954 $\pm$ 19	
	Quilafén	902 $\pm$ 22	
	SNA-2	450 $\pm$ 6	
	SNA1	449 $\pm$ 6	
<i>Triticum aestivum</i>	Candealfén	680 $\pm$ 6	
	Cajeme	519 $\pm$ 11	
	Naofén	517 $\pm$ 2	
	Likay	355 $\pm$ 6	
	Budifén	330 $\pm$ 9	
	Sonka	325 $\pm$ 5	
	Loncofén	316 $\pm$ 6	
	Antufén	299 $\pm$ 8	
	Mexifén	273 $\pm$ 16	
	Capelle	254 $\pm$ 2	
	Aurifén	240 $\pm$ 11	
	Manelle	232 $\pm$ 6	
	Centrifén	226 $\pm$ 2	
	Melifén	219 $\pm$ 5	
Huenufén	212 $\pm$ 37		
<i>Secale cereale</i>	Schlager	1.375 $\pm$ 39	
	Emerald	896 $\pm$ 32	
<i>Zea mays</i>	LH Rinconada	896 $\pm$ 32	
<i>Avena sativa</i>	Peragold	N.D.	
<i>Hordeum distichum</i>	Union	N.D.	
	Cruzat	N.D.	

<sup>a</sup> Los valores informados corresponden a promedios de 3 muestras de 3 g cada una  $\pm$  los errores estándares (EE). Las plantas fueron cultivadas en bandejas con vermiculita humedecida con H<sub>2</sub>O destilada y mantenidas en estufas a 28°C en oscuridad. Cada muestra estaba formada por un grupo de plantas de 8 días de edad.

ND = no detectado.

luz permanente y riego diario con agua destilada. A los 5 y 8 días se analizó el contenido de ácidos hidroxámicos en raíces, hojas o coleóptilos de las plántulas (Tabla 3). Los ácidos hidroxámicos fueron detectados en coleóptilos, hojas y raíces, encontrándose la mayor concentración en las hojas y la menor en las raíces. La concentración, tanto en las hojas como en las raíces, disminuyó con la edad de las plantas.

### 3.3. Variación del contenido de ácidos hidroxámicos con la edad de la planta.

Se germinaron frutos de *T. durum* (L) cv SNA-3 en bandejas con vermiculita humedecida con H<sub>2</sub>O destilada, a 28° con luz permanente. La cuantificación de los ácidos hidroxámicos se realizó en extractos de hojas y raíces a diferentes edades de la planta utilizando el método descrito previamente. Estos compuestos no se encontraron en los frutos de *T. durum* SNA-3 (límite de detección es de  $8-10^{-4}$  mmol/kg p.f.), siendo detectados al segundo día de germinación (Fig. 6). Posteriormente, la concentración aumentó bruscamente llegando a un máximo en el cuarto día (5.0 mmol/kg p.f. en las hojas y 4.0 en las raíces) y luego comenzó a disminuir progresivamente. El contenido total de ácidos hidroxámicos de toda la planta de trigo continuó aumentando monotónicamente con la edad después del 4° día. La máxima concentración de ácidos hidroxámicos en las hojas de otros cereales también se obtuvo al 4° día de edad

TABLA 3. Distribución de ácidos hidroxámicos en  
*Triticum durum*.

Edad de la planta (días)	Ácidos hidroxámicos <sup>a</sup> (mmol/kg p.f.)		
	Coleóptilos	Hojas	Raíces
5	4.01 ± 0.20	4.45 ± 8.33	2.73 ± 0.15
8		3.28 ± 0.11	1.87 ± 0.42

Plántulas crecidas en condiciones de invernadero bajo luz permanente a 28° ± 3° y regadas con agua destilada.

<sup>a</sup>Los valores representan promedios de 3 muestras de 3 g de tejido ± el error estándar de 3 muestras.

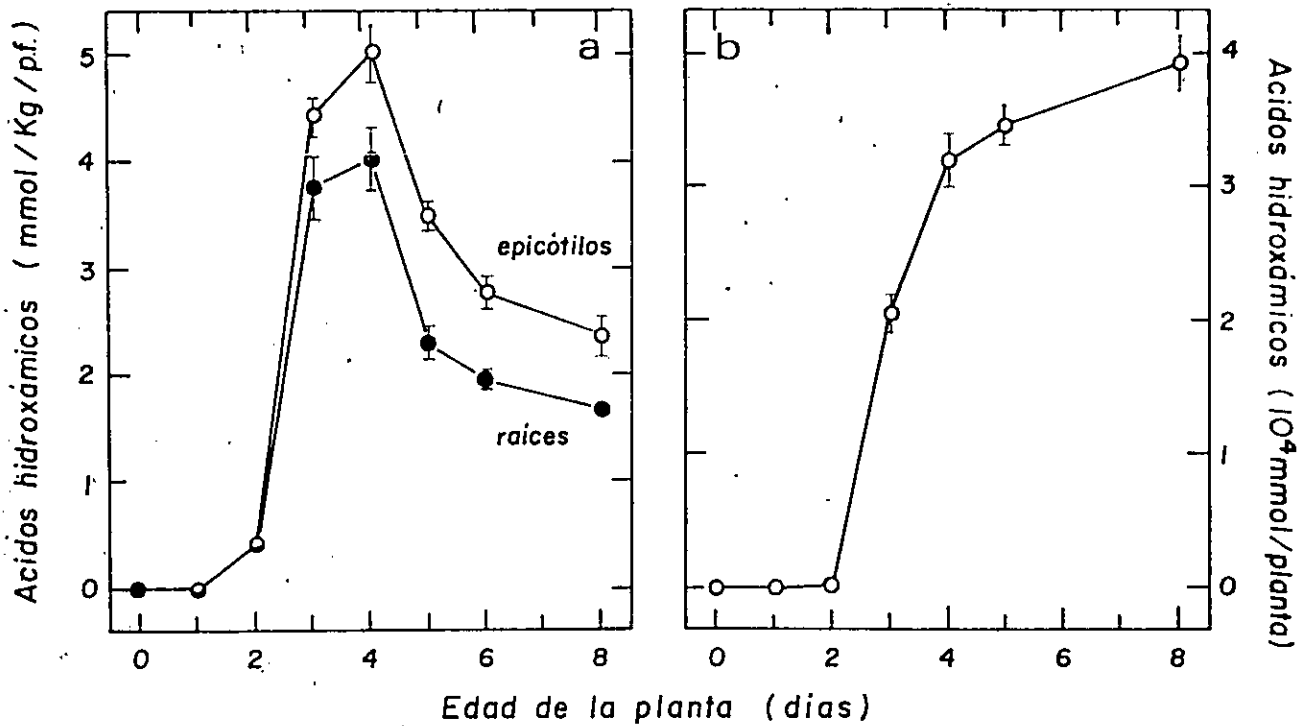


Fig. 6 Variación del contenido de ácidos hidroxámicos con la edad, en plántulas de *Triticum durum* cv SNA-3(a).

(a) Contenido de ácidos hidroxámicos en embriones (edad 0), raíces y epicótilos.

(b) Contenido total de ácidos hidroxámicos por planta.

Las plantas fueron cultivadas en vermiculita a  $28^{\circ} \pm 3$  bajo luz permanente.

La barra vertical de cada punto indica el error estándar del promedio de tres muestras.

(15,2 mmol/kg) p.f. en maíz; 7,4 en centeno; 5,0 en trigo; SNA-3 y 3,2 en trigo Huenufen).

3.4. Concentración de ácidos hidroxámicos en hojas de *Triticum durum* cv SNA-3 de diferentes edades.

Se sembraron frutos de trigo de la variedad SNA-3 en maceteros con tierra de jardín, regados con agua corriente a  $28^{\circ} \pm 3$ .

Cuando las plántulas tuvieron 11 días de edad se cuantificó la concentración de ácidos hidroxámicos en la primera y segunda hoja. Se procedió de la misma forma con otro grupo de plantas que tenían 18 días de edad, examinando separadamente las hojas (Tabla 4). Los resultados indicaron que en cualquier edad de la planta, la hoja de mayor edad (la primera en aparecer) poseía una concentración menor de ácidos hidroxámicos que las más jóvenes (las últimas en aparecer). Además, la concentración en el mismo órgano disminuyó con la edad de la planta.



TABLA 4. Concentración de ácidos hidroxámicos en hojas de *Triticum durum* L. cv SNA-3 a diferentes edades de la planta<sup>a</sup>

Hoja <sup>b</sup>	Ácidos hidroxámicos <sup>c</sup> (mmol/kg p.f.)		
	Plantas de 11 días de edad	Plantas de 18 días de edad	Plantas de 30 días de edad
1°	2.06 ± 0.04	0.63 ± 0.02	0.13 ± 0.01
2°	2.38 ± 0.03	0.85 ± 0.03	0.19 ± 0.01
3°	---	1.62 ± 0.04	0.29 ± 0.02
4°	---	1.57 ± 0.17	0.74 ± 0.02
5°	---	2.09 ± 0.19	0.65 ± 0.08
6°	---	---	0.80 ± 0.01

<sup>a</sup> Las plantas fueron cultivadas en el invernadero bajo luz continua a 28°±3 y regadas con agua destilada.

<sup>b</sup> Las hojas están ordenadas comenzando con la de mayor edad y terminando con la más joven (la última en aparecer)

<sup>c</sup> Los valores representan promedios de 3 muestras de 3 hojas cada una ± los errores estándares de las muestras.

3.5. Contenido de ácidos hidroxámicos y susceptibilidad de diferentes especies de Gramíneas de 7 días de edad a *Metopolophium dirhodum* (Walker).

Se sembraron frutos de *Z. mays* cv T125 L22; *Tricale* cv a51-1978; *T. durum* cv SNA-3; *T. aestivum* cv Huenufen cv Naofen; *H. distichum* cv Fola Union, en maceteros con tierra de jardín y se mantuvieron con riego diario y luz permanente en un invernadero. Cuando las plántulas tuvieron 7 días de edad se seleccionaron aquellas que tenían características semejantes en cuanto a crecimiento y número de hojas y se infestaron con hembras adultas ápteras de *M. dirhodum* (Walk). La cuantificación de ácidos hidroxámicos se realizó en plantas equivalentes de 7 días de edad de características muy semejantes a las infestadas. La cuantificación de áfidos se realizó 5 días después de la infestación.

Se observó (Tabla 5) que la mayor tasa de crecimiento de la población se obtuvo en cebada, una especie de Gramínea en la que no se detectaron ácidos hidroxámicos. Se observó, además que la tasa de crecimiento de los áfidos disminuyó a medida que el contenido de ácidos hidroxámicos aumentó. *Z. mays* fué la especie con mayor contenido de estos compuestos y fué más resistente a *M. dirhodum*.

TABLA 5. Contenido de ácidos hidroxámicos y susceptibilidad de diferentes gramíneas a *Metopolophium dirhodum* (Walker)

	Acidos hidroxámicos en extractos de hoja (mmol/kg p.f.)	Nºáfidos al final del experimento <sup>a</sup>	Tasa de crec. pobl. (por día) <sup>b</sup>
<i>Hordeum distichum</i> cv F. Union	ND	94 ± 3	0,41
<i>Triticum aestivum</i> cv Huenufen	0,52	70 ± 7	0,35
cv Naofen	1,16	58 ± 6	0,31
<i>Triticum durum</i> cv SNA-3	3,11	39 ± 3	0,23
<i>Triticale</i> cv 951-1978	4,48	6 ± 3	- 0,14
<i>Zea mays</i> cv T125 L22	7,98	0	---

<sup>a</sup>Los valores representan promedios de áfidos ubicados en 3 muestras de 9 plantas c/u ± los errores estándares del promedio.

<sup>b</sup>Tasa de crecimiento =  $\ln(N_f/N_i)/\Delta t$ .

La infestación se realizó con 12 áfidos por muestra en plantas de 7 días de edad cultivadas en condiciones de invernadero y encerradas en un tubo de vidrio transparente con su abertura superior tapada con gasa.

El límite de detección del método fué de  $8 \times 10^{-4}$  mmol/kg p.f. bajo las condiciones del experimento.

3.6. Contenido de ácidos hidroxámicos y susceptibilidad de variedades de trigo a *Schizaphis graminum* (Rond).

Se sembraron frutos de *T. aestivum* de las variedades Sonka, Naofen, Cajena, Likay y *T. durum* de la variedad SNA-1. A los 10 días de edad se eligieron plantas que tenían 8 cm de altura (cultivadas en maceteros con tierra de jardín,  $28^{\circ} \pm 3$ , un riego diario y luz permanente, se infestaron con áfidos alados de la especie *S. graminum* y se midieron los ácidos hidroxámicos a las 48 hrs después de la infestación (Tabla 6). Se contó el número de áfidos presentes en cada grupo 6 días después de la infestación. La mayor tasa de crecimiento de una población de *S. graminum* se obtuvo en la variedad Sonka, la cual tuvo la menor concentración de ácidos hidroxámicos en comparación a las otras variedades utilizadas en el ensayo. La variedad SNA-1 tuvo la mayor concentración de ácidos y en ella la tasa de crecimiento fué la menor.

3.7. Efecto de la edad de la planta sobre el contenido de ácidos hidroxámicos en centeno y trigo y su susceptibilidad a *Metopolophium dirhodum*.

Plantas de trigo y centeno de 10, 16, 22 y 28 días de edad fueron infestadas con hembras ápteras adultas de la especie *M. dirhodum*. Seis días después de la infestación se determinó el contenido de ácidos

TABLA 6. Contenido de ácidos hidroxámicos y susceptibilidad de variedades de trigo a *Schizaphis graminum* (Rondani)

Variedad de Trigo	Hx en hojas (mmol/kg p.f.)	Número de áfidos al final del experimento	Tasa de crecimiento pobl. (por día) <sup>b</sup>
Sonka	0,61	86	0,44
Likay	0,89	83	0,43
Cajeme	1,37	52	0,36
Naofen	1,50	25	0,24
SMA-1	1,85	21	0,21

<sup>a</sup> La infestación se realizó con 6 áfidos por muestra en plantas de 10 días de edad crecidas en condiciones de laboratorio. Se cuantificó la concentración de ácidos hidroxámicos 48 horas después de la infestación y los áfidos 6 días después de la infestación.

<sup>b</sup> Tasa de crecimiento =  $(\ln(N_f/N_i))/\Delta t$ .

hidroxámicos y el número de áfidos presentes. Los cultivos se realizaron con *T. durum* cv SNA-3 y *S. cereale* cv Emerald, en maceteros con tierra de jardín, regados diariamente con agua corriente.

Se observó que a medida que la planta envejecía la concentración de ácidos hidroxámicos disminuía, en tanto que la población de áfidos aumentaba (Fig. 7). Es decir, que a medida que la planta crecía, aumentaba la susceptibilidad a áfidos. Al comparar las concentraciones al final del experimento se observó que en el trigo la concentración llegó a límites más bajos que en el centeno. Esto haría más susceptible al trigo, en concordancia con la población final de áfidos mayor observada en él.

3.8. Tasa de crecimiento de poblaciones de *Metopolophium dirhodum* en función de la concentración de ácidos hidroxámicos en las plantas.

Basándose en los resultados obtenidos en el ensayo anterior (Fig. 7), se graficó la velocidad de crecimiento de las poblaciones de *M. dirhodum* en función de la concentración de ácidos hidroxámicos presentes en los diferentes extractos de hojas de *T. durum* y *S. cereale* de distintas edades (Fig. 8). Se observó que a medida que la concentración de ácidos hidroxámicos aumentaba la velocidad de crecimiento de la población de áfidos disminuía.

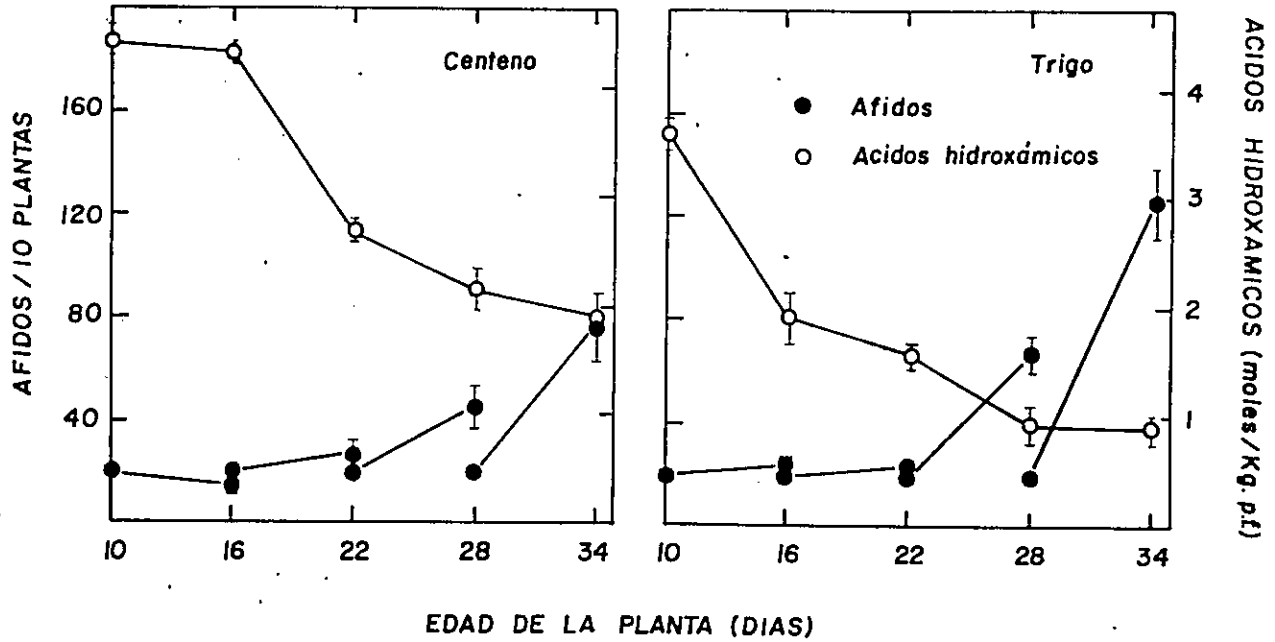


Fig. 7 Efecto de la edad de la planta sobre su contenido de ácidos hidroxámicos y su susceptibilidad a áfidos. Cada punto representa el promedio de 9 muestras de 10 plantas infestadas con 2 áfidos cada una. La barra vertical de cada punto representa el error estándar del promedio.

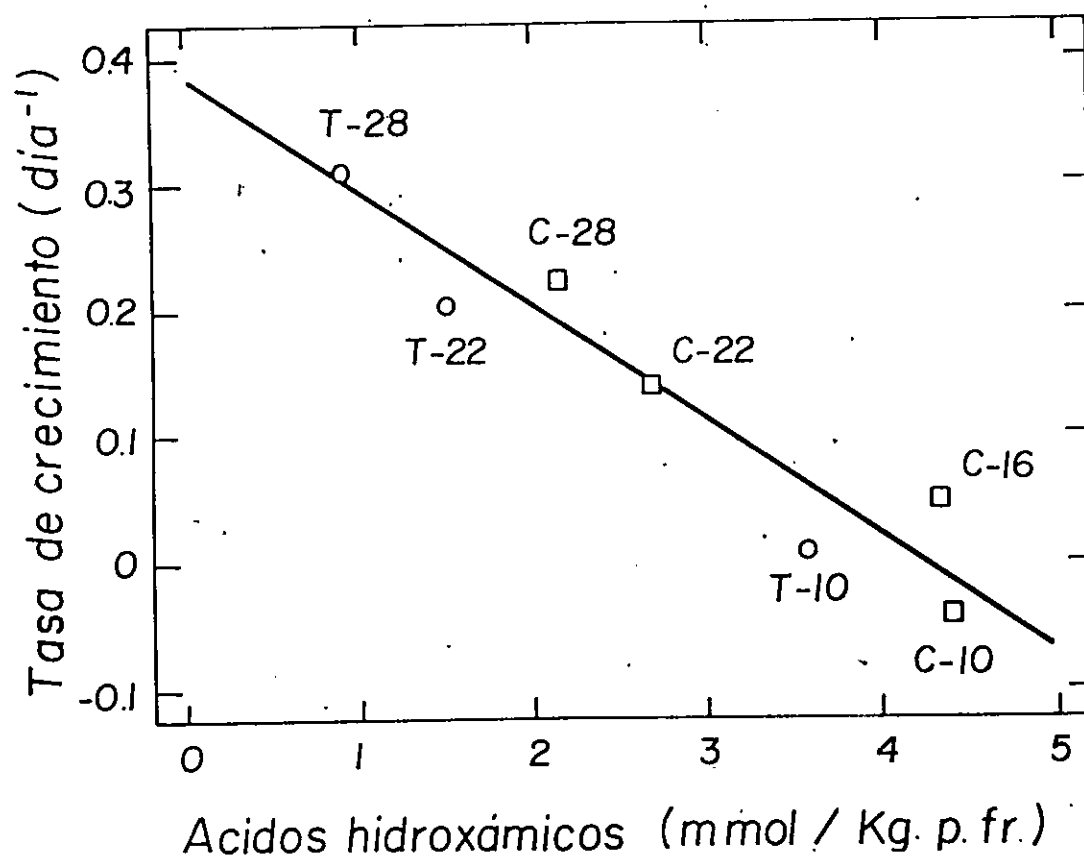


Fig. 8 Tasa de crecimiento de poblaciones de *M. dirhodum* en función de la concentración de ácidos hidroxámicos en las plantas.

Este gráfico se construyó con los datos de la Fig. 7. T = trigo, C = centeno; los números al lado de cada sigla representan la edad de la planta. La tasa de crecimiento se define como  $\frac{1}{n} \ln(n_f/n_i)/\Delta t$  donde  $\Delta t$  es el intervalo de tiempo de medición y  $n_f$  y  $n_i$  son las poblaciones final e inicial de áfidos respectivamente.



3.9 Efecto del DIMBOA incorporado a hojas de cebada en la susceptibilidad a *Metopolophium dirhodum*.

Hojas recién cortadas de *Hordeum distichum* cv Fola Unión (una gramínea que no posee ácidos hidroxámicos en sus tejidos), fueron sumergidas parcialmente en soluciones de pH 5 que contenían diversas concentraciones de DIMBOA. Veinticuatro horas más tarde se infestaron con hembras ápteras adultas de la especie *M. dirhodum* y 5 días después se determinó la concentración de DIMBOA en las hojas y el número de áfidos presentes. La figura 9 muestra la relación inversa encontrada entre las tasas de crecimiento de *M. dirhodum* y las concentraciones de DIMBOA incorporado en las hojas de cebada. Estas últimas fueron más bajas que las concentraciones de ácidos hidroxámicos normalmente encontradas en otras gramíneas. A pesar de que se trató de un experimento en donde se utilizaron órganos aislados en condiciones fisiológicas alteradas, los resultados muestran una relación inversa entre la tasa de crecimiento de la población de áfidos y la concentración de ácidos hidroxámicos incorporados con un coeficiente de correlación igual a  $-0,94$ .

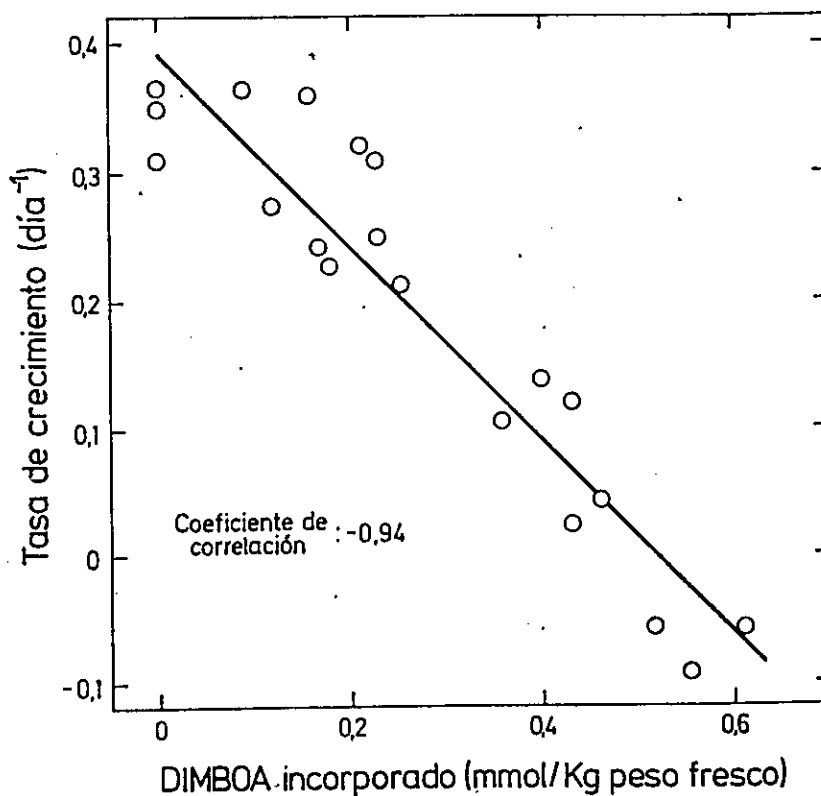


Fig. 9 Efecto del DIMBOA incorporado a hojas de cebada en la susceptibilidad a *M. dirhodum*.

Cada muestra está compuesta de 8 hojas las que son infestadas con 2 áfidos cada una.

La tasa de crecimiento fué determinada como:

$$(\ln N_f/N_i)/\Delta t.$$

3.10. Efecto del contenido de ácidos hidroxámicos de las hojas de plantas de cebada y trigo en la distribución de *S. graminum* en ellas.

Frutos de *T. durum* cv SNA-3 y *H. distichum* cv F. Unión variedad ésta última que no posee ácidos hidroxámicos, fueron cultivadas independientemente en macetas mantenidas en un invernadero. Al cabo de 63 días las plantas de cada maceta fueron seleccionadas dejando solamente 5, aquellas de crecimiento similar. Se infestó a las plantas con 10 áfidos ápteros adultos de la especie *S. graminum* y la maceta se aisló con una red de nylon. Seis días después se contó el número de áfidos presentes en cada una de las hojas y se midió el contenido de ácidos hidroxámicos en ellas (Fig. 10). En cebada, nuevamente, no se detectaron ácidos hidroxámicos, siendo el número de áfidos similar en las tres hojas analizadas. Por otro lado, las hojas de las plantas de trigo difirieron, tanto en el número de áfidos, como en el contenido de ácidos hidroxámicos. Al graficar los resultados en donde se incluyeron los de las hojas de trigo y cebada, se obtuvo una correlación lineal inversa entre el logaritmo del número final de áfidos en cada una de las tres hojas y el contenido de ácidos hidroxámicos en ellas.

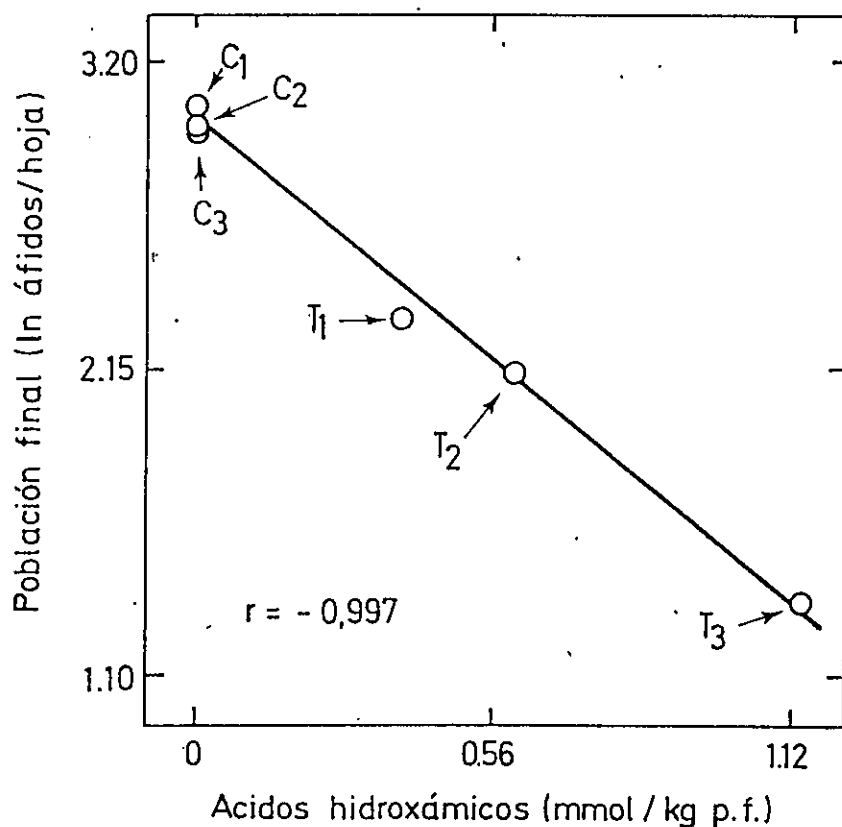


Fig. 10 Efecto del contenido de ácidos hidroxámicos de las hojas de plantas de cebada y trigo en la distribución de *S. graminum* en ellas.

$C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  = primera (la de mayor edad), segunda y tercera hoja de cebada;  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$  = primera, segunda y tercera hoja de trigo. Las plantas fueron mantenidas en un invernadero bajo luz continua y a  $28 \pm 3^\circ$ . Los valores en la ordenada representan el promedio de 10 muestras de 5 hojas cada una.

3.11. Efecto del DIMBOA en la sobrevivencia de tres especies de áfidos de los cereales.

Ninfas de *R. maidis*, *M. dirhodum* y de *S. graminum* fueron alimentadas con dietas artificiales que contenían DIMBOA en concentraciones similares a las encontradas en diversas gramíneas. Al cabo de 48 horas se midió la sobrevivencia (Fig. 11). Se observó que la de *S. graminum* y *M. dirhodum* fué significativamente menor que la de *R. maidis*. La sobrevivencia de esta última especie prácticamente no fué afectada por concentraciones hasta 2 mM de DIMBOA.

*R. maidis* vive preferencialmente en el maíz, que es una de las gramíneas con más alta concentración de ácidos hidroxámicos.

3.12. Mortalidad de ninfas de *S. graminum* alimentadas con dietas artificiales con diferentes concentraciones de DIMBOA.

Ninfas de *S. graminum* fueron alimentadas con dietas artificiales que contenían DIMBOA. Además se agregó un grupo de ninfas que fueron mantenidas en ayuno (Fig. 12).

La incorporación de DIMBOA en las dietas artificiales provocó un aumento significativo de la mortalidad de los áfidos, en comparación con la mortalidad registrada en el control sin DIMBOA. La mortalidad de los

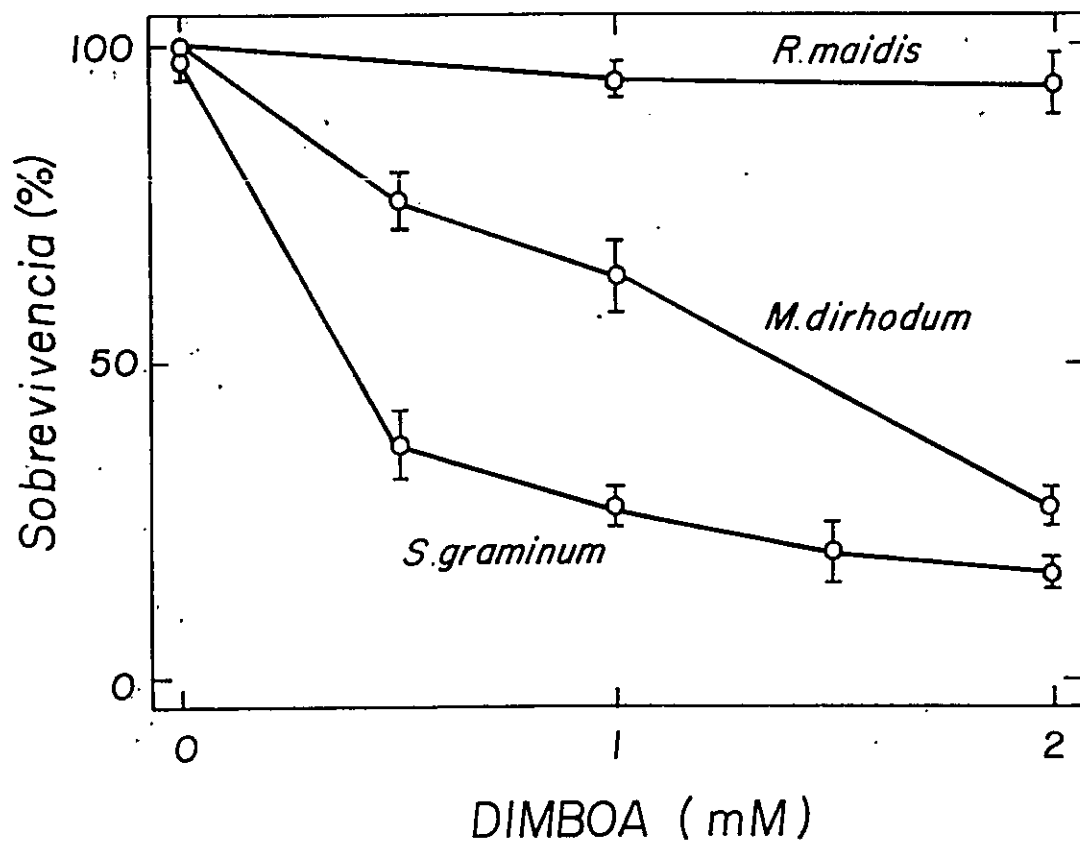


Fig. 11 Sobrevivencia de 3 especies de áfidos de los cereales alimentados con dietas artificiales a las cuáles se agregó DIMBOA hasta distintas concentraciones. Cada punto representa el promedio de 3 muestras de 10 áfidos cada una. La barra vertical de cada punto representa el error estándar del promedio.

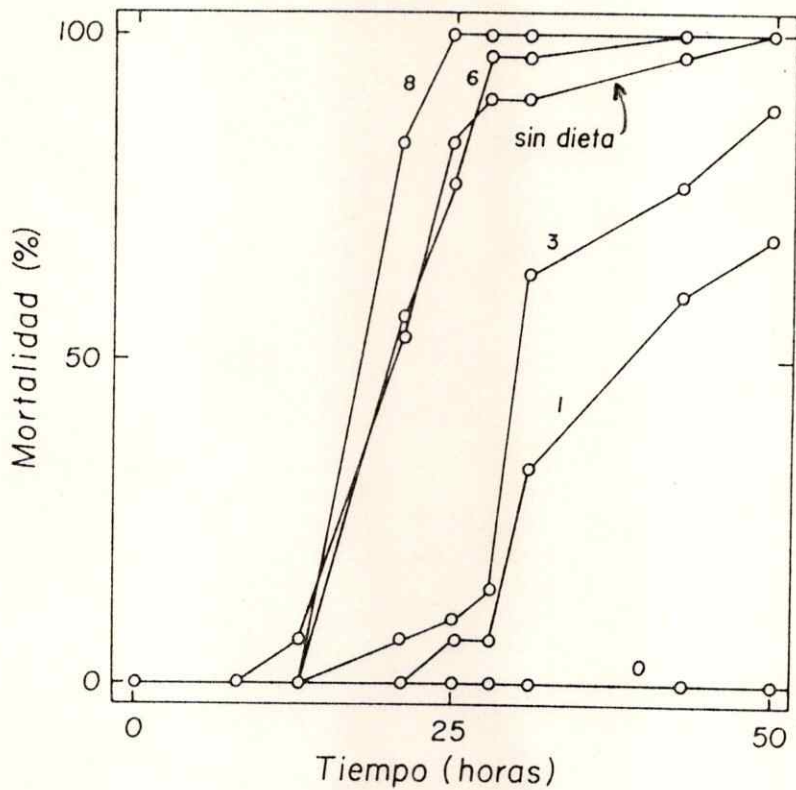


Fig. 12 Mortalidad de áfidos sometidos a dietas con diferentes concentraciones de DIMBOA. Ninfas de *S. graminum* fueron sometidas a dietas que contenían diferentes concentraciones de DIMBOA (0-8 mM). Se agregó un ensayo en donde no existía dieta entre las 2 membranas de Parafilm. Los valores de la ordenada representan el promedio de 3 muestras de 10 áfidos iniciales cada una. Los errores estándares fueron omitidos para simplificar la figura; ellos oscilaron entre 3 y 9%.

áfidos en dietas con DIMBOA en concentración 6 y 8 mM aumentó rápidamente a partir de las 12 horas después que fueron expuestos a la dieta, alcanzando un 100% 12 horas más tarde. Los áfidos que fueron sometidos a ayuno, pero mantenidos en condiciones experimentales análogas a las de los mantenidos en dietas con DIMBOA 6 y 8 mM, mostraron niveles similares de mortalidad. Esto sugirió que la causa principal de muerte de los áfidos expuestos a las concentraciones mayores de DIMBOA podría ser la inanición.

3.13. Conducta y mortalidad de áfidos sometidos simultáneamente a dietas con y sin DIMBOA.

Se tomaron 4 grupos de cápsulas con un número igual de áfidos. En el primer grupo se colocaron 2 dietas controles (sin DIMBOA), y en los otros grupos una dieta control y una dieta con DIMBOA en distintas concentraciones, de modo que los áfidos pudieran elegir una de las dietas para alimentarse.

Cuando los áfidos tuvieron la alternativa de elegir entre dietas con y sin DIMBOA se ubicaron preferentemente en la dieta sin DIMBOA (Fig. 13). La mayor mortalidad de áfidos se observó en dietas que tenían una concentración intermedia de DIMBOA.



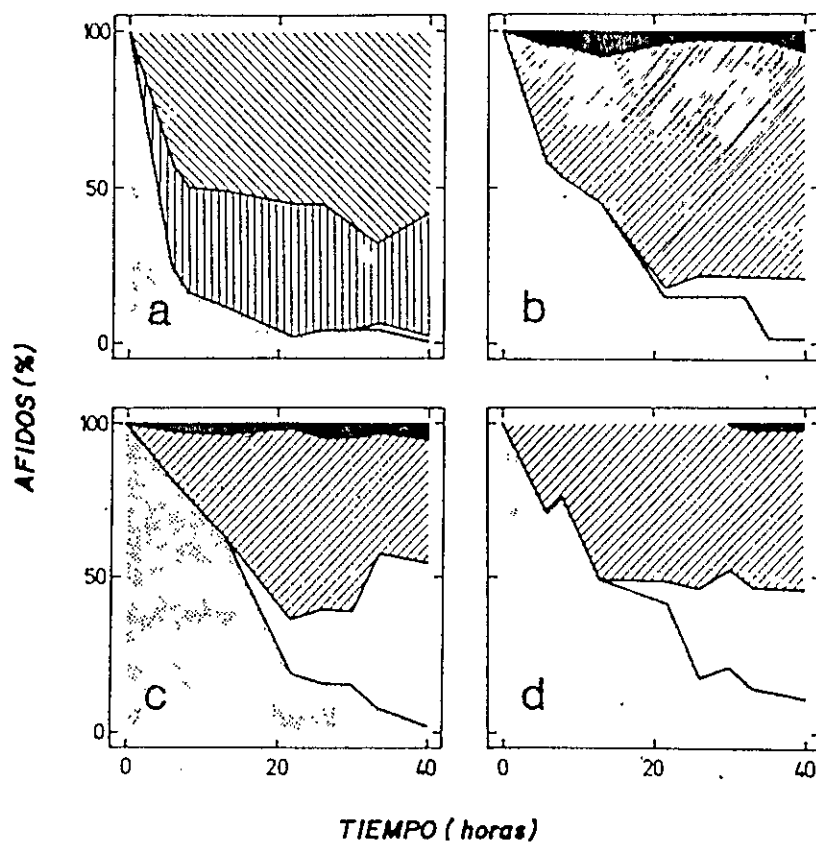


Fig. 13 Conducta y mortalidad de áfidos sometidos a elección de dietas con y sin DIMBOA.

- ▨ ▩ ▧ áfidos ubicados en dieta control (a)
- ▤ áfidos ubicados en dietas con DIMBOA 1 mM (b)  
3 mM (c) y 6 mM (d).
- ▦ áfidos no ubicados
- áfidos muertos

Los valores representan el promedio de 3 muestras de 10 áfidos cada una.

Estos resultados sugieren que el DIMBOA tendría un efecto repelente sobre los áfidos.

3.14. Mortalidad de áfidos de *S. graminum* expuestos a diferentes concentraciones de DIMBOA por un período de 12 horas.

Ninfas de *S. graminum* fueron ubicadas en cajas de cultivo y alimentadas con dietas artificiales que contenían DIMBOA en concentraciones desde 0 hasta 8 mM y al cabo de 12 horas fueron trasladadas a cajas que contenían dietas artificiales sin DIMBOA. El porcentaje de mortalidad fué medido como una función del tiempo y de la concentración del DIMBOA en la dieta inicial (Fig. 14). La mortalidad de los áfidos fué mayor en los grupos sometidos a DIMBOA 3 y 4 mM, pero fué menor en aquellos grupos sometidos a dietas con DIMBOA 0 y 8 mM. La menor mortalidad de los áfidos sometidos a las concentraciones más altas se debería a que el DIMBOA tendría un efecto repelente y por ello los áfidos no se alimentaron. La mayor mortalidad de los áfidos expuestos a concentraciones intermedias (4 mM) sugiere que los áfidos ingirieron el DIMBOA y que este compuesto causó algún efecto tóxico en los insectos.

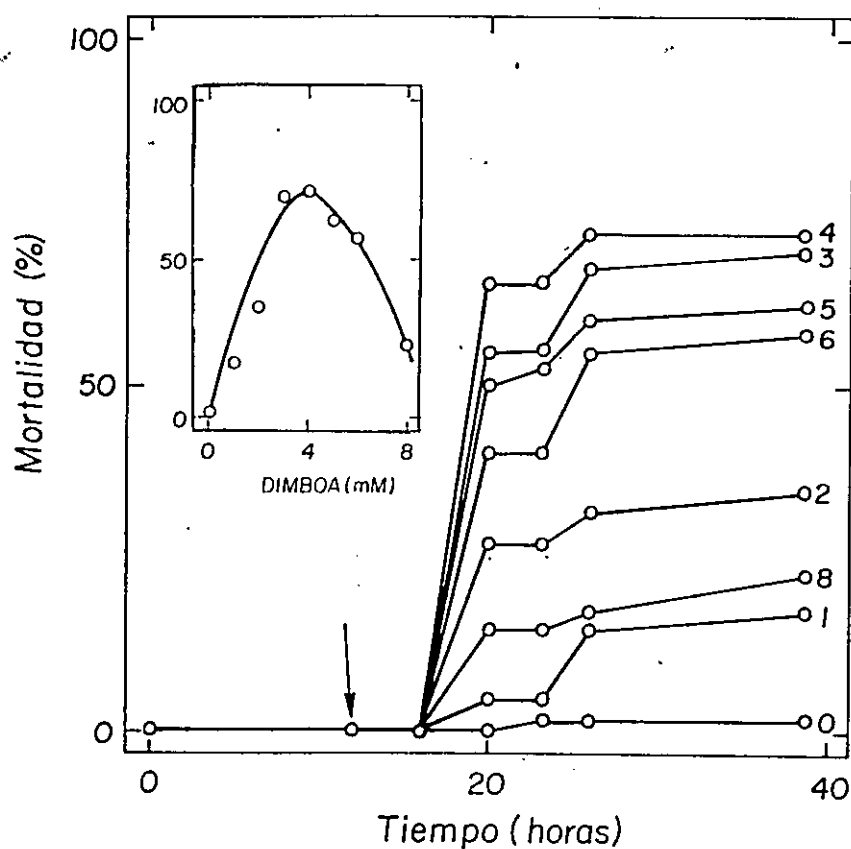


Fig. 14 Efecto en la mortalidad de *S. graminum* expuestos a dietas con diferentes concentraciones de DIMBOA por un período de 12 horas y luego trasladados a dietas sin DIMBOA. Los números de la derecha representan las concentraciones de DIMBOA en la dieta inicial. Los valores en la ordenada representan los promedios de 3 muestras de 10 áfidos cada una. Los errores estándares oscilan entre 2 y 6%. El recuadro es una sección de la curva a las 39 horas.

3.15. Registro eléctrico de la ingestión de dietas con DIMBOA.

El procedimiento usado para el registro eléctrico de la ingestión está descrito en materiales y métodos. Cuando los áfidos fueron expuestos a dietas artificiales que contenían DIMBOA 1 mM se obtuvo un registro (Fig. 15 A), que muestra que los áfidos después de salivar y probar la dieta, la ingieren durante largo tiempo.

Cuando los áfidos fueron expuestos a dietas con DIMBOA 8 mM, solamente se registraron señales que corresponden a pruebas, es decir, el áfido contacta su canal salival con la dieta retirándolo rápidamente sin ingerir alimento, registrándose a continuación una línea basal (Fig. 15 B). Este experimento mostró que el DIMBOA tiene un efecto repelente sobre los áfidos.

3.16. Tiempo de ingestión de dietas con diferentes concentraciones de DIMBOA.

Para estudiar el efecto repelente se sometieron áfidos a dietas con distintas concentraciones de DIMBOA durante un período de 2 horas y se registró electrónicamente la duración total de la ingestión de dicha dieta, basado en la señal del tipo I. En la Fig. 16, se graficó el tiempo promedio de duración de la ingestión (I) en función de la concentración del DIMBOA en las dietas. Se observó una correlación negativa,

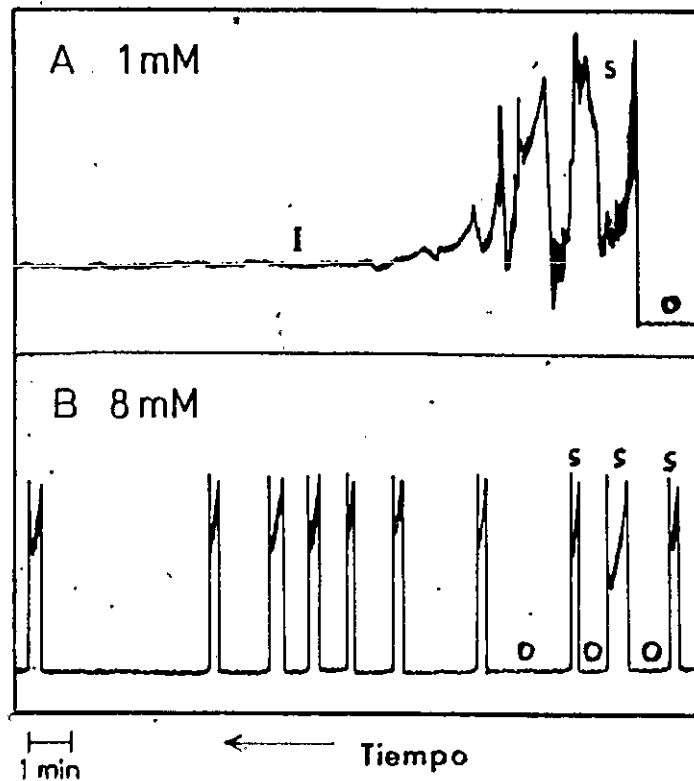


Fig. 15 Registro eléctrico de la ingestión de dietas con DIMBOA.

A. = dieta con DIMBOA 1 mM

B. = dieta con DIMBOA 8 mM

O' = línea base que representa el momento en que los estiletes no están en contacto con la dieta.

S = Salivación o prueba (momento de contacto del conducto salival con la dieta).

I = Ingestión (el alimento pasa a través del canal alimenticio del áfido).

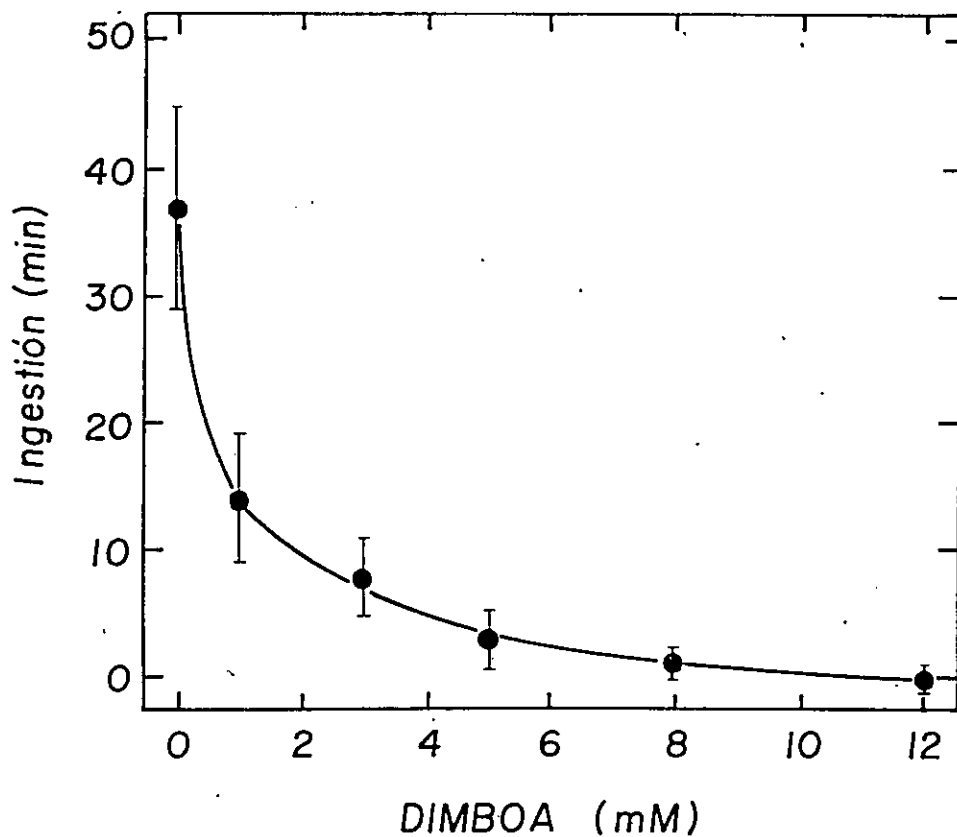


Fig. 16 Tiempo de ingestión de dietas por los áfidos sometidos a diferentes concentraciones de DIMBOA. La respuesta de los áfidos está basada en el tiempo promedio que dura la ingestión (señales tipo I) registrado electrónicamente con áfidos alimentándose en dietas artificiales durante un período de 2 horas. Cada promedio representa el resultado de 10 registros de 10 áfidos separados. Las barras indican un 95% de confiabilidad de los promedios.

entre el tiempo que dura la ingestión por los áfidos y la concentración del DIMBOA en las dietas.

3.17. Efecto del DIMBOA y del DIMBOA-Glc en la sobrevivencia de áfidos alimentados con dietas artificiales.

DIMBOA se encuentra en el tejido vegetal intacto como 2-β-O glucósido (DIMBOA-Glc). Por ello es interesante comparar la actividad del glucósido y de su aglucona sobre ninfas de *S. graminum*. Estos compuestos fueron agregados a dietas artificiales de las cuales se alimentaban los áfidos (Fig. 17). Se observó que el DIMBOA ( $LD_{50} = 1,2$  mM) es más letal que DIMBOA-Glc ( $LD_{50} = 4,1$  mM) sobre los áfidos. Sin embargo, ambos compuestos causaron una mortalidad apreciable en concentraciones similares a las encontradas en las plantas.

3.18. Efecto del DIMBOA y del DIMBOA-Glc en el índice de reproducción de los áfidos.

Otro efecto que causan estos compuestos sobre los áfidos es la de disminuir la tasa de crecimiento de la población a través de una baja en el índice reproductivo (Fig. 18).

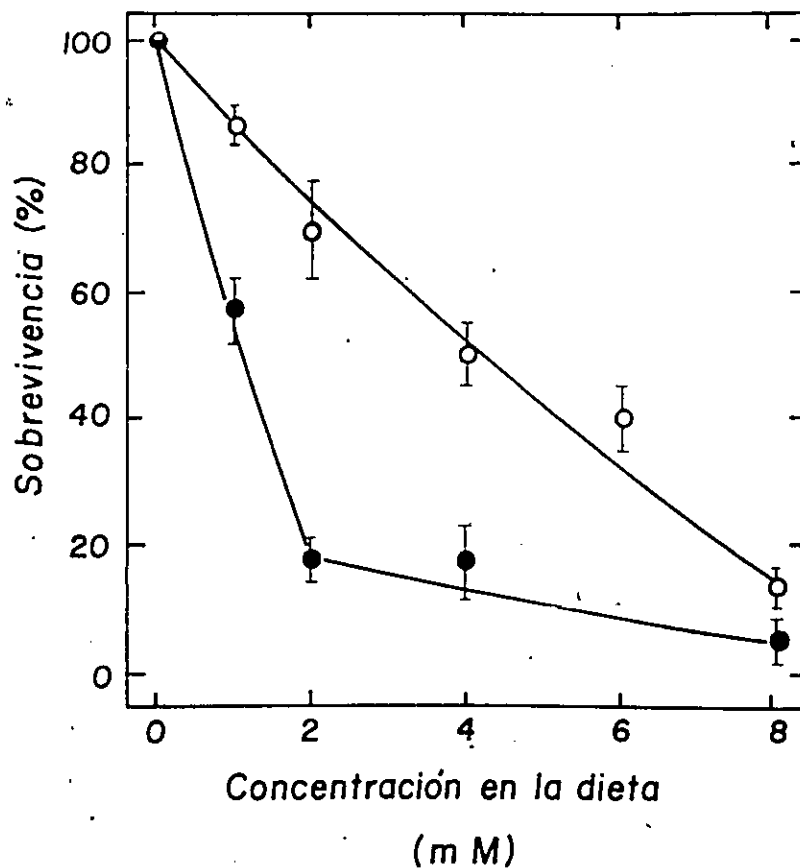


Fig. 17 Efecto del DIMBOA y del DIMBOA-Glc en la sobrevivencia de *S. graminum* alimentados con dietas artificiales. Un grupo de ninfas fueron expuestas a dietas con DIMBOA-Glc en diferentes concentraciones midiéndose la sobrevivencia a las 48 horas.

Los valores de la ordenada representan un promedio de 3 muestras de 10 áfidos iniciales cada una.

La barra vertical de cada punto representa el error estándar del promedio..

○ DIMBOA-Glc                      ● DIMBOA



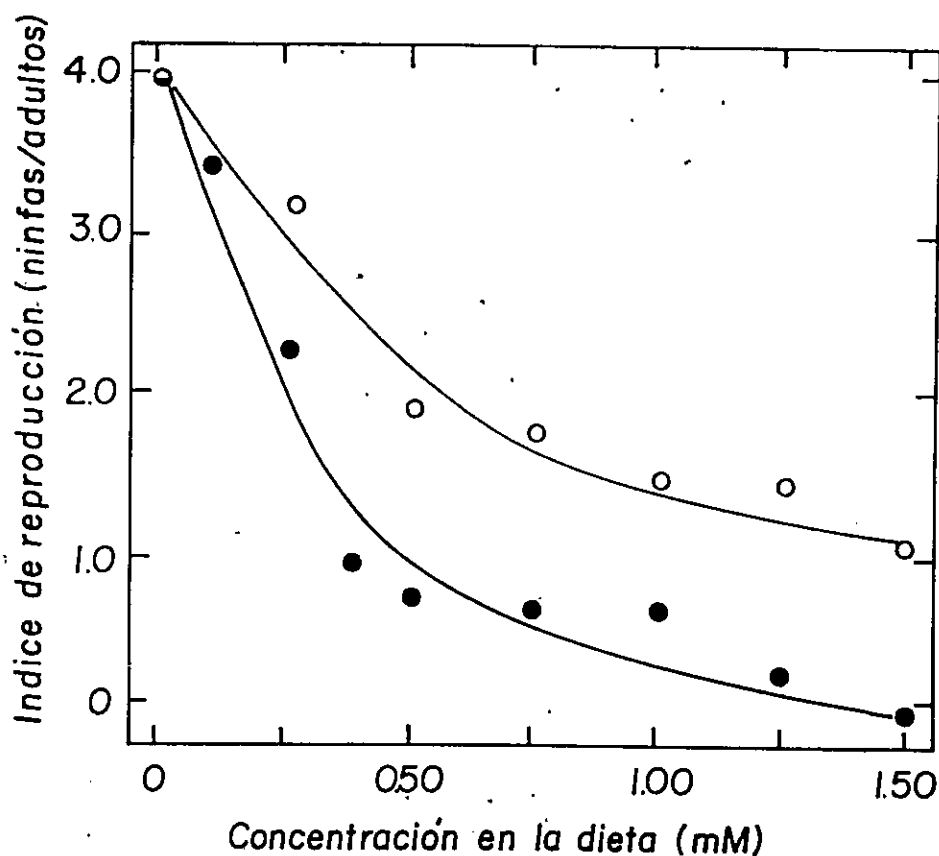


Fig. 18 Efecto del DIMBOA y del DIMBOA-Glc en la reproducción de *S. graminum*. Un grupo de áfidos adultos fué expuesto a dietas con DIMBOA en diferentes concentraciones y otro grupo a dietas con DIMBOA-Glc en diferentes concentraciones. Los valores en la ordenada corresponden al promedio de 5 muestras de 5 áfidos cada una. El índice de reproducción =  $N^{\circ}$  ninfas/ $N^{\circ}$  adultos vivos a las 50 horas de iniciado el ensayo.

○ DIMBOA-Glc

● DIMBOA

3.19. Efecto del DIMBOA-Glc en la alimentación de los áfidos.

Considerando que el DIMBOA tiene un efecto repelente sobre los áfidos (en exp. 3.16) y que éste se manifiesta con una menor ingestión de la dieta a medida que aumenta la concentración en ella (en exp. 3.17) se estudió si el glucósido provocaba el mismo efecto. Para ello se expusieron ninfas de *S. graminum* a dietas que contenían DIMBOA-Glc en concentraciones que variaron entre 0 y 12 mM y se contabilizó el porcentaje de áfidos que se ubicó en la dieta a las 12 hrs de iniciado el ensayo. Se observó (Fig. 19), que a medida que aumentó la concentración de DIMBOA-Glc en la dieta, disminuyó el porcentaje de áfidos ubicados en ellas. Esta conducta fué semejante a la observada en los ensayos con DIMBOA. Sin embargo, la pendiente fué menor, probablemente debido a que el glucósido sería menos repelente que la aglucona.

3.20. Efecto del DIMBOA y del DIMBOA-Glc en la sobrevivencia de áfidos expuestos a dietas con diferentes concentraciones de los compuestos, durante un período de 12 horas.

Se expusieron grupos de ninfas de *S. graminum* a dietas artificiales que contenían DIMBOA-Glc y otros grupos a dietas con DIMBOA en diferentes

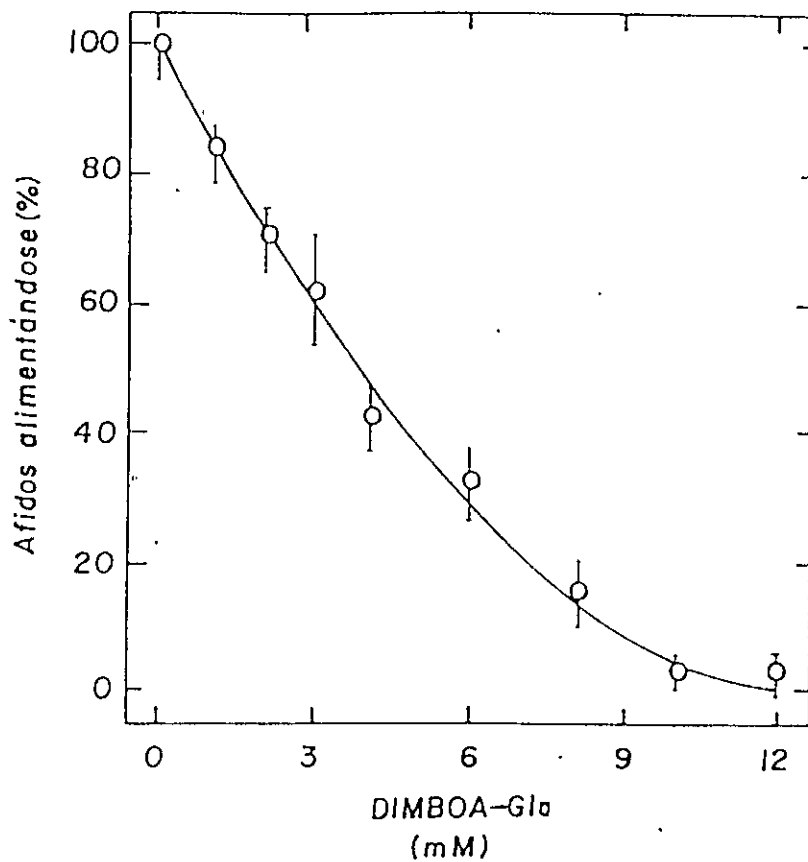


Fig. 19 Efecto del DIMBOA-Glc en la alimentación de los áfidos.

Ninfas de *S. graminum* fueron sometidas a dietas con diferentes concentraciones de DIMBOA-Glc. Se contó el número de áfidos ubicados en las dietas a las 12 horas. Cada punto representa el promedio de 3 muestras de 10 áfidos cada una. La barra vertical de cada punto representa el error estándar del promedio.

concentraciones, durante un período de 12 horas. Luego los áfidos fueron trasladados a dietas sin los compuestos (Fig. 20). Se observó que el menor porcentaje de sobrevivencia para el grupo expuesto a la aglucona ocurrió a concentraciones entre 3 y 4 mM. Para el glucósido este mínimo ocurrió a concentraciones alrededor de 6 mM. Por sobre esta concentración, los compuestos tendrían un efecto repelente tal que los áfidos no ingerirían la dieta o lo harían en muy pequeña cantidad, no sufriendo los efectos deletéreos de los compuestos. Concentraciones menores de estos compuestos serían cada vez menos tóxicos.

### 3.21. Efecto de la cisteína sobre la actividad biológica del DIMBOA.

El DIMBOA reacciona con tioles, dando origen a productos de adición y/o reducción (Niemeyer *et al.*, 1982). Como entre los componentes de la dieta existía cisteína cabe preguntarse las consecuencias que tendría la presencia de ésta en las dietas en que se ensayó la toxicidad del DIMBOA.

Cuando se alimentaron ninfas de *S. graminum* con dietas sin DIMBOA, la presencia o ausencia de cisteína no afectó la sobrevivencia de áfidos alimentados por 24 horas. Sin embargo, cuando se agregó el DIMBOA, la sobrevivencia fué mayor en las dietas con

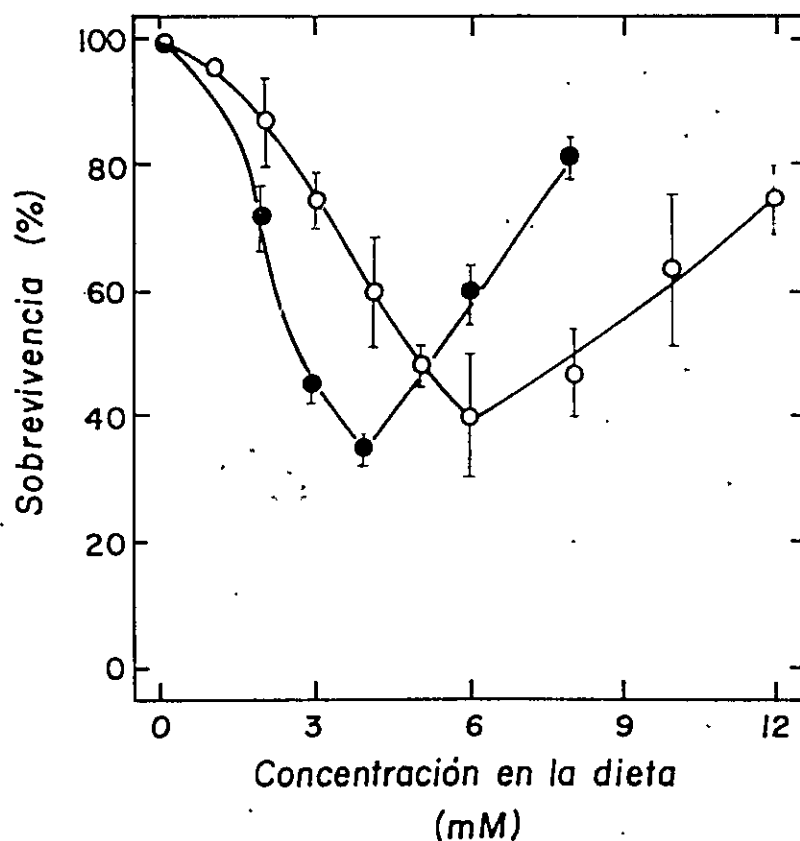


Fig. 20 Sobrevivencia de *S. graminum* sometidos a dietas con diferentes concentraciones de DIMBOA o, con DIMBOA-Glc durante 12 horas y luego trasladados a dietas sin los compuestos. Los valores de la ordenada representan los promedios de 3 muestras de 10 áfidos cada una. La barra vertical de cada punto representa el error standar del promedio.

○ DIMBOA-Glc                      ● DIMBOA

cisteína (Fig. 21). El  $LD_{50}$  para el DIMBOA fué de 2.1 y 0.9 mM en presencia o ausencia de cisteína respectivamente.

3.22. Efecto de la cisteína sobre la desaparición de DIMBOA en dietas y en solución tampón.

La diferente sobrevivencia de los áfidos en las dietas con DIMBOA, con y sin cisteína, se debería a la reactividad del compuesto con la cisteína.

Se estudió la descomposición del DIMBOA en solución tampón y en dietas artificiales con y sin cisteína. Las velocidades de desaparición del DIMBOA fueron seguidas tomando alícuotas, agregando a ellas el reactivo de  $FeCl_3$  y midiendo la absorbancia del complejo azul formado a 590 nm. El período de semidescomposición del DIMBOA en solución tampón fué similar a aquel en las dietas sin cisteína (Tabla 7). Cuando se agregó cisteína a la dieta y a la solución tampón la reacción se aceleró por un factor 1,5. Estos resultados indican que la cisteína sería el principal componente de la dieta que influiría en la descomposición del DIMBOA.

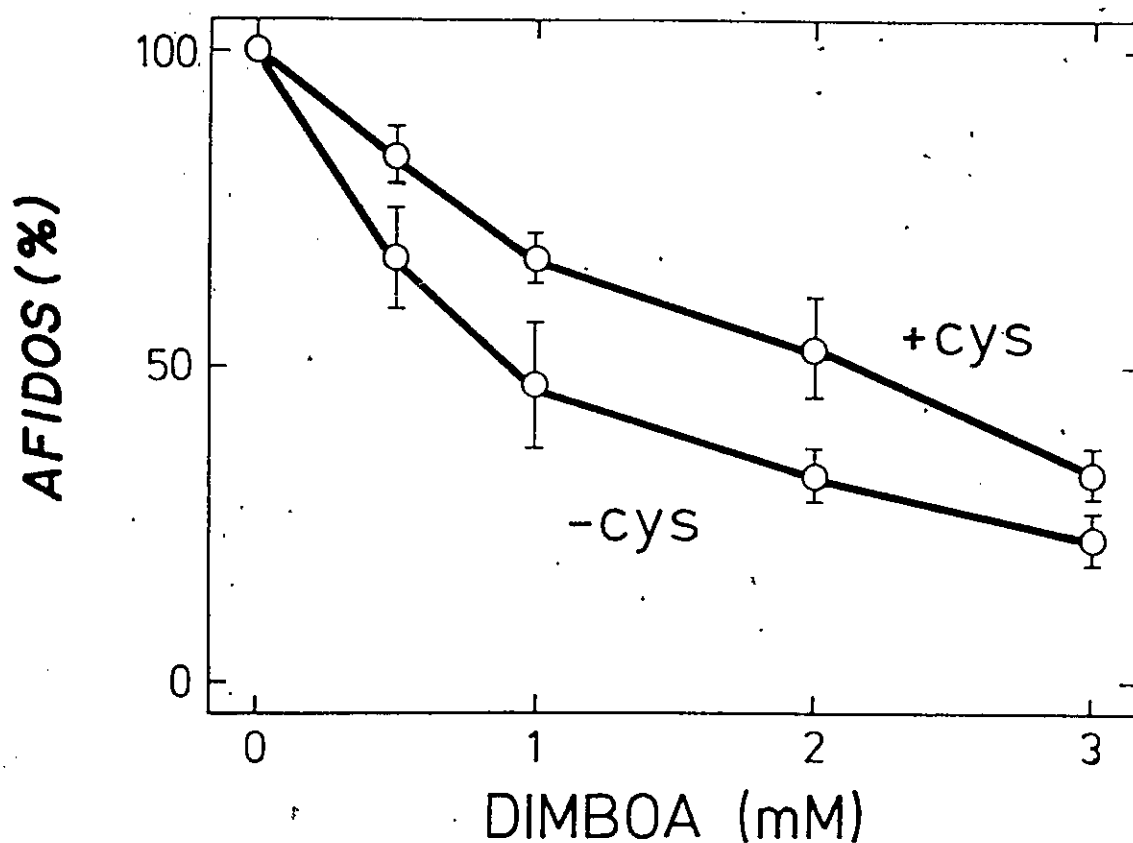


Fig. 21 Efecto del DIMBOA sobre *S. graminum* alimentados con dietas con y sin cisteína en concentración 2.8 mM. La sobrevivencia está expresada como porcentaje del número inicial de individuos, fué medida 24 horas después de iniciado el ensayo. Cada punto representa el promedio de 3 muestras de 10 áfidos cada una. La barra vertical de cada punto representa el error estándar del promedio.

TABLA 7. Efectos de la cisteína sobre la desaparición del DIMBOA en la dieta y en la solución tampón

Solución	Cisteína (mM)	Período de semi-descomposición del DIMBOA (horas)
Dieta	2,8	31,9
Dieta	0,0	48,2
Solución Tampón	2,8	34,1
Solución Tampón	0,0	50,8

Las reacciones fueron hechas con DIMBOA en concentraciones 4,0 mM en la dieta, o en solución tampón de ftalato de potasio pH 5,5 a 28° .



3.23. Actividad biológica de los productos de descomposición del DIMBOA.

Se descompuso DIMBOA en dietas con y sin cisteína y se midió la toxicidad de los productos de reacción del DIMBOA sobre ninfas de *S. graminum*. Los resultados (Tabla 8), mostraron que el DIMBOA disminuyó la sobrevivencia de los áfidos, en cambio, los productos de descomposición no afectarían a los áfidos, al menos hasta las 48 horas de iniciado el ensayo.

3.24. Sobrevivencia de áfidos expuestos a dietas con MBOA.

MBOA es uno de los principales productos de descomposición del DIMBOA, de tal modo que es interesante estudiar los efectos de este compuesto sobre los áfidos. Se expusieron ninfas de *S. graminum* a dietas que poseían diferentes concentraciones de MBOA y al cabo de un tiempo se midió la sobrevivencia de los áfidos. Se observó (Fig. 22) que este compuesto también tenía un efecto deletéreo sobre los áfidos, pero de menor intensidad que el DIMBOA.

TABLA 8. Efecto de la cisteína, del DIMBOA y de los productos de descomposición del DIMBOA sobre ninfas de *S. graminum* alimentadas con dietas.

Concentración en la dieta (mM)		Sobrevivencia <sup>a</sup>	
Cisteína	DIMBOA	24 hrs	48 hrs
2,8	0,0	100	100
0,0	0,0	100	100
2,8	4,0	40 ± 6	10 ± 3
0,0	4,0	20 ± 3	0
2,8	4,0 <sup>a</sup>	100	100
0,0	4,0 <sup>a</sup>	100	100

<sup>a</sup>La sobrevivencia se midió en porcentaje del número inicial de áfidos presentes. Los valores corresponden a promedios de tres muestras de 10 áfidos cada una ± los errores estándares de las muestras.

El DIMBOA se descompuso por 14 períodos de semi-descomposición en dietas con y sin cisteína antes de ser ofrecido a los áfidos.

La descomposición se realizó en un baño termorregulado a 28° ± 1 partiendo de una descomposición 4.0 mM en la dieta o en ftalato de K 50 mM a pH 5,5.

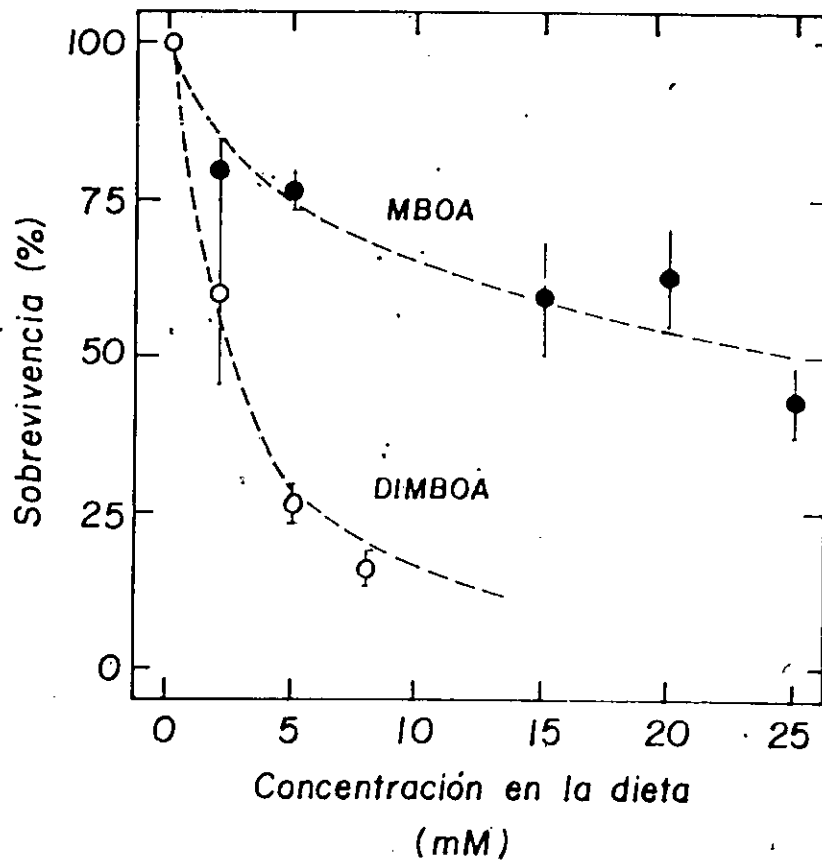


Fig. 22 Sobrevivencia de áfidos expuestos a dietas con ..MBOA. Ninfas de *M. dirhodum* fueron expuestas a dietas artificiales que contenían diferentes concentraciones de MBOA. Otro grupo fué sometido a dietas con DIMBOA. La sobrevivencia fué medida al cabo de 24 horas de iniciado el ensayo. Cada punto representa el promedio de 3 muestras de 10 áfidos cada una. La barra vertical de cada punto representa el error estándar del promedio.

## DISCUSION

En algunas gramíneas se han encontrado ácidos hidroxámicos cíclicos, siendo el DIMBOA el mayoritario en extractos de trigo y maíz (Virtanen y Wahlroos, 1956). En este trabajo se ha demostrado que las concentraciones de estos compuestos varían sustancialmente entre las diferentes especies y variedades de gramíneas. Los ácidos hidroxámicos están presentes en hojas, raíces y coleóptilos, encontrándose la mayor concentración en las hojas y la menor en las raíces. No se detectaron ácidos hidroxámicos ni en los frutos ni en las semillas (Fig. 6). En todas las especies analizadas estos compuestos empiezan a ser detectados alrededor de las 24 horas después de la germinación. A partir de ese momento la concentración aumenta rápidamente para alcanzar un máximo al cuarto día de edad y luego disminuir progresivamente. A pesar que la concentración disminuye a partir del cuarto día de edad, el contenido total de ácidos hidroxámicos por planta continúa aumentando (Fig. 6). Hasta el momento no está claro como los cambios en el peso fresco y las tasas de biosíntesis y/o degradación de los ácidos hidroxámicos interactúan para aumentar y posteriormente disminuir la concentración de estos compuestos. A pesar que el contenido de ácidos hidroxámicos llega a valores cercanos al 5% del peso seco, su rol fisiológico aún no ha sido aclarado.

El contenido de ácidos hidroxámicos en las diferentes especies y variedades de gramíneas se correlaciona inversamente con la resistencia a los áfidos *M. dirhodum* y *S. graminum* (Tablas 6,7). Estas relaciones se obtienen también al infestar plantas de la misma especie pero de edades diferentes (Fig. 7). Al graficar las tasas de crecimiento de poblaciones de *M. dirhodum*, tanto en trigo como en centeno, en función de la concentración de ácidos hidroxámicos presentes en sus hojas, se obtiene una correlación negativa entre ambos parámetros (Fig. 8). Este hecho indicaría que un factor importante de resistencia a los áfidos en estas gramíneas serían los ácidos hidroxámicos. Al incorporar DIMBOA a plantas que no lo poseen se pueden obtener correlaciones semejantes (Fig. 9). La tasa de crecimiento de las poblaciones de *M. dirhodum* extrapolada a la concentración cero de ácidos hidroxámicos, es similar, tanto para las poblaciones de áfidos mantenidos sobre plantas intactas de trigo y centeno, como para hojas aisladas de cebada, a las cuáles se les incorporó el compuesto ( $0,38$  y  $0,39$  día<sup>-1</sup>, respectivamente) (Figs. 8 y 9). Un valor similar ( $0,4$  día<sup>-1</sup>) se obtiene en la tasa de crecimiento de una población de *M. dirhodum* mantenida sobre una planta intacta de cebada, carente de ácido hidroxámico (Tabla 6). La tasa de crecimiento de *M. dirhodum* es más afectada por el DIMBOA incorporado en las hojas de cebada que por la concentración de ácidos hidroxámicos presentes en las plantas intactas, como lo demuestran las pendientes

(0,76 y - 0,089, respectivamente) (Figs. 9 y 10). Esto podría deberse a que los áfidos que se están alimentando sobre las hojas de cebada estarían recibiendo el DIMBOA puro y no la mezcla de glucósidos de ácidos hidroxámicos que existen en la planta, los cuáles son menos tóxicos.

El contenido de ácidos hidroxámicos en las hojas varía también con la edad del órgano (Tabla 5). La hoja más nueva tiene mayor concentración que las de mayor edad. Se encontró, también, una correlación lineal inversa entre la tasa de crecimiento poblacional de áfidos en cada una de las 3 primeras hojas de una planta de trigo y la concentración de ácidos hidroxámicos en cada una de ellas. En cambio en las 3 primeras hojas de cebada la distribución de áfidos fué homogénea. Este hecho nos sugiere que la planta tendría más protegidos sus tejidos jóvenes por estos compuestos y que la distribución de áfidos en la planta sería regulada, en parte, por los ácidos hidroxámicos.

La interpretación dada a estas correlaciones está avalada por los resultados obtenidos en ensayos donde se sometieron a áfidos a dietas artificiales. En estos ensayos se estudiaron los efectos deletéreos del DIMBOA en concentraciones similares a las encontradas en las plantas (Figs. 6 y 7 y Tablas 3, 4 y 5). Al someter ninfas de *R. maidis*, *M. dirhodum* y *S. graminum* a dietas artificiales que contienen DIMBOA en diferentes concentraciones, se obtiene una sobrevivencia sustancialmente menor en las dos últimas especies.

Por el contrario, la primera especie no es muy afectada, al menos en concentraciones hasta 2 mM (Fig. 1). Esto sugiere que la susceptibilidad de los áfidos a los ácidos hidroxámicos podría determinar su preferencia de huésped. Por ejemplo, el maíz, que es una gramínea que posee un alto contenido de ácidos hidroxámicos, en relación a otras especies, sería más susceptible a *R. maidis* que a las otras especies de áfidos. Cuando las concentraciones de ácidos hidroxámicos en las dietas son bajas se afecta principalmente la reproducción de los áfidos, observándose una correlación negativa (Fig. 12).

Cuando los áfidos son sometidos a la alternativa de dieta con y sin DIMBOA en diferentes concentraciones (Fig. 15) se observa que los áfidos se ubican preferentemente en la dieta sin DIMBOA y que el porcentaje mayor de mortalidad se observa en aquellos ensayos en donde existía como alternativa una dieta con DIMBOA 3 mM. Estos resultados nos sugieren que además de un efecto repelente, existiría un efecto tóxico de DIMBOA, debido a que los áfidos ingerirían aquellas dietas con concentraciones bajas de DIMBOA sufriendo los efectos deletéreos. Esta interpretación está avalada por los experimentos en que se demuestra que los áfidos ingieren dietas, por ejemplo, en concentraciones de DIMBOA 1 mM (Fig. 13 a) en cambio, no lo hacen cuando la concentración de DIMBOA es de 8 mM (Fig. 13 B). Además, los resultados expuestos en la Fig. 16 indican que la ingestión de dieta es más corta en promedio a medida que aumenta la concentración del DIMBOA en ella.

La actividad inhibitoria del DIMBOA ha sido medida en un medio de cultivo complejo, como es la dieta (Tabla 2). Por otro lado, el DIMBOA es un compuesto inestable en solución (Woodward *et al.*, 1978) y reacciona con cisteína y otros tioles (Niemeyer *et al.*, 1982). La adición de cisteína acelera la desaparición del DIMBOA en la dieta y en solución tampón (Tabla 9) por un factor 1,5; lo que llevaría a una disminución del efecto deletéreo debido a que los productos de reacción no tienen toxicidad aparente (Tabla 10).

Los ácidos hidroxámicos se encuentran en plantas intactas como glucósidos. Estos también tienen un efecto deletéreo sobre los áfidos aunque en menor grado que la aglucona (Figs. 18, 18 B, 19). El áfido, al dañar el tejido vegetal con la penetración del estilete, se encontraría con el glucósido o bien provocaría su hidrólisis enzimática, liberándose así, la aglucona. La toxicidad del DIMBOA contra varios organismos está bien documentada; el DIMBOA inhibe crecimiento bacteriano y fúngico y el desarrollo de insectos (Corcuera *et al.*, 1978; Couture *et al.*, 1971; Klun *et al.*, 1967). El DIMBOA es un inhibidor de la transducción de energía en las mitocondrias y en cloroplastos reacciona con un factor acoplante ( $CF_1$ ), de esta manera, inhibe la fotofosforilación (Queirolo *et al.*, 1981). Además el DIMBOA reacciona con cisteína de la dieta artificial para los áfidos y reacciona con otros tioles *in vitro* (Niemeyer *et al.*, 1981). De tal modo que es posible proponer que la toxicidad del DIMBOA a los



áfidos puede resultar de la interrupción del metabolismo de aminoácidos y/o modificación de las proteínas. Mas aún, la capacidad de los simbiotes procarióticos para completar los requerimientos nutricionales de los áfidos podría ser suprimida como resultado de la acción antibiótica del DIMBOA, después de su ingestión.

A pesar que el DIMBOA-Glc tiene efectos menores que la aglucona sobre los áfidos, aún él puede actuar como un potente repelente. Así el glucósido podría proteger ciertos cultivos de gramíneas contra el ataque de áfidos, actuando inicialmente como repelente, y luego si es hidrolizado a DIMBOA podría actuar como una toxina para el áfido y además como un repelente.

Los ácidos hidroxámicos están presentes en hojas de trigo, centeno y maíz, pero su localización en el tejido vegetal es aún desconocida. Los áfidos obtienen su alimento preferentemente del floema (Campbell *et al.*, 1982), por ello sería interesante determinar la ubicación de los ácidos hidroxámicos en los tejidos de la planta.

## CONCLUSIONES

1. El contenido de ácidos hidroxámicos en plantas de trigo muestra variaciones importantes entre las diferentes especies y variedades. Las concentraciones máximas se alcanzan alrededor del cuarto día de edad en epicótilos y raíces de plantas cultivadas en invernadero. La concentración de Hx es siempre más alta en las hojas más jóvenes.
2. El contenido de ácidos hidroxámicos de las gramíneas estudiadas, tanto el agregado como el presente en forma natural, se correlaciona con resistencia a los áfidos *Metopolophium dirhodum* (Walker) y *Schizaphis graminum* (Rondani).
3. El DIMBOA y el DIMBOA-Glc tienen efectos repelentes y deletéreos (mortalidad y disminución de la reproducción), contra áfidos en dietas artificiales.
4. Basados en los resultados obtenidos en dietas artificiales y en experimentos de infestación, se propone que el DIMBOA o el DIMBOA-Glc actúan como factores naturales de protección de los cereales contra los áfidos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Agrios, G.N., 1978. Plant Path. 2° Ed. Academic Press, Inc. New York - London.
2. Angell, H.R., Walker, J.C. y Link, K.P., 1930. "The relation of protocatechuic acid to disease resistance in the onion". Phytopath. 20: 431-438.
3. Apablaza, J. y Robinson, A.G., 1967. "Effects of three species of aphids on barley, wheat or oats at various stages of plant growth". Can J. Plant Sci. 47: 367-373.
4. Apablaza, J. y Tiska, W., 1973. "Poblaciones de áfidos (Homóptera: Aphidae) en trigo de la zona central chilena". Revista Chilena de Entomología 7: 173-181.
5. Auclair, J.L., 1963. "Aphid feeding and nutrition". Ann. Rev. Entomol. 8: 439-490.
6. Auclair, J.L., 1965. "Feeding and nutrition of pea aphid. *Acyrtosiphon pisum* (Homóptera: Aphidae), on chemically defined diets of various pH and nutrient levels." Ann Entomol Soc. Amer. 58: 865-875.

7. Beck, S.D., Kaske, E.T. and Smissman, E.E., 1957.  
"Quantitative estimation of the resistance factor,  
6-methoxy benzoxazolinone, in corn plant tissue."  
J. Agr. Food Chem. 5: 933-935.
8. Beck, S.D. and Smissman, E.E., 1961. "The European corn  
borer, *Pyrausta nubilalis* and its Principal host plant."  
IX Biological activity of chemical analogs of corn  
resistance factor A (6-methoxybenzoxazolinone).  
Ann. Entomol. Soc. of Amer. 5: 53-61.
9. Beck, S.D. and Stauffer, J.F., 1957. "The European corn  
borer *Pyrausta nubilalis* and its principal host plant.  
III. Toxic factor influencing larval establishment."  
Ann. Entomol. Soc. America 50: 166-170.
10. Bowman, M.C., Beroza, M. y Klun, J.A., 1968. "Espectrophoto-  
fluorometric determination of 6-methoxy-2-benzoxazolinone  
an indicator of resistance to European corn borer in  
*Zea mays*." J. Econ. Entomol. 61: 120-123.
11. Brendenberg, J.B., Honkanen, E. y Virtanen, A.I., 1962.  
"The kinetics and mechanisms of the descomposition of  
2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one." Acta Chem. Scand  
16: 135-141.

12. Campbell, B.C., McLean, D.L., Kinsey, M.G., Jones, K.C. y Dreyer, D.L., 1982. "Probing behavior of the greenbug (*S. graminum* biotype C) on resistant and susceptible varieties of sorghum." Ent. Exp. & Appl. 31: 140-146.
13. Campos, L. y Charlín, R., 1976. "Los pulgones de los cereales y su control." Boletín Agrícola Shell 3: 1-11.
14. Carrillo, R. y Zúñiga, E., 1974. "Clave para determinar las especies de áfidos (Homóptera: Aphidae) que se encuentran en cereales en Chile." Agro Sur 2(5): 86-87.
15. Carrillo, R. y Mellado, M.Z., 1975. "Efecto de la época de siembra y del áfido *Metopolophium dirhodum* (Walker) en el rendimiento de cultivares de trigo de primavera (*Triticum aestivum* L.)." Agricultura Técnica: 190-204.
16. Corcuera, L.J., Woodward, M.D., Helgeson, J.P., Kelman, A. y Upper, C.D., 1978. "2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one, an inhibitor from *Zea mays* with differential activity against soft rotting *Erwinia* species." Plant Physiol. 61: 791-795.
17. Couture, R.M., Routley, D.G. y Dunn, G.M., 1971. "Role of cyclic hydroxamic acids in monogenic resistance of maize to *Helminthosporium turcicum*." Physiol. Plant. Path. 1: 515-521.

18. CHILE, INIA 1971. Investigación Agropecuaria. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Santiago, Chile  
41: 388-390.
19. Dadd, R.H. y Krieger, D.L., 1967. "Continuous rearing of aphids of the *Aphids fabae* complex on steril synthetic diet." J. Econ. Entomol 60: 1512-1514.
20. Dabed, R.G., Toral, M.I., Corcuera, L.J., Niemeyer, H.M., 1983. "Complexes of bivalent cations with a hydroxamic acid from maize extracts." Polyhedron 2. (en prensa).
21. Dean, G.J., 1974. "Effect of temperature on the cereal aphids *Metopolophium dirhodum* (Walk), *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hem, Aphidae)." Bull. Ent. Res. 63, 401-409.
22. Dean, G.J., 1974. "The overwintering and abundance of cereal aphids". Ann App. Biol. 76: 1-7.
23. Elnaghy, M.A. y Linko, P., 1962. "The role of 4-O-glycosyl-2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one in resistance of wheat to stem rust". Physiol Plant. 15: 764-771.
24. Elnaghy, M.A. y Shaw, M., 1966. "Correlation between resistance to stem rust and the concentration glucoside in wheat". Nature, 210, 417.

25. Emden, H.F. van, 1972. Aphids as phytochemists . In Harborne, J.B. (ed.) "Phytochemical Ecology", pp. 25-44. Academic Press, London.
26. Etcheagaray, J., 1975. "Biología del pulgón del maíz, *Rhopalosiphum maidis*" (Homoptera: Aphidae). Ciencia e Investigación Agraria 2 N° 3-4: 195-205.
27. Farkas, G. y Kiraly, Z., 1962. "Role of phenolic compounds in the physiology of plant disease resistance". Phytopath. 44: 105-150.
28. Geissman, T.A. y Cronk, D.H.G., 1969. Organic chemistry of secondary plant metabolisms. Ed. Faeman, Cooper Co. USA.
29. Guerrero, M.A., Lamborot, Ch.L., 1979. Clave de campo para identificar cinco especies de áfidos. (Homóptera: Aphidae) de los cereales. Investigación Agrícola 5: 33-37.
30. González, R., Arretz, P. y Campos, L., 1973. Catálogo de las plagas agrícolas de Chile, Public. Cienc. Agrícol., Universidad de Chile, Facultad de Agronomía, Santiago N° 2. p. 68.
31. Gorz, H.J., Haskins, F.A., Dam, R. y Vogel, K.P., 1979. "Dhurrin in *Sorghastrum nutans* (L.). "Phytochemistry 18:2024.

32. Hamilton, R.H., 1964. "Metabolism of Herbicides. Tolerance of several grass species to 2-chloro-5-triazine herbicides in relation to degradation and content of Benzoxazinone derivatives". Agric. Food. Chem. 12: 1, 14-17.
33. Harborne, J.B., 1976. Phytochemical Methods. Ed. J.B. Harborne. Academic Press. London, New York.
34. Harborne, J.B., 1977. Introduction Ecological Biochemistry. Academic Press, London, New York.
35. Heathcote, G.D., 1970. "The abundance of grass aphids in Eastern England as shown by Sticky Trap Catches." Plant Path. 19: 87-90.
36. Hietala, P.K. y Virtanen, A.I., 1960. "Precursors of benzoxazolinone in rye plants II precursor I. the glucoside". Acta Chem. Scand. 14: 502.
37. Honkanen, E. y Virtanen, A.I., 1961. "On the reaction of 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one to 2(3)-benzoxazolinone." Acta Chem. Scand 15: 221-222.
38. Hofman, J. y Hofmanova, O., 1969. "1,4-benzoxazine derivatives in plants. Sephadex fraction and identification of a new glucoside". Eur. J. Biochem. 8: 109-112.



39. Hofman, J. y Masojidkova, M., 1974. "1,4-benzoxazine glucosides from *Zea mays*". Phytochemistry 12: 207-208.
40. Hofman, J. y Masojidkova, M., 1971. "1,4-benzoxazine derivatives in plants: Absence of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-one from *Zea mays* plants". Phytochemistry 10: 1441-1444.
41. Ingham, J.L., 1972. "Phytoalexins and other natural products as factors in plant resistance". Bot. Rev. 38: 343-424.
42. Janzen, D.H., Juster, H.B. y Bell, E.A., 1977. "Toxicity of secondary compounds to the seedling larvae of the Bruchid Beetle *Callosobruchus maculatus*". Phytochemistry 16: 223-227.
43. Klun, J.A. y Brindley, T.A., 1966. "Role of 6-methoxybenzoxazolinone in Inbred resistance of whost plant (maize) to first-brood larvae of European corn borer". J. of Econ. Entomol 59: 711-718.
44. Klun, J.A., Robinson, J.F., 1969. "Concentration of two-1,4-benzoxazinones in dent corn at various stages of development of the plant and its relation to resistance of the host plant to the European corn borer." J. Econ. Entomol. 62: 214-220.

45. Klun, J.A.; Tipton, C.L. y Brindley, T.A., 1967.  
"2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA),  
an active agent in the resistance of maize to the  
European corn borer". J. of Econ. Entomol. 60:  
1529-1533.
46. Knott, D.R. y Kumar, J., 1972. "Test of the relationship  
between a specific phenolic glucoside and stem rust  
resistance in wheat". Physiol. Plant. Path. 2:393-  
399.
47. Koyama, T., Yamotota, M. y Kubota, K. 1955.  
"Constituents of the root of *Coix lachryma* (jobi)".  
J. Pharm. Soc. Japan 76: 1077
48. Latteur, G., 1970. "Les pucerons des céréales". Revue  
d'Agriculture, 23, 1633-1646.
49. Latteur, G., 1971. "Evolution des populations aphidiennes  
sur froments d'hiber (Gembloux, 1970)". Revue d'  
Agriculture 24: 928-939.
50. Link, K.P. y Walker, J.C., 1933. "The isolation of  
catechol from pigmented onion scales and its significance  
in relation to disease resistance in onion". J. Biol.  
Chem. 100: 379-383.

51. Long, B.J., Dunn, G.M., Bowman, J.S. y Routley, D.G., 1977. "Relationship of hydroxamic acid content in corn and resistance to the corn leaf aphid". Crop. Sci. 17: 55-58.
52. Long, B.J., Dunn, G.M. y Routley, D.G., 1974. "Aphid procedure of estimating cyclic hydroxamate (DIMBOA) concentration in maize" (*Zea mays* L.) Crop. Sci. 14: 601-603.
53. Long, B.J., Dunn, G.M. y Routley, D.G., 1978. "Relationship of hydroxamate concentration in maize and field reaction to *Helminthosporium turcicum*" Crop. Sci. 18: 573-575.
54. Long, B.J., Dunn, G.M., 1975. "Relationship of hydroxamic acid content in maize and resistance of northern corn leaf blight". Crop. Sci. 15: 333-335.
55. Loomis, R.S., Beck, S.D. y Stauffer, J.F., 1957. "The European corn borer, *Pyrausta nubilalis* (Hubn) and its principal host plant resistance". Plant Physiol. 32: 5, 379-385.
56. Malmerg, A.G. y Theander, O., 1980. "Two phytoalexin glycosides from potato tubers infected with Phoma". Phytochemistry 19: 1739-1742.

57. McLean, D.L. y Weight, W.A., 1968. "An electronic measuring system to record aphid salivation and ingestion". Ann. Entomol. Soc. Amer. 61: 180-185.
58. McLean, D.L. y Kinsey, M.G., 1964. "A technique for electrically recording aphid feeding and salivation". Nature 202: 1358-1369.
59. McLean, D.L., 1970. "Probing behavior of the pea aphid V. The comparison of *Vicia faba*, *Pisum sativum* and chemically defined diet as food sources". Ann. Entomol. Soc. Anual. 64: 499-503.
60. Martin, J.T., 1964. "Role of cuticle in the defense against plant disease". Ann. Rev. Phytopath. 2, 81-100.
61. Miles, W.P., 1972. "The saliva of Hemiptera". Adv. Insect. Physiol 9: 183-255.
62. Mittler, T.E. y Dadd, R.H., 1963. "Studies on the artificial feeding of the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). I. Relative uptake of water and sucrose solutions". Insect Physiol. 9: 741-757.
63. Mittler, T.E. y Dadd, R.H., 1962. "Artificial feeding in rearing of the aphid *Myzus persicae* (Sulzer), on a completely defined synthetic diets". Nature: 195-404.

64. Mittler, T.E. y Dadd, R.H., 1965. "Diferences in the probing responses of *Myzus persicae* (Sulzer) elicited by different feeding solutions behind a parafilm membrane". Entomol. Exp. Appl. 8: 107-122.
65. Nault, L.R. y Styer, W.E., 1972. "Effects of sinigrin on host selection by aphids". Entom. Exp. App. 15: 423-437.
66. Neilands, J.B., 1967. "Hydroxamic acids in nature." Science 156: 1443-1446.
67. Neilands, J.B., 1981. "Microbiol iron compounds". Ann. Rev. Biochem. 50: 715-731.
68. Niemeyer, H.M., Corcuera, L.J. y Pérez, F.J., 1982. "Reaction of cyclic hydroxamic acid from Gramineae with thiols". Phytochemistry 21:2287-2289.
69. Niemeyer, H.M., Bravo, H.R., Peña, G.F. y Corcuera, L.J., 1981. "Decomposition of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one a hydroxamic acids". En "Chemistry and Biology of Hydroxamic Acids. H. Kehl, Ed. Karger, A.G., Basel. Switzerland.
70. Oswald, J.W. y Houston, B.R., 1951. "A new virus of cereals, Transmission by Aphids". Plant. Dis. Rep. 35: 471-475.

71. Queirolo, C.B., Andreo, C.S., Vallejos, R.H., Niemeyer, H.M. y Corcuera, L.J., 1981. "Effects of hydroxamic acids isolated from Gramineae on Adenosine 5'-triphosphate synthesis in chloroplasts". Plant. Physiol. 68: 941-943.
72. Royle, D.J., 1976. "Structural features of resistance to plant disease. In Biochemical Aspects of Plant-Parasite Relationships". Cap. 9, 161-191. Ed. J. Friend and D.R. Threlfall. Academic Press. London, New York.
73. Samuel, G., 1927. "On the shot-hole disease caused by *Clasterosporium carpophilum* and on the shot-hole effect". Ann. Bot. 41: 375-404.
74. Saunders, J.P., Conn, E.E., 1978. "Presence of the cyanogenic glucoside dhurrin isolated vacuoles from Sorghum". Plant Physiol. 61: 154-157.
75. Scism, P.J., Bemiller, J.N. y Caskey, A.L., 1974. "Determination of 2,4-dihidroxy-1,4(2H)-benzoxazin-3-one. Glucosides in Corn (*Zea mays* L.)." Anal. Biochem. 58: 1-13.

76. Smith, B.D., 1966. "Effect of the plant alkaloid sparteine on the distribution of the aphid *Acyrthosiphon spartu*" (Koch). Nature, London 212: 213-214.
77. Smith, T.A. y Best, G.R., 1978. "Distribution of Hordatines in Barley". Phytochemistry 17: 1093-1098.
78. Stoessl, R., 1967. "The antifungal factors in barley. IV. Isolation, structure and synthesis of hordatines". Can. J. Chem. 45: 1745-1760.
79. Struckmeyer, B.E., Breckman, C.H., Kuntz, J.E. y Riker, A.S., 1954. "Plugging of vessels by tyloses and gums in wilting oaks". Phytopath. 44: 148-153.
80. Tipton, C.L., Husted, R.R. y Tsao, F.H.C., 1971. "Catalysis of simazine hydrolysis by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one". J. Agric. Food. Chem. 19: 3, 484-486.
81. Tipton, C.L., Klun, J.A., Husted, R.R. y Pierson, M.D., 1967. "Cyclic hydroxamic acid and related compound from maize". Isolation and Characterization". Biochemistry 9: 2866-2870.

82. Tipton, C.L., y Buell, E.L., 1970. "Ferric iron complexes of hydroxamic acids from maize". Phytochemistry 9: 1215-1217.
83. Tollenaar, H. y Hepp, R., 1972. "Presencia del virus causante del enanismo amarillo en la cebada ("Barley yellow dwarf virus") en Chile". Agricultura Técnica (Chile) 32: 137-142.
84. Virtanen, A.I., Hietala, P.K y Wahlroos, O., 1957. "Antimicrobial substances in cereals and fooder plants". Arch. Biochem. Biophys. 69: 486-500.
85. Virtanen, A.I. y Hietala, P.K., 1960. "Precursors of benzoxazolinone in rye plants I. Precursors the aglycone." Acta Chem. Scand. 14: 499.
86. Virtanen, A.I. y Hietala, O.K., 1959. "On the structures of the precursors of benzoxazolinone in rye seedlings". II Suomen Kemistilehti B. 32, 138.
87. Virtanen, A.I. y Hietala, P.K., 1955. "2(3)-benzoxazinone. An antifusarium factor in rye seedlings". Acta Chem Scand 9: 1543.
88. Virtanen, A.I. y Wahlroos, O., 1956. "An antifungal factor in maize and wheat plants". Suomen Kemistilehti B 29, 143.



89. Wahlroos, O. y Virtanen, A.T., 1959. "The precursors of 6-methoxy-benzoxazolinone in maize and wheat plants their isolation and some of their properties". Acta Chem. Scand. 13: 1906.
90. Watt, A.D., 1979. "The effect of cereal growth stages on the reproductive activity of *Sitobion avenae* and *Metopolophium dirhodum*". Ann. Appl. Biol. 91: 147-157.
91. Wensler, R.J.D. (1962). Mode of host selection by an aphid. Nature. London 195: 810-831.
92. Whitney, N.J., Mortimore, C.G., 1961. "Effect of 6-methoxy-benzoxazolinone on the growth of *Xanthomas stewartii* (Erw. Smith), Dowson and its presence in sweet corn (*Zea mays* var. *Saccharata* Bailey)." Nature 189: 596-597.
93. Woodward, M.D., Corcuera, L.J., Helgeson, J.P. y Upper, C.D., 1978. "Decomposition of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3(4H)-one in aqueous solutions". Plant Physiol 61: 798-780.
94. Woodward, M.D., Corcuera, L.J., Schnoes, H.K., Helgeson, J.P. y Upper, C.D., 1979a. "Identification of 1,4-benzoxazin-3-ones in maize extracts by gas-liquid chromatography and mass spectrometry". Plant Physiol. 63: 9-13.

95. Woodward, M.D., Corcuera, L.J., Helgeson, J.P., Kelman, A., 1979b. "Quantitation of 1,4-benzoxazin-3-ones in maize by gas-liquid chromatography". Plant Physiol. 63: 14-19.
96. Wyatt, I.J., Brown, S.J., 1977. "The influence of light intensity, daylength and temperature on increase rates of four glasshouse aphids". J. Appl. Ecol. 14: 391-399.
97. Zúñiga, E., 1967. Lista preliminar de áfidos que atacan cultivos en Chile, sus huéspedes y sus enemigos naturales. Agricultura Técnica (Chile) 27: 165-177.