

PAPEL DEL ALCALOIDE INDOLICO GRAMINA EN LA DEFENSA DE LA
CEBADA CONTRA

Helicoverpa zea Y *Pseudomonas syringae*

Tesis entregada a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de Doctor en Ciencias
con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

BERNARDO ANTONIO SEPULVEDA HERNANDEZ

Mayo, 1988

Profesor patrocinante:
LUIS J. CORCUERA PEREZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

BERNARDO ANTONIO SEPULVEDA HERNANDEZ

ha sido aprobada por la Comisión informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología en el exámen de Defensa de Tesis rendido el

Patrocinante de Tesis
Dr. Luis Corcuera P.

Comisión Informante de Tesis
Dra. Liliana Cardemil O.

Dr. Mariano Castillo V.

Dra. Luz María Pérez R.

Dr. Italo Serey E.

.....

.....

.....




AGRADECIMIENTOS

Se agradece a:

Los miembros del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias (Universidad de Chile), que aportaron a la realización de este trabajo.

Al señor Hernán Miranda, de la Fac. de Ciencias, por su asesoría y consejos en el aspecto estadístico.

Al Sr. Orlando Paratori, jefe del Proyecto Maíz del INIA (Santiago), por permitir la obtención de muestras de larvas durante varios años.

Al CEFOTI (Rosario, Argentina) por la base de conocimientos entregada.

A Luis Corcuera (tutor de tesis), Luz María Pérez y Gustavo Zúñiga, por su dedicada ayuda en la corrección de la tesis.

A Claudio González (Fac. de Ciencias, Lab. de Espectroscopía) y familia, por su amistad y por su ayuda.

A los que me permitieron compartir un camino fraternal; a mi papá, mamá, hermana y hermano. Por lo que hicieron sin pedir nada a cambio, por lo que no saben que hicieron y por lo que no tenían porque haber hecho.

"Si el ser humano es un producto de las circunstancias, tendremos que humanizar las circunstancias"

Espero que el esfuerzo haya valido la pena.

Toño.

Esta tesis fue realizada en el
Laboratorio de Fisiología Vegetal
de la Facultad de Ciencias de la
Universidad de Chile, bajo la
dirección del profesor
Dr. Luis Corcuera P.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	001
Efecto de la presencia de gramina en cebada sobre <u>Helicoverpa zea</u>	001
Efecto de la gramina sobre <u>Pseudomonas syringae</u>	002
Modo de acción de la gramina.....	003
ABSTRACT.....	005
Effect of the presence of gramine in barley on <u>Helicoverpa zea</u>	005
Effect of the presence of gramine in barley on <u>Pseudomonas syringae</u>	005
Mechanism of action of gramine.....	006
1. INTRODUCCION.....	008
1.1. Agentes fitófagos y fitopatógenos.....	008
1.2. Mecanismos defensivos naturales de las plantas..	011
1.2.1. Acción aleloquímica de metabolitos secundarios de gramineas.....	012
1.2.2. Papel de algunos alcaloides en la interacción entre plantas y herbivoros.....	017
1.2.3. Capacidad degustativa en insectos.....	022
1.2.4. Hipótesis.....	024
2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	025
3. MATERIALES Y METODOS.....	026
3.1. Reproducción y crianza de <u>H. zea</u> en el laboratorio.....	026

3.2. Alimentación de <u>H. zea</u> con dietas que contienen gramina.....	028
3.2.1. Ensayo de elección de dietas artificiales...	028
3.2.2. Ensayo de elección de variedades de cebada...	032
3.2.3. Ensayo de toxicidad.....	034
3.3. Variedades de cebada.....	035
3.4. Cuantificación de gramina.....	036
3.5. Cuantificación de clorofila.....	038
3.6. Crecimiento poblacional de <u>P. syringae</u>	039
3.7. Inóculo bacteriano.....	041
3.8. Prueba de fitopatogenicidad.....	041
3.9. Determinación de proteína.....	044
3.10. Curvas de crecimiento bacteriano.....	045
3.11. Concentración de gramina en relación al crecimiento bacteriano.....	046
3.12. Localización de gramina en cultivos bacterianos...	047
3.13. Respiración bacteriana.....	049
3.14. Cuantificación de fosfato en bacterias.....	050
3.15. Determinación de betaina.....	052
4. RESULTADOS.....	053
4.1. Reproducción y crianza de <u>H. zea</u>	053
4.2. Ensayo de elección de dieta por larvas de <u>H. zea</u> ..	055
4.3. Ensayo de toxicidad con <u>H. zea</u>	058
4.4. Efectos de la gramina sobre <u>P. syringae</u>	063
4.4.1. Efecto de la gramina sobre el crecimiento poblacional de <u>P. syringae</u>	063

4.4.2. Concentración y localización de la gramina en los cultivos bacterianos.....	069
4.4.3. Efecto fitopatogénico de <u>P. syringae</u> sobre cebada.....	073
4.4.4. Efectos de la gramina sobre la respiración bacteriana.....	080
4.5. Modo de acción de la gramina.....	087
4.5.1. Efecto de la betaina sobre <u>P. syringae</u> ...	090
4.5.2. Efecto del 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) sobre <u>P. syringae</u>	096
4.5.3. Efecto del NH_4Cl sobre <u>P. syringae</u>	101
4.5.4. Sitio de acción de la gramina en <u>P. syringae</u> ...	105
4.5.4.1. Acción del NADH sobre el efecto inhibitorio de la gramina.....	105
4.5.4.2. Acción del succinato sobre <u>P. syringae</u> ...	108
5. DISCUSION.....	112
5.1. Crianza de <u>H. zea</u>	112
5.2. Efecto de la gramina sobre <u>H. zea</u>	112
5.3. Acción de la gramina y otros compuestos sobre <u>P. syringae</u>	122
5.4. Mecanismo de acción de la gramina.....	127
5.5. Consideraciones generales.....	134
6. CONCLUSIONES.....	138
BIBLIOGRAFIA.....	139

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1:	Compuestos presentes en algunas gramíneas.....	014
FIGURA 2:	Ciclo de crianza de <u>H. zea</u>	027
FIGURA 3:	Elección de dietas artificiales por larvas de <u>H. zea</u>	029
FIGURA 4:	Elección de variedades de cebada por larvas de <u>H. zea</u>	033
FIGURA 5:	Ciclo de vida de <u>H. zea</u>	054
FIGURA 6:	Efecto de la gramina en la elección de dieta artificial por <u>H. zea</u>	056
FIGURA 7:	Efecto de la gramina en dietas en el peso de larvas de <u>H. zea</u>	062
FIGURA 8:	Efecto de la gramina en el crecimiento poblacional de <u>P. syringae</u>	064
FIGURA 9:	Tiempo de inicio de la fase de crecimiento proporcional en cultivos de <u>P. syringae</u>	066
FIGURA 10:	Efecto de la gramina en la densidad poblacional en la fase de crecimiento estacionario de <u>P. syringae</u>	067
FIGURA 11:	Efecto del crecimiento poblacional de <u>P. syringae</u> sobre la concentración de gramina en medio de cultivo.....	070
FIGURA 12:	Correlación entre el contenido de gramina en cebada sobre el daño producido por <u>P. syringae</u>	075

FIGURA 13:	Correlación entre el contenido de gramina en cebada y el contenido de clorofila en discos de hoja atacados por <u>P. syringae</u> ...	077
FIGURA 14:	Efecto de la gramina sobre la respiración bacteriana.....	082
FIGURA 15:	Acción del ADP sobre el efecto de la gramina en <u>P. syringae</u>	084
FIGURA 16:	Efecto de la gramina sobre la respiración bacteriana en presencia de ADP.....	086
FIGURA 17:	Efecto de la gramina en el consumo de fosfato por bacterias.....	088
FIGURA 18:	Efecto de la betaína sobre la cinética de crecimiento poblacional de <u>P. syringae</u>	091
FIGURA 19:	Efecto del 2,4 - dinitrofenol sobre la cinética de crecimiento de <u>P. syringae</u> ...	097
FIGURA 20:	Efecto del 2,4 - dinitrofenol sobre la respiración bacteriana.....	100
FIGURA 21:	Efecto del NH_4Cl en el crecimiento poblacional de <u>P. syringae</u>	102
FIGURA 22:	Efecto de la gramina sobre la respiración bacteriana en presencia de NH_4Cl	103
FIGURA 23:	Esquema del sistema respiratorio en membranas bacterianas.....	106
FIGURA 24:	Efecto del NADH sobre la acción de la gramina en la respiración bacteriana.....	107

FIGURA 25: Efecto del succinato sobre la acción de la gramina en la respiración bacteriana.....	109
FIGURA 26: Efecto de la gramina sobre la respiración bacteriana en presencia de succinato.....	110
FIGURA 27: Esquema del sistema respiratorio en membranas bacterianas y proposición teórica de la acción de la gramina.....	129

INDICE DE TABLAS

TABLA 1:	Efecto de la gramina en la elección de variedades de cebada por <u>H. zea</u>	057
TABLA 2:	Efecto de la gramina en el ciclo de vida de <u>H. zea</u>	059
TABLA 3:	Efecto de la gramina en la ingestión y defecación de dieta en <u>H. zea</u>	061
TABLA 4:	Efecto de la gramina en la recuperación de cultivos de <u>P. syringae</u>	068
TABLA 5:	Contenido de gramina en cultivos bacterianos.....	072
TABLA 6:	Efecto de la betaína en la acción de distintos compuestos sobre la tasa respiratoria de <u>P. syringae</u>	092
TABLA 7:	Efecto de la betaína en la acción de la gramina sobre la tasa respiratoria de <u>P. syringae</u>	094
TABLA 8:	Efecto de la betaína en la acción del 2,4-dinitrofenol sobre la tasa respiratoria de <u>P. syringae</u>	095
TABLA 9:	Efecto del 2,4 - dinitrofenol en la recuperación de cultivos de <u>P. syringae</u>	098
TABLA 10:	Metabolitos de plantas que presentan actividad sobre insectos.....	117

RESUMENEfecto de la presencia de gramina en cebada sobreHelicoverpa zea.

Los alcaloides indólicos pueden constituir parte del mecanismo de defensa de algunas gramíneas contra herbívoros e insectos. Uno de los propósitos de esta tesis fue determinar si la gramina constituye una defensa natural de la cebada (Hordeum vulgare) contra el fitofago H. zea.

A larvas de H. zea se dió la alternativa de alimentarse en dietas normal o conteniendo gramina. Tanto en la dieta artificial como natural las larvas prefirieron alimentarse en la dieta control, donde no estaba presente la gramina, y más claramente en ésta última, a medida que aumentaba el contenido de gramina en la dieta alternativa.

Cuando las larvas de H. zea sólo se alimentaron con dieta artificial conteniendo una concentración dada de gramina, las larvas ingirieron y defecaron más rápidamente, que cuando se alimentaron con la dieta control. Además, la ganancia de peso fue mayor y se aceleró levemente la pupación en la larvas alimentadas con gramina. No hubo diferencias significativas de tiempo de vida de las larvas entre los tratamientos.

Efecto de la gramina sobre Pseudomonas syringae.

Un segundo objetivo es estudiar el efecto de la gramina, como defensa natural de la cebada (H. vulgare), contra el fitopatógeno bacteriano P. syringae. La gramina, en el medio de cultivo, retardó el crecimiento poblacional de P. syringae por prolongación de la fase de latencia. Además los cultivos no alcanzaron el tamaño poblacional máximo del control. Bacterias provenientes de cada tratamientos crecieron normalmente al ser traspasadas a un medio de cultivo libre del compuestos en ensayo. Estos resultados indican que el alcaloide ejerce un efecto bacterioestático. Se estudió la capacidad fitopatogénica de P. syringae en función de la gramina en las hojas de variedades de cebada. La bacteria atacó en menor grado discos de hoja de una cebada con gramina que a los de la variedad sin gramina (F. Unión). Lo anterior, y el efecto de la gramina en el crecimiento bacteriano, indican que la gramina sería un factor de defensa contra la penetración de bacterias a la planta por heridas. Contrariamente, P. syringae aumentó el daño en discos de hoja de cebada a la cual se le indujo un aumento de betaína en sus tejidos. La betaína incorporada al medio aumentó el tamaño máximo de poblaciones bacterianas por sobre el control. Se concluye que la betaína tiene un efecto potenciador del crecimiento y, por lo tanto, del ataque de P. syringae al tejido vegetal.

Modo de acción de la gramina.

Se estudió el efecto de la gramina sobre la respiración de P. syringae, comparándolo con los efectos de otros compuestos. Bajas concentraciones de gramina aceleraron la tasa respiratoria basal bacteriana y sobre los 2 mM ésta fue inhibida.

Se estudió la acción de la betaina sobre la gramina y el desacoplante 2,4-DNP. Se vió que solamente el efecto inhibitorio de la gramina fue revertido. Estos resultados indican que la gramina tiene un mecanismo diferente al de un desacoplante.

La gramina tuvo un efecto inhibitorio rápido sobre el transporte acoplado, o dependiente de ADP, y sobre el consumo de fosfato inorgánico por las bacterias. Pero, el agregado de ADP al medio revertió en un 77 % la inhibición por 5 mM de gramina. También el succinato pudo revertir la inhibición por gramina en 33,3 %. Ni el NADH ni el amonio modificaron la acción de la gramina. Estos resultados indican que la gramina afecta a ATPsintetasa de la membrana. Por otra parte, considerando que el succinato entrega electrones inmediatamente después del NADH, se podría postular que la gramina podría actuar también sobre la cadena respiratoria de P. syringae.

En esta tesis se concluye que la gramina, entre otros compuestos, puede ser responsable de la resistencia de la cebada contra el ataque de H. zea y P. syringae. Se

concluye, además, que la betaina es un potenciador del ataque de la bacteria a la cebada.

ABSTRACTEffect of the presence of gramine in barley onHelicoverpa zea.

Indolic alkaloids could be part of the defense mechanism of some gramineae against herbivorous and insects. One of the aim of this thesis is to determinate if gramine is a natural defense of barley (Hordeum vulgare) against the phytophagous H. zea.

To H. zea larvae the options of feeding on normal diets or containing gramine were done. In both artificial and natural diets larvae preferred to feed on the control diet with the increasing of gramine in the alternative diet.

H. zea larvae were fed with diets containing a unic gramine concentration. Larvae ingested and defecated faster than the control larvae group. Moreover, the weight gain was faster in the larvae fed with gramine-diet, increasing gently the pupation. There was no significative difference in life time of the larvae state between treatments.

Effect of the presence of gramine in barley onPseudomonas syringae.

Other aim of this thesis is to study gramine as natural defense of barley against the bacterial phytopathogenous P. syringae. Gramine delayed the bacterial growth by

prolongation of the lag growing fase. Moreover, the bacterial gramine-afected cultures did not reach the final maximum population growth of the control. Bacteriae from different gramine-treatments had normal population growth in the culture media without the assay compound. These results are indicating that gramine exert a bacteriostatic effect.

The phytopathogenicity of P. syringae was correlated with the gramine content in the barley leaves. The bacteria attacked leaf discs of gramine-containing barley cultivars in minor extent than the discs whithout gramine (barley cv. F. Union). The previous results, and the effects of gramine on the bacterial growth, it made suggest that gramine could act as a defensive factor against the bacteria when it penetrate through wounded tissue. On the contrary, the bacterial attack increased in barley leaves discs from plants induced to increase their betaine content. Betaine included in culture media increased the maximal size of the bacterial population. It could be concluded that betaine had an elicitory effect on the bacterial growth, and then on its phytopathogenicity on barley tissue.

Mechanism of action of gramine.

The effect of gramine on the P. syringae respiration was studied, confronting it with the effects of other compounds. Low concentrations of gramine increased the

respiratory basal rate of P. syringae, and inhibited it over 2 mM.

The action of betaine on the gramine and the uncoupler 2,4-DNP effects were studied. Only the inhibition caused by gramine was reverted by betaine. This result indicate that gramine has an mechanism different from the uncoupler.

Gramine had a rapid inhibitory effect on the coupled transport (ADP-dependent) and on the consumption of phosphate by bacteria. However, ADP addition to the culture medium reverted the inhibitory effect of 5 mM gramine in 76 %. On the other hand, succinate reverted gramine inhibition in 33,3 %. Neither NADH nor NH_4Cl modified the effect of gramine. These results indicate that gramine affected the ATPsynthase. Considering that succinate is an electron donnor immediately after the NADH, it could be assumed then, that gramine would act as an inhibitor on the first part of the respiration chain of P. syringae too.

In this thesis it can be concluded that gramine, among other compounds, has a protective role on barley against H. zea and P. syringae. On the other hand, betaine has an elicitory effect on the bacterial attack development.

1. INTRODUCCION

1.1. Agentes fitófagos y fitopatógenos.

En plantas, una enfermedad se ha definido como cualquier disturbio producido por un patógeno o un factor ambiental que interfiere con el metabolismo de la planta (Agrios, 1978). Los estados anormales en una planta pueden ser provocado por diversos agentes, entre los cuales se encuentra a fitófagos y a fitopatógenos.

Los fitófagos, sin ser directamente patógenos, pueden actuar destruyendo el tejido vegetal haciendo que se altere el funcionamiento normal de la planta. Lo anterior favorecería el ingreso de agentes fitopatógenos al tejido vegetal. Además del mecanismo anterior, los agentes fitófagos podrían ser vectores de agentes fitopatógenos (Vakili et al, 1966; Harris y Maramorosh, 1982).

Entre los agentes fitófagos, las especies de la familia Noctuidae entre otras, conforman un grupo de lepidópteros nocturnos que tienen un estado larval, de hábitos fitófagos, descrito como una plaga destructora para una gran variedad de plantas cultivadas, entre ellas el algodón (Zummo et al, 1984), el poroto de soya (Smith y Bass, 1971), maíz (Benett y Josephson, 1962; Hardwick, 1965; Josephson et al, 1966; Angulo y Weigert, 1975; Linduska y Harrison, 1977; Scott, 1977) y tomate (Kennedy, 1984). Así,

según la literatura, las especies de la familia Noctuidae no muestran especificidad por algún hospedador, pudiendo calificarse como holófagos altamente destructores (Hardwick, 1965; Angulo y Weigert, 1975). Al analizar la composición de especies de la familia Noctuidae en campos de maíz, se encontró que existía una predominancia clara de una especie de esta familia, la cual corresponde a Helicoverpa zea (Boddie) según la clave de Angulo y Weigert (1975). Para esta especie Angulo y Weigert (1975) describen una gran cantidad de hospedadores, dentro de los cuales se encuentra a algunos de gran importancia comercial como tabaco, frutillas, frejoles, hortalizas, frutales, papas y, entre las gramíneas, sorgo, maíz, avena, arroz, centeno y trigo. Estos antecedentes indican que H. zea constituye una plaga de importancia económica.

Lo anterior, probablemente, pudo ser el motivo por el cual esta especie, de entre otras, ha sido estudiada para ser criada en laboratorio (Benett y Josephson, 1962; Callahan, 1962). Este hecho ha permitido usarla como organismo para ensayos diversos, como efectos ambientales sobre su ciclo de vida y ensayos de compuestos vegetales diversos (Jermy, 1968; Fye y Surber, 1971; Chan et al, 1978; Elliger et al, 1980; Isman, 1983; Kubo et al, 1983; Kennedy, 1984).

Entre los agentes fitopatógenos se encuentran algunas especies de la familia Pseudomonadaceae, las cuales se han informado como patógenos de una gran variedad de plantas.

Se han descrito varias especies del genero Pseudomonas basándose en el hospedador en que se ha encontrado la cepa. Al respecto, Dudoroff y Palleroni (1974) indican que el nombre P. syringae van Hall englobaría a 37 otros nombres específicos, atribuidos a cepas fitopatógenas, en calidad de sinonimia, biotipo, patotipo o variedades. Entre los nombres subordinados se puede mencionar a P. avenae, P. nectarophyla, P. phaseolicola, P. tabaci, P. tomato y P. glycinea (Dudoroff y Palleroni, 1974).

Complementando la información anterior, la literatura indica que algunas especies del género Pseudomonas constituyen un factor de daño para especies de plantas de producción como hortalizas, tabaco, manzano, poroto de soya y otras leguminosas, tomate, papa y algunas gramíneas como la avena (Chamberlain, 1956; Nielsen, 1956; Smith y Ramsey, 1956; Lai y Watson, 1973; Dudoroff y Palleroni, 1974; Ritchie y Klos, 1974).

Las especies fitopatógenas del género Pseudomonas, en general, producen una pústula en el lugar de penetración (Chamberlain, 1956a, 1956b; Smith y Ramsey, 1956; Lownsbery et al, 1972; Lai y Watson, 1973; Agrios, 1978). Las bacterias penetran por los vasos conductores xilemáticos (Nelson y Dickey, 1966; Dickey y Nelson, 1967), produciendo clorosis en tejidos adyacentes por destrucción de las células parenquimáticas (Hussain y Kelman, 1956; Nelson y Dickey, 1967). Además, la bacteria P. syringae, siendo una

especie facultativa y estando presente en el ambiente (Dudoroff y Palleroni, 1974; Fac. de Agronomía, 1980; Kahn, 1982), puede provocar necrosis en plántulas y plantas de especies cultivadas (Nielsen, 1956; Pepin et al, 1967; Lownsbery et al, 1972; Ritchie y Klos, 1974; Agrios, 1978). Tanto los hospedadores como las formas de penetración y de acción dentro de tejidos vegetales hacen que esta especie se considere un fitopatógeno importante de ser estudiado en sus aspectos relacionados con la resistencia de las plantas a su ataque. En este plano se ha encontrado que en plantas no hospedadoras ha ocurrido una abrupta inhibición del crecimiento de especies del genero Pseudomonas, el cual se ha relacionado con una reacción de hipersensibilidad de las células del hospedador (Klement et al, 1964).

1.2. Mecanismos defensivos naturales de las plantas.

Las plantas pueden presentar diversos mecanismos de defensa en contra de ataques de distintos agentes. Éstos pueden ser estructurales externos (cutículas, pelos) o internos (capas de corcho producidas por células dentro de tejidos). Otras defensas son de carácter fisiológico como la defensa por reacción citoplasmática y de hipersensibilidad con necrosis celular (Agrios, 1978) y por metabolitos secundarios presentes en el tejido vegetal (Fraenkel, 1959; 1969; Whittaker y Feeny, 1973; Robinson, 1974; Swain, 1977; Bell, 1981).

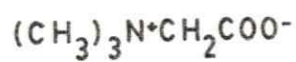
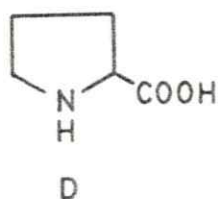
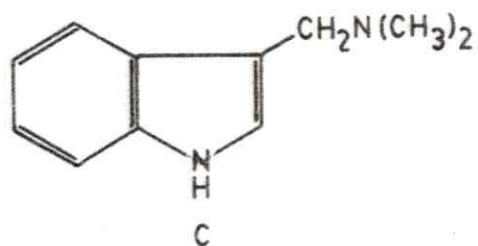
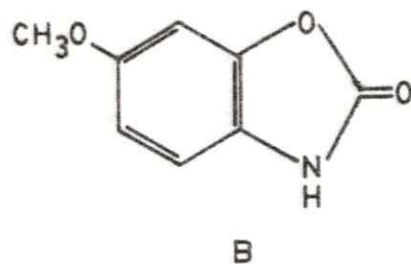
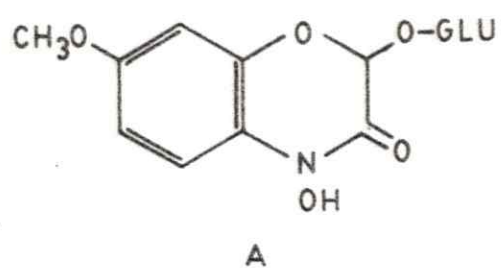
Las sustancias tóxicas que se acumulan en las plantas se habrían seleccionado y perpetuado debido a que su toxicidad y su acción repelente frente a herbívoros (insectos y mamíferos mayores) le ha dado ventaja a las plantas mutantes productoras de estos compuestos (Culvenor, 1973). Estos compuestos, al ejercer sus efectos nocivos, actuarían como un tipo de defensa pasiva (Fraenkel, 1959, 1969; Swain, 1977; Whittaker y Feeny, 1971; Bell, 1981). Entre los compuestos con las actividades mencionadas están los ácidos fenólicos, flavonoides, terpenoides, esteroides (Whittaker y Feeny, 1971; Elliger et al, 1980; Kennedy, 1984; Zummo, 1984), ácidos hidroxámicos (Corcuera, 1985) y alcaloides (Whittaker y Feeny, 1971; Mears y Mabry, 1971; Culvenor, 1973; Marten et al, 1981).

1.2.1. Acción aleloquímica de algunos metabolitos secundarios de gramíneas.

Las larvas deben enfrentarse, entre otros controles naturales, a la presencia de compuestos de diverso tipo en su sustrato alimenticio. Por ejemplo, se ha comprobado que la presencia de fitoecdisteroides en plantas, compuesto ampliamente distribuido, inhibe el crecimiento larval del lepidóptero Pectinophora gossypiella, por efecto hormonal simulado sobre el proceso de écdisis (Kubo et al, 1983). Además, se ha registrado que los "pelos" (estilos de la

infrutescencia o "champa") de algunos híbridos de maíz presentan características antialimenticias o repelentes, pudiendo llegar a ser letales para H. zea (Josephson et al, 1966; Widstrom et al, 1977). Se ha identificado una glicosilflavona que produce la inhibición del desarrollo de larvas de esta especie (Elliger et al, 1980), al igual que la acumulación de taninos y terpenoides en algodón (Zummo et al, 1984). La 2-tridecanona presente en variedades de tomate, tienen una acción protectora por toxicidad contra Manduca sexta y Leptinoptarsa decemlineata; H. zea es capaz de recuperarse del efecto de este compuesto, e incluso de desarrollar mecanismos de detoxificación para éste y otros compuestos como insecticidas (Kennedy, 1984).

En algunas gramíneas se ha descrito la existencia de ácidos hidroxámicos (figura 1) y derivados, los cuales protegen al trigo, maíz, centeno y triticale (híbrido entre trigo y cebada) contra el ataque de insectos y patógenos (Argandoña et al, 1980; Zúñiga et al, 1983; Argandoña et al, 1983; Corcuera et al, 1985). Se ha aislado de extractos de gramíneas compuestos con estructuras como la 6-metoxi-benzoxazolinona (MBOA), la 2(3)-benzoxazolinona (BOA) (Koyama et al, 1955; Virtanen y Hietala, 1955). Posteriormente se encontró que las benzoxazolinonas mencionadas corresponden a productos de descomposición de ácidos hidroxámicos como el 2 (4 - dihidroxi- 7 - metoxy- 1,4 - benzoxazin- 3 - ona-B-D - glucopiranosido (DIMBOA



E

FIGURA 1: Compuestos presentes en algunas gramíneas
 A = DIMBOA - glucósido, B = MBOA, C = gramina, D =
 prolina, E = glicil-betaína.

glucósido, figura 1) y el 2 (2,4 -dihidroxi- 1,4 -benzoxazin- 3 -ona) glucopiranosido (DIBOA glucósido) (Virtanen y Hietala, 1959; Wahloos y Virtanen, 1959; Hietala y Virtanen, 1960). El glucósido correspondería a los compuestos en las células vegetales, el cual se hidroliza enzimáticamente cuando el tejido es dañado (Virtanen y Hietala, 1960).

Se ha encontrado que los ácidos hidroxámicos y sus derivados, pueden tener un papel importante en la resistencia de gramíneas al ataque de agentes como hongos y bacterias (Virtanen y Hietala, 1955; Virtanen et al, 1957; Whitney y Mortimore, 1961). Así, estudiando el efecto de algunos de los compuestos mencionados sobre insectos se encontró que las benzoxazolinonas, encontradas en extractos de maiz, inhiben el crecimiento de Blatella germanica (Virtanen et al, 1957). Por otra parte se encontró que el DIMBOA era el compuesto responsable del principal efecto inhibitorio del crecimiento de larvas y de la pupación del taladrador del maiz Ostrinia nubilalis (Beck y Swisman, 1957; Beck y Stauffer, 1957; Beck y Swisman, 1961; Klun et al, 1967; Klun y Robinson, 1969).

En las hojas de las gramíneas ya mencionadas, como maiz, trigo y centeno se han encontrado DIBOA y DIMBOA cuyas concentraciones en las plantas varía con la estación del año y el estado de crecimiento. Así, la concentración de estos compuestos es mayor durante la temporada de verano y,

en el caso del trigo, máxima a los cuatro días después de la germinación (Zúñiga et al, 1983). El DIMBOA, el principal ácido hidroxámico encontrado en extractos de hojas de maíz y trigo, aumentó la mortalidad del áfido Schizaphis graminum cuando este se alimentó con dietas artificiales. El DIMBOA tuvo también, efectos repelentes a la concentración de 1 mM, y sobre los 12 mM la alimentación de los áfidos fue completamente inhibida. Estas observaciones permitieron postular que los efectos del DIMBOA y del DIMBOA glucósido son importantes para la resistencia de gramíneas contra áfidos (Argandoña et al, 1983; Corcuera et al, 1985).

Los ácidos hidroxámicos, por otra parte, están compartimentalizados en los distintos tejidos de las hojas de trigo, encontrándose mayor concentración en los haces vasculares (cerca de un 50 % del total) que en las células del mesófilo, y no fueron detectados en la epidermis de las hojas ni en el exudado xilemático (Argandoña et al, 1987, en prensa). Habiéndose determinado que el áfido Schizaphis graminum (biotipo c) se alimenta preferentemente en los haces vasculares (Campbell et al, 1982) y considerando que los ácidos hidroxámicos se encuentran en las células del mesófilo y en los haces vasculares, se hace probable que los áfidos ingieran estos compuestos desde las hojas de las gramíneas mencionadas anteriormente. Luego, los ácidos hidroxámicos constituirían una defensa natural contra

áfidos en maíz, trigo y centeno (Argandoña et al, 1987, en prensa).

Otros compuestos no alcaloideos importantes en las interacciones planta-patógenos son la betaína y la prolina (figura 1), compuestos que se sintetizan en algunas gramíneas y se acumulan en las hojas como respuesta al estrés hídrico, salino y térmico (Hanson, 1980; Hitz et al, 1982; Grieve y Maas, 1984). La betaína en especial se acumula en las hojas de especies de gramíneas especialmente de la tribu Hordeae (Culvenor, 1973; Tan y Hallorand, 1982; Riazi et al, 1985). Se ha encontrado que la betaína aumenta la susceptibilidad de las plantas a insectos, incrementando el índice de reproducción de áfidos tanto en dietas artificiales suplementadas con estos compuestos, como en plantas de cebada sometidas a estrés hídrico; y se ha visto que disminuye los efectos tóxicos del alcaloide indólico gramina sobre áfidos de los cereales (Zúñiga y Corcuera, 1987).

Por su parte, se ha publicado que la prolina estimula la herbivoría de alguno ortópteros sobre gramíneas (Haglun, 1980).

1.2.2. Papel de algunos alcaloides en la interacción entre plantas y herbívoros.

Los alcaloides se han encontrado, principalmente, en dicotiledóneas y en gramíneas (monocotiledóneas)

preferentemente anuales y parece probable que su diversidad estructural sea un resultado de la coevolución con mamíferos herbívoros (Swain, 1977). Los alcaloides pueden encontrarse en diversos tejidos vegetales, tales como en hojas, bulbos, raíces, tejidos en crecimiento, etc., y el sitio de almacenamiento en la planta parece implicar un papel de defensa química para ésta.

Se ha publicado que algunos alcaloides se pueden encontrar en las células de tejidos más externos; tal es el caso de la nicotina en el tabaco, la cual se encuentra en altas concentraciones en la epidermis (McKey, 1974). Es importante también, indicar que este tipo de compuestos se encontraría compartimentalizado en vacuolas, lo que evitaría que se produjeran fenómenos de autotoxicidad. La presencia de los alcaloides en las condiciones anteriores puede ser parte del mecanismo de hipersensibilidad del tejido vegetal, ya que al romperse este se liberarían los compuestos de las células hacia el exterior, constituyendo un mecanismo defensivo (Agrios, 1978).

En general, a los alcaloides se les ha atribuido una actividad antiherbívora y un importante papel como agentes aleloquímicos con efectos tóxicos y repelentes, protegiendo a las plantas contra el ataque de insectos y agentes patógenos como hongos y bacterias (Fraenkel, 1969; Whittaker y Feeny, 1971). Por ejemplo la nicotina ejerce una acción específicamente insecticida, y algunos

alcaloides de la papa son repelentes para algunos coleopteros (Fraenkel, 1959; Robinson, 1974).

Segun Culvenor (1973), los alcaloides son compuestos poco comunes en gramíneas; pero, en algunas de ellas se acumulan derivados de la triptamina o alcaloides indólicos, de los cuales es de particular interes la gramina o N,N-dimetiltriptamina (figura 1).

El contenido de alcaloides puede variar segun diversos factores que influyen en la planta. Algunos autores indican que la concentración es mayor en plantas nuevas y en tejidos meristemáticos, decayendo con la edad de la planta y con la maduración de los tejidos (McKey, 1974; Robinson, 1974; Barnes et al, 1971). Otros autores encontraron que existía un patron repetitivo del contenido de gramina en plantas de Hordeum (cebada) desarrolladas en diferentes condiciones, postulándose un control ambiental y un posible control genético de la concentración del alcaloide (Hanson et al, 1981).

Así, se ha encontrado que la concentración y producción de alcaloides derivados de la triptamina en Phalaris tuberosa aumentan con la temperatura y también con el nivel relativo de nitrato en el medio. En el primer caso el aumento del alcaloide se produce independientemente a las condiciones de luminosidad y en el segundo caso ocurre principalmente en condiciones de iluminación (Moore et al, 1967).

El alcaloide indólico gramina se aisló de Hordeum vulgare (cebada) y se informó como un nuevo alcaloide indólico en

el año 1935 (Von Euler y Erdtmann, 1935). Este alcaloide se acumula en las hojas de plántulas de la cebada y se ha detectado en especies del genero Hordeum y Phalaris y en otras como Arundo donax (Moore et al, 1967; Culvenor, 1973; Leete, 1975; Woods et al, 1979; Ghini, 1982; Mulvena y Slaytor, 1983). Otros autores han encontrado que la gramina se acumula en las hojas de variedades de cebada en condiciones de alta temperatura y dependiendo del genotipo de la variedad vegetal (Hanson et al, 1983). Además se propone en trabajos anteriores, que el efecto de las condiciones ambientales sobre el nivel de la gramina, y la tendencia de algunos genotipos de presentar altos contenidos de este alcaloide en regiones cálidas, implica que su acumulación podría ser una respuesta metabólica adaptativa a las altas temperaturas (Hanson et al, 1981). La concentración de la gramina depende también de la edad de la planta. Así, se ha determinado que Hordeum vulgare y Phalaris arundinaceae muestran una concentración máxima del alcaloide a los 8 y 7 días después de la germinación, respectivamente, para luego declinar (Hanson et al, 1981; Mulvena y Slaytor, 1983).

De los alcaloides conocidos, solo los indólicos han mostrado ser tóxicos en pastos bajo condiciones de campo (Culvenor, 1973). Al estudiarse la toxicidad de Phalaris arundinacea hacia ganado ovino, se encontró que al ser consumido como forraje se produce una grave enfermedad en

los animales caracterizada por colapsos repentinos y posterior muerte. El síntoma principal son desordenes neurológicos a los que, sumados a otros síntomas, se les llamo "síndrome de Phalaris" (Gallagher et al, 1964).

Se encontró que los síntomas observados en las ovejas se correlacionaron bien con la administración de los alcaloides indólicos 5-metoxidimetiltriptamina, 5-hidroxidimetil triptamina y la dimetiltriptamina (gramina), postulándose que los alcaloides indólicos dimetilados son los principales factores tóxicos presentes en Phalaris tuberosa (Gallagher, 1964). Otros autores, trabajando en Phalaris arundinacea, también encontraron una correlación inversa entre el contenido de alcaloides indólicos y la palatabilidad del forraje para los animales (Barnes et al, 1971; Marten et al, 1973; 1981).

Estudiando el efecto de alcaloides indólicos sobre insectos, se encontró que las bases indólicas N-metiltriptamina, 5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina, 3-N,N dimetil aminometilindol (gramina) y el 5-metoxitriptamina disminuyen la sobrevivencia de ninfas de los áfidos R. maidis y S. graminum después de 48 horas de alimentación en una dieta sintética. La gramina, también, disminuyó la sobrevivencia del áfido S. graminum en el mismo tiempo de alimentación. Los compuestos probados mostraron tener actividad repelente sobre los áfidos a concentraciones tan bajas como 0,5 mM (Corcuera, 1983). Por otra parte se

encontró que el contenido de gramina en algunas cultivares de cebada varía desde 0 hasta 2,6 mmoles/Kg.p.f. y aquellos cultivares que fueron disminuyendo la gramina en sus hojas fueron los más susceptibles al ataque de los áfidos S. graminum y R. padi. Así mismo, la tasa de crecimiento poblacional de R. padi está negativamente correlacionada con el contenido de gramina en las dietas artificiales y en las hojas de la cebada (Zúñiga y Corcuera, 1986). Por otra parte, otros autores han encontrado que la presencia de la gramina en la planta modifica la conducta alimenticia de los áfidos S. graminum y R. padi (Zúñiga et al, en prensa). Estudiando la concentración de la gramina en los diferentes tejidos de la hoja se encontró que cerca del 70 % de la gramina se encontraba en las células del mesófilo y un 30 % en las células de la epidermis, y no se encontró en los haces vasculares (Argandoña et al, 1987). Considerando estos resultados y los efectos deletéreos de la gramina en dietas sintéticas, se postuló que estos compuestos pueden ser responsables de la resistencia de la cebada al ataque de áfidos (Corcuera, 1983; Zúñiga et al, 1985; Zúñiga y Corcuera, 1986).

1.2.3. Capacidad degustativa en insectos.

Jermy (1966; Jermy et al, 1968), trabajando con larvas de insectos lepidópteros, encontró que las larvas de Manduca

sexta y Heliothis zea fueron capaces de reconocer de un grupo de plantas aquellas con las que fueron prealimentadas. Además concluyeron que tal inducción no fue posible usando plantas que mostraron efectos repelentes hacia las larvas o plantas "no hospedadoras". En base a lo anterior, los autores suponen que existía una retención de información que induciría en las larvas la conducta alimenticia indicada.

En algunos insectos, lepidópteros entre ellos, se han localizado quimiorreceptores celulares en las sensilas. Así, la maxila de larvas de lepidópteros lleva dos sensilas estilocónicas, ambas con función gustativa (Shoohoven, 1969a y b). Así mismo, se indica que los insectos pueden reconocer lo salado, lo dulce, lo ácido y lo amargo, a través de receptores ubicados en diferentes lugares. Los receptores mencionados se diferencian de los sensores químicos generales, en que no son estimulados por gases. Estas sensilas quimiorreceptoras corresponden a estructuras poseedoras de finos filamentos cuyos extremos están expuestos a la atmósfera (Wigglesworth, 1974).

Shoohoven (1969) señala que la mayoría de los insectos pueden obtener información acerca del valor nutritivo de las plantas hospedadoras y, además, reconocer la presencia de algún metabolito secundario, que pueda actuar como un estímulo en diversos sentidos. Así, se ha encontrado que larvas de Pieris brassica no aceptan dietas conteniendo

glucósidos de aceite de mostaza (David y Gardner, 1966) y en cambio, larvas de Manduca sexta se alimentan de hojas de tomate que contienen compuestos repelentes para otras especies. Concluye este autor que las larvas, a través de su sentido del gusto, pueden tener un conocimiento suficiente de la composición química de la planta como para diferenciar hospedadores.

Otros autores encontraron que larvas de H. zea pudieron seleccionar, a partir de un número de alternativas, una dieta nutricionalmente superior y balanceada en nutrientes como sacarosa y caseína. Los autores proponen, entre otras cosas, que los insectos herbívoros buscan un balance favorable de nutrientes probando en diferentes estructuras y tejidos de distintas plantas (Waldbauer et al, 1984). Estas conclusiones coinciden con las de autores señalados anteriormente en este mismo capítulo.

1.2.4. Hipótesis.

Hasta ahora se ha demostrado que la gramina protege a la cebada contra el ataque de áfidos. En esta tesis se postula que la gramina puede jugar un papel mas general en la defensa de la cebada contra fitófagos y patógenos. Ello se debería a que el compuesto ejerce efectos deletereos (tóxicos y/o repelentes).

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.1. Estudiar los efectos del alcaloide indólico gramina sobre H. zea usando un sistema de dietas artificiales.
- 2.2. Establecer si existen correlaciones entre la presencia y la concentración de gramina en las hoja de la cebada y la resistencia de esta planta a H. zea.
- 2.3. Establecer si existen correlaciones entre la concentración de la gramina en las hojas de la cebada y el grado de integridad del tejido, cuando este es expuesto a P. syringae.
- 2.4. Estudiar los efecto de la gramina sobre la bacteria Pseudomonas syringae en medios de cultivo.
- 2.5. Estudiar el posible modo de acción de la gramina en P. syringae.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Reproducción y crianza de H. zea en el laboratorio.

Con el objetivo de criar especímenes de H. zea se desarrolló un sistema basado en la alimentación de larvas con dieta merídica. La composición de la dieta es levadura seca (7 g), ácido ascórbico (1 g) ácido sórbico (360 mg), ácido linolénico (100 mg), harina de maiz (76 g), sacarosa (9 g), inositol (120 mg), aceite mazola (1 ml), colesterol (180 mg), agar (4,6 g) y agua destilada (300 ml). Esta dieta corresponde a una optimización de diversas dietas indicadas en la bibliografía (Vanderzant, 1959; Vanderzant et al, 1962; Chauthani y Adkinsson, 1963; Vanderzant 1968, 1969; Le Berre y Lenoir, 1969; Anthon et al, 1971; Howell, 1971; Sutter et al, 1971; Guerra y Bhuiya, 1977; Robertson, 1979; Chan et al, 1978).

Se colectaron larvas de H. zea desde mazorcas de maiz (Estación Experimental "La Platina", INIA de Santiago) y fueron alimentadas, con la dieta ya descrita durante todo el período larval que les restaba (figura 2). El siguiente estado metamórfico (pupa) se puso en bandejas con vermiculita húmeda dentro de las cajas de crianza para mariposas (25 x 25 x 35 cm), donde las pupas eclosionaron originando el insecto adulto volador. Las mariposas fueron

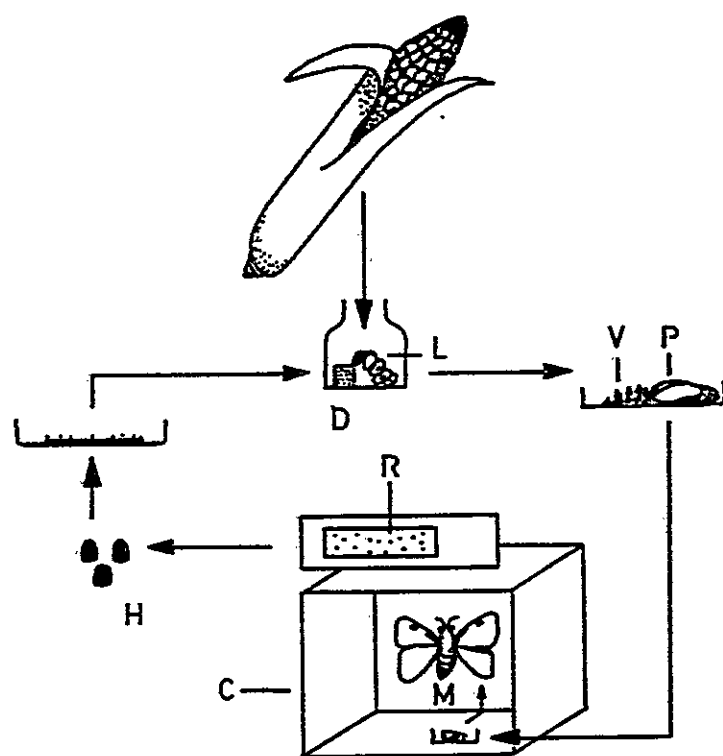


FIGURA 2: Ciclo de crianza de *Helicoverpa zea*. De mazorcas de maiz se obtuvieron larvas (L), las cuales se pusieron en frascos y se alimentaron con una dieta merídica sólida (D) en base a harina de maiz. Las pupas originadas (P) se pusieron en vermiculita (V) y dentro de una caja de crianza (C), en la cual emergieron las mariposas (M). Éstas últimas depositaron sus huevos (H) principalmente en la rejilla de visillo (R) y fueron colectados para ser incubados en placas petri con papel filtro humedo. Los huevos originaron nuevos estados larvales.

alimentadas con una mezcla densa de agua y miel de abeja. Toda esta crianza se realizó entre 24 y 27 °C (Fye y Surbe, 1971; Jones et al, 1977).

Las cajas de crianza llevan una rejilla de gasa, en donde los adultos depositaron los huevos, los que se colectaron diariamente arrastrándolos con agua destilada. Los huevos recuperados se mantuvieron a 25 °C en placas petri, sobre un papel filtro húmedo hasta su eclosión. Las larvas recién nacidas (F1) se transfirieron a frascos con la dieta sólida merídica ya indicada. Lo descrito anteriormente corresponde a una optimización de diversas técnicas encontradas en literatura (Callahan, 1962; Howell, 1971; Sutter et al, 1971; Robertson, 1979).

3.2. Alimentación de H. zea con dietas que contienen gramina.

3.2.1. Ensayo de elección de dietas artificiales.

Este ensayo se esquematiza en la figura 3. Se preparó dieta, como la descrita para el ensayo anterior, y se le incorporó concentraciones crecientes de gramina. Se seleccionaron grupos de larvas de 5 mm de largo, aproximadamente, y a cada larva de cada grupo (separadamente) se le dió la alternativa de alimentarse con un cubo de dieta control (0 mM de gramina) o con otro que

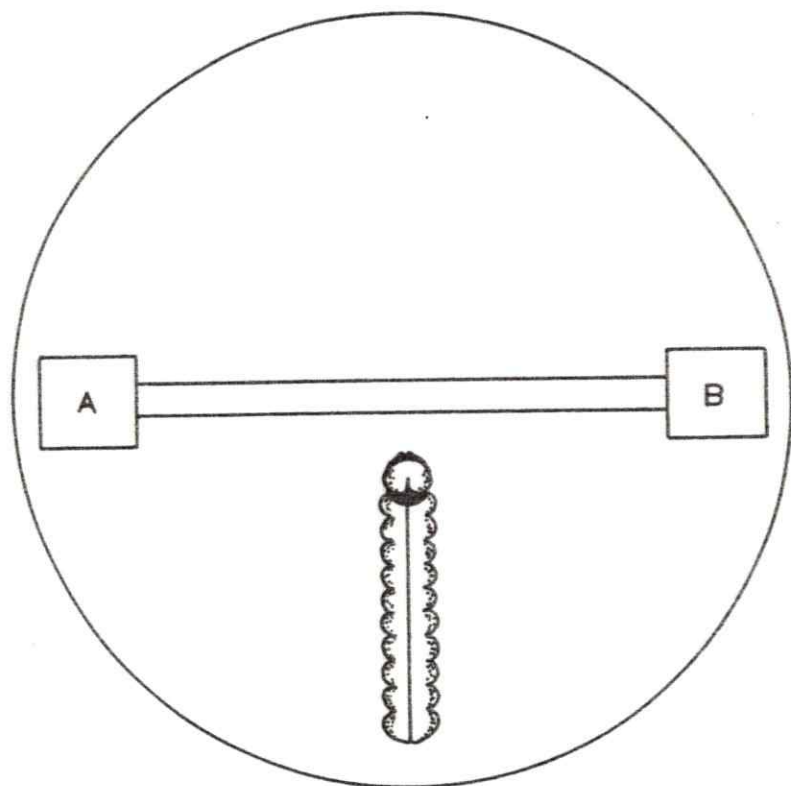


FIGURA 3: Elección de dietas artificiales por larvas de Helicoverpa zea. A larvas de H. zea se les dió a elegir el alimentarse en una dieta artificial sin gramina (A, control) o en una alternativa conteniendo gramina en concentraciones crecientes (B). Este ensayo se evaluó registrando la frecuencia de visitas con alimentación de las larvas en cada dieta, cada una hora.

contenía gramina en una concentración determinada. Para evaluar este ensayo se construyeron tablas de frecuencia, en las cuales se registró la ocurrencia cada una hora, por observación visual de las larvas, de los eventos "alimentación en la dieta control", "en la dieta con gramina" y "sin alimentarse" (sobre la dieta; pero, sin morderla, ambulatorias, y otras situaciones similares). De los registros anteriores se obtuvo el porcentaje de cada evento para cada larva y tratamiento, para determinar si existía repelencia dependiente de la concentración del alcaloide. Se graficó la concentración de gramina en la dieta alternativa control versus los porcentajes de alimentación en cada dieta.

El diseño de este experimento y el del punto 3.2.2. obedecieron al objetivo de evaluar si las larvas eran capaces de diferenciar entre dieta con y sin gramina, para lo cual la única opción es ofrecer ambas alternativas a una sola larva. Cada par de puntos experimentales representan la elección entre una dieta sin gramina y otra con gramina, expresados como eventos porcentuales del total. La significación de la diferencia entre las visitas por cada larva a una u otra alternativa de dieta se evaluaron con el método estadístico llamado "Prueba de parejas de muestra" (Parker, 1976). Esta prueba estadística está orientada a evaluar las diferencias entre dos grupos de prueba, uno control y uno tratado con el factor de ensayo, la gramina

en este caso. Este método se basa en que en determinadas circunstancias, los dos conjuntos de valores muestrales están relacionados entre sí, en el sentido de que corresponden a una sola serie de individuos, o también a una serie de individuos pareados. Si, por ejemplo, se deseara comparar los efectos de dos dietas sobre animales (terneros, por ejemplo) en términos de ganancia de peso vivo, se podría tomar un grupo razonablemente uniforme de animales y dividirlos en dos muestras (o seleccionar dos muestras a partir de dicho grupo). Lo anterior se puede hacer mediante la utilización de algún proceso aleatorio; luego, se alimentarían a los individuos de una de las muestras usando un primer tipo de dieta, y a los de la otra con un segundo tipo. Los resultados experimentales se expresarían como dos series de valores cuya diferencia correspondería a la ganancia de peso vivo, y se aplicaría la prueba "t". Para el caso de los ensayos 2.2.1. y 2.2.2. las dos series de valores corresponden a visitas con alimentación en la dieta control y a la con gramina. Ambas están relacionadas porque corresponden a la capacidad de selección de dieta por una larva. Siendo las mismas tendencias las que se evalúan para cada réplica, los resultados se pueden promediar para cada concentración de gramina.

Diseños experimentales semejantes y con el mismo objetivo fueron usados por Jermy (1966; Jermy et al, 1968). Estos

diseños fueron discutidos con I. Kubo (seminario personal del autor de la tesis, 1986).

3.2.2. Ensayo de elección de variedades de cebada.

Este ensayo se esquematiza en la figura 4. Se seleccionaron grupos de larvas como en el punto 2.1. En maceteros con suelo normal (tierra) se sembró, pareadamente, una variedad de cebada sin gramina (F. Unión, variedad control) y otra variedad o alternativa, la que podría tener distinta concentración de gramina en las hojas. Las plantas se mantuvieron a 25 °C en un fotoperíodo de 16/8 (luz/oscuridad) y se utilizaron para los ensayos a los siete días de edad (contado desde el sembrado). A cada larva se le dió la alternativa de alimentarse de las hojas de la variedad control de cebada o con la variedad alternativa. Puesta la larva entre las variedades de cebada, el sistema se selló con una campana de vidrio para evitar que el espécimen se escapara.

La evaluación de este ensayo se hizo llevando tablas de frecuencia, tomando 100 registros de los eventos "alimentación en la variedad control", en la "alternativa" y "no alimentandose" o desubicadas. De estos registros se obtuvo el porcentaje de cada evento, se graficó la concentración de gramina en la cebada, alternativa a la control, versus los porcentajes de alimentación en cada variedad.

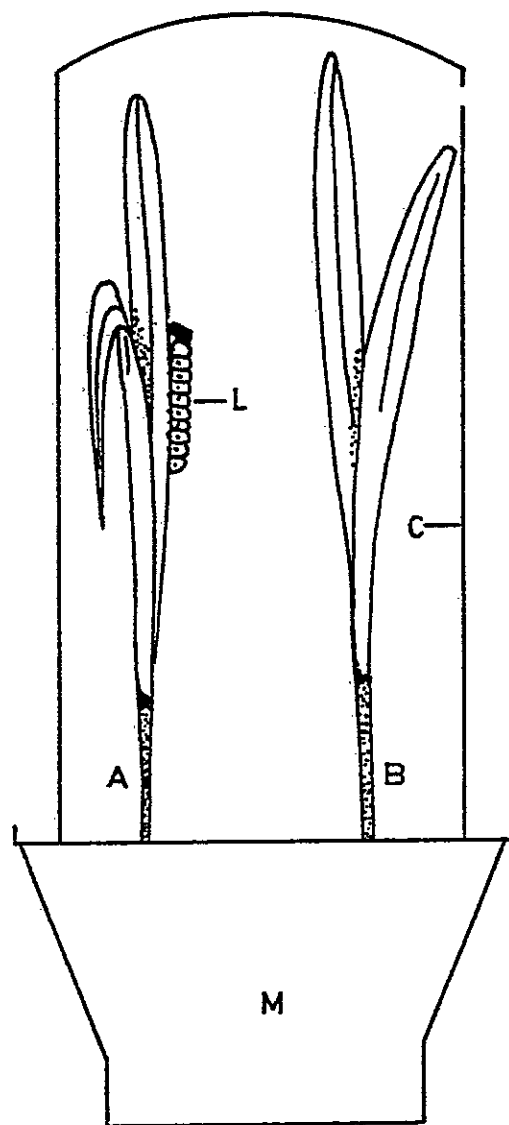


FIGURA 4: Elección de variedades de cebada por larvas de Helicoverpa zea. A larvas de H. zea se les dió a elegir el alimentarse en una variedad de cebada (Hordeum vulgare) sin gramina (A, control) o en otra que contenía gramina en sus hojas (B). En el macetero (M) que llevaba las variedades de cebada se puso una campana de vidrio (C) para evitar el escape de las larvas. Este ensayo se evaluó registrando la frecuencia de visitas con alimentación de las larvas en cada variedad de cebada.

Las bases del ensayo y de los análisis estadísticos se indican en el punto 3.2.1.

3.2.3. Ensayo de toxicidad.

Este ensayo se realizó con el fin de observar si existía algún efecto sobre H. zea por ingestión directa de la gramina.

Se preparó dieta, como la descrita en el punto 1, incorporándosele gramina en concentración creciente (0, 1,5, 3,1 y 4,6 mM). Se seleccionaron 20 larvas de 5 días de edad por cada tratamiento, y a cada uno de ellos se les dió como alimento exclusivamente dieta con una sola concentración de gramina. Para evaluar este ensayo se tomó el peso y la longitud de cada espécimen cada cuatro días, además se registró el tiempo de duración de cada estado metamórfico así como su peso y longitud. Los datos de peso y longitud se analizaron usando el prueba de parejas de muestras (Parker, 1976). La base teórica de éste análisis se explica en el punto 3.2.1. En este caso uno de los datos para su análisis correspondió a un grupo de datos réplica del peso y longitud, tratados independientemente un parámetro del otro, de un grupo que comió dieta sin gramina (control). Este grupo de datos control se pareó, para su comparación, con grupos réplica de datos, homólogos obviamente, representativos del peso y longitud de un grupo de larvas que comió dieta con gramina.

Por otra parte, se graficó la frecuencia (%) de peso versus los intervalos de peso, para cada tiempo de muestreo. Se determinó la cantidad de dieta ingerida y defecada en 24 horas usando 5 larvas por cada concentración de gramina. Para lo anterior se dejó sin alimentar, a las larvas, por medio día para luego alimentarlas con un cubo de una dieta determinada, previamente pesado. A las 24 horas se pesó nuevamente lo que quedaba de dieta y las fecas. La dieta ingerida se calculó tomando la diferencia entre el los pesos final e inicial de la dieta.

3.3. Variedades de cebada.

En los experimentos se usaron variedades de cebada con distinto contenido de gramina en sus hojas. Éstas fueron las variedades F. Unión (sin gramina), X81-T-1030 1,46 y 1,91 mmoles/K.p.f. , H251/Api-CM67 x ORE 2,2 mmoles/K.p.f. , DATIL-S 2,3 mmoles/K.p.f y Sotol abn x Gas-ore "S" 2,5 mmoles/K.p.f. , X81-T-1027 3,81 mmoles/K.p.f. .

Estas variedades se obtuvieron en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile y en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA, Santiago).

3.4. Cuantificación de gramina.

Para la extracción de gramina desde las hojas, se usó la técnica descrita por Woods et al (1979) levemente modificada. Dos gramos de material vegetal fresco (hojas) fueron macerados en una mezcla de metanol y amoníaco (7:1 v/v) y el extracto se filtró por lana de vidrio para continuar su procesamiento. Del filtrado se tomó una alícuota de 5 ml y se agregaron a 100 ml de una mezcla de cloroformo, metanol y amoníaco (26:33:1 v/v), la cual se llevo a pH=1 con H_2SO_4 2 N. La mezcla se agitó y se descartó la fase clorofórmica (con los pigmentos) y se agregaron 10 ml de cloroformo, para extraer nuevamente. Luego, la mezcla se llevó a pH=9 con amoníaco concentrado, se agregó cloroformo y se descartó la fase acuosa, repitiendose la extracción con 10 ml de agua adicionales. De ésta última mezcla se conservó la fase clorofórmica, la que se secó con aire para su posterior análisis. Los extractos de cebada se analizaron cualitativamente por cromatografía en capa fina (tipo placa, con metanol-amoníaco 7:1 v/v). La visualización de las manchas cromatográficas se hizo, separadamente, con luz ultravioleta de onda corta, reactivo de Dragendorf (Dominguez, 1973) y de Ehmann (Ehmann, 1977). Se comparó el desplazamiento (R_f) de los compuestos obtenidos con el de patrones de alcaloides indólicos, especialmente.

En el análisis se utilizó el reactivo de Ehmann (Ehmann, 1977) modificando la técnica para adaptarla a la cuantificación de alcaloides indólicos por espectrofotometría. Para preparar el reactivo de Ehmann se pesó 1 g de p-dimetilaminobenzaldehído y se disolvió en 50 ml de HCl (concentrado) y 50 ml de etanol absoluto (solución A, reactivo de Van Urk); por otra parte se disolvieron 2,3 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 500 ml de agua destilada y 300 ml de H_2SO_4 (concentrado) (solución B, reactivo de Salkowsky) y el reactivo se preparó mezclando una parte de la solución A con 3 partes de la solución B. El reactivo de Ehmann es estable a temperatura ambiente; pero, es conveniente conservarlo en frío y en una botella oscura.

Al extracto, obtenido de la fracción clorofórmica básica, se agregaron 3 ml de reactivo de Ehmann y se calentó a 100 °C por 30 minutos. Luego del tiempo indicado, la mezcla de reacción se completó a 5 ml con agua destilada y se midió la transmitancia a 550 nm, comparando con un blanco de reactivo puro sometido al mismo procedimiento. La concentración de este compuesto se obtuvo comparando estos valores con los de una curva patrón hecha con gramina.

El método mostró un límite de detección de 0,01 $\mu\text{moles/K.p.f.}$ o 3 mg/K.p.f. y un coeficiente de extinción molar de $E = 4207$, (calculado de una curva de calibración, $r = 0,999$). El análisis de las variedades de cebada por CCF; revelado con UV, xantidrol, reactivo de Dragendorff

(Domínguez, 1973) y de Ehmann; y comparación espectroscópica (UV) con patrones mostraron que la gramina es el único alcaloide indólico y el único indol detectable en estas variedades por este procedimiento.

3.5. Cuantificación de clorofila.

Para el análisis de contenido de clorofila en los discos de hoja, se usó la técnica de Talling y Driver para la determinación de clorofila "a" (Talling y Driver, 1963; Cabrera, 1984). Este método se usa en tejidos que tienen bajo o ningún contenido de feofitinas. La clorofila de los discos de hoja, de cada tratamiento y replicas, se extrajo agitándolos en metanol al 90 % y a 40 °C (nunca más de 24 horas), al metanol se agregó 1 g de $MgCO_3$ debido a que el metanol comercial puede ser levemente ácido. Al extracto verde obtenido se le registró la absorbancia a 480 nm (control para carotenoides), a 750 nm (corrección para otros compuestos coloreados y para turbidez) y a 665 para evaluar la clorofila "a". La concentración de clorofila se calculó usando la expresión:

$$Clf. (ug/g.p.f.) = \frac{[Abs (665) \times 13,9 *] \times V_0}{p.f.}$$

* = índice dado en Talling y Driver (1963), éste factor

representa el recíproco del coeficiente de absorción específico a 665 nm para la clorofila "a" en metanol, V_0 = volumen total de extracción metanólica y p.f. = peso fresco de los discos.

3.6. Crecimiento poblacional de Pseudomonas syringae.

El crecimiento bacteriano se midió en términos de concentración celular o número de células por unidad de volumen de cultivo líquido. Los cultivos bacterianos absorbieron la luz a 550 nm, por lo que se pudo seguir espectrofotométricamente el cambio en la densidad celular del cultivo, siendo proporcional al número de células. Por lo anterior, la relación entre la absorbancia y el número de células dependió de la especie y cepa bacteriana con la cual se trabajó y de las condiciones de cultivo.

La velocidad de crecimiento de un cultivo, que es directamente proporcional al número de células presentes en ese momento, se calculó por la expresión (2) que resulta al integrar la expresión (1).

$$(1) \quad KN = \frac{dN}{dt} \quad (2) \quad N = N_0 e^{Kt}$$

N_0 = número de células iniciales a tiempo cero (t_0), N = número de células en un tiempo posterior cualquiera (t) y K = tasa instantánea de crecimiento.

En un sistema de reproducción por fisión binaria una

generación se define como la duplicación del número de células, así se calculó el número de generaciones (g) por la expresión (4), proveniente de la expresión (3), transformada en la expresión (5).

$$(3) \quad K = \frac{\ln (N/N_0)}{t} \quad (4) \quad N = N_0 2^g$$

$$(5) \quad g = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$$

Dividiendo g por el tiempo de crecimiento considerado, se obtuvo g/t o el número de generaciones por hora.

La información anterior corresponde a un resumen de fuentes bibliográficas (Odum, 1972; Pritchard, 1968).

Para caracterizar el crecimiento poblacional de P. syringae se hizo un cultivo bacteriano y se tomaron muestras de 5 ml para hacer diluciones sucesivas de a 10 %. Se incluyó 1 ml de cada dilución en agar/peptona (1%/2%), homogeneizando la placa. Las placas se incubaron a 28 °C y a las 24 horas se hizo un conteo de las UFC (unidades formadoras de colonias). Las UFC implican el considerar que cada colonia encontrada en las placas fue iniciada por una bacteria, luego el conteo será proporcional al número de células por mililitro de cultivo.

En seguida, se calculó el tiempo de duplicación y la velocidad de crecimiento del cultivo bacteriano

3.7. Inóculo bacteriano.

En todos los casos los cultivos bacterianos se hicieron crecer en agitación constante a 28 °C. Aproximadamente a las 16 horas de incubación estos cultivos se encontraron en la fase de crecimiento estacionario, o tamaño máximo poblacional para el medio de cultivo que se estaba usando. La densidad de la población bacteriana se midió tomando la transmitancia del cultivo a 550 nm.

A partir de un cultivo puro de P. syringae, aislado de cerezo, se estabilizó un cultivo madre (primario), inoculando caldo de cultivo (peptona 2 %) con la bacteria. Este cultivo se mantuvo, propagándolo en medio sólido (peptona 2 %, agar 1 %), cada cierto tiempo. Posteriormente se observó el cultivo para la verificación de la especie y se renovó la población, mezclándola con bacterias provenientes del cultivo puro original, el cual se conservó en frío (4 °C).

Para preparar inóculos se preparó medio de cultivo líquido y se inoculó con una alícuota de cultivo madre (3,75 µl/ml de medio de cultivo) de 16 horas de crecimiento.

3.8. Prueba de fitopatogenicidad.

El cultivo bacteriano para los ensayos se preparó a partir de un cultivo de 16 horas de incubación (condiciones

indicadas en el punto anterior), diluyéndolo hasta un 50 % de transmitancia con medio de cultivo puro. A placas petri de 9 cm de diámetro, y para cada cada variedad de cebada, se agregaron 10 ml del cultivo bacteriano al 50 % y, también, se estableció un tratamiento con medio de cultivo sin bacterias como control. A todos los medios se agregó cinetina 0,4 mg/l con el fin de disminuir la senescencia de los discos de hoja (Sahai y Ware, 1964; Morrison, 1960).

Se infectaron hojas de cebada enteras, heridas (pinchaduras y cortes) y discos con P. syringae. Éstos últimos fueron los usados regularmente por la facilidad de ensayo y la claridad de los resultados.

Cuando las plantas de cebada tuvieron siete días de edad se cortaron sus hojas y, de ellas, se obtuvieron discos de seis milímetros de diámetro, cortados con un sacabocados (Tuite, 1969). Los discos se lavaron con agua destilada y, por cada variedad, se pusieron 80 de ellos en cada una de tres placas petri (ver Inóculo bacteriano). Las placas se cerraron con parafilm y se dejaron en una cámara de cultivo a 25 °C con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad. A las 48 horas, y para cada disco, se determinó el área no dañada (área que conservó sus células verdes) como porcentaje relativo a la superficie total del disco. Para determinar el porcentaje anterior, luego del tiempo de ensayo se observó cada disco de hoja con el aumento menor de un microscopio. Se observó todo el disco dentro del

campo del microscopio, así el área total del disco se consideró el 100 %. Se determinó el área intacta evaluando visualmente el porcentaje de las zonas sin clorosis en octantes (el área del disco se dividió en ocho partes, usando una película transparente rayada desde un punto central). Cada octante es un 12,5 % del total, luego el porcentaje de área intacta en cada octante se transforma en referencia al área total del disco, por simple operación matemática, y se suman los valores de porcentaje de todos los octantes.

Para expresar el efecto de daño neto, producido por la bacteria, los porcentajes de daño promedio de cada tratamiento se usaron para calcular la diferencia porcentual de daño por la expresión:

$$DPD \% = \frac{\text{daño \% b} - \text{daño \% c}}{\text{daño \% c}} \times 100$$

b = tratamiento con bacterias, c = tratamiento control o sin bacterias y DPD = diferencia porcentual de daño.

En este ensayo se tomó como parámetro, también, el contenido de clorofila en los discos de hoja. Luego, con el objetivo de expresar la diferencia neta de contenido de clorofila con respecto al control, los datos (obtenidos como se indica en el punto 3.5) de clorofila se procesaron por la siguiente expresión:

$$\text{DPC \%} = \frac{\text{Clf. db} - \text{clf. dc}}{\text{Clf. dc}} \times 100$$

Clf = clorofila mg por gramo de peso fresco, db = discos en tratamiento con bacterias, dc = discos en tratamiento sin bacterias o control y DPC = diferencia porcentual de clorofila.

Se graficó la concentración de gramina en las hojas de las distintas variedades de cebada versus la DPD y la DPC, respectivamente.

Se estableció el efecto de la betaína sobre el potencial fitopatogénico de P. syringae. Para ello se determinó el daño producido por la bacteria (DPD) y el contenido de clorofila (DPC) en discos de hoja (cebada var. F. Unión), obtenidos de plantas en condiciones normales ($\psi = 4.3$) y sometidas a estrés hídrico ($\psi = -8.0$). Éstos últimos acumularon betaína en el tejido.

3.9. Determinación de proteína.

Con el fin de determinar la concentración de proteína correspondiente a los 200 μl de cultivo bacteriano (ver medición de actividad respiratoria) se usó el reactivo de Bradford (Bradford, 1976). Del inóculo bacteriano de 16 horas (en fase de crecimiento estacionario) se tomaron muestras de 40 μl y a cada una de ellas se les precipitó la

proteína con acetona fría, en proporción 1:5 (v/v). Las muestras anteriores se dejaron en congelador por un mínimo de media hora y, luego, se centrifugaron por cinco minutos, en una centrifuga Eppendorf. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 1 ml de reactivo de Bradford. A la mezcla de reacción anterior se le midió la absorbancia a 595 nm, comparando con una referencia de reactivo puro. La absorbancia de cada una de las muestras (y réplicas) se interpoló en una curva de calibración (μg de albúmina/ml vs absorbancia a 595 nm).

La absorbancia de las muestras de los cultivos bacterianos (punto 3.7) arrojó el valor 27,5 μg de proteína en 200 μl de cultivo bacteriano, volumen que se usó en los ensayos a continuación descritos.

3.10. Curvas de crecimiento bacteriano.

La gramina, y otros compuestos a ensayar, fueron incorporados a medio de cultivo líquido (peptona 2 %) en concentraciones crecientes. Cada tratamiento fue inoculado con una alícuota del cultivo bacteriano (3,75 μl por ml de caldo del tratamiento) y se incubaron en agitación constante a 28 °C. Desde el tiempo cero, y periódicamente, se sacaron muestras de 3 ml de cada tratamiento para determinarles su transmitancia a 550 nm (ver punto 5). Posteriormente, se graficó el tiempo de incubación de los

tratamientos (horas) versus la absorbancia, como medida de crecimiento bacteriano (Abs. = $2 - \log T\%$).

Con el fin de dilucidar si la gramina tiene efecto bactericida o bacterioestático, se inocularon medios de cultivo con P. syringae (punto 3.7) con gramina incorporada en distintas concentraciones (0, 2, 4 y 6 mM). Los tratamientos se incubaron (punto 3.7 y 3.7) y, a las 18 horas, se midió la transmitancia del cultivo (550 nm) para verificar el estado de crecimiento. Además, se tomó una muestra de 200 µl de cada uno de ellos para inocular medios de cultivo sin alcaloide. Estos últimos tratamientos se incubaron en las mismas condiciones y, a partir del tiempo cero (inicio de la experiencia), cada 4 horas se tomó la transmitancia (550 nm) del cultivo. Los resultados se compararon con la curva de crecimiento normal o control.

3.11. Concentración de gramina en relación al crecimiento bacteriano.

Se prepararon dos grupos de medios de cultivo (40 ml de peptona al 2 %) con 0, 2 y 4 mM de gramina incorporada. Uno de los grupos se inoculó con un cultivo bacteriano (ver punto 3.7) y el otro se conservó como control de concentración. Todos los tratamientos se incubaron con agitación constante a 28 °C, en un baño termorregulado.

Cada dos horas se tomaron 2 ml de muestra de cada

tratamiento, y se les extrajo la gramina por el método de partición de fases de solvente (método basado en la inmiscibilidad de dos solventes), y se determinó la concentración del alcaloide con el método colorimétrico descrito en el punto 3.4. Se graficó el tiempo de incubación versus la concentración de la gramina en los tratamientos. Paralelamente, en este ensayo se registró el cambio de densidad de los cultivos (absorbancia a 550 nm) con el objetivo de verificar el estar trabajando con un crecimiento bacteriano control comparable al de la fig. 7.

3.12. Localización de gramina en cultivos bacterianos.

Se inocularon medios de cultivo (peptona 2 %) que contenían concentraciones crecientes de gramina (0, 2, 4 y 6 mM) con un P. syringae (ver punto 3.7). En la fase de crecimiento estacionario (sobre las 16 horas) se tomaron dos grupos de muestras de 5 ml de cada tratamiento. Un grupo de muestras se centrifugó a 2000xg por 5 minutos para separar el medio de las bacterias, y el sobrenadante se guardó en congelador. El precipitado de bacterias se lavó del medio original resuspendiéndolo en medio de cultivo puro y centrifugándolo para eliminar el sobrenadante. La masa bacteriana total correspondió a 687,5 mg de proteína (punto 3.9). A las muestras de cultivo total y de medio sobrenadante, se les extrajo la gramina agregando 4 ml de

cada muestra a 10 ml de HCl 0,1 N (pH 1). La mezcla anterior se alcalinizó a pH 9 con NH_3 y se hicieron dos extracciones con 8 ml de CHCl_3 a la vez. Éste método ha mostrado un 90 % de recuperabilidad. A los precipitados de bacteria se les extrajo la gramina agregándoles, inicialmente, metanol puro (2 ml) y extrayendo luego como se indicó para las otras muestras. De las extracciones anteriores se obtuvo un extracto clorofórmico básico, el cual fue secado, poniendo dentro de los tubos colectores una espita conectada a una bomba emisora de aire seco. En los extractos provenientes de las muestras de cultivo completo (MB) y medio sobrenadante (M) se cuantificó gramina por el método con reactivo de Ehmann (punto 3.4). La concentración del alcaloide se determinó usando una curva de calibración realizada midiendo concentración creciente de gramina en medio peptona 2 % y graficando la concentración encontrada versus la inicial ($r= 0,99$; $E= 0,4895$).

Los extractos provenientes de la extracción de los precipitados de bacterias se redisolviéron en etanol p.a. para registrar los espectros UV entre 190 y 350 nm, y la concentración de gramina se determinó usando una curva de calibración hecha con gramina disuelta en medio de cultivo.

3.13. Respiración bacteriana.

Las determinaciones de respiración bacteriana se hicieron en un oxígrafo HANSATECH, provisto de una cámara de reacción (vol. max. 2 ml) y un electrodo de oxígeno (tipo CLARCK).

Se prepararon 40 ml de cultivo líquido (punto 3.6) de bacterias los cuales, sobre las 18 horas de incubación, se concentró (centrifugación a 2000xg, 5 min.) al 25 % de su volumen original. Este concentrado se mantuvo en agua a cero grados durante las experiencias. La actividad respiratoria se registró poniendo, en la cámara de reacción, 1,8 ml de medio peptona 2% y 0,2 ml de cultivo bacteriano concentrado (27,5 μ g de proteína, punto 3.9). El electrodo registró el consumo de oxígeno de la población bacteriana, la que fue expresada como tasa respiratoria o μ moles de O_2 consumidos/ml de mezcla de reacción/minuto y por la cantidad de proteína en la alicuota del cultivo bacteriano. Sobre la respiración bacteriana se probó el efecto de gramina, ADP, NH_4Cl , 2,4 DNP y betaína.

Se graficó el cambio en la tasa respiratoria bacteriana, como porcentaje de la tasa respiratoria basal o control, en función de la concentración del compuesto de ensayo. El cambio en la tasa respiratoria se indica con la expresión:

$$\text{DTR \%} = \frac{\text{TRI} - \text{TRB}}{\text{TRB}} \times 100$$

TR = tasa respiratoria en $\mu\text{moles de O}_2$ consumidos/ml de mezcla de reacción/minuto/ μg de proteína bacteriana, TRI = tasa respiratoria inducida por un compuesto en ensayo, TRB = tasa respiratoria basal (control) y DTR % = diferencia de tasa respiratoria como porcentaje del basal.

En este ensayo se graficó la DTR % calculada en función de la concentración del compuesto, cuya acción sobre la tasa respiratoria se está probando.

El sistema descrito se usó para observar el efecto de la gramina sobre la respiración afectada por ADP (acoplada), succinato y NADH y el sustrato NH_4Cl . Además se comparó el efecto de la gramina, en las condiciones mencionadas con el efecto del 2,4-DNP, un desacoplante protonóforo conocido (Neumann y Jagendorf, 1964; Lehninger, 1982).

3.14. Cuantificación de fosfato en bacterias.

Se cuantificó la concentración de fosfato durante el crecimiento bacteriano y en relación al efecto de algunos compuestos.

Se prepararon series de frascos con 5 ml de volumen final de medio de cultivo (peptona 2 %), conteniendo concentraciones crecientes de el o los compuestos a

ensayar. Cada tratamiento se inoculó con 200 μ l de cultivo bacteriano de cerca de 20 horas o maduro (27,5 μ g de proteína bacteriana).

A las 18 horas, cada tratamiento se centrifugó a 2500xg por 10 minutos, con el fin de separar las bacterias del medio de cultivo. Del sobrenadante (medio) se tomaron 0,5 ml, se precipitaron las proteínas de la muestra con 0,5 ml de acetona fría, y se guardaron las muestras en congelador durante un mínimo de 30 minutos. Después de lo anterior, las muestras se centrifugaron a 2500xg por 10 minutos. Para determinar la concentración de fosfato, al sobrenadante se le agregaron 0,5 ml de un reactivo que se describe a continuación.

Se prepara una solución de molibdato de amonio al 4,6 % en H_2SO_4 o reactivo A. Se pesan 1,5 g de sulfato ferroso, se le agregan 3 ml del reactivo A y se completa a 30 ml con agua destilada. En caso de presencia de fosfato la mezcla debe tomar un tono azulado. Las soluciones se miden a 740 nm a 25 °C.

Experimentalmente se obtuvo un coeficiente de extinción molar ($E \frac{1}{(M \times cm)}$) igual a 1,17, con el cual se calculó la concentración de fosfato en el medio. Para fines de expresión gráfica, la concentración de fosfato en cada tratamiento se expresó como porcentaje de la concentración de fosfato encontrada en el medio de cultivo sin inocular con bacterias o PF.

3.15. Determinación de betaina.

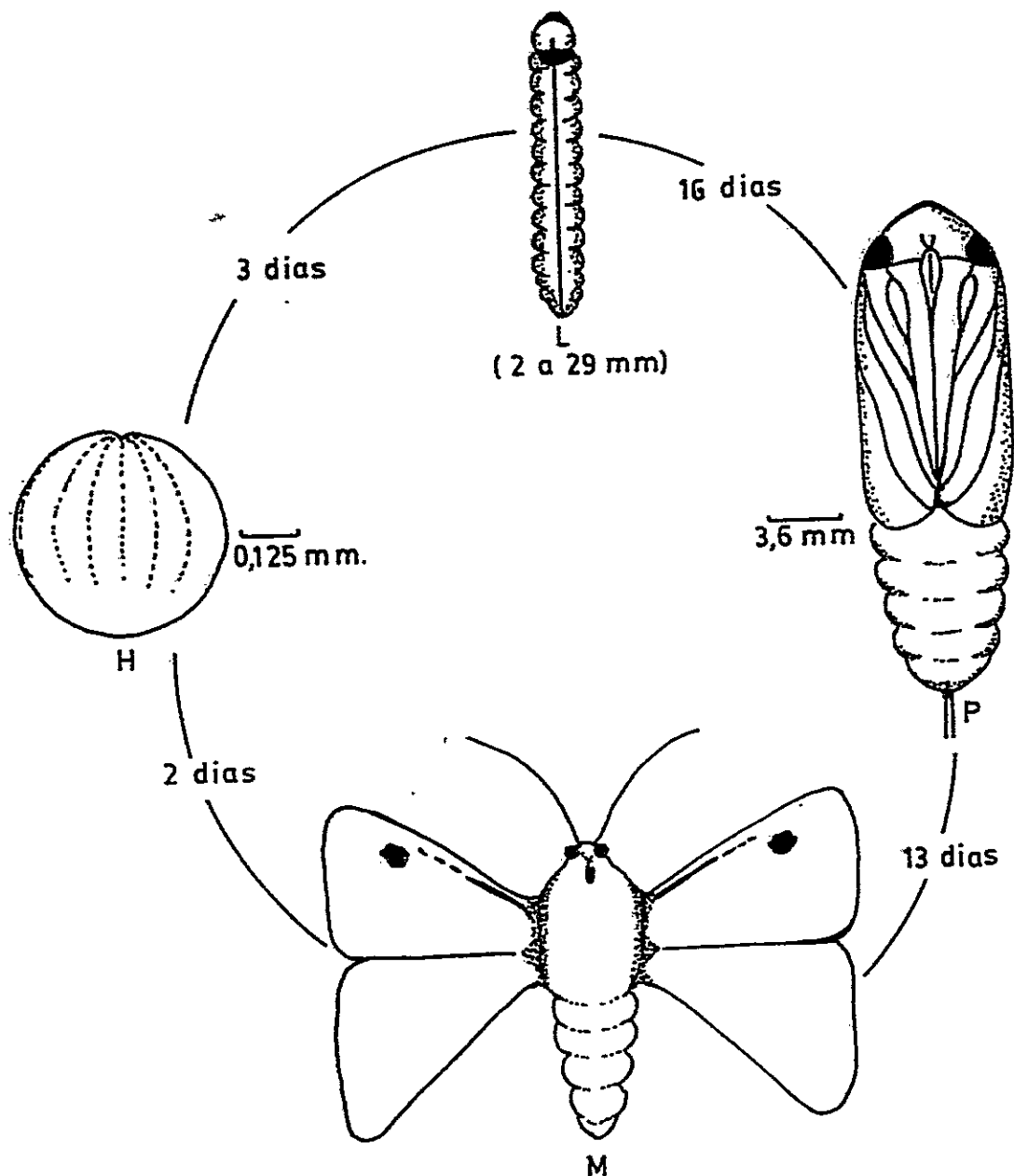
La betaina se cuantificó con el método de Grieve y Grattan, descrito por Zúñiga y Corcuera (1987). Tejido seco de planta (0,5 g), se agitó con 20 ml de agua desionizada con ácido sulfúrico 2N. se enfriaron alícuotas de 0,5 ml, en agua con hielo, por una hora y luego se agregó 0,2 ml de reactivo frío de KI-I. Los tubos se guardaron entre 0 y 4 °C por 16 horas y luego se centrifugaron a 5000xg por 30 minutos a 0 °C. El sobrenadante se descartó. Los cristales de KI-I se disolvieron en 5 ml de 1,2-dicloroetano. Después de 2,5 horas se midió la Absorbancia de las muestras a 365 nm (coeficiente de extinción molar $E_{365} = 2244$).

4. RESULTADOS

4.1. Reproduccion y crianza de *Helicoverpa zea*.

Con el metodo de dietas artificiales, se logro instalar un sistema de reproduccion y crianza de *H. zea* en el laboratorio, manteniendose ciclos de vida completos de esta especie de lepidoptero. Se recolecto una poblacion de larvas de *H. zea* (Fo), provenientes de terreno. Estas larvas originaron mariposas, las cuales ovipositaron; de los huevos eclosiono la primera generacion de laboratorio (F1). Las larvas F1 alcanzaron los estados metamorficos de prepupa, pupa y mariposa, regenerando el ciclo de vida durante cuatro generaciones. Lo anterior permitio disponer de larvas de edad conocida para los ensayos de laboratorio. La duracion de los distintos estados metamorficos se muestra en la figura 5.

En las cajas de crianza la oviposicion no tuvo un patron determinado, a excepcion de encontrarseles principalmente en las areas iluminadas, por proyeccion a traves de la rejilla (ver figura 5). Los huevos se encontraban adheridos por su base, no muy firmemente, en las areas que tenian una textura con un grado de aspereza (madera terciada, gasa, papel) y muy poco en superficies mas lisas (tela adhesiva plastica, metal).



·FIGURA 5: Ciclo de vida de *Helicoverpa zea*. Cada una de las formas corresponde a un estado metamórfico de *H. zea*, obtenidos también en el proceso de crianza en laboratorio. Se midió el tiempo de duración de cada estado metamórfico, L = larva, P = pupa, M = mariposa, H = huevo.

4.2. Ensayo de elección de dieta por larvas de H. zea.

Cuando a larvas de H. zea se les dió la alternativa de alimentarse de las dietas artificiales, estas aumentaron su frecuencia de alimentación en la dieta control (sin gramina) a medida que aumentó el contenido del alcaloide en la dieta alternativa. Así, se ve que cuando ninguna de las dos dietas alternativas tiene gramina (ambas son dieta control) el porcentaje de visita es idéntico para ambas ($p \gg 0,1$); cuando se tuvo una concentración alta de gramina en la dieta alternativa al control (4,6 $\mu\text{moles/K.p.f.}$) la preferencia alimenticia de las larvas se desplazó hacia la dieta sin gramina ($p \ll 0,001$) (figura 6).

Por otra parte, cuando a las larvas se les dió la alternativa de elegir variedades de cebada (tabla 1), éstas aumentaron su frecuencia de alimentación en la variedad F. Unión (variedad sin gramina, usada como control) a medida que en la variedad alternativa a la control aumentaba el contenido de gramina en sus hojas. Igual que en el caso anterior, se puede ver que cuando ambas variedades de cebada no tenían gramina (ambas son control) la frecuencia de visita es idéntica ($p \gg \gg 0,1$); pero, cuando la gramina aumentó a 3,8 $\mu\text{moles/k.p.f.}$ la frecuencia de visita disminuyó significativamente en la cebada con gramina ($p \ll \ll 0,001$) (tabla 1). Sin embargo, la visita a la cebada

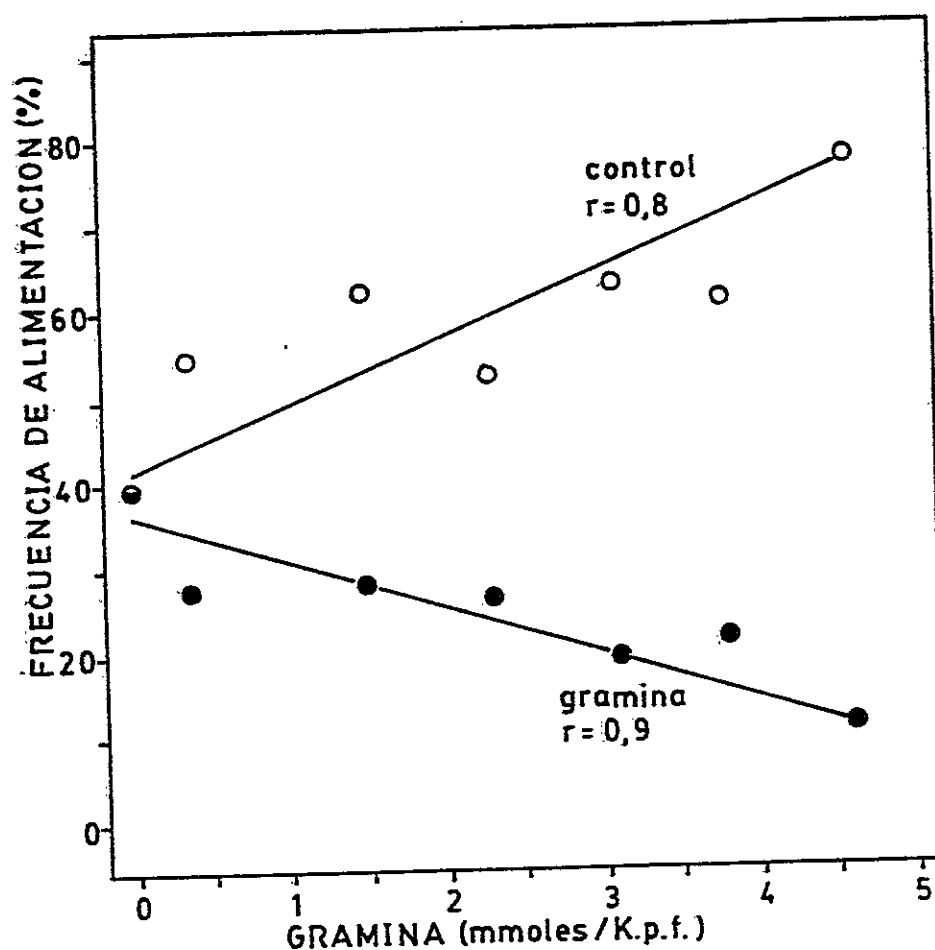


FIGURA 6: Efecto de la gramina en la elección de dieta artificial por Helicoverpa zea. Larvas de H. zea eligieron entre un cubo de dieta sin gramina (control) o conteniendo el alcaloide en distintas concentraciones. Se evaluó las tendencias registrando la frecuencia de alimentación en las dietas cada una hora. Las frecuencias se expresaron en función de la concentración de gramina en la dieta alternativa al control. Los errores estandar menores de 10 % no se indican. A 0 mM de gramina los puntos son idénticos con $p \gg 0,1$ (prueba "t") y a 4,6 mmoles/K. p. f. de gramina los puntos son significativamente diferentes con $p \ll 0,001$. $n = 10$ para cada par de puntos.

TABLA 1: Efecto de la gramina en la elección de variedades de cebada por Helicoverpa zea.

Variedad cebada Gramina alternativa al control	Gramina mmol/k.p.f.	Frecuencia Visitas a cebada (%)		
		% sin ali- mentarse	Control	Alternativa
F. Unión	0,0	20,0 ± 2	40,5 ± 2	39,5 ± 2
X81-T-1030	1,9	32,5 ± 5	51,0 ± 2	17,0 ± 0
X81-T-1027	3,8	40,0 ± 5	48,0 ± 2	12,0 ± 2

± = Error estandar

A larvas de H. zea (n=6) se les dió la alternativa de alimentarse de una variedad de cebada control, o sin gramina en sus hojas, o en otras que contenían gramina en concentraciones diferentes. Se evaluó la frecuencia de visita (n=100 observaciones) con alimentación en cada dieta alternativa cada una hora (mat. y met. 3.2.2). La frecuencia se expresó en función de la concentración de gramina en la cebada alternativa a la control. Los resultados son el promedio del comportamiento de seis larvas. Cuando ambas ^{variedades} variedades de cebada no contenían gramina la diferencia de visita no fue significativa ($p \gg 0,1$); con 3,8 mmol/k.p.f. en la cebada alternativa al control los puntos son significativamente diferentes con $p \lll 0,001$ (prueba "t").

control no se vió aumentada en la misma proporción del abandono de la alternativa.

El resultado de los dos ensayos manifesto la misma tendencia, vale decir el disminuir la visita a las dietas que contenían gramina. Por lo tanto, esto puede indicar que la gramina ejerce un efecto repelente sobre las larvas de H. zea cuando esta presente en la fuente de alimento.

4.3. Ensayo de toxicidad con H. zea.

Para estudiar si existe efecto tóxico por parte de la gramina se alimentó a larvas con dietas conteniendo diferentes concentraciones del alcaloide. Las larvas de H. zea ingirieron la dieta independientemente del contenido del alcaloide en ella. La presencia de la gramina en la dieta no produjo diferencias en el tiempo de vida de las larvas ($p \gg 0,1$), ni sobre el tiempo de pupación ($p \gg 0,1$), ni sobre la duración del estado de pupa (o aparición de la mariposa). Sin embargo, el alcaloide si aumentó el porcentaje de pupación ($p < 0,001$) en los tratamientos con alto contenido de gramina (tabla 2). Además, por el análisis con la prueba para parejas de muestras (Parker, 1976) se encontró que la cantidad de dieta ingerida por las larvas fue mayor en los tratamientos con gramina que en el control (tabla 3) con $0,05 > p > 0,2$ para 1,5 y 3,1

TABLA 2: Efecto de la gramina en el ciclo de vida de Helicoverpa zea.

GRAMINA EN DIETA (mmoles/K. p. f.)	LARVA A PREPUPA	* n	TIEMPO (dias)		PUPA A MARIPOSA	n
			PREPUPA A PUPA n=*	% de pupacion n=20		
0,0	16,5 ± 1,5	2	3 ± 0	10	14,0 ± 1,5	2
1,5	18,5 ± 0,5	2	3 ± 0	10	12,5 ± 0,5	2
3,1	18,0 ± 0,5	6	3 ± 0	30	14,7 ± 0,3	3
4,6	21,3 ± 4,4	4	3 ± 0	25	14,0 ± 1,0	3

± = Error estandar, n = numero de individuos.

Larvas de H. zea (n=20) se alimentaron con dietas conteniendo concentraciones crecientes de gramina. Este ensayo se evaluó registrando la sobrevivencia larval a los 20 días de crianza. Al tiempo mencionado se determinó el porcentaje de pupación (pupas/total de individuos) y los tiempos de pupación y de emergencia de la mariposa (valores promedio de los individuos que alcanzaron los estados) (mat. y met. 3.2.3). El cambio en el porcentaje de pupación fue significativo con $p < 0,001$; el resto de las diferencias no fueron significativas ($p \gg 0,1$) (prueba "t").

mmoles/K.p.f. y $0,01 > p > 0,02$ para 4,6 mmoles/K.p.f.. Así mismo, se encontró que en todos los tratamientos con alta concentración de gramina la defecación fue mayor que en el control ($p= 0,1$) (tabla 3).

Por otra parte, se comparó la distribución de pesos (mg) a diferentes tiempos en grupos de larvas alimentadas sólo con dieta control (0 gramina) y con dieta conteniendo 4,6 mmoles de gramina/K.p.f de dieta (figura 7). Al inicio del ensayo, los pesos de las larvas de ambos tratamientos se encontraban entre 0 y 50 mg. A los 4 y 8 días de alimentación aparecieron rangos de peso mayores. A los 12 días de alimentación, en el tratamiento con 4,6 mmoles de gramina/K.p.f de dieta predominaron clases de peso sobre los 300 mg, en cambio en el control predominaron pesos entre 50 y 250 mg. A los 16 días las larvas de peso alto, del tratamiento con 4,6 mmoles de gramina/K.p.f., llegaron a su última etapa y pasaron al estado de pupa. Mientras en el control (0 mmoles de gramina/K.p.f. de dieta) las larvas continuaban creciendo.

Estos resultados indican que la gramina no tiene efectos fisiológicos letales sobre H. zea. Su efecto se manifestó principalmente disminuyendo la duración de la etapa larval, acelerando la pupación y aumentando la tasa de ganancia de peso en las larvas.

TABLA 3: Efecto de la gramina en la ingestión y defecación de dieta en Helicoverpa zea.

Dieta gramina (mmol/K.p.f.)	Dieta (mg)		Probabilidad (PPM) [x > p > y]	
	ingerida	defecada	ingerido	defecado
0,0	80 ± 5	3 ± 0.5	--	--
1,5	110 ± 11	4 ± 0,2	0.05/0.02	> 0,1
3,1	190 ± 39	11 ± 4,5	0.05/0.02	0,1
4,6	190 ± 2	13 ± 4,5	0.01/0.002	0,1

± = Error estandar.

A larvas de H. zea se les alimentó con dietas artificiales conteniendo concentraciones crecientes de gramina. El cubo de dieta se pesó antes y después de las 24 horas de alimentación. A las 24 horas se recolectaron las fecas y se pesaron. Los pesos corresponden a un promedio de cinco larvas por tratamiento (mat. y met. 3.2.3). Los datos se analizaron usando la prueba para parejas de muestra (PPM), evaluando la diferencia entre el control y cada uno de los tratamientos. La expresión $x > p > y$ indica p = probabilidad para las diferencias, "x" e "y" = probabilidades acotadas por la tabla de probabilidades "t" para los grados de libertad ($o = n-1$) correspondientes.

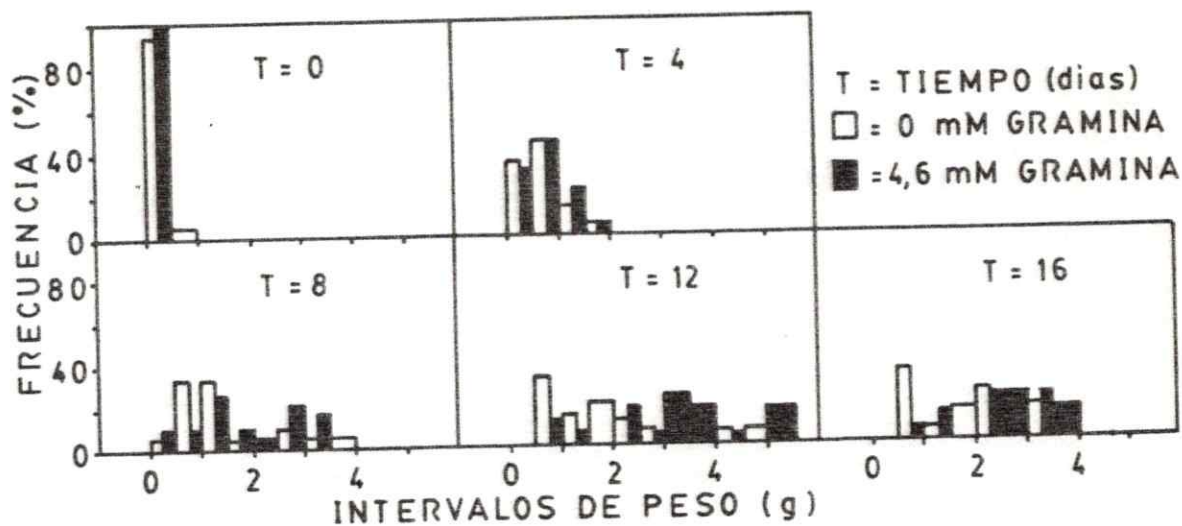


FIGURA 7: Efecto de la gramina en dietas en el peso de larvas de *Helicoverpa zea*. Grupos de 20 larvas de *H. zea* se alimentaron con dieta artificial conteniendo 0 y 4,6 mmoles/k.p.f. de dieta y se registró el peso de cada una de las larvas cada cuatro días. Se calculó la frecuencia de pesos en intervalos de 50 mg, a distintos tiempos (T, días) durante la crianza.

4.4. Efectos de la gramina sobre P. syringae.

4.4.1. Efecto de la gramina sobre el crecimiento poblacional de P. syringae.

Se estudiaron las características de la especie de trabajo con el objetivo de poder verificar la mantención de la cepa durante el tiempo de ensayo. Así, de las cuentas de UFC se obtuvo el valor de $6,45 \times 10^4$ bacterias/ml de medio para el tiempo cero (t_0) y 3×10^8 bact./ ml a $t = 20$ horas. La constante de crecimiento fue $K = 0,38$ (H⁻¹) y el tiempo de duplicación (tiempo en que una población de densidad $1xN$ llega a $2xN$) fue $t = 1,82$ horas. Finalmente, la velocidad de crecimiento poblacional fue de $G = 0,55$ generaciones/hora. Los parametros cinéticos estudiados e indicados al principio de este parrafo se verificaron periodicamente, manteniéndose constantes en cada análisis. Estos análisis poblacionales aseguraron el estar trabajando con la misma especie bacteriana (P. syringae).

Con el objetivo de examinar el efecto de la gramina sobre el crecimiento poblacional de P. syringae se incorporó el alcaloide en el medio de cultivo (figura 8). La curva de crecimiento normal (0 mM de gramina en el medio) mostró las tres etapas del crecimiento, que son latencia, crecimiento exponencial y el estado estacionario. En la primera fase (latencia) la duplicación poblacional no fue manifiesta, en

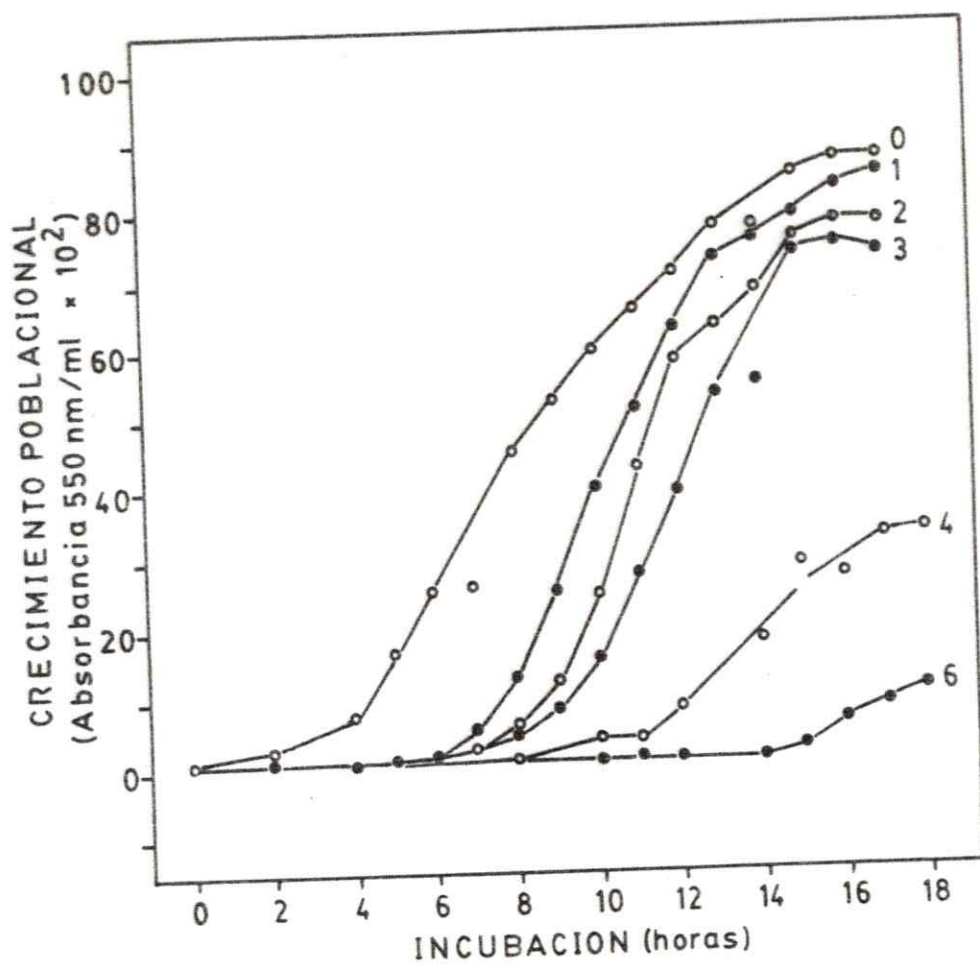


FIGURA 8: Efecto de la gramina en el crecimiento poblacional de *Pseudomonas syringae*. Se incorporó gramina en concentraciones crecientes a cultivos líquidos. Cada uno se inoculó con *P. syringae*. Los cultivos se mantuvieron en un baño termostático con agitación (60 ciclos/min, 28 °C) y se midió la absorbancia (550 nm) periódicamente, como medida del crecimiento poblacional. La absorbancia se expresó en función del tiempo de incubación. El número en cada curva corresponde a la concentración mM de gramina en el medio. Los errores menores del 10 % no se indican. Las fases de crecimiento latente, a $A = 0,02$ y estacionario, a las 16 horas, se grafican en las figuras 9 y 10.

la segunda (exponencial) se manifestó la velocidad máxima de duplicación (0,55 gen/h.), y en la última (estacionaria) el cultivo llegó a la capacidad máxima de crecimiento poblacional el medio de cultivo usado (peptona 2 %), después de las 16 horas de incubación.

Observando el efecto de la gramina en las distintas fases se vió que la fase de latencia (figura 9) se hizo mayor (p máximo 0,01), el crecimiento exponencial fue menor y la densidad máxima, o fase estacionaria, de la población bacteriana se hizo menor con el aumento de la gramina en el medio de cultivo (figura 10). La densidad poblacional en la fase de crecimiento estacionario no fue significativamente diferente del control a 1 mM de gramina ($p = 0,15$); pero se hizo diferente con el aumento de la concentración del alcaloide ($p = 0,03$ para 2 mM; $p = 0,01$ para 3 mM; $p < 0,001$ para 4 y 6 mM). El que la gramina haya prolongado la fase de latencia implica que la población bacteriana retardaría el comienzo de su fase de crecimiento exponencial y, ante altas concentraciones de gramina, no podría llegar a su desarrollo máximo.

Se inocularon medios de cultivo sin gramina (tabla 4), usando como inóculo alícuotas de los cultivos originados en los tratamientos con gramina. En el crecimiento por reinoculación se calculó $p \gg 0,1$ (prueba "t") para las diferencias con el crecimiento en el cultivo proveniente desde 0 mM gramina. No siendo significativas las

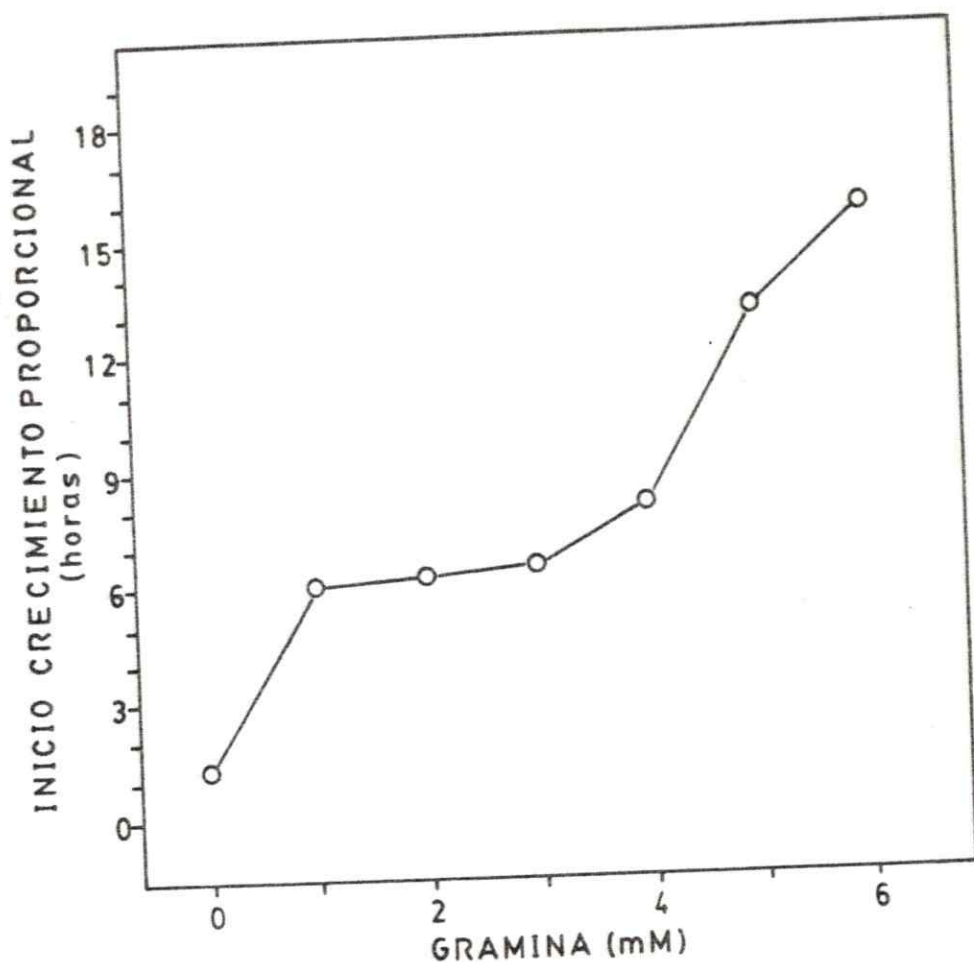


FIGURA 9: Efecto de la gramina en el inicio de la fase de crecimiento proporcional en cultivos de Pseudomonas syringae. En la figura 8 se trazó una horizontal que pasara por los puntos de término de la fase de latencia ($\alpha A = 0,02$). La duración de esta fase se expresa en función de la concentración de gramina en el medio de cultivo de cada tratamiento. Los datos son significativos con $p = 0,01$ (prueba "t").

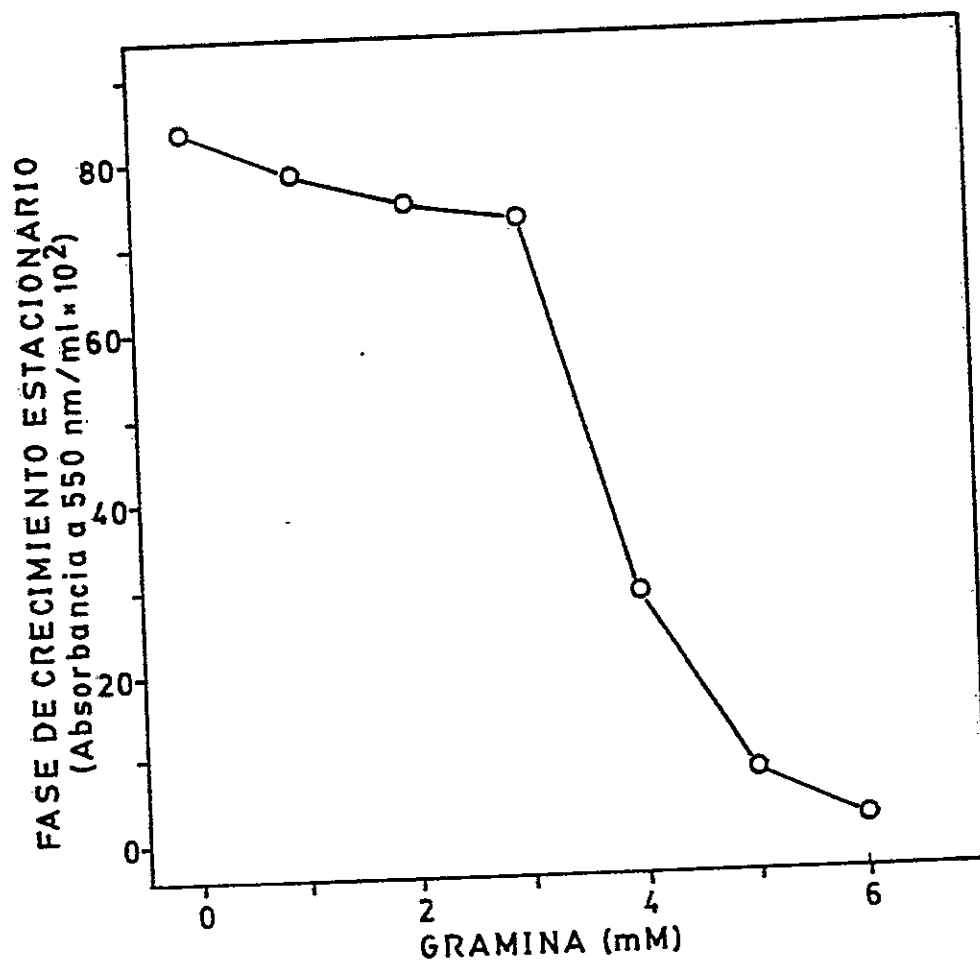


FIGURA 10: Efecto de la gramina en la densidad poblacional en la fase de crecimiento estacionario de Pseudomonas syringae. De la figura 8 se tomaron los valores de absorbancia (550 nm) de la densidad poblacional final o fase de crecimiento estacionario (18 horas) en cada tratamiento y se expresó en función de la concentración de gramina en el medio de cultivo. Los datos son significativos con $p < 0,001$ (prueba "t").

TABLA 4: Efecto de la gramina en la recuperación de cultivos de Pseudomonas syringae.

Gramina en medio inicial (mM)	Tamaño poblacional (Abs 550 nm) (a las 18 horas)	
	medio con gramina (inoculación)	medio sin gramina (reinoculación)
0	0,90	0,90
2	0,84	0,85
4	0,32	0,80
6	0,10	0,80

No hay errores estandar

Se incorporó gramina en concentraciones crecientes a cultivos líquidos de P. syringae y se les determinó la absorbancia (550 nm) a las 18 horas de incubación. A las 18 horas se tomaron alícuotas de cada tratamiento. Con éstas alícuotas se inocularon medios de cultivo sin el alcaloide. Estos cultivos se dejaron crecer en un baño termorregulado con agitación (60 ciclos/min, 28 °C) y se les determinó la absorbancia (550 nm) a las 18 horas (mat. y met. 3.10). La diferencia de crecimiento poblacional bacteriano bajo la concentración máxima estimulante de gramina (2 mM) no fue significativa ($p \gg 1$ para la diferencia). Sobre los 2 mM las diferencias fueron significativas con $p = 0,35$ (prueba chi-cuadrado).

diferencias anteriores, se puede decir que el crecimiento por reinoculación fue semejante al control. Las diferencias de crecimiento poblacional bacteriano entre la reinoculación y los tratamientos con gramina, no fueron significativas hasta gramina (2 mM), calculándose $p \ggg 1$ para las diferencias (prueba chi-cuadrado). Las diferencias fueron significativas a concentraciones mayores de 2 mM, con $p = 0,35$ (prueba chi-cuadrado).

El hecho de que las poblaciones bacterianas afectadas por la gramina puedan crecer normalmente en ausencia del alcaloide en el medio, indica que la gramina ejerce una acción bacterioestática sobre el crecimiento de P. syringae, en todas las concentraciones ensayadas.

4.4.2. Concentración y localización de la gramina en los cultivos bacterianos.

Con el objetivo de determinar si existe variación en la concentración de la gramina, incorporada al medio de cultivo, debida al crecimiento poblacional bacteriano, se cuantificó la concentración del alcaloide durante el crecimiento bacteriano (figura 11). Paralelamente, al registrarse el cambio de densidad de las poblaciones bacterianas se verificó que el crecimiento poblacional en este ensayo siguió la misma dinámica observada en las cinéticas experimentales a las mismas concentraciones de gramina.

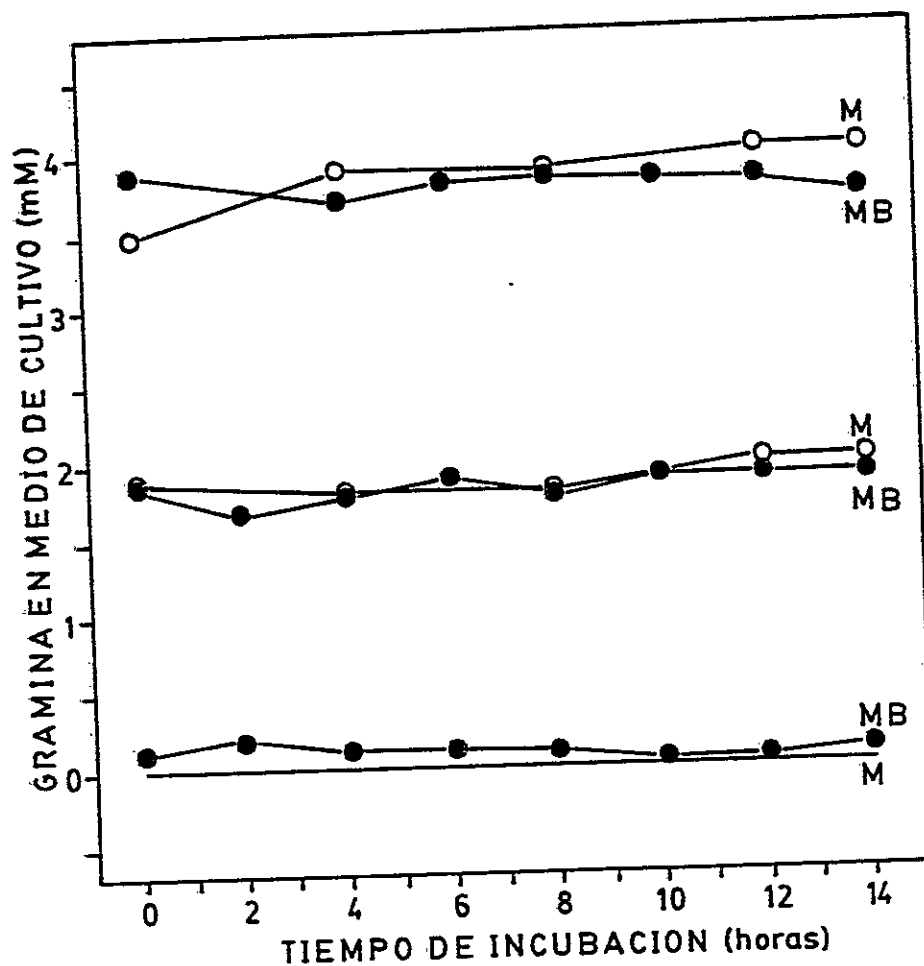


FIGURA 11: Efecto del crecimiento poblacional de Pseudomonas syringae sobre la concentración de gramina en el medio de cultivo. Se incorporaron distintas concentraciones de gramina a medios de cultivo. Para cada concentración de gramina se estableció un tratamiento sin inocular, o control de concentración, y otro inoculado con P. syringae. Se determinó la concentración de gramina (mat. y met. 3.4) en el medio completo (MB = medio + bacterias), en el medio (M) y en bacterias (B, separadas por centrifugación) durante el crecimiento bacteriano. Los errores menores de 10 % no se indican. Para cada concentración, los puntos no fueron diferentes, con $p \gg 0,1$ (prueba "t").

Se encontró (figura 11) que las concentraciones de gramina (2 y 4 mM) en los cultivos inoculados con P. syringae no sufrieron cambios importantes con respecto al control con la misma concentración de gramina, sin inocular con bacterias ($p \gg 0,1$ en todos los casos).

Al analizar la concentración de gramina en los cultivos (tabla 5) se encontró que la concentración del alcaloide en el medio completo y en el medio sobrenadante (separado de las bacterias por centrifugación) fueron semejantes ($p \gg 0,1$) y similares a la agregada originalmente. Por su parte las bacterias asimilaron pequeñas cantidades de gramina desde el medio de cultivo. Así, con 2 mM de gramina en el medio se encontró $9,68 \times 10^{-8}$ mmoles de gramina/mg de bacterias y en los tratamientos con 4 y 6 mM del alcaloide, la gramina encontrada en las bacterias fue de $9,61 \times 10^{-6}$ y $4,28 \times 10^{-5}$ mmoles de gramina/mg de bacteria, respectivamente. Así, las bacterias asimilaron gramina desde el medio y no afectaron, en forma importante, a la concentración total. Si hubo degradación del alcaloide durante el crecimiento bacteriano, ésta tampoco fue importante. Por su parte, la concentración de gramina asimilada por las bacterias fue mayor con el aumento del alcaloide en el medio.

El que las bacterias asimilaren la gramina desde el medio, conjuntamente con el efecto bacterioestático demostrado por el alcaloide, podrían explicar el que la población de

TABLA 5: Contenido de gramina en cultivos bacterianos.

Gramina (a las 20 horas de incubación)			
Gramina (mM)	en el medio (mM)		en bacterias (mmoles/mg)
	MB	M	B*
0	0	0	0
2	1,74 ± 0,02	1,79 ± 0,01	9,68 x 10 ⁻⁸
4	3,53 ± 0,03	3,67 ± 0,03	9,61 x 10 ⁻⁶
6	5,77 ± 0,01	5,77 ± 0,01	4,28 x 10 ⁻⁵

n = 3, * No hay error estandar

Se incorporó la gramina en concentraciones crecientes a medios de cultivo de P. syringae. Los cultivos se incubaron en agitación a 28 8C. A las 20 horas se cuantificó gramina en el medio completo (MB = medio + bacterias) y en el medio solo (M, separado de las bacterias por centrifugación). Se estimó la concentración del alcaloide por reactivo de Ehmann, usando una curva de calibración peptona 2%-gramina creciente. Se cuantificó, también gramina en centrifugados de bacterias (B), usando una curva de calibración etanol-gramina (mat. y met. 3.4). Las diferencias de concentración entre MB y M no fueron significativas (p >> 0,1) (prueba "t").

bacterias creciera menos que en el control cuando el alcaloide se encontraba en el medio. A concentraciones bajas de la gramina la inhibición parcial del crecimiento se podría explicar, también, por la absorción de concentraciones no altamente inhibitorias.

4.4.3. Efecto fitopatogenico de P. syringae sobre cebada.

Con el fin de determinar la forma de infectar a la cebada se intentaron varias formas de penetración y se encontro que la bacteria no ataco a la cebada sino cuando sus hojas se encontraban heridas (corte o pinchadura). Dentro de estos métodos mecánicos se probó el uso de discos de hoja, los cuales se utilizaron finalmente. Los discos de la variedad F.Unión tratados con bacteria presentaron una fuerte clorosis. Al poner estos discos incluidos en un medio agar 1 %-peptona 2 %, se vió un lento desarrollo de bacterias cuyas características morfológicas, individuales y coloniales, así como su comportamiento cinético coincidieron con las de la bacteria de ensayo.

Para comparar, ahora, la acción fitopatogénica de P. syringae se infectaron discos de hoja de las variedades de cebada con distinto contenido de gramina. Se evaluó el daño producido y la cantidad de clorofila en los discos. La cantidad de clorofila resultó ser una buena expresión de la cantidad de tejido intacto o no atacado. Tanto la

diferencia porcentual de daño (DPD) como la diferencia porcentual de contenido de clorofila (DPC) son una medida del cambio neto que se produce entre una condición inicial y otra final. Para todos los casos, la DPD expresa la en daño tisular neto (en porcentaje) en un tratamiento, en comparación con un disco control (relea la sección 3.8.) y en una misma variedad de cebada lógicamente. El signo negativo indica que el daño es mayor en el tratamiento con bacterias que en el control.

Las diferencias de daño en los tratamientos (figura 12) muestran que el daño producido por la bacteria en los discos de la variedad control (F. Unión) fue de 100 % y los discos de esta variedad se tornaron totalmente cloróticos. Haciendo observaciones microscópicas de los discos de hoja atacados por bacterias y de los controles, se ve que el tejido muestra un gran daño en el sistema vascular xilemático. Este daño se extendió a las células vecinas, provocando clorosis en los tejidos adyacentes. En su extremo, las variedades de cebada con alto contenido de gramina en sus hojas, presentaron porcentajes de daño menores de 50 % ($0,02 > p > 0,01$). Así, la variedad con más alto contenido de gramina (Var. Sotol abn, 2,5 mmoles/k.p.f.) presentó una DPD de 10,5 %. Entre la variedad control (0 gramina) y el grupo de variedades de mas alto contenido de gramina estuvo la variedad X81-T-1027, con un contenido intermedio del alcaloide (1,46

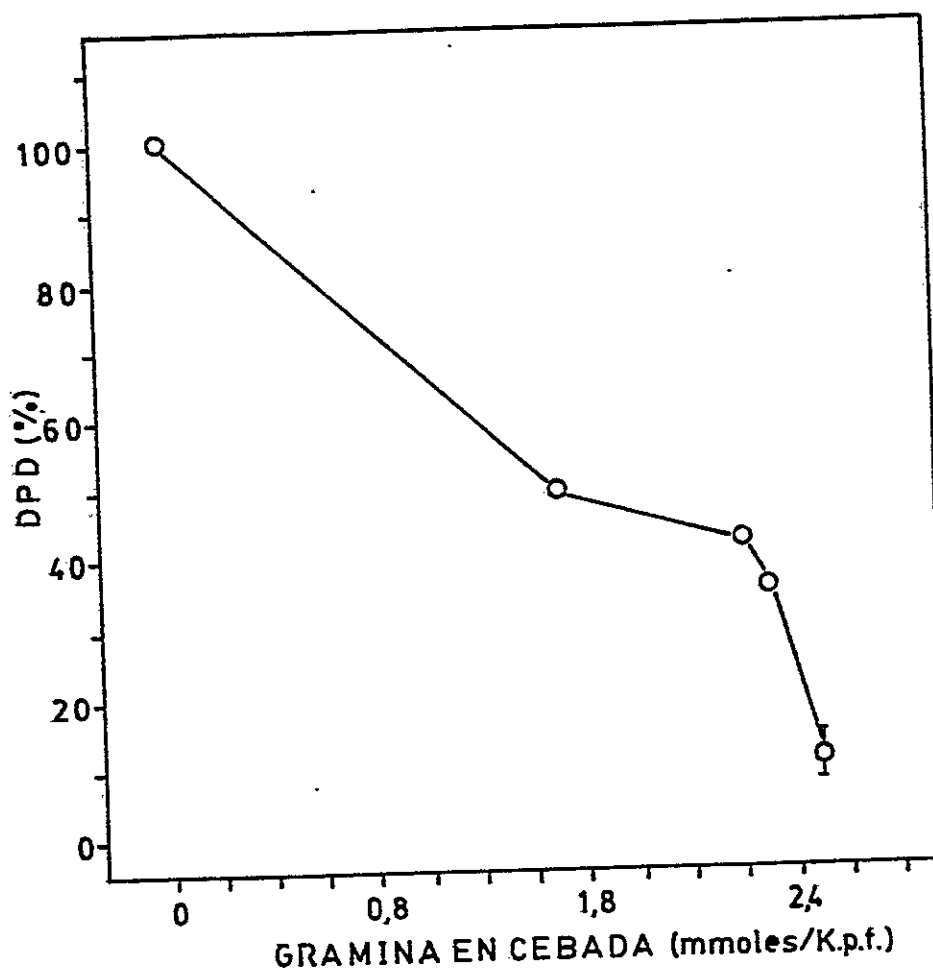


FIGURA 12: Correlación entre el contenido de gramina en cebada y el daño producido en las hojas por Pseudomonas syringae. Discos de hoja de variedades de cebada con diferente contenido de gramina se infectaron con P. syringae. El daño en los discos se evaluó como porcentaje del área total de cada disco. Este daño se expresó como diferencia porcentual de daño o DPD (mat. y met. 3.8.). El DPD expresa el cambio neto en el grado de daño. Los puntos son diferentes con $0,02 > p > 0,01$ (prueba "t").

mmoles/k.p.f.), y que mostró una resistencia al ataque de la bacteria también intermedia.

A su vez, la diferencia en contenido de clorofila (DPC) fue mayor a medida que aumentó la concentración de gramina en las hojas (figura 13). En la DPC el porcentaje significa la diferencia de contenido de clorofila entre discos expuestos y no expuestos a P. syringae, el signo negativo significa que los discos atacados tienen menos clorofila que el control (relea la sección 3.8.). Así, en la variedad F. Unión la DPC fue de -17,8 % y la variedad de cebada Sotolabn, con alto contenido de gramina (2,5 mmoles de gramina/K.p.f. de tejido foliar), dió una DPC de 4 % ($p = 0,05$), este último valor de DPC se interpreta como igual contenido de clorofila que en los discos control.

Estos resultados muestran que el contenido de clorofila en discos atacados por la bacteria fue similar al de los controles (sin inocular) en los discos de las variedades de cebada con mas alto contenido de gramina en sus hojas, lo que se reflejó en un menor daño visual (observado) en los discos. Estos experimentos, conjuntamente con los efectos de la gramina sobre P. syringae, sugieren que la gramina podría ser un factor de protección de la cebada contra esta bacteria.

Como ya se indicó en la introducción, la betaína se acumuló en hojas de cebada sometidas a estrés hídrico. Este compuesto ha demostrado efectos potenciadores del

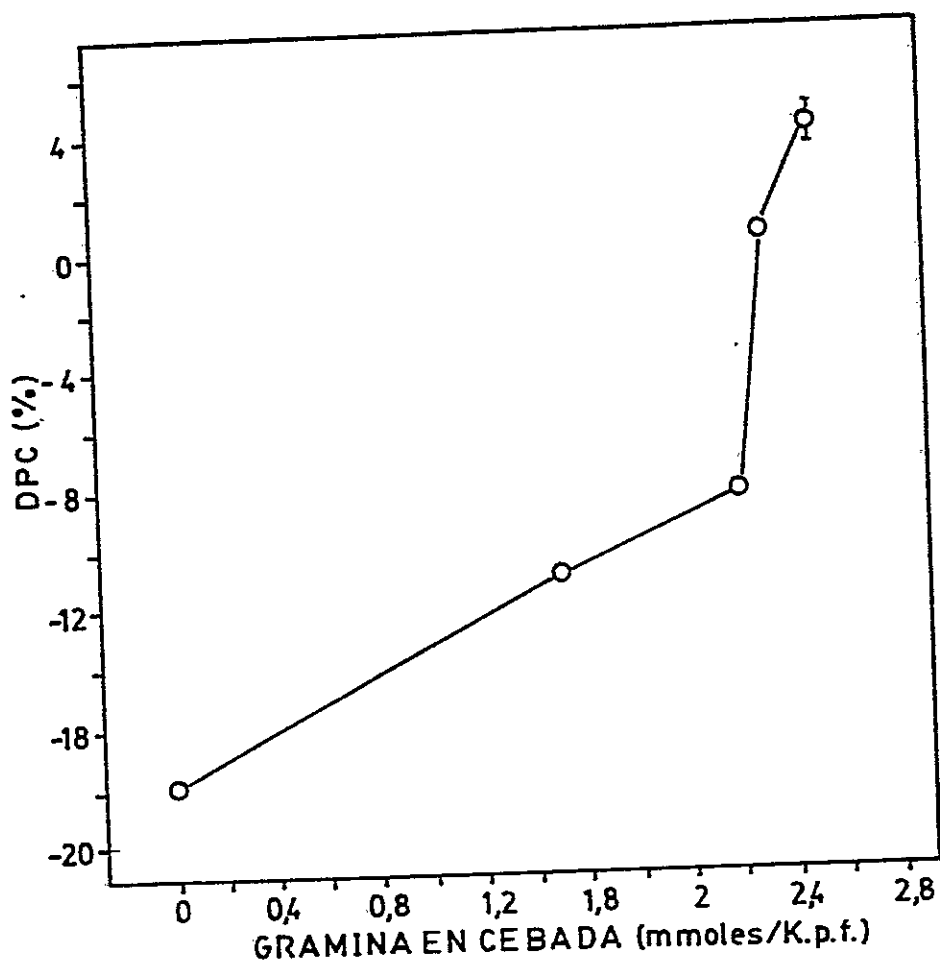


FIGURA 13: Correlación entre el contenido de gramina en cebada y el contenido de clorofila de discos de hoja atacados por Pseudomonas syringae. Discos de hoja de variedades de cebada, con diferente contenido de gramina, se infectaron con P. syringae y se determinó el contenido de clorofila en ellos (mat. y met. 3.5). Ésta se expresó como diferencia porcentual de clorofila, o DPC (mat. y met. 3.5). Este índice expresa el cambio en el contenido de clorofila sobre la clorofila neta en controles de $637 \pm 15 \mu\text{g/ml/g}$. de tejido ($n = 5$; mat. y met. 3.5). Los puntos son diferentes con $p < 0,05$ (prueba "t").

crecimiento poblacional de insectos. Con la base anterior se comparo el daño tisular (DPD) y el contenido de clorofila en discos (DPC) provenientes de plantas de cebada F. Unión en condiciones normales (no estresada o control de estrés hídrico) y plantas de cebada sometidas a estrés hídrico. En este ensayo se tuvo el objetivo de examinar el efecto de la betaína aislada de la gramina, sobre la capacidad de ataque de P. syringae a la cebada. Para ello se usó una variedad de cebada sin gramina, porque si se usa una variedad resistente (productora del alcaloide) el efecto observado sería el de la betaína y la gramina juntos. Por otra parte, en este mismo capítulo, se puede leer los resultados del efecto de la presencia de la gramina en el tejido de la cebada sobre la capacidad de ataque de la bacteria. Con los resultados del efecto 'in vivo' de la betaína y la gramina, independientes entre si, sobre la bacteria se planeó estudiar el efecto de la betaína sobre el de la gramina usando un sistema en el cual se pueda controlar estrictamente las concentraciones de ambos compuestos (ver punto 4.5.1.).

En condiciones normales, P. syringae originó un daño de $[57,5 \pm 3]$ % en comparación con un $[42,7 \pm 3]$ % producido en el control o sin inocular; el contenido de clorofila fue de 453,7 μg de clorofila/g.p.f. en el tratamiento inoculado y de 672,2 μg de clorofila/g.p.f. en el control. Los datos anteriores indican una DPD de +34,6 % y una DPC de -32,5 %.

En la misma variedad de cebada sometida a estrés hídrico se encontró un daño de $[65 \pm 3]$ % en los discos atacados por la bacteria y de un $[45,9 \pm 5]$ % en el control; el contenido de clorofila fue de 552,3 μg de clorofila/g.p.f. en los discos atacados por la bacteria y de 928,9 μg de clorofila/g.p.f. en el control. Los datos anteriores indican una DPD de +41,6 % y una DPC de -40,5 % en el control.

Los resultados anteriores muestran que el efecto del ataque bacteriano fue mayor en los discos provenientes de las plantas sometidas a estrés hídrico. En condiciones de estrés hídrico la concentración de betaína en las hojas de cebada F. Unión fue de 90 mmoles/K.p.seco contra 18 mmoles/K.p.seco (Zúñiga y Corcuera, 1987) en la cebada en condiciones normales. Estos resultados podrían estar indicando algún grado de correlación entre la presencia de la betaína en las hojas de la cebada y el ataque bacteriano.

En la misma variedad de cebada sometida a estrés hídrico se encontró un daño de $[65 \pm 3]$ % en los discos atacados por la bacteria y de un $[45,9 \pm 5]$ % en el control; el contenido de clorofila fue de 552,3 μg de clorofila/g.p.f. en los discos atacados por la bacteria y de 928,9 μg de clorofila/g.p.f. en el control. Los datos anteriores indican una DPD de +41,6 % y una DPC de -40,5 % en el control.

Los resultados anteriores muestran que el efecto del ataque bacteriano fue mayor en los discos provenientes de las plantas sometidas a estres hidrico. En condiciones de estres hidrico la concentracion de betaina en las hojas de cebada F. Union fue de 90 $\mu\text{moles/K.p.seco}$ contra 18 $\mu\text{moles/K.p.seco}$ (Zuniga y Corcuera, 1987) en la cebada en condiciones normales. Estos resultados confirman el que la betaina pueda ser un potenciador del ataque bacteriano cuando se presenta en la cebada.

4.4.4. Efectos de la gramina sobre la respiracion bacteriana.

Se determino estudiar el efecto de la gramina sobre la respiracion bacteriana, debido a estudios anteriores. Estos prueban que la gramina actua sobre procesos homologos en tilacoides de espinaca (Andreo et al, 1984), ademas se indica como un desacoplante en mitocondrias animales (Niemeyer y Roveri, 1984). Debido a la semejanza de una bacteria como *P. syringae* con una mitocondria, y considerando que los esquemas teoricos de los procesos de fosforilacion oxidativa son tambien similares, se eligio hacer este estudio. Ademas, como *P. syringae* puede penetrar por heridas del tejido vegetal, se considero que la forma mas natural de contacto de ellas con cualquier compuesto es

a través de la presencia del compuesto en el medio circundante. Según esto se estaría usando un sistema homologable a las circunstancias naturales.

Con el fin de establecer el efecto general de la gramina sobre la respiración bacteriana, se estudió el efecto de concentraciones crecientes de gramina sobre el transporte basal de electrones (respiración sin suplementos metabólicos), acoplado (respiración suplementada con ADP y Pi) e inducido por un sustrato (NH_4Cl) (figura 14). La gramina, hasta 2 mM, aumentó la tasa respiratoria sobre la del transporte basal ($1,02 \times 10^{-3} \pm 5 \times 10^{-5}$ $\mu\text{moles O}_2/\text{ml de medio de reacción}/\text{min.}/\mu\text{g de proteína bacteriana}$) ($p = 0,05$) y a concentraciones mayores la tasa fue inhibida por el alcaloide ($p = 0,07$, $p = 0,03$, etc). El ADP aumentó la tasa respiratoria basal en un 26 % ($p = 0,08$); pero, este aumento en la tasa fue inhibido progresivamente por la gramina ($p = 0,1$ para 2 mM; $p = 0,07$ para 3 mM, etc), no observándose el efecto estimulante inicial de la gramina ocurrido en el transporte basal. Por su parte el NH_4Cl aumentó la tasa respiratoria sobre la basal en un grado semejante (28,6 %) al ADP ($p = 0,1$) y la gramina, hasta 2 mM, aumentó la tasa respiratoria sobre el efecto del NH_4Cl ($p = 0,07$) y, al igual que en los casos anteriores, a mayor concentración la gramina inhibió la actividad respiratoria bacteriana.

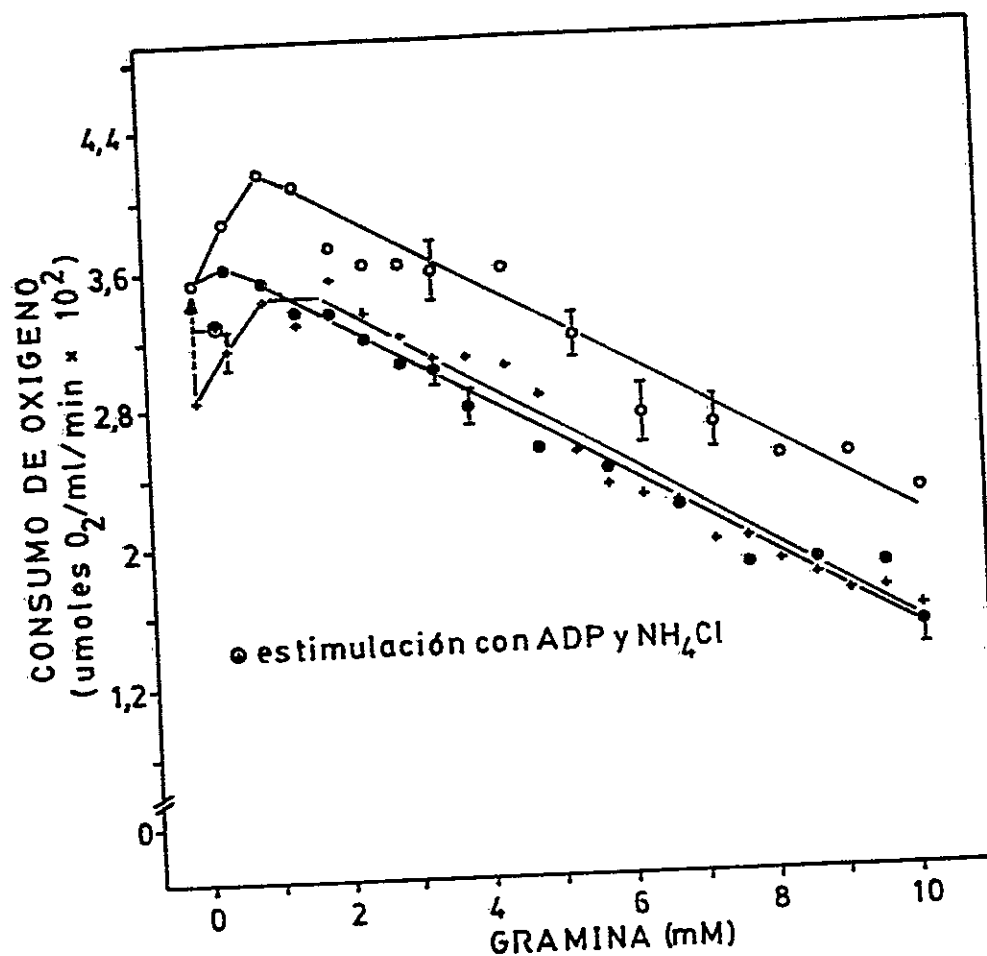


FIGURA 14: Efecto de la gramina sobre la respiración bacteriana. Se estudió el efecto de concentraciones crecientes de gramina en la respuesta respiratoria de P. syringae, en sus estados basal (cruces), acoplado o suplementado con ADP (círculos llenos) y sobre la respiración acelerada por acción de sustrato (NH₄Cl, círculos vacíos). Los errores estandar menores o iguales al 10 % no se indicaron. La tasa respiratoria basal fue $1,02 \times 10^{-3} \pm 5 \times 10^{-5}$ μmoles de O₂/ml de medio de reacción/min/μg de proteína bacteriana. Los resultados fueron significativos con $0,07 > p > 0,03$ (prueba "t").

Estos resultados muestran que la gramina estimula la respiración hasta 2 mM y, luego, a mayores concentraciones, la inhibe independientemente del efecto inducido previamente. Se puede observar, sin embargo, que el transporte acoplado es especialmente afectado. En todos los casos la gramina, a la concentración 5 mM, comenzó a producir un grado de inhibición bajo la tasa respiratoria basal sin ser letal. Por las características mencionadas, esta concentración de gramina se usó en los ensayos posteriores.

Como ya se indicó anteriormente, la gramina afectó inhibiendo directamente la respiración inducida por el ADP (transporte acoplado). Entonces, con el objetivo de profundizar el estudio de éste efecto de la gramina, se investigó si el ADP tenía algún efecto sobre la acción de la gramina. Para lo anterior, se vió el efecto de concentraciones crecientes del ADP sobre la respiración bacteriana en presencia de gramina 1 mM, como concentración estimuladora del transporte basal y 5 mM, como concentración medianamente inhibitoria del transporte basal (figura 15). La diferencia porcentual de tasa respiratoria (DTR) expresa la diferencia neta de tasa respiratoria entre la respiración inducida y la basal, como porcentaje de la tasa respiratoria basal. El signo negativo implica que la tasa respiratoria basal es mayor que la inducida por el compuesto, lo que implica inhibición.

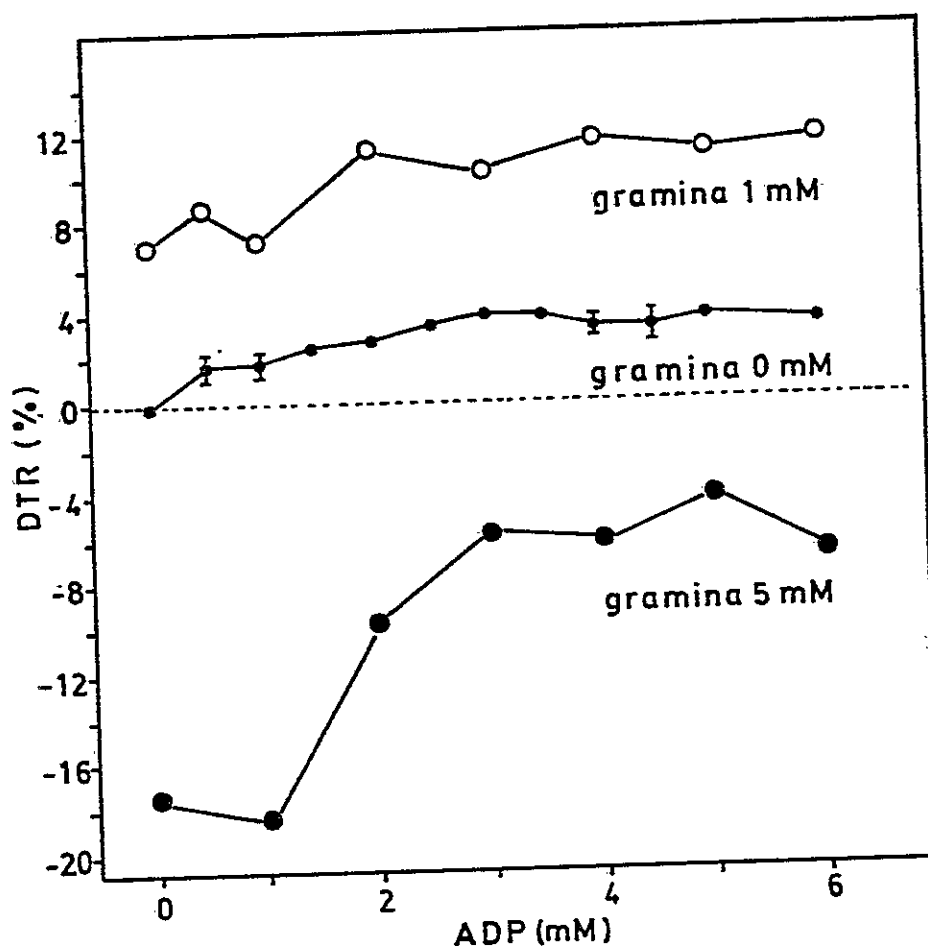


FIGURA 15: Acción del ADP sobre el efecto de la gramina en Pseudomonas syringae. Se estudió el efecto de concentraciones crecientes del ADP en la respuesta respiratoria de P. syringae afectada por gramina en una concentración estimulante (1 mM) y otra inhibitoria (5 mM). Las tasas respiratorias se expresaron como diferencia porcentual de tasa respiratoria o DTR (mat. y mat. 3.13). La tasa basal respiratoria fue $1,31 \times 10^{-3} + 1 \times 10^{-5}$ $\mu\text{moles de O}_2$ /ml de medio de reacción/min/ μg de proteína bacteriana. (n = 41, desde distintos ensayos). El signo negativo implica inhibición sobre la tasa basal. Los errores estandar menores de 10 % no se indican. Los resultados son significativos con $p < 0,001$ (5 mM) y $p < 0,04$ (1 mM) (prueba "t").

El ADP 3 mM aumentó la respiración basal ($1,31 \times 10^{-3}$ $\pm 1 \times 10^{-5}$ $\mu\text{moles de O}_2/\text{ml de medio de reacción}/\text{min}/\mu\text{g de proteína bacteriana}$, $n = 41$, desde varios ensayos) en un 6 % sobre el aumento producido por la gramina 1 mM ($p < 0,001$), manteniéndose el mismo efecto hasta altas concentraciones de ADP (7 mM). Además, el ADP revertió el efecto inhibitorio producido por la gramina en la respiración bacteriana de una DTR de -18 % a un -4 % ($p = 0,04$, 77,7 % de recuperación), 3 mM de ADP fue la concentración de efecto saturante, vale decir sobre esta concentración de ADP no hay variación del efecto. Los resultados parciales muestran que en presencia de ADP el efecto inhibitorio de la gramina es menor. Para detallar más lo anterior, se suplemento a bacterias con 4 mM de ADP y se observó el efecto de la gramina sobre su respiración (figura 16) y se encontró que la gramina comenzó a inhibir la respiración a mayor concentración, entre 4 y 5 mM ($p = 0,02$). El efecto protector del ADP se reafirmó al compararlo con la DTR obtenida para 5 mM de gramina sola en el transporte basal y con 5 mM de gramina mas ADP 4 mM las cuales fueron $-16,4 \pm 1,8 \%$ (valor proveniente de cinco otros valores obtenidos independientemente) y $-4,3 \pm 0,3 \%$, respectivamente.

Debido a que la síntesis de ATP, además del ADP requiere de fosfato, se determinó si existía alguna relación entre el consumo de fosfato por parte de las bacterias en relación a

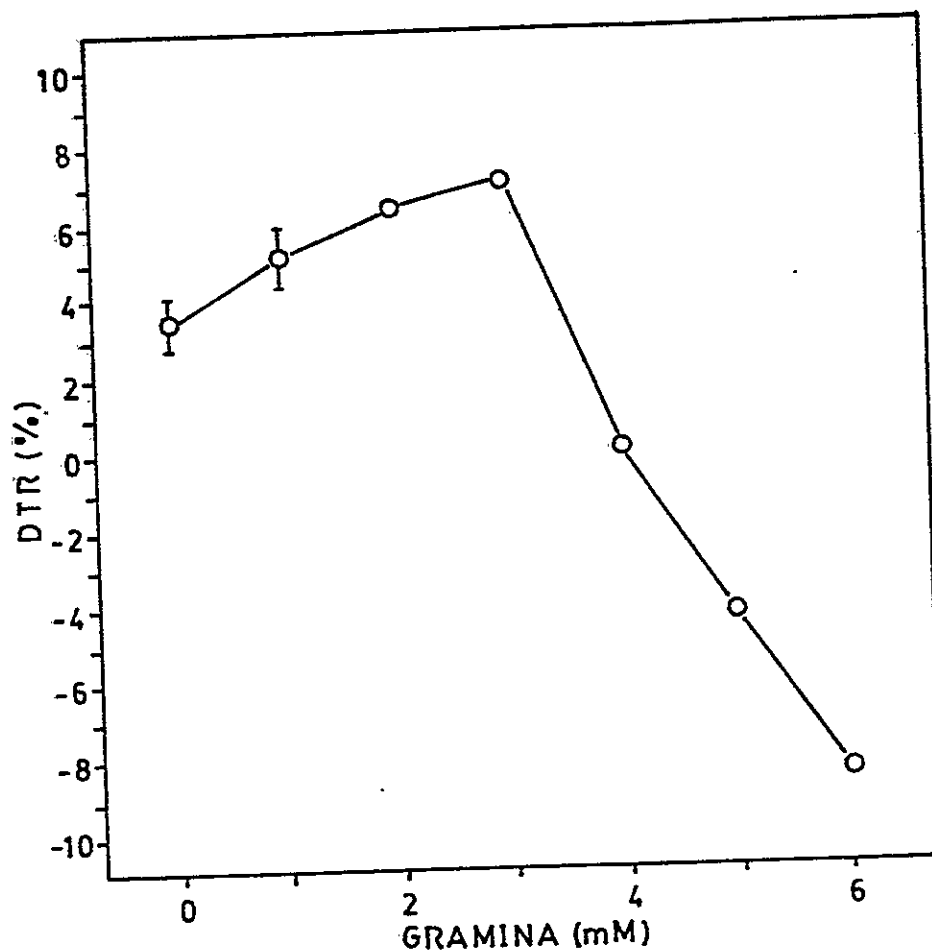


FIGURA 16: Efecto de la gramina sobre la respiración bacteriana en presencia de ADP. Se estudió el efecto de concentraciones crecientes de gramina en la respuesta respiratoria de cultivos de Pseudomonas syringae en presencia de 4 mM de ADP. La tasa basal fue $1,31 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-5}$ $\mu\text{moles de O}_2/\text{ml de medio de reaccion}/\text{min}/\mu\text{g de proteina bacteriana}$. (n = 41, desde varios ensayos). Las tasas respiratorias se expresaron como diferencia porcentual de tasa respiratoria o DTR (mat. y met. 3.13). El signo negativo implica inhibición de la tasa basal. Los errores estandar menores de 10 % no se indican. Los resultados son significativos con $p = 0,02$ (prueba "t").

la presencia de los compuestos inhibidores en cultivos bacterianos. En cultivos de 18 horas, conteniendo gramina incorporada en concentraciones crecientes, se cuantifico el fosfato y se expreso como porcentaje de la concentracion en el control (0,50 + 0,01 umoles de fosfato/ml de medio) (figura 17). La concentracion de fosfato en el cultivo bacteriano con 2 mM de gramina represento un 12 % (p = 0,03) de la concentracion total del medio puro y un 80 % a 4 mM de gramina (p = 0,02); a concentraciones mayores del alcaloide en el medio, la concentracion de fosfato en los medios de cultivo con bacterias se igualo a la del control (sin bacterias).

Los resultados muestran que se produjo un fuerte decaimiento del consumo de fosfato a las concentraciones de 3 mM de gramina, mostrando que la gramina afecta el consumo de fosfato por parte de los microorganismos.

Los resultados del efecto de la gramina sobre el consumo del ADP y del fosfato indicarian un posible efecto inhibitorio de la gramina sobre la actividad de la ATPsintetasa.

4.5. Modo de accion de la gramina.

Se encontro que la gramina, en la dieta, produjo efectos repelentes en larvas de *H. zea*. Ademas se encontraron efectos inhibitorios bacterioestaticos del alcaloide sobre

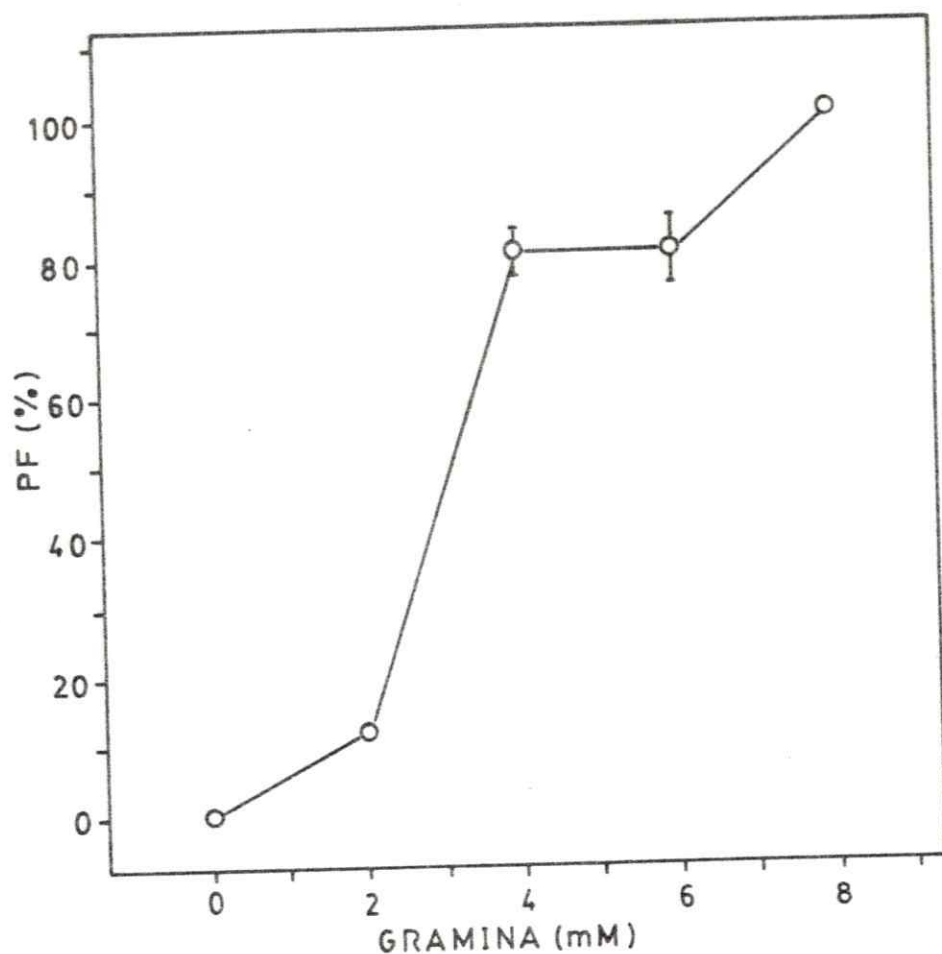


FIGURA 17: Efecto de la gramina en el consumo de fosfato por bacterias. Se incorporó gramina en concentraciones crecientes en cultivos de Pseudomonas syringae. A las 18 horas de incubación se determinó el contenido de fosfato (mat. y met. 3.14). El contenido de fosfato en los tratamientos se expresó como porcentaje del fosfato en el control o PF (mat. y met. 3.14). El contenido de fosfato en el control (medio sin inocular) fue de $0,50 \pm 0,01$ $\mu\text{moles/ml}$ de fosfato ($n = 6$). Los errores estandar menores de 10 % no se indican. La disminución del consumo fue significativa a $p < 0,03$ (prueba "t").

P. syringae. Por lo anterior se investigó el posible mecanismo de acción general de la gramina.

Se estudiaron los efectos de distintos compuestos sobre la respiración celular de P. syringae (ADP, NADH, succinato, NH_4Cl y betaína). Se comparó, en todos los casos, el efecto individual de los distintos metabolitos con sus efectos sobre la inhibición por gramina y 2,4-DNP.

En primer lugar, se estudió el efecto de la betaína por ser un compuesto que ha manifestado efectos contrarios a los de la gramina sobre áfidos (Zúñiga et al, 1987, en prensa). En segundo lugar, el ADP revertió el efecto inhibitorio de la gramina.

En la figura 15 puede verse la comparación del efecto de 5 mM de gramina con el efecto puro del ADP (curva 0 mM de gramina), se sugiere un efecto inhibitorio de la gramina sobre el consumo de ADP. Si bien el efecto revertidor del ADP sobre la inhibición de la respiración por 5 mM de gramina existe, este no fue suficiente como para normalizar la actividad respiratoria. Recordando que el ADP sería usado por la ATP sintetasa (teoría de Mitchell) se podría suponer que la gramina está actuando como un inhibidor sobre esta enzima.

Como se mencionó algunos autores postulan que la gramina es un desacoplante y un inhibidor a nivel de la cadena respiratoria. Para examinar lo anterior se estudió el efecto de compuestos intermediarios de la cadena

respiratoria, y de otros, sobre la acción de la gramina. También, con el mismo objetivo anterior, se comparó la actividad de la gramina con la del desacoplante reconocido 2,4-dinitrofenol, para el cual se comprobó previamente que tenía actividad sobre la respiración de P. syringae.

4.5.1. Efecto de la betaína sobre *P. syringae*.

Se estudió el efecto de la betaína sobre la actividad de la gramina y otros compuestos en *P. syringae*, debido a que se ha encontrado que la betaína disminuyó los efectos tóxicos de la gramina sobre áfidos (Zúñiga y Corcuera, 1987). Esto se hizo en el sistema in vitro descrito, en esta tesis, para utilizar el proceso respiratorio de *P. syringae*, ya que se puede controlar las concentraciones de betaína y de los demás compuestos (ver punto 4.4.3. 6º párrafo).

Se incorporó betaína a caldos de cultivo que fueron inoculados con *P. syringae* (figura 18) y se encontró que la betaína afectó solamente a la fase de crecimiento estacionario, aumentando el tamaño máximo final de la población en función del aumento de de la betaína disuelta. Para complementar los resultados anteriores se determinó su efecto directamente sobre la respiración bacteriana. Además, se comparó la diferencia de tasa respiratoria (DTR) inducida por distintos efectores y mezclas de ellos, en un cultivo bacteriano sin y con betaína (tabla 6). La tasa

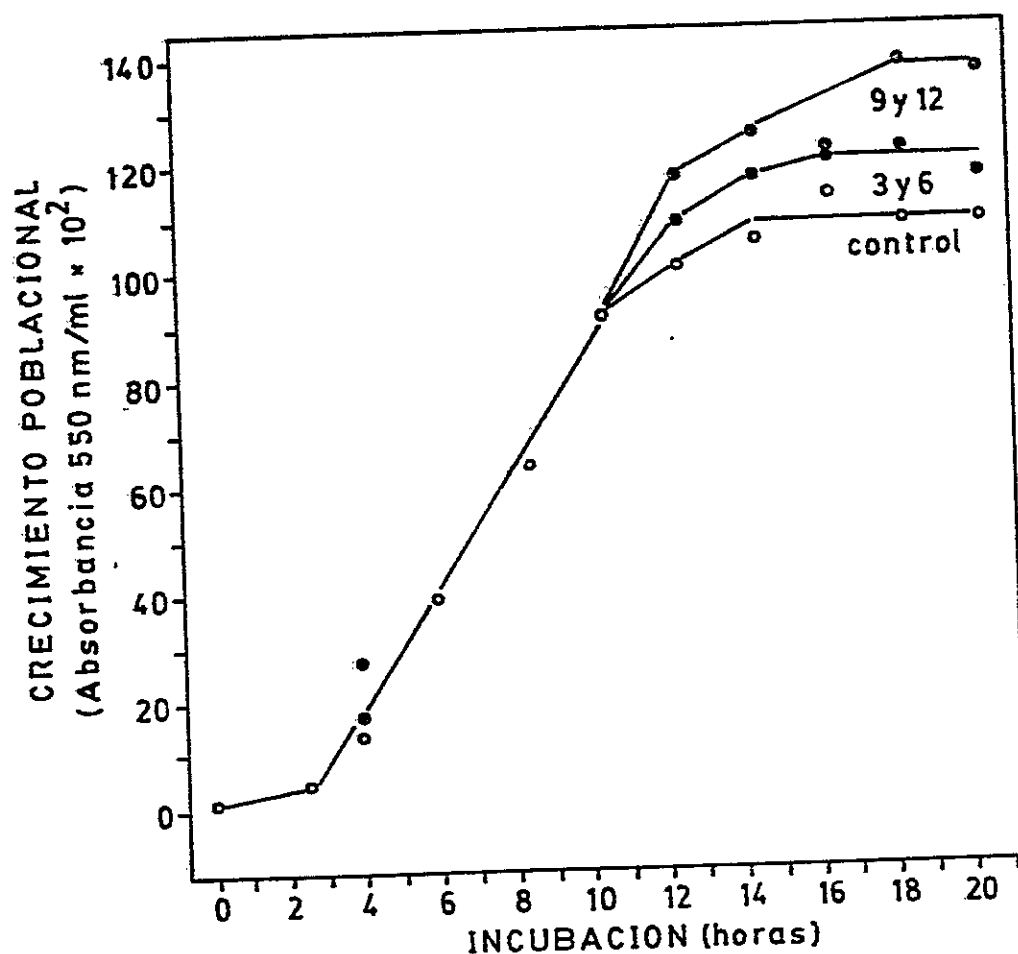


FIGURA 18: Efecto de la betaína sobre la cinética de crecimiento poblacional de Pseudomonas syringae. A caldo de cultivo se incorporó betaína en concentraciones crecientes. Cada uno de ellos se inoculó con P. syringae. Los cultivos se mantuvieron en un baño termostático con agitación (60 ciclos/min, 28 °C) y se midió la transmitancia (550 nm) de los cultivos periódicamente. Se usó la absorbancia de los cultivos ($2 - \log T\%$), como medida del crecimiento poblacional, y se expresó en función del tiempo de incubación. El número en las curvas corresponde a la concentración mM de betaína en el medio. Los errores menores de 10 % no se indican.

TABLA 6: Efecto de la betaína en la acción de distintos compuestos sobre la tasa respiratoria de Pseudomonas syringae.

EFECTOR	mM	DTR (%)	
		s/BETAÍNA	+ BETAÍNA 0,8 mM
NADA	0	0	11 ± 3
ADP	1,00	8 ± 3	18 ± 3
NADH	0,14	9 ± 3	21 ± 4
succinato	1,00	5 ± 1	7 ± 1
betaína	0,80	11 ± 3	-
succ/bet	0.14/0.8	18 ± 2	-
NADH/ADP	0.14/1.0	18 ± 3	26 ± 6
2,4-DNP	0,4	3 ± 0.1	4.4 ± 0,1

± = Error estandar, - = no hay error estandar

Se comparó la actividad respiratoria de cultivos de P. syringae inducida por distintos metabolitos en ausencia (estado basal) y presencia de betaína. Betaína 0,8 mM correspondió a la concentración de efecto saturante. Las tasas respiratorias se expresaron como diferencia porcentual de tasa respiratoria o DTR (mat. y met. 3.13). La tasa respiratoria basal fue $1,1 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-5}$ $\mu\text{moles de O}_2/\text{ml}$ de medio de reacción/min/ μg de proteína bacteriana (n = 4). Los resultados son significativos con $p < 0,03$.

respiratoria basal fue $1,1 \times 10^{-3} \pm 1,4 \times 10^{-5}$ μ moles de O_2 /ml de medio de reacción/min/ μ g de proteína bacteriana. Se encontró que la respiración bacteriana fue estimulada por la mayoría de los metabolitos usados ($p = 0,03$) e inhibida por el desacoplante 2,4-DNP ($p = 0,01$), en ausencia de betaína. La betaína sola produjo un efecto estimulante de la respiración más alto que el producido por los demás compuestos ($p = 0,01$). Cuando se suplementó con betaína 0,8 mM (concentración de efecto saturante), el efecto de la betaína se mantuvo y predominó por sobre el efecto de los otros metabolitos ($p = 0,01$). Para este caso, el efecto inhibitorio del 2,4-DNP fue menor en presencia de betaína; pero, este efecto fue notoriamente menor que el observado en los otros compuestos ($p = 0,01$).

Se comparó la gramina y el desacoplante 2,4-DNP en sus efectos sobre la respiración bacteriana basal y suplementada con 0,8 mM de betaína (tabla 7 y 8, respectivamente). La tasa respiratoria basal fue de $1,1 \times 10^{-3} \pm 1,4 \times 10^{-5}$ μ moles de O_2 /ml de medio de reacción/min./ μ g de proteína bacteriana. La gramina (tabla 7) comenzó a inhibir el transporte basal desde 3 mM (DTR = -10 %, $p = 0,01$), llegando a una inhibición alta a 6 mM (DTR = -41 %, $p = 0,001$) y cuando el cultivo bacteriano se suplementó con betaína la gramina comenzó a inhibir la respiración a los 6 mM (DTR = -14 %, $p = 0,002$). Por su parte, el 2,4-DNP (tabla 8) comenzó a inhibir el transporte

TABLA 7: Efecto de la betaína en la acción de la gramina sobre la tasa respiratoria de Pseudomonas syringae.

GRAMINA mM	DTR (%)	
	BASAL	+ BETAÍNA 0,8 mM
0	0	11 ± 3
1	15 ± 1	18 ± 2
2	14 ± 1	18 ± 2
3	-10 ± 1	18 ± 2
4	-15 ± 2	14 ± 3
5	-27 ± 1	9 ± 2
6	-41 ± 5	-14 ± 2

± = Error estandar

En cultivos de P. syringae se comparó el efecto de la gramina sobre la tasa respiratoria en ausencia (estado basal) y presencia de betaína. Betaína 0,8 mM corresponde a la concentración de efecto saturante (concentración de máximo efecto). Las tasas respiratorias se expresaron como diferencia porcentual de tasa respiratoria o DTR (mat. y met. 3.13). La tasa respiratoria basal fue $1,1 \times 10^{-5}$ ± 1×10^{-5} µmoles de O₂/ml de medio de reacción/min/µg de proteína bacteriana (n = 4). Los resultados son significativos con $0,01 > p > 0,001$ (prueba "t").

TABLA 8: Efecto de la betaína en la acción del 2,4-dinitrofenol sobre la tasa respiratoria de Pseudomonas syringae.

2,4-DNP mM	DTR (%)	
	BASAL	+ BETAÍNA
0	0	9,9 ± 0.1
0,4	2,7 ± 0.1	4,4 ± 0.1
0,8	-5,8 ± 0.2	-6,3 ± 0.3
1,6	-43,0 ± 1.0	-42,1 ± 0.7
2,0	-64,0 ± 0.6	-44,4 ± 1.0

± = Error estandar

En cultivos de P. syringae se comparó el efecto del 2,4-DNP sobre la tasa respiratoria en ausencia (estado basal) y presencia de betaína. Betaína 0,8 mM corresponde a la concentración de efecto saturante. Las tasas respiratorias se expresaron como diferencia porcentual de tasa respiratoria o DTR (mat. y met. 3.13). La tasa respiratoria basal fue $1,1 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-5}$ $\mu\text{moles de O}_2/\text{ml de medio de reaccion}/\text{min}/\mu\text{g de proteína bacteriana}$ (n = 4). Los resultados son significativos con $p < 0,001$ (prueba "t").

basal a los 0,8 mM (DTR = -5,8 %, $p < 0,001$) al igual que cuando el cultivo se suplemento con betaína (DTR = -6,3 %, ($p < 0,001$).

Los resultados generales muestran a la betaína como un importante estimulador de la respiración. Por otra parte, se puede observar que la betaína revertió solamente el efecto de la gramina y no el del 2,4-DNP, lo que indica que ambos compuestos tienen modos de acción diferentes. Luego, el comportamiento de la gramina frente a la betaína puede ser una prueba de que este alcaloide no es un desacoplante.

4.5.2. Efecto del 2,4 - dinitrofenol (2,4 - DNP) sobre P. syringae.

Al estudiar el efecto del 2,4-DNP sobre el crecimiento bacteriano (figura 19), se encontró que el desacoplante prolongó la fase de latencia ($p < 0,001$ para las diferencias) y disminuyó el tamaño máximo final de los cultivos con el aumento del 2,4-DNP en el medio de cultivo ($p = 0,02$ máximo). Sobre 0,4 mM el 2,4-DNP comenzó a inhibir y a concentraciones mayores de 0,8 mM los cultivos no manifestaron crecimiento importante. Se inocularon medios de cultivo sin gramina (tabla 9) usando alicuotas de los cultivos originados en los tratamientos con gramina. En el crecimiento por reinoculación se calculó $p \gg 0,1$ (prueba "t") para las diferencias con el crecimiento en el

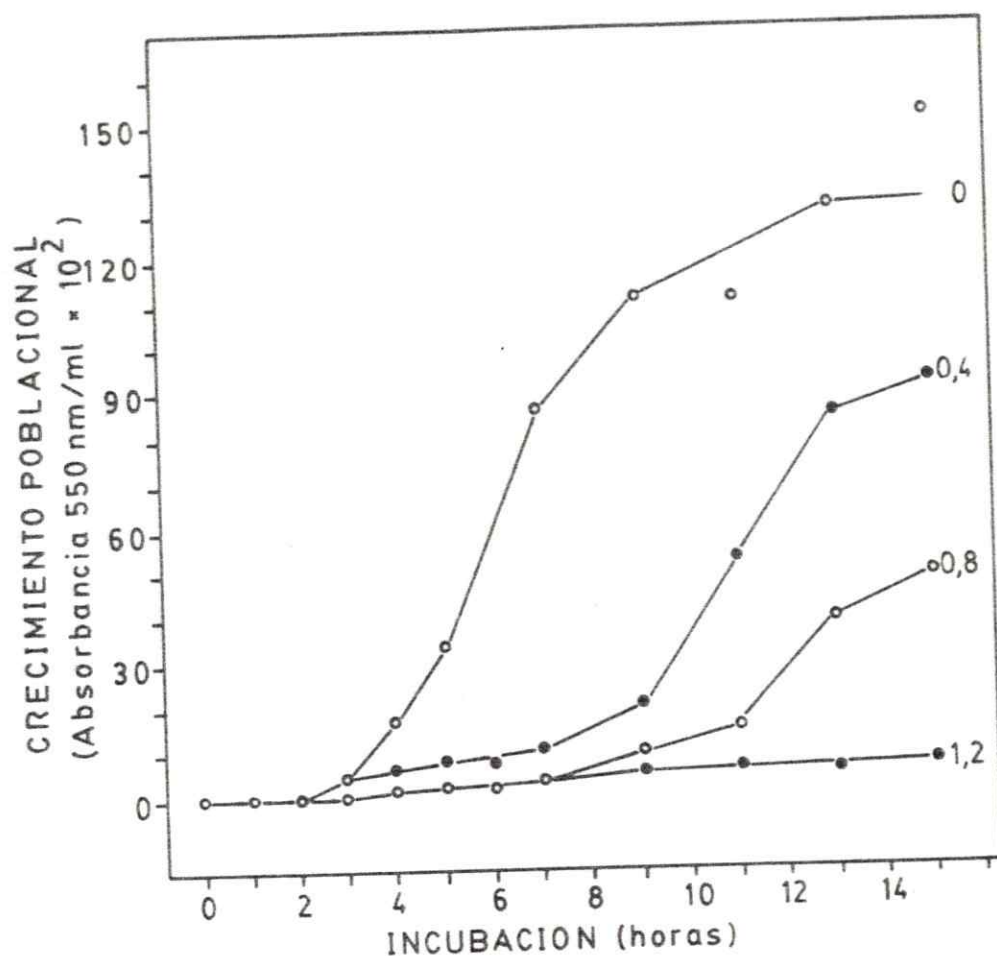


FIGURA 19: Efecto del 2,4-dinitrofenol sobre la cinética de crecimiento de Pseudomonas syringae. A caldos de cultivo se incorporó 2,4-DNP en concentraciones crecientes. Cada uno de ellos se inoculó con P. syringae. Los cultivos se mantuvieron en un baño termorregulado con agitación (60 ciclos/min, 28 °C) y se midió la transmitancia (550 nm) de los cultivos periódicamente. Se usó la absorbancia de los cultivos ($2 - \log T\%$) como medida de crecimiento poblacional, y se expresó en función del tiempo de incubación. El número en cada curva corresponde a la concentración del 2,4-DNP en cada tratamiento. Los resultados fueron significativos con $p < 0,02$ (prueba "t").

TABLA 9: Efecto del 2,4-dinitrofenol en la recuperación de cultivos de Pseudomonas syringae.

2,4-DNP en medio inicial (mM)	Tamaño poblacional (abs 550 nm) a las 18 horas	
	medio con 2,4-DNP (inoculación)	medio sin 2,4-DNP (reinoculación)
0	1,20	1,21
0,4	1,21	1,21
0,8	1,12	1,10
1,6	0,33	1,10
2,0	0,05	1,10

Errores estandar inferiores al 10 %.

Se incorporaron concentraciones crecientes de 2,4-DNP a cultivos líquidos de P. syringae y se les determinó la absorbancia (550 nm) a las 18 horas de incubación. A las 18 horas de se tomaron alícuotas de cada tratamiento y se inoculó medios de cultivo sin el alcaloide. Estos cultivos se mantuvieron en un baño termoregulado con agitación (60 ciclos/min, 28 °C) y se les determinó la absorbancia (550 nm) a las 18 horas de incubación. La diferencia de crecimiento poblacional bacteriano bajo la concentración máxima estimulante de 2,4-DNP (0,8 mM) no fue significativa ($p \gg 1$ para la diferencia). A concentraciones mayores de 2 mM las diferencias fueron significativas con $p = 0,27$ (de tabla "t").

cultivo proveniente desde 0 mM de 2,4-DNP. No siendo significativas las diferencias anteriores, se puede decir que el crecimiento por reinoculación fue semejante al crecimiento de la población bacteriana en el control (sin 2,4-DNP). Las diferencias de crecimiento poblacional bacteriano entre la reinoculación y los tratamientos con 2,4-DNP, no fueron significativos bajo la concentración máxima estimuladora (0,8 mM), calculandose $p \gg 1$ para las diferencias (prueba chi-cuadrado). Las diferencias fueron significativas a concentraciones mayores de 0,8 mM, con $p = 0,27$ (prueba chi-cuadrado).

Estos resultados indican que el 2,4-DNP tiene un efecto también bacterioestático sobre la cinética de crecimiento de P. syringae.

Se observó el efecto del 2,4-DNP sobre la respiración bacteriana (figura 20). La respiración basal fue de $1,78 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-5}$ $\mu\text{moles de O}_2 / \text{ml de medio de reaccion/min} / \mu\text{g de proteína bacteriana}$. A baja concentración del desacoplante se vio estimulación de la tasa respiratoria (DTR positiva) ($p = 0,02$) y desde 0,8 mM se observa una inhibición (DTR negativa) progresiva de la respiración por parte del desacoplante ($p = 0,02$). Así, se observó una DTR de 2,7 % con 2,4-DNP 0,4 mM y de 1,3 % con 2,4-DNP 0,6 mM, y a concentraciones mayores del desacoplante la DTR se hizo negativa, siendo de -5,8 % con 0,8 mM de DNP y llegando a -64,4 % con 2 mM de DNP. Estos

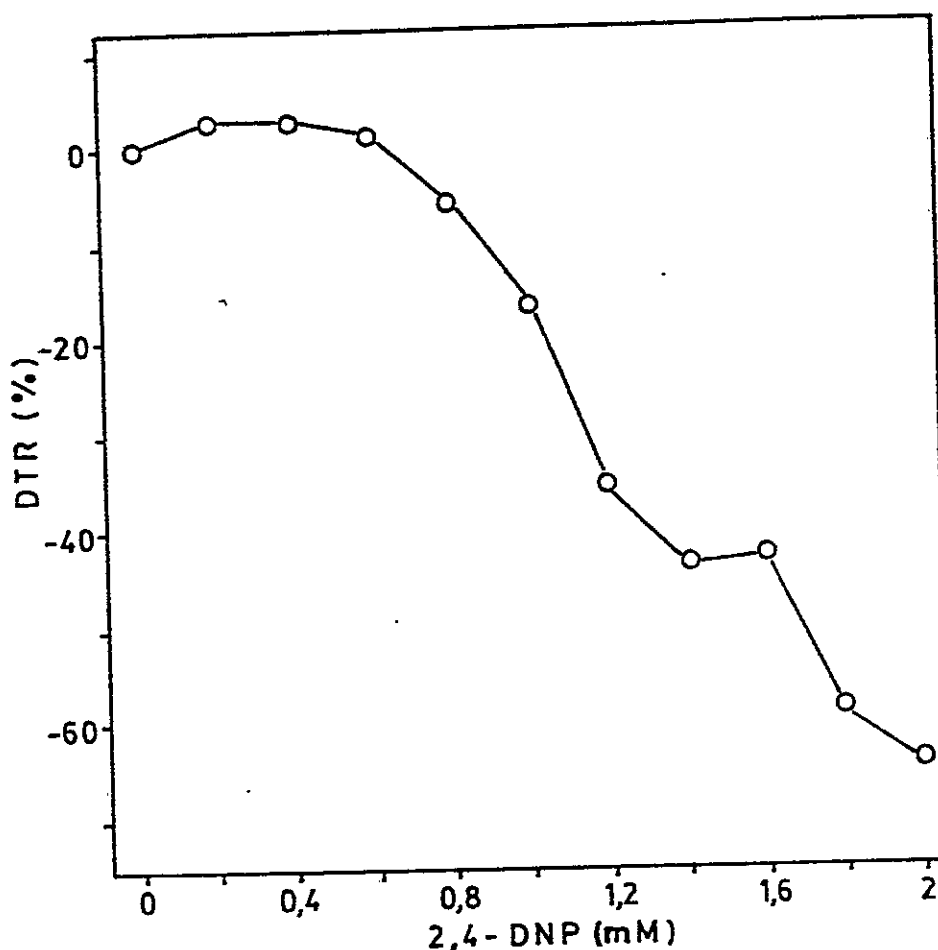


FIGURA 20: Efecto del 2,4-dinitrofenol sobre la respiración bacteriana. Se estudió el efecto de concentraciones crecientes de 2,4-DNP en la respuesta basal respiratoria de Pseudomonas syringae. Las tasas respiratorias se expresaron como diferencia porcentual de tasa respiratoria o DTR (mat. y met. 3.13). La tasa respiratoria basal fue $1,78 \times 10^{-3} + 7 \times 10^{-5}$ $\mu\text{moles de O}_2/\text{ml de medio de reaccion}/\text{min}/\mu\text{g de proteina bacteriana}$. El signo negativo implica inhibición de la tasa basal. Los errores estandar menores de 10 % no se indican. Los resultados son significativos con $p < 0,02$ (prueba "t").

resultados explican el drástico comportamiento del desacoplante, el cual reitera su diferencia con el efecto de la gramina.

4.5.3. Efecto del NH_4Cl sobre P. syringae.

El amonio se ha citado como un sustrato utilizado por bacterias, entre otras, del genero Pseudomonas en su metabolismo basal (Abdelal, 1979). Al respecto se dió más información en la introducción. Por lo anterior se estudió el efecto del amonio sobre el crecimiento poblacional de la bacteria, con el fin de establecer el efecto este como sustrato sobre P. syringae.

El NH_4Cl (figura 21) produjo un prematuro y leve desarrollo de la fase de crecimiento proporcional con respecto al control ($p = 0,01$ a las 8 horas de incubación), aumentando la densidad poblacional de la fase de crecimiento estacionario. La fase estacionaria inducida por el NH_4Cl fue semejante en todos los tratamientos a las 24 horas ($p > 0,1$), indicando que pudo haber ocurrido una estimulación inicial sólo por presencia de sustrato.

Por otra parte, se estudió el efecto de la gramina en la respiración de cultivos bacterianos suplementados con distintas concentraciones de NH_4Cl (figura 22). La tasa respiratoria basal fue de $1,24 \times 10^{-3} \pm 1,1 \times 10^{-5}$ μmoles de O_2/ml de medio de reaccion/min/ μg de proteína bacteriana

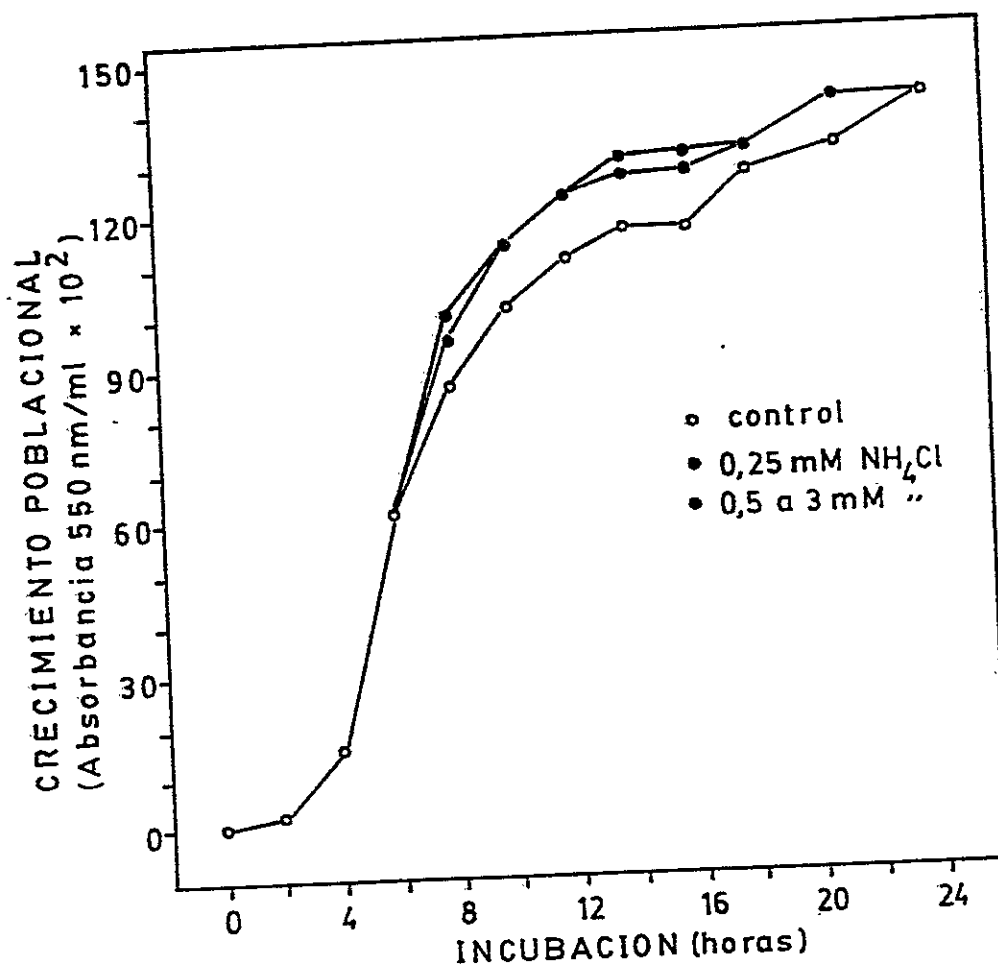


FIGURA 21: Efecto del NH_4Cl en el crecimiento poblacional de Pseudomonas syringae. A caldos de cultivo se incorporó NH_4Cl en concentraciones crecientes. Cada uno de ellos se inoculó con P. syringae. Los cultivos se mantuvieron en un baño termostático con agitación (60 ciclos/min, 28 °C) y se midió la transmitancia (550 nm) de los cultivos periódicamente. Se usó la absorbancia de los cultivos ($2 - \log T\%$), como medida del crecimiento poblacional, y se expresó en función del tiempo de incubación. El número en cada curva corresponde a la concentración mM de NH_4Cl en el medio. No hay error estándar. Los puntos son diferentes al control solo hasta las 17 horas, con $p = 0,01$ (prueba "t").

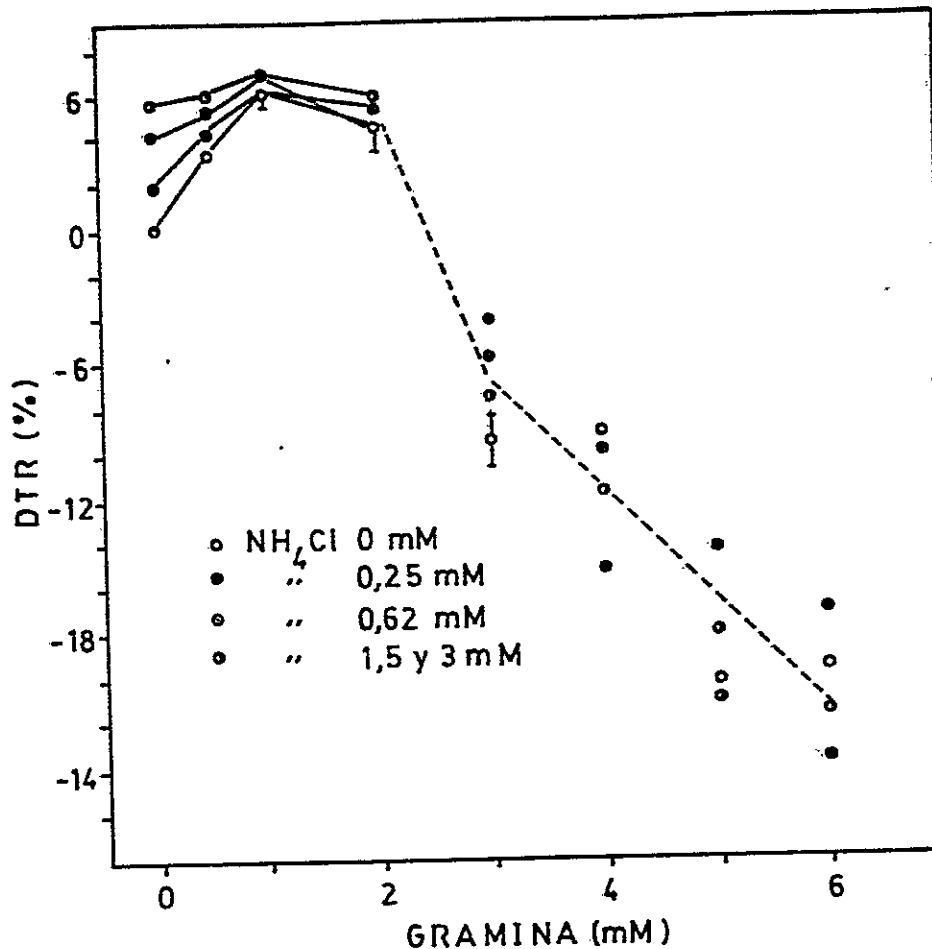


FIGURA 22: Efecto de la gramina sobre la respiración bacteriana en presencia de NH_4Cl . A cultivos de Pseudomonas syringae suplementados con distintas concentraciones de NH_4Cl se les determinó la tasa respiratoria en relación al agregado de concentraciones crecientes de gramina. Las tasas respiratorias se expresaron como diferencia porcentual de tasa respiratoria o DTR (mat. y met. 3.13). La tasa respiratoria basal fue $1,24 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-5}$ $\mu\text{moles de O}_2/\text{ml de medio de reacción}/\text{min}/\mu\text{g de proteína bacteriana}$ ($n = 54$). El signo negativo implica inhibición sobre la tasa basal. Los errores estandar menores de 10 % no se indican. El efecto inicial del NH_4Cl fue significativo, hasta 1,5 mM, con $p < 0,001$, desde 1 mM gramina los puntos no son diferentes ($p \gg 0,1$) (prueba "t").

(n = 54). Bajas concentraciones de gramina estimularon tasa respiratoria basal (DTR = 5 %, p < 0,001), representada por la curva con 0 mM de NH_4Cl , y a medida que aumentó la concentración inicial de NH_4Cl , en el medio de reacción, el efecto estimulante de la gramina (1 mM) se enmascaró gradualmente. Así, a partir de 1,5 mM de NH_4Cl el efecto de la gramina a baja concentración se enmascaró totalmente (p >> 0,1 para las diferencias) y la DTR llegó a un nivel máximo de 6 %. En todos los tratamientos la tasa respiratoria bacteriana se inhibió en el mismo grado con concentraciones de gramina mayores de 2 mM independientemente del contenido de sustrato en el medio. Estos resultados indican que el NH_4Cl produce un efecto estimulante semejante al producido por la gramina a baja concentración; pero, esta acción es producida sólo por un efecto neto de sustrato y no protege a las bacterias de la acción de gramina. Lo anterior puede ilustrarse indicando que el efecto de 5 mM de gramina (concentración usada como punto de comparación en otros resultados) sobre un exceso de cloruro de amonio (3 mM) es de DTR = - 21 % versus una DTR = -4,3 % para el ADP, este último si está previniendo el efecto inhibitorio total de la gramina sobre la respiración bacteriana.

4.5.4. Sitio de acción de la gramina en P. syringae.

Para intentar identificar un posible sitio de acción de la gramina se estudió la acción de intermediarios donantes de electrones a la cadena respiratoria, sobre el efecto de la gramina en la respiración de P. syringae. En estos ensayos se utilizó NADH, el donante primario, y el succinato, como donante secundario al NADH (figura 23).

4.5.4.1. Acción del NADH sobre el efecto inhibitorio de la gramina.

En este ensayo se registró la tasa respiratoria inducida por la gramina observando el efecto del agregado de NADH, en concentraciones crecientes (figura 24). La tasa respiratoria basal fue de $1,38 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-5}$ $\mu\text{moles de O}_2/\text{ml de medio de reacción}/\text{min.}/\mu\text{g de proteína bacteriana}$. El NADH 0,1 mM no mostró un efecto significativo sobre la respiración (DTR = 13 %) en el tratamiento con 1 mM de gramina ($P > 0,07$); pero, el NADH estimuló la respiración basal ($p < 0,05$). A su vez, el NADH no recuperó el efecto inhibitorio producido por la gramina 5 mM (DTR = - 20 %, $p \gg 0,1$). Estos resultados, unidos a los del efecto de la gramina sobre el ADP y el fosfato, indica nuevamente que la gramina no es un desacoplante.

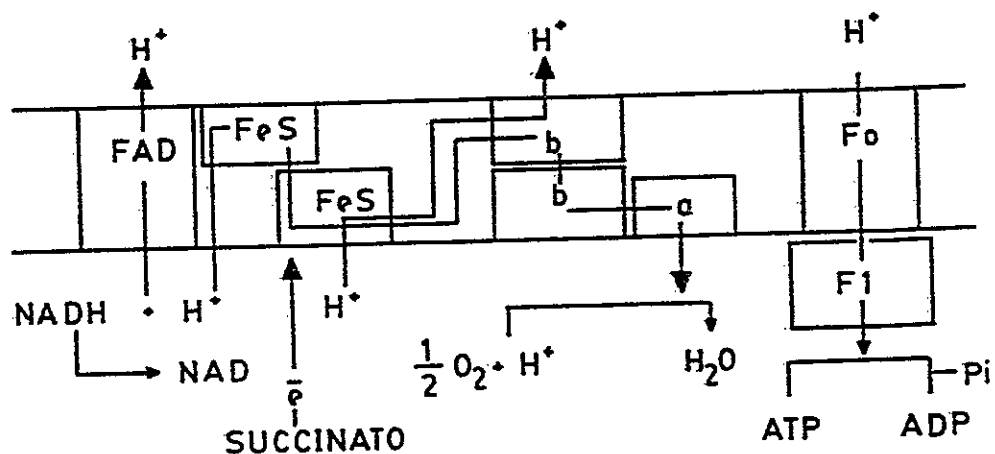


FIGURA 23: Esquema del sistema respiratorio en membranas bacterianas (Hinkle y McCarty, 1978). El sitio de donación de electrones por el succinato corresponde a una proposición teórica.

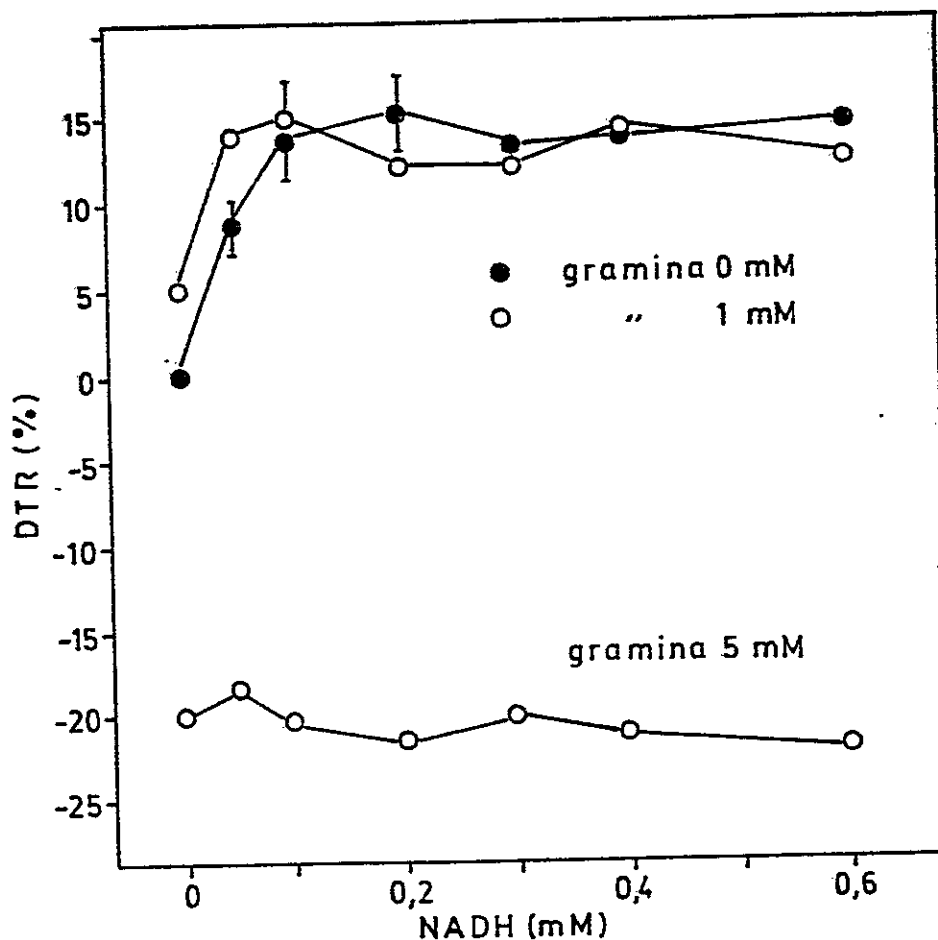


FIGURA 24: Efecto del NADH sobre la acción de la gramina en la respiración bacteriana. A cultivos de *Pseudomonas syringae* bajo el efecto de la gramina 0, 1 y 5 mM se les determinó la tasa respiratoria en relación al agregado de concentraciones crecientes de NADH. La tasa respiratoria basal fue $1,38 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-5}$ $\mu\text{moles de O}_2/\text{ml de medio de reacción}/\text{min}/\mu\text{g de proteína bacteriana}$ ($n = 44$). Las tasas respiratorias se expresaron como diferencia porcentual de tasa respiratoria o DTR (mat. y met. 3.13). El signo negativo implica un efecto inhibitorio de la tasa basal. Los errores estandar menores de 10 % no se indican. Para 1 y 5 mM de gramina los puntos no son diferentes ($p > 0,05$, para 0 mM de gramina los puntos son significativamente diferentes con $p < 0,05$ (prueba "t").

4.5.4.2. Acción del succinato sobre P. syringae.

Se estudió el efecto del succinato en concentraciones crecientes sobre la inhibición producida por la gramina en la respiración bacteriana (figura 25). La tasa respiratoria basal fue de $1,64 \times 10^{-3} \pm 4 \times 10^{-5}$ $\mu\text{moles de O}_2/\text{ml de medio de reacción}/\text{min}/\mu\text{g de proteína bacteriana}$. El succinato 1 mM estimuló la respiración bacteriana ($p = 0,02$) y la inhibió a concentraciones mayores ($p = 0,01$ para succinato 2 mM), independientemente de la concentración de gramina del tratamiento. En el tratamiento con 1 mM de gramina se observó una estimulación más prolongada de la respiración, probablemente producida por un efecto conjunto de succinato y de la gramina 1 mM. Por ser el succinato 1 mM una concentración límite estimulante se uso en los ensayos siguientes. El succinato 1 mM produjo una DTR de 4,35 % en el tratamiento con 0 mM y de 6,1 % en el tratamiento 1 mM de gramina. También, el succinato revertió el efecto inhibitorio producido por gramina 5 mM, cambiando la DTR de - 12,9 a un - 8,7 % (33,3 % de recuperación) a la concentración de efecto saturante (1 mM).

Complementando los resultados anteriores se vió el efecto de la gramina sobre la respiración bacteriana suplementada con 1 mM de succinato (figura 26). La tasa respiratoria basal fue $1,31 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-5}$ $\mu\text{moles de O}_2/\text{ml de medio de reacción}/\text{min}/\mu\text{g de proteína bacteriana}$. La gramina

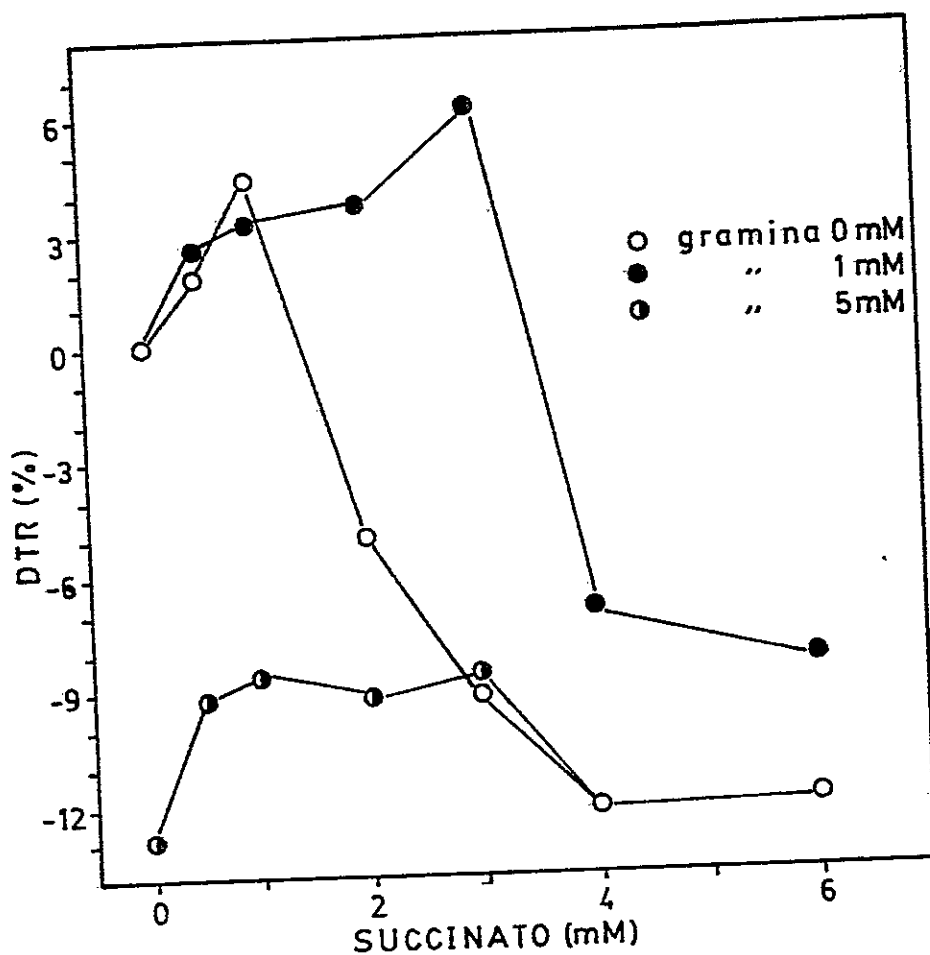


FIGURA 25: Efecto del succinato sobre la acción de la gramina en la respiración bacteriana. A cultivos de *Pseudomonas syringae* bajo el efecto de gramina 0, 1 y 5 mM se les determinó la tasa respiratoria en relación al agregado de concentraciones crecientes de succinato. La tasa respiratoria basal fue $1,64 \times 10^{-3} \pm 4 \times 10^{-5}$ $\mu\text{moles de O}_2/\text{ml de medio de reacción}/\text{min}/\mu\text{g}$ de proteína bacteriana ($n = 29$). Las tasas respiratorias se expresaron como diferencia porcentual de tasa respiratoria o DTR (mat. y met 3.13). El signo negativo implica efecto inhibitorio sobre la tasa basal. Los errores estandar menores de 10 % no se indican. El efecto estimulante del succinato fue significativo con $p < 0,02$ (prueba "t").

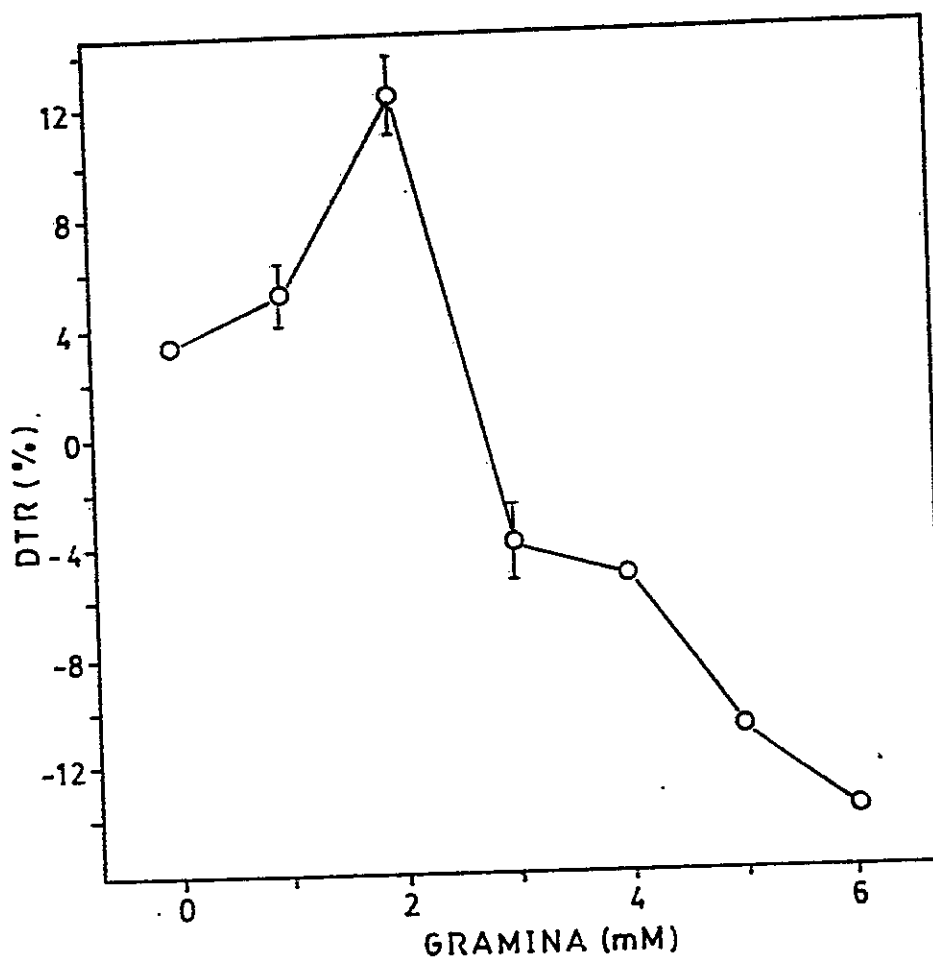


FIGURA 26: Efecto de la gramina sobre la respiración bacteriana en presencia de succinato. A cultivos de Pseudomonas syringae suplementado con succinato 1 mM se les determinó la tasa respiratoria en relación al agregado de concentraciones crecientes de gramina. La tasa respiratoria basal fue $1,31 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-5}$ $\mu\text{moles de O}_2/\text{ml de medio de reacción}/\text{min}/\mu\text{g de proteína bacteriana}$ ($n = 15$). Las tasas respiratorias se expresaron como diferencia porcentual de tasa respiratoria o DTR (mat. y met. 3.13). El signo negativo implica un efecto inhibitorio sobre la tasa basal. Los errores estandar menores de 10 % no se indican. Los datos son significativos con $p = 0,04$ (prueba "t").

presento un efecto estimulante inicial e inhibió la tasa respiratoria sobre los 2 mM ($p = 0,04$). Sin embargo, la inhibición producida por la gramina 5 mM en el tratamiento con succinato 1 mM (DTR = $-4,02 \pm 1,2 \%$) fue menor que la producida por el alcaloide solo sobre el transporte basal (DTR = $-16,4 \pm 1,8 \%$) ($p = 0,08$). Estos resultados indican que el succinato no evita la acción de la gramina; pero, si disminuye el efecto inhibitorio del alcaloide.

5. DISCUSION

5.1. Crianza de Helicoverpa zea.

El tiempo de duración de los diferentes estados de desarrollo metamórfico de H. zea fue similar a los entregados en la literatura (Hardwick, 1965). La escasa diferencia es atribuible a la variabilidad genética de la especie y a las condiciones de crianza en el laboratorio. Las características morfológicas de los distintos estados metamórficos (figura 5) de la especie recolectada en terreno coincidieron con la descripción de Helicoverpa zea (Boddie) (Angulo y Weigert, 1975). Para la clasificación de la especie de trabajo se usó las claves actuales de Angulo y Wiegert (1975), usadas en Chile.

Del total de larvas colectadas en terreno, un 95 % correspondió a H. zea. No se encontró la amplia diversidad de especies mencionada en el trabajo de Hardwick (1965), y junto a H. zea se encontró solamente la especie Euxoa lutescens, cuyas características morfológicas son bien diferenciables de la principal.

5.2. Efecto de la gramina sobre H. zea.

La presencia de gramina, tanto en la cebada como en la dieta artificial, provocó un efecto repelente en las larvas

(figura 6, tabla 1). La dieta artificial esta constituida de compuestos quimicos, maiz blanco molido (maiz dulce, variedad poco resistente al ataque de H. zea). La calidad dietetica de este maiz asegura la supervivencia de esta especie, entre otras. Angulo y Weigert (1975) en su descripcion de especies de Noctuidos en Chile, indica una larga lista de plantas cultivadas que son usada como sustrato por H. zea y otras especies de la familia, haciendola merecer la clasificacion de holofagas a muchas especies de la familia Noctuidae.

Dado que el uso de la dieta artificial permitio el desarrollo completo del ciclo de biologico de H. zea y su composicion general es controlable, constituyo un buen medio para probar el efecto del alcaloide indolico presente naturalmente en algunas variedades de cebada.

Con el proposito de verificar el efecto de la gramina en condiciones naturales, se infesto con larvas de H. zea plántulas de cebada, de variedades con y sin gramina en sus hojas, comparando los resultados de cada ensayo con sus blancos. Por ejemplo, en el caso de usar variedades de cebada, el control fue el macetero donde las dos alternativas de alimentacion eran la misma variedad de cebada que no produce gramina en sus tejidos. El resto de los tratamientos tenia la variedad de cebada que no produce gramina y como alternativa una variedad de cebada que produce naturalmente la gramina en sus tejidos, en distintas concentraciones.

En el tratamiento control, el porcentaje de visitas con alimentación indicó que las larvas no diferenciaban entre ambas variedades. En cambio cuando se combinó una variedad sin gramina con otra productora del alcaloide, se vió que las larvas comenzaron a diferenciarlas, llegando a rechazarlas claramente cuando la variedad de cebada (alternativa a la sin gramina), presentaba un alto contenido de gramina en sus tejidos foliares.

En los ensayos con dieta, las larvas, ante la alternativa de elegir entre dos cubos de dieta artificial sin gramina, no diferenciaron ambas alternativas. Sin embargo, cuando uno de los cubos de dieta contenía gramina, a baja concentración las larvas comenzaron a diferenciarlas. Cuando la concentración de gramina fue alta, en uno de los cubos de dieta, las larvas los diferenciaban notoriamente, prefiriendo la alternativa sin gramina. Estos resultados permiten sugerir que la gramina tiene un efecto repelente sobre H. zea.

En los ensayos de elección de dieta se tomó en cuenta sólo la alimentación larval en una u otra dieta. Existe un porcentaje complementario que corresponde a cuando las larvas no se estaban alimentando, en el momento de la observación. Éste último evento ocurrió cuando la larva se encontraba inactiva y estática, sobre la dieta o en cualquier otra parte de la placa petri, y cuando se encontraba deambulando, sin objetivo aparente o buscando

salida. Por las razones expuestas el porcentaje de larvas no alimentándose (tabla 1) no representa un evento de causas ni de objetivos definidos; sino mas bien parte de un estado de transición en el aprendizaje degustativo y no necesariamente relacionado con él. Por lo anterior el cambio en el porcentaje de larvas no alimentándose no es estadísticamente importante para probar la repelencia de la gramina, ni estadísticamente analizable.

Cuando las larvas fueron sometidas a comer dieta con gramina, este alcaloide no mostró tener efectos letales sobre ellas. Contrariamente a lo anterior, las larvas ganaron peso. Junto con lo anterior las larvas ingirieron mas rápidamente la dieta y aumentaron la masa fecal. Respecto a efectos similares de otros compuestos sobre las larvas de H. zea, se ha propuesto que existe un mecanismo de detoxificación (Kennedy, 1984); así, respecto al efecto de la gramina, se podría pensar que estos resultados reflejan un comportamiento fisiológico de detoxificación. Este mecanismo podría manifestarse en la mayor velocidad de paso de la dieta por el tracto digestivo de la larva y en el mayor volumen de defecación.

La aparente contradicción entre los efectos repelentes de la gramina y su efecto sobre H. zea en el ensayo de toxicidad, no existiría del punto de vista que se indica. La mayor ingestión de dieta con gramina podría intentar explicarse elucubrando que el alcaloide estimularía los

sensores maxilares de la larva, cuando esta muerde la dieta; éste sería un estímulo externo al organismo larval, que condujo a que las larvas simplemente abandonaran la dieta. Pero, cuando la larva se ve obligada a consumir la dieta con gramina, cualquier respuesta es ya producto de un estímulo interno a su organismo. Luego estos efectos no son contradictorios, sino solamente diferentes en función de receptores también diferentes. En esta tesis no se logra una explicación cabal de lo ocurrido; sin embargo, puede ser interesante de ser estudiado.

Los antecedentes enunciados ponen de manifiesto que la presencia de la gramina en la fuente alimenticia (dieta u hojas) modifica la conducta alimentaria de las larvas.

Como ya se mencionó en la introducción, diversos compuestos parecen tener un papel defensivo en plantas, contra ataques de insectos. La tabla 10 resume algunos de estos ejemplos, principalmente en larvas de lepidópteros y mencionando los trabajos hechos en el Laboratorio de Fisiología Vegetal en áfidos (dos últimos compuestos de la tabla). Se puede observar que dentro de la variedad de compuestos hay una hormona esteroidal, carbohidratos, taninos, terpenoides, hidroxamatos y alcaloides. Éstos compuestos han sido descritos en plantas de diferente origen filogenético, como Pinaceae (Or. Pinales), Solanaceae (Or. Scrophulariales), Malvaceae (Or. Malvales) y de la Poaceae (Or. Poales) o gramíneas. Su diferente origen químico (biosíntesis) hace

COMPUESTO	ORIGEN	RESISTENCIA	EFFECTO	ENSAYO	REFERENCIA
fitoecdisteriodes 20-hidroxiecdisterona	<u>Ajuga remota</u> <u>Podocarpus</u> <u>gracillior</u>	<u>Pectinophora</u> <u>gossypiella</u>	hormonal sobre la écdisis. muerte	dieta artificial	Kubo et al, 1961
"factores de resistencia"	estilos de maiz, 3 var. e híbridos	<u>Heliothis</u> <u>zea</u>	no indica	alimentación en plantas	Josephson et al, 1966
"factores de resistencia"	estilos de maiz, var. e híbridos	<u>Heliothis</u> <u>zea</u>	no indica	alimentación en plantas	Widstrom et al, 1977
2"-O-o -L- ramosil -6-C-(6-desoxi-xilo - hexo - 4 -ulosil) luteolina ("maizina")	estilos de maiz, var. Zapoteca chico	<u>Heliothis</u> <u>zea</u>	inhibición del crecimiento	dieta artificial	Elliger et al, 1980
2-tridecanona	tricomas glandulares de <u>Lycopersicon</u> <u>hirsutum</u> y <u>L. esculentum</u>	<u>Manduca</u> <u> sexta</u> <u>Leptinotarsa</u> <u>decimlineata</u> <u>Heliothis</u> <u>zea</u>	vapores tóxicos H. zea se recu- pera, manifies- ta mecanismos detoxicantes	dieta artificial	Kennedy, 1984
taninos	primeras hojas expan- didas de algodon	<u>Heliothis</u> <u>zea</u>	menor daño en el fruto	alimentación en plantas	Zunmo et al, 1984
terpenoides aldehídicos	ibid.	<u>Heliothis</u> <u>zea</u>	menor daño en el fruto	alimentación en plantas	Zunmo et al, 1984
ácidos hidroxámicos (DIMBOA, DIBOA)	hojas de <u>Zea mays</u> <u>triticum</u> <u>durum</u>	<u>Schizaphis</u> <u>graminum</u> <u>Ropalosiphum</u> <u>padi</u> <u>Metopolophium</u> <u>dirhodum</u>	repelencia y toxicidad	dieta artificial y natural (plantas)	Zúñiga et al, 1983 Corcuera et al, 1985 Corcuera et al, 1987 Argandoña et al, 1985
Gramina (alcaloide indólico)	hojas de <u>Hordeum</u> sp.	<u>S. graminum</u> <u>Kh. padi</u> <u>Kh. maidis</u>	repelencia y toxicidad	dieta artificial y natural (plantas)	Corcuera, 1984 Zúñiga y Corcuera, 1986

TABLA 10: Metabolitos de plantas que presentan actividad sobre insectos.

que se deba considerar que no necesariamente tienen el mismo mecanismo de acción; su diferente origen filogenético indica que no necesariamente se encontraran juntos en una misma planta; la diferente composición química y origen biosintético, de los compuestos, los hace fisicoquímicamente diferentes. Por lo anterior no podría compararse la gramina con los otros compuestos, en términos de decir cuan efectivo es el alcaloide con respecto a los otros compuestos (en términos de concentración). Sin embargo varios de los compuestos indicados (tabla 10) tienen en comun el ejercer una acción protectora de la planta contra larvas de lepidópteros, y la mayoría sobre Heliothis zea. Por su parte, los ácidos hidroxámicos y la gramina tienen efectos sobre los mismos áfidos, siendo diferentes las plantas atacadas. El descubrimiento de los efectos descritos se han hecho también mediante métodos semejantes, alimentando individuos con plantas que contenían el compuesto en consideración. Se complementa con el uso de dieta artificial a la cual se incorpora el compuesto. Estos estudios hicieron llegar a conclusiones semejantes a las de esta tesis, las que se pueden resumir en que los compuestos representan mecanismos de defensa para la planta que los contiene contra patógenos y fitopatogenos. A las plantas poseedoras de los compuestos se les ha llamado "variedades resistentes". Esto ha permitido tener variedades de mayor rendimiento agrícola.

Según información dada en el INIA (Santiago), la "cuncunilla" (H. zea) no constituye una plaga de la cebada, aunque si se sabe que en un grado muy bajo puede consumir las hojas de esta especie. Entre las variedades de cebada que existen en el mercado, una de las mas usadas es la variedad "cruzat" (MUSIC S. A.). Esta variedad se vende como forrajera y se le ha cuantificado un contenido de gramina de 20 ± 2 mmoles/K.p. seco (Zúñiga y Corcuera, 1987). La variedad F. Unión ya no se encuentra en el mercado debido, probablemente, a que es altamente susceptible; esta variedad fue cambiada por otra para efectos de producción en la Compañía de Cervecerías Unidas (comunicación personal). Considerando que las variedades, de cebada, muy susceptibles se usan como control en el laboratorio por no tener gramina en sus hojas, ya no se comercializan; que los cultivares usados en la actualidad tienen gramina en sus hojas y que estos no son atacados por H. zea, indica un posible papel defensivo de este metabolito. Esto puede ser importante en la productividad de la cebada (forraje o grano).

Como el proposito de esta tesis fue estudiar el papel de la gramina en la relación fitófago-planta, éstos resultados tienen una implicancia importante. En esta tesis se demuestra que la gramina tiene efecto repelente sobre H. zea, similar al efecto del alcaloide sobre áfidos (Corcuera, 1983). Esto permite concluir que, tal como se

enuncio en la hipótesis, este alcaloide tiene un efecto protector mas general que el que se le atribuía. Además considerando el panorama expuesto en la tabla 10, se puede decir que la gramina es una de las formas de defensa química natural, que se hace efectivo en las variedades de cebada que la producen. Este hecho cobra mayor importancia, en la medida que la presencia de la gramina se describe como un evento regulado genéticamente (Hanson et al, 1981;1983), ya que ello permitiría el manejo de variedades de cultivo resistentes.

Algunos autores postulan que los alcaloides indólicos causan disturbios degenerativos fuertes a nivel del sistema nervioso central (ver introducción). Otros estudios señalan que el crecimiento poblacional de áfidos está correlacionado inversamente con el contenido de gramina en la dieta (artificial y en hojas de plantas) (Zúñiga y Corcuera, 1986; Corcuera et al, 1987). Lo anterior más estudios que indican que larvas de lepidópteros tienen capacidad degustativa y un grado de aprendizaje de conducta alimenticia (Jermy et al, 1968; Schoenhoven, 1969a, 1969b), permitirían pensar que el rechazo de la gramina por la larvas puede corresponder a una conducta adquirida por degustación del alcaloide.

En esta tesis, los resultados del ensayo de toxicidad de gramina sobre H. zea, no mostraron un efecto tóxico letal (tablas 2 y 3, figura 7) del alcaloide sobre las larvas a

nivel de sobrevivencia individual, como lo indica la literatura para otros compuestos. Sin embargo, se presentó un comportamiento diferente como fue la mayor velocidad de consumo y defecación de la dieta. Además, H. zea sufrió alteraciones en el ciclo de vida, como la aceleración relativa de la pupación. La fase larval es la única etapa fitófaga, dentro del ciclo de vida de esta especie.

El efecto de la gramina sobre el ciclo de vida de H. zea podría tener incidencias importantes. Sin embargo, hay que considerar que se está hablando de una situación experimental, lo que no da motivo para pensar que lo mismo ocurra in natura. Efectivamente, el hecho de que las larvas de H. zea hayan reconocido la presencia de la gramina en la dieta indica que la acción repelente de la gramina tiene mayor importancia. Lo anterior se puede justificar, ya que al ser reconocida la gramina como estímulo negativo la larva no continuará consumiendo el sustrato. Ante éste último hecho lo esperable va a ser que la larva busque el sustrato mas adecuado del punto de vista de la degustación, cuando ellas se encuentran en su medio natural.

Se ha visto que la gramina produce efectos principalmente repelentes sobre larvas de H. zea, y efectos repelentes y tóxicos sobre áfidos (Corcuera, 1983). Esto último, unido a la presencia de sensores químicos en otras especies y a los resultados de los otros autores mencionados, permitiría postular que la gramina podría constituir una barrera

tambien para otras especies de insectos. Esto amplia el rango de acción defensivo que se le atribuía a la gramina.

5.3. Acción de la gramina y otros compuestos sobre P. syringae.

El crecimiento bacteriano sigmoide presentó las fases de latencia, crecimiento exponencial y estacionaria característicos de la bacteria.

La gramina afectó al crecimiento poblacional de P. syringae prolongando su fase de latencia y disminuyendo la fase de crecimiento estacionario (tamaño máximo final) de la población bacteriana (figuras 8 a 10). En consecuencia, la gramina retardó el inicio del crecimiento exponencial. Por otra parte, el ensayo de reinoculación de P. syringae en medio de cultivo sin alcaloide (tabla 4) indicó que la gramina tiene un efecto bacterioestático sobre el crecimiento poblacional de P. syringae. La asimilación de pequeñas cantidades del alcaloide desde el medio de cultivo (figura 11, tabla 5), por las bacterias, no cambió en forma significativa la concentración total detectada en los caldos de cultivo.

Estos antecedentes, podrían indicar que las bacterias pueden asimilar la gramina desde el medio, sin efecto letal. Así, una concentración alta del alcaloide en el medio mantendría a la población bacteriana en un estado de

crecimiento potencial. Luego, la bacteria podría volver a su estado activo en el medio libre del alcaloide, por disminución de la concentración relativa de la gramina. Atendiendo a los resultados anteriores, se estudió la fitopatogenicidad de P. syringae en distintas variedades de cebada (figuras 12 y 13). En la cebada control (F. Unión, sin gramina), la bacteria provocó un fuerte daño celular a partir del xilema (resultados 4.4.3), como tejido de entrada al tejido, además provocó una fuerte clorosis. Sin embargo, tanto la intensidad del ataque como el grado de clorosis disminuyeron con el aumento de la concentración de gramina en las hojas de cebada. El efecto anterior podría atribuírsele, en parte, a la gramina considerando el efecto del compuesto puro sobre la respiración bacteriana.

La primera evidencia del ataque de P. syringae a la planta, que se observó en este estudio, fue la presencia de masas de bacterias en el lumen de los vasos xilemáticos, y luego en las células parenquimáticas. El mismo mecanismo de ataque se describe también para otros patógenos bacterianos (Nelson y Dickey, 1966; 1970). Además, en esta tesis, se vió que P. syringae no atacó plantas íntegras dentro del tiempo de duración de los experimentos (ver mat y met. 3.8. segundo párrafo). Esto se justificaría ya que se ha visto que el ingreso de las bacterias al tejido vegetal ocurre principalmente por heridas (McFadden y Creager, 1960; Dickey y Nelson, 1967; Nelson y Dickey, 1968, 1970). Al

respecto se cita en literatura que especies de la familia Pseudomonadaceae tienen actividad enzimática (pectinasa y celulasa; Johnson y Powell (1969) y producen péptidos fitotóxicos extracelulares (Husain y Kelman, 1958; Bakman y DeVay, 1971; Gross y DeVay, 1977, Bidway et al, 1987). Estos elementos destruirían tejido vegetal; pero, no facilitarían la penetración de bacterias desde el exterior. Resumiendo, las bacterias de esta familia no tendrían un mecanismo propio de penetración, por lo que no podrían producir la herida (Bakman y DeVay, 1971; Bidwai et al, 1987; Ceponis y Friedman, 1958; Gross y DeVay, 1977; Husain y Kelman, 1958; Sinden et al, 1971; Surico y DeVay, 1982), y que la cutícula de las hojas de cebada represente una barrera física para la penetración de P. syringae, como microorganismo patógeno facultativo.

Recapitulando, se vió que P. syringae no atacó a la cebada sino cuando esta estaba herida, la herida sería homóloga al hecho de obtener discos ya que estos últimos hay que cortarlos de la hoja, luego queda un tejido rodeado de células rotas. En este caso la situación impone que el contenido de la célula rota se liberará al medio. Hay que sumar a lo anterior que la bacteria fue afectada por el alcaloide cuando éste se encontraba en contacto directo con la bacteria, es decir en el medio de reacción. Estos antecedentes, resumidos de los resultados de esta tesis, permiten postular que la gramina podría estar actuando como

defensa natural a través de un mecanismo de defensa hipersensible, o necrótico, sobre P. syringae.

El mecanismo de defensa hipersensible consiste en la desintegración del tejido vegetal que circunda al patógeno, impidiendo su avance. Esto corresponde a una autólisis mediada por metabolitos celulares, siendo independiente del efecto que el metabolito pueda tener sobre los agentes patógenos. Este mecanismo necrótico se encuentra en hospedadores que presentan grados de resistencia, ya que en los hospedadores susceptibles el tejido atacado puede sobrevivir mayor tiempo y permitir que un agente atacante se desarrolle (Agrios, 1978). La lisis celular implica la liberación de todos los componentes citoplasmáticos a la mancha necrótica, algunos de los cuales pueden actuar sobre el agente que provocó la herida o que penetró por ella (Klement et al, 1963)

En los casos mencionados antes, la localización tisular del metabolito puede ser importante. Al respecto Argandoña et al. (1987) encontraron que en hojas de cebada la concentración de gramina fue de 2,2 y 2,0 $\mu\text{moles/K.p.f.}$ en la epidermis superior e inferior, respectivamente y de 3,1 $\mu\text{moles/K.p.f.}$ en las células del mesófilo. El alcaloide no fue detectado en las vainas vasculares ni en el xilema. Si el alcaloide se detecta en células del mesófilo, se puede pensar que este está compartimentalizado en el tejido. Cuando una hoja es herida se rompen células de la epidermis

y del mesófilo y su contenido se libera a la mancha necrótica. Si el contenido de la célula rota incluye la presencia de gramina, esta se liberará también a la mancha necrótica. Finalmente, si bacterias P. syringae llegan a la herida, tendrán que entrar en contacto con el contenido de la mancha necrótica, y por lo tanto con la gramina. Por deducción obvia, si la bacteria entra en contacto con el alcaloide sufrirá los efectos correspondientes descritos en esta tesis. Esto corresponde estrictamente a la acción de la gramina utilizando el mecanismo de defensa hipersensible de las plantas, mencionado antes. Luego, también los estudios de Argandoña et al, (1987), sobre la localización de la gramina, apoyan el que el alcaloide pueda ser una defensa natural a través de las células portadoras del alcaloide.

La posibilidad de que la gramina pueda liberarse al medio, junto al efecto inhibitorio del alcaloide sobre el crecimiento bacteriano, permitiría decir que la gramina constituiría una defensa natural de la cebada contra el ataque de P. syringae.

En un tejido puede existir compuestos con efectos diferentes sobre el organismo. Al respecto, se ha descrito que la acumulación de betaína en plantas de cebada, puede aumentar su susceptibilidad a patógenos (Zúñiga y Corcuera, 1987). Al respecto aquí se observó que la betaína se mostró como un potenciador del crecimiento poblacional bacteriano

(in vitro, figura 18). También la betaína podría estar correlacionada con el aumento de la fitopatogenicidad de P. syringae sobre discos de hoja, de plantas de cebada sometidas a estres hídrico. Esto se pudo ver cuando los discos de hoja de cebada, variedad F. Unión, con contenido de betaína aumentado por las condiciones de estres, mostraron un daño por ataque bacteriano de 42 % en relación a un 35 % en la misma variedad de cebada en condiciones normales y con bajo contenido de betaína (basal) (ver res. 4.4.3. sexto parrafo). Así mismo, se confrontan los contenidos relativos de clorofila, después del ataque bacteriano, de -32,5 % en los discos con alto contenido de betaína y de -40,5 % en los discos con el contenido basal (ver res. 4.4.3.). Estos resultados están indicando que con el aumento de la betaína en el tejido vegetal, el daño hace mayor y, por consiguiente el contenido de clorofila disminuye. De estos resultados se concluye que el aumento de la betaína, en las hojas de la cebada F. Unión, aumentó la capacidad de ataque, o fitopatogenicidad, de P. syringae.

5.4. Mecanismo de acción de la gramina.

Para la gramina se han descrito efectos inhibitorios sobre la fosforilación, sobre la gradiente protónica en tilacoides de espinaca (Andreo et al, 1984) y sobre el

proceso respiratorio de mitocondrias de hígado de rata y de bovino (Niemeyer y Roveri, 1984). Los efectos de la gramina sobre procesos bioquímicos y organelos hacen suponer que el alcaloide podría afectar a nivel de la respiración celular de la bacteria P. syringae.

En la respiración bacteriana (figura 27) el NADH es el primer donante de electrones a la cadena de transporte electrónico. El succinato, se ha descrito como donante secundario de electrones en las proteínas ferrosulfuradas, sitio consecutivo al punto de donación del NADH (Lehninger, 1982). Basándose en la teoría de Mitchell (Mitchell, 1966; Fillingame, 1980; Lehninger, 1982), se puede decir que la continuidad de los sistemas mencionados implica que el efecto producido por un compuesto, en cualquier parte del sistema, afectará finalmente a la tasa respiratoria de la bacteria (figuras 23 y 27).

Segun la literatura, los microorganismos pueden utilizar diferentes fuentes de sustrato para su metabolismo, entre ellos compuestos simples como las aminas. En varias especies del género Pseudomonas se describe la utilización de metilaminas como sustrato de oxidación. En este proceso ocurre una N-desmetilación, donde los grupos metilo se transforman en formaldehido, dejando como producto NH_4^+ (Colby et al, 1979), entre otros. En algunos microorganismos, incluido el género Pseudomonas, se han identificado las enzimas carbamatoquinasa y carbamilfosfato

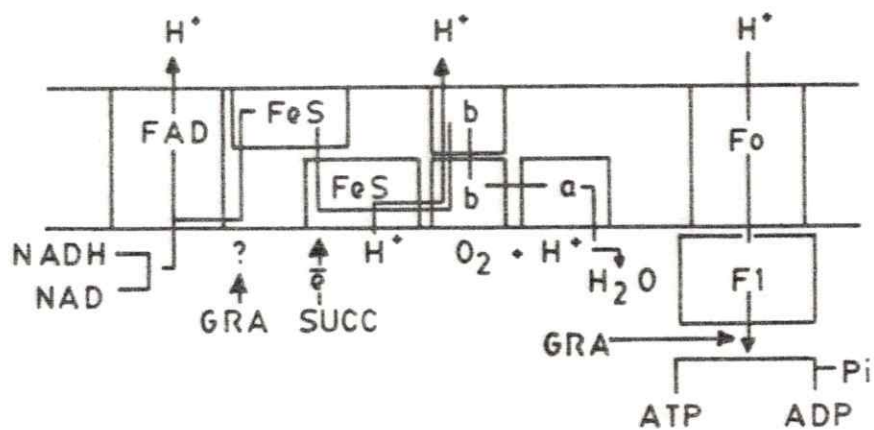


FIGURA 27: Esquema del sistema respiratorio en membranas bacterianas y proposición teórica de la actividad de la gramina (GRA).

sintetasa. La primera enzima cataliza la fosforilación del ADP por el carbamilo fosfato (este último es el sustrato de la enzima) con la producción de CO_2 y NH_4^+ y la segunda cataliza la síntesis de carbamilo fosfato desde ATP, CO_2 y NH_4^+ . Esta última enzima se compone de una subunidad grande que cataliza la síntesis del carbamilo fosfato a partir de amonio y de una subunidad pequeña que utiliza la glutamina para dicha síntesis.

El carbamilo fosfato entra como sustrato al ciclo de la ornitina. La arginina, uno de los intermediarios del ciclo anterior, va hacia la vía metabólica del succinato (Conn y Stumpf, 1973; Abdelal, 1979). Esta última vía se ha descrito, también, para bacterias del género Pseudomonas (Abdelal, 1979). Las vías de biosíntesis de pirimidinas y purinas requieren también del carbamilo fosfato, ya que se sintetizan por la condensación del carbamilo fosfato con otros intermediarios. Esta última vía biosintética es común y similar en una amplia gama de organismos (Suttie, 1976). Con estos antecedentes queda implícito, que era el objetivo de mencionarlos, que el amonio puede ser usado por las bacterias para su propio crecimiento poblacional. Por lo anterior, se usó cloruro de amonio en los ensayos como activador del crecimiento bacteriano por efecto de sustrato. El efecto esperado del amonio sobre P. syringae se presentó (figura 21) sin observarse otras consecuencias, además de la aceleración del crecimiento poblacional.

Conociendo el efecto anterior, se quiso probar si el amonio, implicando la vía de utilización como sustrato, tenía algún efecto protector sobre la acción inhibitoria de la gramina.

A partir de los resultados obtenidos, se comparó el efecto de la gramina (figura 16) con el del desacoplante 2,4-DNP (figura 20) sobre la tasa respiratoria. Ambos compuestos mostraron un efecto estimulador de la respiración, a bajas concentraciones, y un efecto inhibitorio a concentraciones más altas. En los resultados de los ensayos de actividad bacteriana en presencia de betaína, se encontró que la presencia de este compuesto en el medio (tablas 6, 7 y 8) revertió solo el efecto inhibitorio de la gramina. Los resultados en conjunto, mencionados en este párrafo, indican que el efecto de la gramina pudo ocurrir por un mecanismo diferente al de un desacoplante típico.

Concentraciones de gramina inferiores a 2 mM aceleraron la tasa respiratoria basal de P. syringae y, tanto la tasa basal como la acoplada (ADP) fueron inhibidas a concentraciones mayores del alcaloide (figura 14). Para profundizar, se estudió el efecto de la gramina sobre la respiración bacteriana suplementando el medio con ADP y donantes de electrones a la cadena transportadora. El ADP (figura 15) revertió en un 76 % el efecto inhibitorio de la gramina 5 mM. Esto puede interpretarse como un efecto producido por competencia del sustrato ADP con la gramina, indicando que el alcaloide es un inhibidor del sistema ATP

sintetasa, en su efecto sobre las bacterias.

Considerando, ahora, que la síntesis de ATP requiere de fosfato, se observó el consumo de fósforo dependiente de gramina (figura 17). El consumo bacteriano de fosfato disminuyó notoriamente a bajas concentraciones de ambos compuestos, concentraciones que mostraron un efecto inhibitorio leve sobre el crecimiento poblacional y la respiración bacterianas. Estos resultados explicarían el efecto rápido, a bajas concentraciones, de la gramina sobre el transporte respiratorio acoplado bacteriano.

Con respecto al posible sitio de acción de la gramina, se encontró que ni el amonio (figura 22) ni el NADH (figura 24) protegieron a las bacterias de la inhibición por el alcaloide ni revirtieron su efecto (figura 21). El succinato (figura 24) revertió el efecto inhibitorio de la gramina 5 mM en un 33,3 % (figura 25). Además, el efecto inhibitorio de la gramina en cultivos suplementados con succinato en el medio fue menor (DTR = -12 %, figura 26) que en los sin succinato (DTR = -41 %, tabla 7).

Respecto al mecanismo de la gramina, Andreo y col. (1984) postularon que esta actúa como un desacoplante en tilacoides de espinaca inhibiendo la fosforilación, la reacción de intercambio P_i -ATP y la gradiente protónica y estimulando el transporte electrónico en los tilacoides, a bajas concentraciones. Concluyen que la gramina corresponde a un "típico desacoplante" de la fosforilación. Por otra parte, Niemeyer y Roveri (1984) describen que la gramina

estimula el transporte basal de mitocondrias de hígado de rata, a bajas concentraciones, e inhibe a nivel del complejo I (ubiquinona NADP reductasa) de la cadena de transporte, a altas concentraciones. Estos autores, además, postulan para la gramina un efecto de dispersión de la gradiente protónica a través de la membrana mitocondrial (figura 27), como efecto secundario. Estos antecedentes indican un mecanismo desacoplante protonóforo para la gramina.

Los resultados de esta tesis indican que la gramina sería un inhibidor de la ATP sintetasa y no un desacoplante. Independiente de las conclusiones anteriores, los efectos observados de los intermediarios de la cadena respiratoria (NADH, succinato) podrían indicar que la gramina actúa sobre la cadena. Este efecto, en caso de ser real, ocurriría en un punto anterior al punto de donación de electrones, por el succinato, es decir en la primera parte de la cadena respiratoria. Esto estaría apoyado en que el succinato tuvo un efecto recuperador de la inhibición; pero, no el NADH.

El autor de esta tesis piensa que ninguna prueba, hasta ahora encontrada, indica que un compuesto no pueda tener varios modos de acción dependiendo, por ejemplo, de la concentración. Podría ser el caso de la gramina, en el cual a concentraciones bajas actuará como un inhibidor de la ATP asa; pero, cuando la concentración es alta, la gramina podría afectar, además, a otros procesos. Si bien esto no

se prueba en esta tesis, se deja planteado como posibilidad basándose en las pruebas obtenidas en esta tesis.

Paleg et al (1981) demostraron que la betaína protege diferentes enzimas de la inactivación por estrés térmico y que el mecanismo de respuesta puede estar relacionado con la mantención de la conformación activa de las mismas. Si así fuera, la betaína podría tener un efecto preventivo contra la inhibición producida por la gramina, mediante la protección de enzimas de la fosforilación oxidativa. Sería interesante investigar este último punto ya que se podría comparar el mecanismo de la betaína con el de la gramina, y obtener luz respecto al modo de acción del alcaloide.

5.5. Consideraciones generales.

El efecto de la gramina sobre los hábitos alimenticios de las larvas de H. zea indica que las larvas reconocen una fuente alimenticia como "no palatable". Por otra parte la gramina afecta al ciclo de vida de H. zea. En base a lo anterior, se podría postular que existen distintos niveles de acción del alcaloide sobre las larvas. Estas podrían reconocer una planta como desagradable al probarla; pero, la ingestión de bajas concentraciones del alcaloide, que no tengan un efecto repelente marcado, podría actuar a nivel fisiológico en las larvas, afectando la duración de la fase larval o fitófaga.

Por otra parte, la gramina podría actuar a nivel de las membranas bacterianas y sobre los procesos respiratorio y fotosintético en mitocondrias y cloroplastos (ver introducción). Por lo anterior se podría suponer que el alcaloide actuaría sobre los procesos mitocondriales de las larvas que lo consuman. Sobre posibles consecuencias de este hipotético efecto, en esta tesis no se dan pruebas; pero, si se revela como incógnita el si este podría ser uno de los efectos desencadenantes del comportamiento de alimentación de las larvas que consumen el alcaloide.

El efecto de la gramina sobre la respiración bacteriana explica la actividad bacterioestática del alcaloide sobre la bacteria. Habiéndose localizado la gramina en las células del mesófilo y del parénquima de las hojas de la cebada, podría suponerse que el alcaloide sería liberado cuando un insecto ataca y rompe las hojas de cebada. Estas heridas serían un punto de entrada posible para las bacterias; pero, si la gramina se encontrara presente en la mancha necrótica (herida) afectaría a los procesos fisiológicos de la bacteria y detendría el avance del foco infeccioso.

El ataque de larvas fitófagas a una planta implica la ruptura parcial del tejido vegetal, rompiéndose la barrera física que representa la cutícula de la hoja. Lo anterior permitiría la entrada de los microorganismos sin poder de penetración propio (P. syringae, por ejemplo). Luego, se puede decir que si la planta atacada tiene gramina en sus

tejidos podría repeler al fitófago y, al mismo tiempo, detener un ataque bacteriano. Lo anterior le daría continuidad al sistema de defensa de la planta contra agentes distintos en cuanto a mecanismo de ataque.

Siendo la gramina un metabolito protector, se puede pensar que la selección de plantas con un contenido de gramina adecuado sería una estrategia de control del ataque de algunas plagas y enfermedades como las estudiadas en este trabajo.

En el punto 5.2. (últimos párrafos) se analizó el efecto del aumento del nivel basal de betaína en hojas, de la cebada var. F. Unión, sobre el ataque de P. syringae a dichos tejidos. Se concluyó que el aumento de la betaína en el tejido, estimula la fitopatogenicidad de P. syringae, probablemente por su efecto estimulante sobre el crecimiento poblacional. Además, la betaína revertió y previno el efecto inhibitorio de la gramina sobre la bacteria.

Estos antecedentes permiten concluir que la betaína es un factor susceptibilizante de la cebada, ante el ataque de P. syringae. Esto pone de manifiesto que la interacción entre planta y patógeno esta determinada por diversos factores. Además refuerza la conclusiones obtenidas por otros autores respecto al efecto de la presencia de la betaína en los tejidos en insectos (ver introducción).

Esto sugiere una selección cuidadosa de las plantas en cuanto al contenido de este metabolito, por ser un posible

potenciador de enfermedades vegetales.

El mecanismo de acción de la gramina no se muestra claro. Aparentemente, su esclarecimiento se podría lograr determinando con certeza los sitios de actividad del alcaloide, para lo cual podría también ser útil el estudio del modo de acción de la betaína. Con esta base se resalta que se necesita mayor estudio de mecanismos de acción de los compuestos involucrados en este estudio. De esta forma sería posible interpretar correctamente el mecanismo de acción defensivo, implicado por la presencia de la gramina en los tejidos vegetales.

Finalmente, los resultados obtenidos en esta tesis no dan, obviamente, información acabada respecto al papel de algunos metabolitos en la defensa natural de plantas. Sin embargo, esta información indicaría que en vegetales la presencia de algunos metabolitos es importante en los procesos defensivos contra agentes diversos. El conocimiento de la presencia como de los niveles de especificidad y mecanismos de acción de metabolitos vegetales, podría ser usado como una vía de mejoramiento y racionalización (pesticidas) de producción vegetal.

6. CONCLUSIONES

En esta tesis se sugiere que:

- 6.1. La gramina puede proteger a la cebada contra H. zea, posiblemente por su propiedad repelente contra las larvas.
- 6.2. La gramina constituye, también, una defensa natural en cebada contra el ataque de la bacteria P. syringae afectando a la bacteria a nivel de respiración celular, pareciendo actuar como un inhibidor de la ATP sintetasa.
- 6.3. La betaína se sugiere como un potenciador del ataque de P. syringae, suceptibilizando directamente el ataque y disminuyendo el efecto inhibitorio de la gramina.

BIBLIOGRAFIA

1. Abdelal , A. T. , 1979. Arginine catabolism by microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 33: 139-168.
2. Agrios, G. N., 1978. Plant pathology. Academic Press Inc. (USA), pp. 1-504.
3. Andreo, C. S., E. G. Orellano, y H. Niemeyer, 1984. Uncoupling of spinach thylakoids by gramine. Z. Naturforsch 39c: 746-748.
4. Angulo , A. O. y G. Th. Weigert , 1975. Estados inmaduros de lepidópteros noctuidos de importancia económica en Chile y claves para su determinación (Lepidoptera: Noctuidae). Soc. Biol. de Concepción, publicación especial No 2. pp 1-153.
5. Anthon, E., L. O. Smith, y S. D. Garrett, 1971. Artificial diet and pheromone studies with peach twig borer. J. Econ. Entomol. 64: 259-262.
6. Argandoña, V. H., J. G. Luza, H. M. Niemeyer y L. J. Corcuera, 1980. Role of hydroxamic acids in the resistance of cereals to aphids. Phytochemistry. 19: 1665-1668.
7. Argandoña, V. H., L. J. Corcuera, H. M. Niemeyer, y B. C. Campbell, 1983. Toxicity and feeding deterrency of hydroxamic acids from gramineae in synthetic diets against the greenbug, Schizaphis graminum. Ent. exp. & appl. 34: 134-138.

8. Argandoña, V. H., G. B. Zuñiga, y L. J. Corcuera, 1987. Distribution of gramine and hydroxamic acids in tissues of barley and wheat leaves. Phytochemistry, in press.
9. Backman, P. A., y J. E. DeVay, 1971. Studies on the mode of action and biogenesis of the phytotoxin syringomycin. Phys. Plant. Pathol. 1: 215-233.
10. Barnes, R. F., A. B. Simons, y G. C. Marten, 1971. Evaluation of selected clones of Phalaris arundinacea, II. Indole alkaloid derivatives. Agronomy J. 63: 507-509.
11. Beck, S. D., y J. F. Stauffer, 1957. The european corn borer Pyrausta nubilalis and its principal host plant. III: Toxic factor influencing larval establishment. Ann. Entomol. Soc. Amer. 50: 166-170.
12. Beck, S. D., y E. E. Smissman, 1961. The european corn borer, Pyrausta nubilalis and its principal host plant. IX: Biological activity of chemicals analogs of corn resistance factor A (6-methoxy benzoxazolinone). Ann. Entomol. Soc. Amer. 5: 53-61.
13. Bell, E. A., 1981. The physiological role(s) of secondary (natural) products. In Conn, E. E., (Eds), The Biochemistry of plants. Academic Press Inc. Vol 7(1): 1-19.
14. Bennett, S. E., y L. M. Josephson, 1962. Methods of artificial infestation of corn with the earworm, Heliothis zea. J. Econ. Entomol. 55(1): 797-798.

15. Bidwai, A. P., L. Zhang, R. C. Bachmann, y J. Y. Takemoto, 1987. Mechanism of action of Pseudomonas syringae phytotoxin, syringomycin. Plant Physiol. 83: 39-43.
16. Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
17. Cabrera, S., 1984. Estimación de la concentración de clorofila "a" y feopigmentos (revisión). In Bahamondes, N. y S. Cabrera (Eds.), Embalses, fotosíntesis y productividad primaria. Eds. Universidad de Chile. Anexo 2: 189-200.
18. Callahan, P. S., 1962. Techniques for rearing the corn earworm, Heliothis zea. J. Econ. Entomol. 55(1): 453-457.
19. Campbell, B. C., D. L. McLean, M. G. Kinsey, K. C. Jones y D. L. Dreyer, 1982. Probing behaviour on resistance and susceptible varieties of sorghum. Ent. exp. & appl. 31: 140-146.
20. Ceponis, M. J., y B. A. Friedman, 1958. Pectolytic enzymes of Pseudomonas marginalis and their effects on lettuce. Phytopathology 49: 141-144.
21. Chamberlain, D. W., 1956. Methods of inoculation for wildfire of soybean and the effect of bacterial pustule on wildfire development. Phytopathology 46: 96-98.

22. Chamberlain, D. W., 1956. Pathogenicity of Pseudomonas tabaci on soybeans and tobacco. Phytopathology 46: 51-52
23. Chan, B. G., A. C. Waiss, W. L. Stanley, y A. D. Goodban, 1978. A rapid diet preparation method for antibiotic phytochemical bioassay. J. Econ. Entomol. 71(2): 366-368.
24. Chauthani, A. R., y P. L. Adkinsson, 1963. Comparison of two artificial diets for rearing Heliothis zea larvae for insecticide tests. J. Econ. Entomol. 58(6): 1163-1164.
25. Colby, J., H. Dalton, y R. Whittenbury, 1979. Biological and biochemical aspects of microbial growth on C1 compounds. Ann. Rev. Microbiol. 33: 481-517.
26. Conn, E. E. y P. K. Stumpf, 1973. Bioquímica fundamental. Ed. Limusa (2a ed.), Mejico.
27. Corcuera, L. J., 1983. Effects of indole alkaloids from gramineae on aphids. Phytochemistry 23: 539-541
28. Corcuera, L. J., C. B. Queirolo, y V. H. Argandona, 1985. Effects of 2-B-D-glucosyl-4-hydroxy-7-methoxy 1,4 benzoxazin-3-one on Schizaphis graminum (Rondani) (Insecta, Aphididae) feeding on artificial diets. Experientia 41: 514-516.

29. Corcuera, L. J., V. H. Argandoña , y G. E. Zúñiga, 1987. Resistance of cereal crop to aphids: Role of allelochemicals. In Allelochemicals: Role in agriculture and forest , G. R. Waller (Ed.), Amer. Chem.Soc. Reprinted from ACS SYMPOSIUM SERIES # 330.
30. Culvenor, C. C., 1973. Alkaloids. In Butler, G. W., and R. W. Bailey (Eds), Chemistry and Biochemistry of Herbage, Vol I. Academic Press (London). Cap 8: 375-446.
31. David, W. A. L., y B. O. C. Gardiner, 1966. Mustard oil as feeding stimulants for Pieris brassicae larvae in a semi-synthetic diet. Ent. exp & appl. 9: 248-255.
32. Dickey , R. S., y P. E. Nelson, 1967. Pseudomonas caryophylli in carnation. III. Effect of certain environmental factors on development of the pathogen in the host. Phytopathology 57: 1353-1357.
33. Domínguez, X. , 1973. Modos de investigación fitoquímica. 15: Alcaloides. Ed. Limusa S. A., 1a. ed (Méjico). pp 211-227.
34. Dudoroff, M. y N. Palleroni, 1974. Gram-negative aerobic rods and cocci. Genus I: Pseudomonas. In R. E. Buchanan, and N. E. Gibbons (Eds), 8a ed. Bergey's manual of determinative bacteriology, Part 7. The William and Wilkins Co. (Baltimore (USA)).

35. Ehmann, A., 1977. The Van Urk-Salkowski reagent-a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. J. Chromatography 132: 267-276.
36. Elliger, C. A., B. G. Chan, A. C. Waiss (Jr.), R. E. Lundin, y W. F. Haddon, 1980. C-Glycosyl flavones from Zea mays that inhibit insect development. Phytochemistry 19: 293-297.
37. Facultad de Agronomía (Eds), 1980. Manual de laboratorio para fitopatología general. Universidad de Chile (Stgo.), pp. 136.
38. Fillingame, R. H., 1980. The proton-translocating pumps of oxidative phosphorylation. Ann. Rev. Biochem. 49: 1079-1113.
39. Fraenkel, G. S., 1959. The raison d'être of secondary plant substances. Science 129: 1466-1470.
40. Fraenkel, G. S., 1969. Evaluation of our thoughts on secondary plant substances. Ent. exp. appl. 12: 473-486.
41. Fye, R. E., y D. E. Surber, 1971. Effects of several temperature and humidity regimens of eggs of six species of lepidopterous pests of cotton in Arizona. J. Econ. Entomol 64: 1138-1142.

42. Gallagher, C. H., J. H. Koch, R. M. Moore, y J. D. Steel, 1964. Toxicity of Phalaris tuberosa for sheep. Nature 204: 542-545.
43. Ghini, A. A., G. Burton, y E. G. Gros, 1982. Metabolism of gramine in Hordeum vulgare plants: a time course study. Phytochemistry 21(3): 605-607.
44. Grieve, C. M., y E. V. Maas, 1984. Betaine accumulation in salt-stressed sorghum. Physiol Plant 61: 167-171.
45. Gross, D. C., y J. E. DeVay, 1977. Population dynamics and pathogenesis of Pseudomonas syringae in maize and cowpea in relation to the in vitro production of syringomycine. Phytopathology 67: 475-483.
46. Guerra, A. A., y A. D. Buiya, 1977. Nutrition of the tobacco budworm: an economical larval diet for rearing. J. Econ. Entomol. 70(5): 568-570.
47. Haglund, B. M., 1980. Proline and Valine- cues which stimulate grasshoper herbivory during drought stress. Nature 288: 697-700.
48. Hanson, A. D., 1980. Interpreting the metabolic responses of plants to water stress. Hort. Science 15(5): 623-629.
49. Hanson, A. D., P. L. Traynor, K. M. Ditz, y D. A. Deicosky, 1981. Gramine in barley forage-Effects of genotype and environment. Crop Science 21: 726-730.

50. Hanson, A. D., K. M. Ditz, G. W. Singletary, y T. J. Leland, 1983. Gramine accumulation in leaves of barley grown under high-temperature stress. Plant Physiol. 71: 896-904.
51. Hardwick, D. F., 1965. The corn earworm complex. Memoirs of the Entomological Society of Canada No 40, pp 253.
52. Harris, K. F., y K. Maramorosh (Eds.), 1982. Pathogens, vectors, and plant disease: Approches to control. Academic Press Inc. pp. 1-310.
53. Hietala, P. K., y A. I. Virtanen, 1960. Precursors of benzoxalinone in rye plants II. Precursor I: The glycoside. Acta Chem. Scand. 14: 502.
54. Hitz, W. D., J. A. R. Ladyman, y A. D. Hanson, 1982. Betaine synthesis and accumulation in barley during field water stress. Crop Science 22: 47-54.
55. Hinkle, P. C., y R. E. McCarty, 1978. How cells make ATP. Scientific American 238 (3): 104-123.
56. Howell, J., 1971. Problems involved in rearing the codling moth on diet in trays. J. Econ. Entomol. 64: 631-636.
57. Husain A., y A. Kelman, 1956. Mode of pathogenesis of Pseudomonas solanacearum. Phytopathology 46: 16a.
58. Husain, A., y A. Kelman, 1958. The role of pectic and cellulolytic enzymes in pathogenesis by Pseudomonas solanacearum. Phytopathology 48: 377-386.

59. Isman, M. B., y S. S. Duffey, 1983. Pharmacokinetics of chlorogenic acid and rutine in larvae of Heliothis zea. J. Insect Physiol 29 (4): 195-300.
60. Jermy, T., 1966. Feeding inhibitors and food preference in chewing phytophagous insects. Ent. exp. & appl. 9: 1-12.
61. Jermy, T., F. E. Hanson, y v. G. Dethier, 1968. Induction of specific food preference in lepidopterous larvae. Ent. exp. & appl. 11: 211-230.
62. Johnson, A. H. y N. T. Powell, 1969. Influence of root knot nematodes on bacterial wilt development in flue-cured tobacco. Phytopathology 59: 486-491.
63. Jones, R., W. D. Perkins, y A. N. Sparks, 1977. Corn earworm: Effects of temperature variation on a colony. Ann. Entomol. Soc. Amer. 71(3): 393-396.
64. Josephson, L. M., S. E. Benett, y E. E. Burgess, 1966. Methods of artificially infesting corn with the corn earworm and factors influencing resistance. J. Econ. Entomol. 6: 1322-1324.
65. Kahn, R. P., 1982. The host as a vector: Exclusion as a control. In Harris, K. F., and K. Maramorosh, Pathogens, vectors, and diseases: Approach of control. Academic Press Inc. (USA). pp. 123-148.
66. Kennedy, G. G., 1984. 2 - tridecanone, tomatoes and Heliothis zea: potential incompatibility of plant antibiosis with insecticidal control. Entomol. exp & appl. 35: 305-311.

67. Klement, Z., G. L. Farkas, y L. Lovrekovich, 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology 64: 474-477.
68. Klun, S. A., C. L. Tripton, y T. A. Brindley, 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. Econ. Entomol. 60: 1529-1533.
69. Klun, S. A., y J. F. Robinson, 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.
70. Koyama, T., M. Yamato, y K. Kubota, 1955. Constituents of the root of Coix lachryma (Jobi). J. Pharm. Soc. Japan. 76: 1077.
71. Kubo, I., J. A. Klocke, y S. Asano, 1983. Effects of ingested phytoecdysteroids on the growth and development of two lepidopterous larvae. J. Insect Physiol. 29(4): 307-316.
72. Lai, M. y T. Watson, 1973. Bacterial spots of tomato and pepper in California. Plant Dis. Rep. 57: 258-259.
73. Le Berre, J. R. y A. Lenoir, 1969. Incidence de regimes alimentaires de type meridique et de la duree d'eclaircissement sur le developpement larvaire du criquet migrateur Locusta migratoria. Ent. exp. & appl. 12: 670-697.

74. Leete, E., 1975. Biosynthesis and metabolism of
gramine in Lupinus hartwegii. Phytochemistry 14:
471-474.
75. Lehninger, A., 1982. Principles of biochemistry. Part
II, cap 17: Electron transport, oxidative
phosphorilation and regulation of ATP production.
Worth Publs, INC., p. 467.
76. Linduska, J. J., y F. P. Harrison, 1977. Corn
earworm: Artificial infestation as a means of
evaluating resistance in sweet corn. J. Econ. Entomol.
3: 565-567.
77. Lownsbery, B. F., W. H. English, E. H. Moody, y F.
J. Shick, 1972. Development of stems cankers in peach
trees inoculated with ring nematodes, Phytium spp.,
and Pseudomonas syringae. Phytopathology 62: 774b.
78. Marten, G. C., R. F. Barnes, y F. J. Wooding, 1973.
Alkaloids and palatability of Phalaris arundinacea L.
grown in diverse environments. Agron. J. 65: 199-201.
79. Marten, G. C., R. M. Jordan, y A. W. Hovin, 1981.
Improved lamb performance associated with breeding for
alkaloid reduction in reed canarygrass. Crop Science
21: 295-298.
80. McFaden, L. A., y D. B. Creagger, 1960. Recent
ocurrence of bacterial blight of Poinsettia in
Florida. Plant Dis. Rep. 44: 568-571.
81. McKey, D., 1961. Adaptative patterns in alkaloids.
Physiology. Amer. Nat. 108: 305-320.

82. Mears, J. A., y T. J. Mabry, 1971. Alkaloids in Leguminosae. In Harborne, J. B., D. Boulter, and B. L. Turner (Eds.), Chemotaxonomy of the Leguminosae. Academic Press Inc. Cap. 3: 73-168.
83. Mitchell, P., 1966. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol. Rev. 41: 445-502.
84. Moore, R. M., J. D. Williams, y J. Chia, 1967. Factors affecting concentrations of dimethylated indolealkylamines in Phalaris tuberosa L.. Aust. J. Biol. Sci. 20: 1131-1140.
85. Morrison, R. M., 1960. Studies of clonal isolates of Erysiphe cichoriacearum on leaf disk culture. Mycologia 52: 388-393.
86. Mulvena, D. P., y M. Slaytor, 1983. N - Methyl tranferase activities in Phalaris aquatica. Phytochemistry 22(1): 47-48.
87. Nelson, P. E., y R. S. Dickey, 1966. Pseudomonas caryophylli in carnation. II. Histological studies of infected plants. Phytopathology 56(2): 154-163.
88. Nelson, P. E., y R. S. Dickey, 1970. Histopathology of plants infected with vascular bacterial pathogens. Ann. Rev. Phytopathology 8: 259-280.
89. Neuman, J. y A. T. Jagendorf, 1964. Dinitrophenol as an uncoupler of photosynthetic phosphorylation. Biochem. Biophys. Res. Comm. 16(6): 562-567.

90. Niemeyer, H. M., y O. A. Roveri, 1984. Effects of gramine on energy metabolism of rat and bovine mitochondria. Biochem. Pharmacol. 33(19): 2973-2979.
91. Nielsen, L. W., 1956. Evaluation of irish potatoes for resistance to Pseudomonas solanacearum. Phytopathology 46: 22a.
92. Paleg, L. G., T. J. Douglas, A. Van Daal, y D. B. Keech, 1981. Proline, Betaine and other organic solutes protect enzymes against heat inactivation. Aust. J. Physiol. 8: 107-114.
93. Parker, R. E., 1976. Estadística para biólogos. Ediciones Omega S. A. (Barcelona), España. 129 pp.
94. Pepin, H. S., H. A. Daubeny, y I. C. Carne, 1967. Pseudomona blight of raspberry. Phytopathology 57(9): 929-931.
95. Pritchard, R. H., y D. W. Tempest, 1968. Growth: Cells and populations. In Mandelsman, J. K., K. McQuillen, and I. Dower (Eds.), Biochemistry of bacterial growth (3th ed.). Blackwell Scientific Publs. Part II, Cap. 2. pp. 99- 1124.
96. Queirolo, C. B., C. S. Andreo, H. M. Niemeyer, y L. J. Corcuera, 1983. Inhibition of ATPase from chloroplast by a hydroxamic acid from the gramineae. Phytochemistry 22 (11): 2455-2458.

97. Riaz, A., K. Matsuda, y A. Arslan, 1985. Water-stress induced changes in concentrations of Proline and other solutes in growing regions of young barley leaves. J. Exp. Bot. 36(172): 1716-1725.
98. Ritchie, D. F., y E. J. Klos, 1974. A laboratory method of testing pathogenicity of suspected Erwinia amylovora isolated. Plant Dis. Rep. 58(2): 181-183.
99. Robertson, J. L., 1979. Rearing the western spruce budworm. Forest Service U. S. Dep. of Agriculture, Washington D. C., 15 pp.
100. Robinson, T., 1974. Metabolism and function of alkaloids in plants. Science 184: 430-435.
101. Sahai S., B. I., y G. Ware, 1964. The effect of kinetin on nucleic acids and nucleases of excised barley leaves. Plant Physiol. 39: 62-64.
102. Schoonhoven, L. M., 1969. Gustation and foodplant selection in some lepidopterous larvae. Ent. exp. & appl. 12: 555-564.
103. Schoonhoven, L. M., 1969. Amino - acid receptor in larvae of Pieris brassicae (Lepidoptera). Nature 221: 1268.
104. Scott, D. R., 1977. The corn earworm in southwestern Idaho: Infestation levels and damage to processing corn and sweet corn seed. J. Econ. Entomol. 6: 709-713.

105. Sinden, S. L., J. E. DeVay, y P. A. Backman, 1971. Properties of syringomycin, a wide spectrum antibiotic and phytotoxin produced by Pseudomonas syringae, and its role in the bacterial canker disease of peach trees. Physiol. Pl. Pathol. 1: 199-213.
106. Smith, M. A., y G. B. Ramsey, 1956. Bacterial zonate spot of cabbage. Phytopathology 46: 210-213.
107. Smith, R. H., y M. H. Bass, 1971. Survey of Heliothis spp. infestations in soybeans in Alabama. J. Econ. Entomol. 64: 767-769.
108. Surico, G., y J. E. DeVay, 1982. Effect of syringomycin and syringotoxin produced by Pseudomonas syringae pv. syringae on structure and function of mitochondria isolated from holcus spot resistant and susceptible maize lines. Physiological Plant Pathology 21: 39-53.
109. Suttie, J. W., 1976. Bioquímica. Ed. Interamericana, Méjico. 354 pp.
110. Sutter, G. R., J. I. Krysan, y P. I. Guss, 1971. Rearing the southern corn rootworm on artificial diet. J. Econ. Entomol. 64: 65-67.
111. Swain, T., 1977. Secondary compounds as protective agents. Ann. Rev. Plant Physiol. 28: 479-501.

112. Talling, J. F., y D. Driver, 1963. Some problems in the estimation of chlorophyll a in phytoplankton. In Doty, M. S. (Ed). Proc. conf. on primary productivity measurement, marine and freshwater. Univ. Hawaii, UK Atomic Energy Commission. pp 142-146.
113. Tan, B. H., y G. M. Halloran, 1982. Variation and correlations of proline accumulation in spring wheat cultivars. Crop Science 22: 459-463.
114. Thurston, R., W. T. Smith y B. P. Cooper, 1966. Alkaloids secretion by trichomas of Nicotiana species and resistance to aphids. Ent. exp. & appl. 9: 428-432.
115. Tuite, J., 1969. Plant pathological methods. Fungi and bacteria. Cap. 6: Establishment of disease. Burgess Publ. Co. (USA). pp. 176-192.
116. Vakili, N. G., y Ch. H. Baldwin (jr), 1966. Insect dissemination of the tomato race of Pseudomonas solanacarum, the cause of bacterial wilt of certain Musa species. Phytopathology 56(3): 355-356.
117. Vanderzant, E. S., 1959. Inositol: An indispensable dietary requirement for the boll weevil. J. Econ. Entomol. 52(5): 1018-1019.
118. Vanderzant, E. S., C. D. Richardson, y S. W. Fort (Jr.), 1962. Rearing of bollworm on artificial diet. J. Econ. Entomol. 55(1): 140.

119. Vanderzant, E. S., 1968. Dietary requirements of the bollworm, Heliothis zea (Lepidoptera: Noctuidae), for lipids, choline, and inositol and the effect of fats and fatty acids on the composition of the body fat. Ann. Entomol. Soc. Amer. 61(1): 120-125.
120. Vanderzant, E. S., 1969. Physical aspects of artificial diets. Ent. exp. appl. 12: 642-650.
121. Virtanen, A. I., y P. K. Hietala, 1955. 2(3)-benzoxazolinones, an antifusarium factor in rye seedlings. Acta Chem. Scand. 9: 1543-1544.
122. Virtanen, A. I., P. K. Hietala, y O. Wahlroos, 1957. Antimicrobial substances in cereals and fooder plants. Arch. Biochem. Biophys. 69: 486-500.
123. Virtanen, A. I., y P. K. Hietala, 1959. On the structures of the precursors of benzoxazolinone in rye plants II. Soumen. Kemistilehti B. 32: 252.
124. Virtanen, A. I., y P. K. Hietala, 1960. Precursors of benzoxazolinone in rye plants. Precursors II. The aglicone. Acta Chem. Scand. 14: 499-502.
125. Von Euler, H. y H. Erdtman. 1935. Uber Gramin aus Schwedischen Gerstensippen. Justus Liebigs Annalen der Chimie, 520: 1-10.
126. Wahlroos, O., A. I. Virtanen, 1959. The Precursors of 6-methoxy-benzoxazolinone in maize and Wheat plants, their isolation and some of their properties. Acta Chem. Scand. 13: 1906-1908.

127. Waldbauer, G. P., 1984. Self-selection of an optimal nutrient mix from defined diets by larvae of the corn earworm, Heliothis zea (Boddie). Physiol. Zool. 57(6): 590-597.
128. Whitney, N. J., y C. G. Mortimore, 1961. Effects of 6-methoxy-benzoxazolinone on the growth of Xantomonas sewartii (Erw. Smith) dowson and its presence in sweet corn (Zea mayz var. Saccharata Bailey). Nature 189: 596-597.
129. Whittaker, R. H., y P. P. Feeny, 1971. Allelochemicals: Chemical interaction between species. Science 171: 757-770.
130. Widstrom, N. W., B. R. Wiseman, y W. W. McMillan, 1977. Responses of corn earworm larvae to maize silks. Agronomy J. 69: 817-815.
131. Wigglesworth, W. B., 1974. Insect Physiology. Chapman & Hale Eds. (London), 7a ed. pp. 166.
132. Woods, D. L., A. W. Hovin, y G. C. Marten, 1979. Seasonal variation of hordenine and gramine concentration and their heritability in reed canarygrass. Crop Science 19: 853-857.
133. Zummo, G. R., J. C. Segers, y J.H. Benedict, 1984. Seasonal Phenology of allelochemicals in cotton and resistance. Environmental Entomology 13(5): 1287-1290.

134. Zúñiga, G. E., V. H. Argandoña, H. M. Niemeyer, y L. J. Corcuera, 1983. Hydroxamic acid content in wild and cultivated gramineae. Phytochemistry 22(12): 2665-2668.
135. Zúñiga, G. E., M. S. Salgado, y L. J. Corcuera, 1985. Role of an indole alkaloid in the resistance of barley seedlings to aphids. Phytochemistry 24(5): 945-947.
136. Zuniga, G. E., y L. J. Corcuera, 1986. Effect of gramine in the resistance of barley seedlings to the aphid Rophalosiphum padi. Entomol. exp. appl. 40: 259-262.
137. Zúñiga, G. E., y L. J. Corcuera, 1987. Glycine -betaine accumulation influences susceptibility of water-stressed barley to the aphid Schizaphis graminum. Phytochemistry 26(2): 367-369.
138. Zúñiga, G. E., y L. J. Corcuera, 1987. Glycine -betaine in wilted barley reduces the effects of gramine on aphids. Phytochemistry 26: 3197-3199.