

**ROL DE LOS COMPUESTOS SEMIOQUIMICOS EN LA COLONIZACION DE  
CEREALES POR EL AFIDO *RHOPALOSIPHUM PADI***

**Tesis**

**presentada a la**

**Universidad de Chile**

**en cumplimiento parcial de los requisitos**

**para optar al grado de**

**Doctor en Ciencias con mención Química**

**Facultad de Ciencias**

**por**

**ANDRES EDUARDO QUIROZ CORTEZ**

**Profesor patrocinante : Dr. Hermann Niemeyer M.**

**Junio 1996**

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el Candidato :

ANDRES EDUARDO QUIROZ CORTEZ

ha sido aprobada por la Comisión informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias, mención Química.

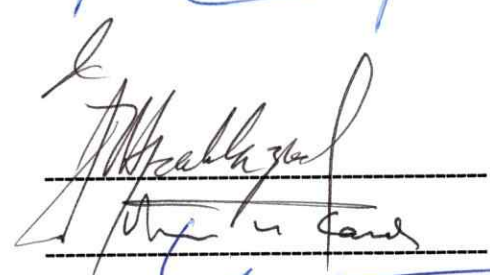
Patrocinante de tesis :

Dr. Hermann Niemeyer M.

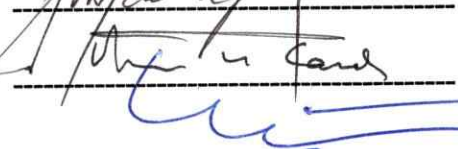


Comisión informante de Tesis

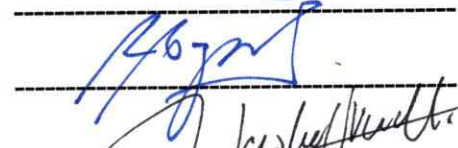
Dr. Jaime Apablaza



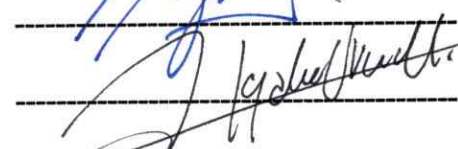
Dr. Bruce Cassels



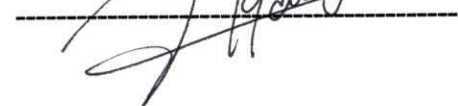
Dr. Mariano Castillo



Dr. Roberto Rozas



Dr. Alejandro Urzúa



*A MI MADRE*

## AGRADEMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros y profundos agradecimientos al Dr. Hermann Niemeyer M. por su infinita colaboración y comprensión durante el desarrollo de esta investigación, especialmente en los momentos más tristes que me ha tocado vivir.

También agradezco a la comisión evaluadora de este trabajo por los valiosos aportes hechos a esta investigación.

No puedo dejar de mencionar y agradecer al Dr. Jan Pettersson quien me inició en el mundo de la "afidología".

Un especial recuerdo y gratitud para todas las personas que de una u otra forma participaron en el desarrollo de mi tesis : A mis viejos amigos Arturo, Liliana y Victoria quienes me dieron todo su apoyo en la primera etapa de este trabajo. A mis amigas de siempre Paola, Claudia y Lili. A la nueva generación, Paula, Claudio, Ernesto y Eduardo.

Finalmente agradezco a Dios por su constante compañía, especialmente en los momentos más dolorosos.

*Con amor para Mi Padre y Hermano*

## INDICE DE MATERIAS

Lista de tablas	vi
Lista de figuras	vii
Resumen	ix
Abstract	x
INTRODUCCION	1
Compuestos semioquímicos volátiles en la interacción áfido-planta	3
Comunicación química intraespecífica en áfidos	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
OBJETIVOS	6
MATERIALES	7
Afidos	7
Plantas	7
Solventes	7
Reactivos químicos	7
METODOS	8
Colección de compuestos volátiles	8
Olfatometría	9
Electroantenografía	10
Ensayos de movilidad de áfidos en colonias de distinto tamaño sobre avena	11
Análisis de mezclas de volátiles	12
Cuantificación de enantiómeros del ( $\pm$ )-6-metil-5-hepten-2-ol en mezclas de volátiles	13
Síntesis de los ésteres diastereoisoméricos del ( $\pm$ )-6-metil-5-hepten-2-ol	14
Separación de los ésteres diastereoisoméricos del ( $\pm$ )-6-metil-5-hepten-2-ol	14
Obtención de los enantiómeros del ( $\pm$ )-6-metil-5-hepten-2-ol	16
Esterificación de mezcla de volátiles de trigo y cuantificación indirecta de los enantiómeros del ( $\pm$ )-6-metil-5-hepten-2-ol	17

RESULTADOS	18
Comunicación química entre <i>R. padi</i> y avena	18
Actividad olfatométrica de extractos de compuestos volátiles de avena	23
Identificación de los componentes de los extractos de avena	24
Identificación tentativa de los componentes minoritarios en los extractos de avena	29
Comunicación química entre <i>R. padi</i> y trigo	31
Actividad olfatométrica de extractos de volátiles de trigo	31
Identificación de los componentes de los extractos de trigo	32
Identificación tentativa de los componentes minoritarios en los extractos de trigo	37
Identificación de (+) y (-)-6-metil-5-hepten-2-ol presentes en el extracto de volátiles de trigo con una alta densidad de áfidos	37
Actividades olfatométricas de los compuestos puros presentes en extractos	39
Curvas dosis-respuesta para compuestos repelentes de áfidos	40
Olfatometrías con combinación de compuestos repelentes	41
Electroantenografías	42
DISCUSION	44
BIBLIOGRAFIA	49
APENDICES	53
Espectros de masas e identificación tentativa de componentes minoritarios de extractos de volátiles de trigo.	53
Identificación de compuestos por medio de Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de Masas (CG/EM)	53

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Olfatometrías con hojas de avena, y con <i>R. padi</i> alados o ápteros, solos y sobre una hoja de avena	18
<b>Tabla 2.</b> Olfatometrías con hojas de avena con ápteros de <i>R. padi</i> , y luego con las hojas de avena y los áfidos por separado	19
<b>Tabla 3.</b> Olfatometrías con plantas de avena enteras sin áfidos, y con bajo y alto número de ápteros de <i>R. padi</i>	23
<b>Tabla 4.</b> Olfatometrías con extractos de volátiles de avena sin áfidos, y con áfidos a baja y alta densidad	24
<b>Tabla 5.</b> Compuestos identificados (y su tasa de producción en ng/día) en los extractos de volátiles recolectados de plantas de avena	28
<b>Tabla 6.</b> Identificación tentativa de otros componentes minoritarios presentes en extractos de volátiles de plantas de avena (A), trigo (T), avena con una baja densidad de áfidos (ABD), trigo con una baja densidad de áfidos (TBD), avena con una alta densidad de áfidos (AAD) y trigo con una alta densidad de áfidos (TAD)	29
<b>Tabla 7.</b> Olfatometrías con plantas de trigo enteras sin áfidos, y con áfidos a baja y alta densidad poblacional	31
<b>Tabla 8.</b> Olfatometrías con extractos de volátiles de trigo sin áfidos, y con áfidos a baja y alta densidad	32
<b>Tabla 9.</b> Compuestos identificados (y su tasa de producción en ng/día) en los extractos de volátiles colectados de plantas de trigo	36
<b>Tabla 10.</b> Olfatometrías de volátiles de extractos de avena o trigo con o sin áfidos	39
<b>Tabla 11.</b> Olfatometrías con una mezcla de compuestos repelentes en proporciones semejantes a los extractos naturales	42



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida del áfido <i>R. padi</i>	2
<b>Figura 2.</b> Equipo de atrapamiento de volátiles	8
<b>Figura 3.</b> Olfatómetro	9
<b>Figura 4.</b> Electroantenógrafo	10
<b>Figura 5.</b> Experimento de movilidad de áfidos	11
<b>Figura 6.</b> Cromatograma de líquido de los ésteres diastereoméricos	15
<b>Figura 7.</b> Espectros de masas de los (S)-canfanatos de los enantiómeros del 6-metil-5-hepten-2-ol	16
<b>Figura 8.</b> Espectro de masas del (+)-6-metil-5-hepten-2-ol	17
<b>Figura 9.</b> Efecto de grupos de diferente tamaño de ápteros de <i>R. padi</i> en una hoja de avena cortada (□) o en una plántula entera de avena (○), sobre la conducta de un áfido áptero de <i>R. padi</i> en un olfatómetro	20
<b>Figura 10.</b> Movilidad de áfidos de ápteros de <i>R. padi</i> en grupos de distinto tamaño sobre hojas cortadas de avena de dos tamaños, en función del número de áfidos en cada experimento	21
<b>Figura 11.</b> Movilidad de áfidos de ápteros de <i>R. padi</i> en grupos de distinto tamaño sobre hojas cortadas de avena de dos tamaños, en función de la densidad poblacional de los áfidos en ambos experimentos	21
<b>Figura 12.</b> Olfatómetro conectado a frascos campana	22
<b>Figura 13A.</b> Cromatograma de gases (columna capilar polar CBP20) de un extracto de sustancias volátiles de avena (A)	25
<b>Figura 13B.</b> Cromatograma de gases (columna capilar polar CBP20) de un extracto de sustancias volátiles de avena con una baja densidad de áfidos (ABD)	26
<b>Figura 13C.</b> Cromatograma de gases (columna capilar polar CBP20) de un extracto de sustancias volátiles de avena con una alta densidad de áfidos (AAD)	27
<b>Figura 14A.</b> Cromatograma de gases (columna capilar polar CBP20) de un extracto de sustancias volátiles de trigo (T)	33

<b>Figura 14B.</b> Cromatograma de gases (columna capilar polar CBP20) de un extracto de sustancias volátiles de trigo con una baja densidad de áfidos (TBD)	34
<b>Figura 14C.</b> Cromatograma de gases (columna capilar polar CBP20) de un extracto de sustancias volátiles de trigo con una alta densidad de áfidos (TAD)	35
<b>Figura 15.</b> Corriente iónica total obtenida por impacto electrónico de los ésteres diastereoméricos de la mezcla racémica de ( $\pm$ )-6-metil-5-hepten-2-ol	38
<b>Figura 16.</b> Corriente iónica total obtenida por impacto electrónico de un extracto de volátiles de trigo con una alta densidad de áfidos esterificado con cloruro de (S)-(-)-canfanilo	38
<b>Figura 17.</b> Curvas dosis-respuesta para los compuestos repelentes de áfidos	41
<b>Figura 18.</b> Electroantenografías obtenidas con ápteros de <i>R. padi</i> con 6-metil-5-hepten-2-ona (A), 2-tridecanona (B) y control (C)	43

## RESUMEN

Recientes trabajos han demostrado que la olfacción juega un papel importante en la ecología química de áfidos, habiéndose logrado importantes avances en la identificación y en la comprensión del papel que juegan las feromonas sexual y de alarma. Sin embargo, los estudios químicos relacionados con los fenómenos de dinámica poblacional (selección de un hospedero, migraciones de áfidos ápteros y/o alados, agregación y espaciamiento) han recibido menos atención.

En esta tesis se evaluó el papel de compuestos semioquímicos en la interacción entre individuos del áfido *Rhopalosiphum padi* (L.) y otros individuos de la misma especie, y con dos de sus plantas hospederas, la avena (*Avena sativa* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.).

A partir de estudios olfatométricos y de atrapamiento y análisis de compuestos volátiles fue posible identificar compuestos atrayentes y repelentes hacia áfidos ápteros de *R. padi*, producidos por la interacción de ellos con su planta hospedera. Los compuestos atractivos corresponden a los llamados compuestos volátiles de hojas verdes ("green leaf volatiles"). Los compuestos repelentes fueron la 6-metil-5-hepten-2-ona y el salicilato de metilo en el caso de la avena, y la 6-metil-5-hepten-2-ona, el 6-metil-5-hepten-2-ol y la 2-tridecanona, en el caso del trigo. Por otra parte se determinó la existencia de un umbral de densidad (ca. 4 áfidos/cm<sup>2</sup>) bajo el cual los volátiles producidos por la combinación de los áfidos y la planta atrajo otros áfidos, y sobre el cual los volátiles producidos por la combinación de los áfidos y la planta repelió otros áfidos y el movimiento de ellos se hizo dependiente de la densidad poblacional.

Los resultados mostrados en esta tesis permiten postular un mecanismo de regulación poblacional de áfidos ápteros de *R. padi* mediado por compuestos semioquímicos volátiles: a) atracción hacia su planta hospedera por medio de compuestos volátiles de hojas verdes; b) atracción intraespecífica de áfidos cuando están agrupados en baja densidad sobre la planta hospedera, y c) repulsión intraespecífica de áfidos cuando están agrupados en alta densidad sobre la planta hospedera.

## ABSTRACT

Recent work has shown that olfaction plays an important role in the chemical ecology of aphids, important progress having been achieved in the identification and in the understanding of the role played by sex and alarm pheromones. However, studies related to population dynamics (host plant selection, migrations of apterae and alatae, aggregation and spacing) have received less attention.

In this thesis, the role of semiochemicals in the intraspecific interaction of the aphid *Rhopalosiphum padi* (L.) and the interspecific interaction with two of its host plants, wheat (*Triticum aestivum* L.) and oat (*Avena sativa* L.), was evaluated.

Attractant and repellent compounds towards apterae of *R. padi* produced by their interactions with their host plant were identified by olfactometry as well as entrainment of volatiles and analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Attractive compounds corresponded to the so-called green leaf volatiles. Repellent compounds were 6-methyl-5-hepten-2-one and methyl salicylate in the case of oat, and 6-methyl-5-hepten-2-one, 6-methyl-5-hepten-2-ol and 2-tridecanone in the case of wheat. A density threshold (*ca.* 4 aphids/cm<sup>2</sup>) was found below which volatiles produced by the aphid-plant combination was attractive to apterae of *R. padi* and above which volatiles were repellent and aphid movement was density-dependent.

The results shown in this thesis allow the following mechanisms to be postulated for the regulation of populations of apterae of *R. padi*: a) attraction to the host plant by green leaf volatiles; b) intraspecific attraction when aphids are grouped at low densities; c) intraspecific repellency when aphid population density grows beyond a given threshold.

## INTRODUCCION

Los áfidos son un grupo de insectos que se pueden encontrar a través de todo el mundo, aunque el mayor número de especies se concentra en regiones templadas. Muchas especies son plagas agrícolas y pueden producir grandes daños, llegando a ser tan numerosos que en 1 hectárea es posible encontrar 5000 millones de áfidos.

El ciclo de vida de los áfidos son complejos y presentan además poliformismo, características relacionadas con el ambiente donde se desarrollan y que los capacitan para explotar a sus hospederos y responder en un alto grado a los cambios ambientales. Es así como los áfidos pueden exhibir reproducción sexuada y/o partenogenética. La producción de ambas formas es común en áfidos donde los inviernos son largos y fríos (reproducción holocíclica). La forma sexuada se produce principalmente durante el otoño y las hembras ovíparas dejan los huevos para que invernen. Una vez llegada la primavera los huevos eclosionan y se comienzan a suceder una serie de generaciones partenogenéticas. En condiciones de clima más caluroso, suelen reproducirse sólo por la vía partenogenética (reproducción anholocíclica).

Según su forma de alimentarse, los áfidos pueden ser monófagos o polífagos. Frecuentemente los áfidos que se reproducen holocíclicamente tienen dos tipos de hospederos : uno de invierno y otro de primavera/verano.

El áfido de la avena, *Rhopalosiphum padi* (L.) (Homoptera, Aphididae), es una especie que puede o no alternar de hospedero según el clima donde se desarrolla. En Escandinavia se reproduce holocíclicamente, siendo el árbol *Prunus padus* L. (Rosaceae) el hospedero primario o de invierno y un amplio rango de cereales y pastos (Poaceae = Gramineae ) sus hospederos secundarios o de verano. En estos lugares se suceden tres períodos de migraciones (ref.) (Figura 1). Una migración se produce en primavera, cuando los áfidos dejan su hospedero de invierno (*P. padus*) y se dirigen hacia sus hospederos de verano (gramíneas cultivadas). Durante el verano ocurre otro período de migraciones, cuando los áfidos se trasladan entre gramíneas cultivadas y silvestres. Por último, otra migración se produce cuando los áfidos recolonizan su hospedero de invierno durante el otoño.

En el resto de Europa y también en nuestro país, no se han observado formas sexuadas de esta especie. El áfido habita en verano cultivos de cereales, reproduciéndose partenogenéticamente. A fines del verano, como producto de la disminución en la calidad del recurso y los cambios ambientales en

temperatura y fotoperiodo, se producen generaciones aladas que migran hacia gramíneas y otras especies silvestres, principalmente ciperáceas, donde pasan el invierno en formas ápteras partenogénicas. A comienzos de la primavera, nuevamente se producen generaciones aladas que migran hacia los cultivos.

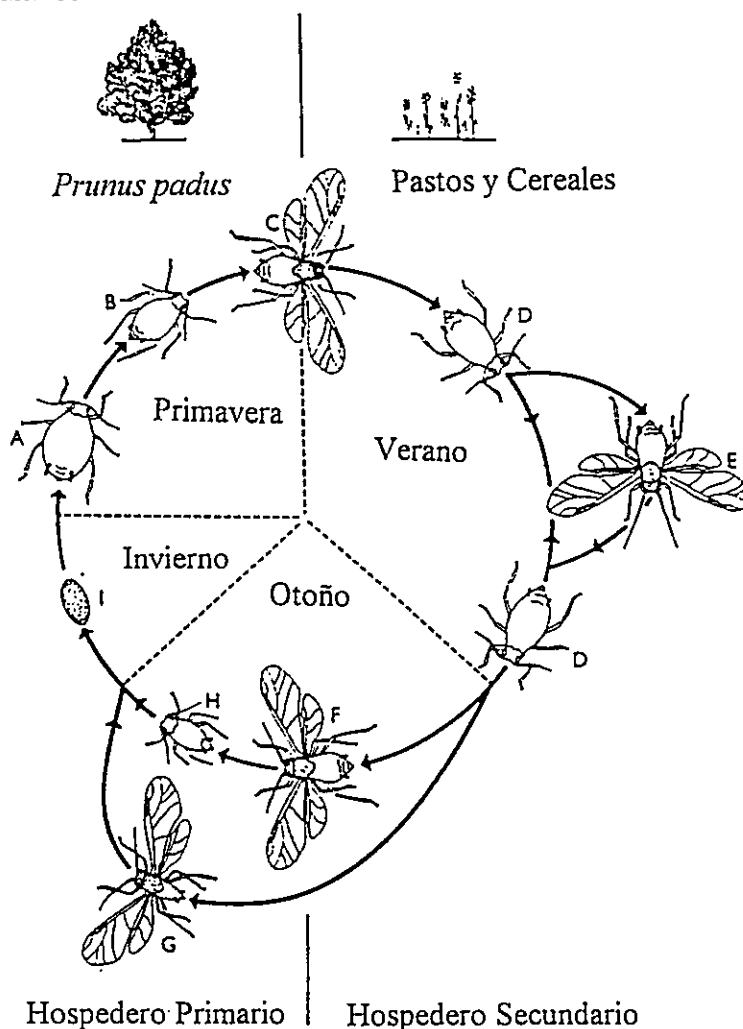


Figura 1. Ciclo de vida de *Rhopalosiphum padi* en Escandinavia (A, fundadora; B, hembras ápteras fundatrigenas; C, migrante; D, alienícolas ápteras; E, alienícolas aladas; F, sexúpara; G, macho; H, ovípara; I, huevo).

A fines de los años 50 se encontraba improbable la participación de señales químicas en estos fenómenos de búsqueda de un hospedero, aposentamiento sobre las plantas y migraciones de áfidos. Hoy en cambio es posible encontrar antecedentes en la literatura que respaldan la idea que diversos patrones conductuales de los áfidos están influenciados por estímulos olfativos (Pettersson, 1994). Existe abundante literatura sobre el papel de los compuestos semioquímicos en el apareamiento de

áfidos (feromonas sexuales) (Pettersson, 1970a; Dawson y col., 1987,1989) y en su defensa contra predadores (feromonas de alarma) (Bowers y col., 1972; Nault y Bowers, 1974; Arakaki, 1989). Sin embargo, los fenómenos relacionados con la dinámica poblacional de áfidos, tales como migraciones, agregaciones y espaciamiento, que regulan el tamaño, la distribución y la supervivencia de la población, han sido relacionados sólo circunstancialmente con señales químicas intra e interespecíficas.

### Compuestos semioquímicos volátiles en la interacción áfido-planta

El establecimiento de una población de áfidos sobre una planta hospedera ocurre en varias etapas. Estudios de comportamiento de áfidos alados han mostrado que el vuelo se inicia con un período de vuelo migratorio durante el cual el áfido no responde a señales provenientes de las plantas. Esta etapa es seguida por un vuelo de ataque, en el cual el áfido responde a estímulos visuales y/o olfativos, éstos últimos importantes a corta distancia del hospedero (David y Hardie, 1988).

La literatura reciente muestra numerosos ejemplos de participación de compuestos volátiles provenientes de plantas hospederas en la atracción de áfidos. Individuos sexuales de *R. padi* fueron atraídos por el aroma de su hospedero de invierno, *Prunus padus* (Pettersson, 1970b). Estudios olfatométricos y de campo han demostrado que migrantes de primavera de *Phorodon humuli* son atraídos por compuestos volátiles de su hospedero de invierno (Campbell y col., 1990), pero los compuestos responsables de esta actividad no fueron identificados. Pettersson y Stephansson (1991) encontraron que dos especies de áfidos, *Brevicoryne brassicae* y *Lipaphis erysimi*, reaccionaban positivamente a los olores de *Brassica napus*. Campbell y col. (1993) identificaron el (*E*)-2-hexenal, el  $\beta$ -cariofileno y el salicilato de metilo como tres compuestos volátiles provenientes de migrantes de primavera de *P. humuli* comiendo sobre hojas de lúpulo. Los dos primeros compuestos fueron atrayentes en ensayos olfatométricos y la adición del salicilato de metilo inhibió la actividad de ellos.

Por otra parte, se ha estudiado también el efecto de compuestos volátiles de plantas no hospederas sobre el comportamiento de áfidos. Es así como ensayos de campo y de laboratorio demostraron que el isocianato de 4-pentenilo, un compuesto volátil ausente de la planta hospedera del áfido *Aphis fabae*, ejercía un poder repelente hacia él (Isaacs y col., 1992). Nottingham y Hardie (1993) informaron que extractos de diversas plantas no hospederas de los áfidos *B. brassicae* y *A. fabae* tenían un efecto repelente y afectaban el vuelo y el aterrizaje de estos áfidos.

Compuestos volátiles provenientes de plantas no hospederas pueden también alterar los efectos de compuestos volátiles de plantas hospederas. Es así como el salicilato de metilo, un compuesto volátil emitido por *Prunus padus*, junto con el (-)-(1*R*,5*S*)-mirtenal, un compuesto de resinas de gimnospermas, fueron repelentes hacia el áfido *A. fabae* e inhibieron el poder atractor de los olores provenientes de su hospedero *Vicia faba* (Hardie y col., 1994). Además, el salicilato de metilo inhibió el poder atractor de los compuestos volátiles de hojas de avena hacia migrantes de primavera de *R. padi* (Pettersson y col., 1994).

Dos de los principales hospederos del áfido en estudio, *R. padi*, son la avena (*Avena sativa* L.) y el trigo (*Triticum aestivum* L.). Los compuestos volátiles producidos por extractos de éstos y otros cereales han sido analizados cromatográficamente (Hamilton-Kemp y Andersen, 1984; Buttery y col., 1985). Sin embargo, los compuestos aislados no han sido bioensayados con áfidos. Más aún, estos compuestos volátiles fueron aislados a partir de plantas dañadas, lo que no da certeza de la presencia de ellos en plantas intactas.

Hasta la fecha no han sido identificados los compuestos volátiles emitidos por cereales con un rol importante en la aceptación o rechazo de ellos por parte de *R. padi*. En esta tesis se aislarán e identificarán compuestos provenientes de plantas hospederas y de la interacción entre plantas y áfidos, y se determinará su actividad sobre áfidos

### Comunicación química intraespecífica en áfidos

Numerosos patrones de conducta exhibidos por áfidos han sido asociados a la percepción de compuestos volátiles. Pettersson (1970a) demostró que hembras ovíparas del género *Schizaphis* atraían a machos por medio de una feromona sexual. Sin embargo la estructura de una feromona sexual de áfidos sólo fue determinada por primera vez por Dawson y col. (1987, 1989) quienes, trabajando con el áfido *Megoura viciae*, demostraron que la feromona sexual estaba compuesta por una mezcla de dos monoterpenoides, el (1*R*,4*aS*,7*S*,7*aR*)-nepetalactol y la (4*aS*,7*S*,7*aR*)-nepetalactona, que actuaban sinérgicamente. Esta feromona sexual fue identificada más tarde en otras especies de áfidos (Campbell y col., 1990; Dawson y col., 1988, 1989 y 1990).

Por otro lado, la feromona de alarma de varias especies de áfidos fue identificada como el (*E*)- $\beta$ -farneseno (Bowers y col., 1972; Edwards y col., 1973). Esta feromona es liberada por los áfidos



cuando éstos son atacados por depredadores o parasitoides, y dan origen a respuestas tales como defensa, evasión (Nault y col., 1984) e incluso ataque (Arakaki, 1989).

La agregación y la migración de áfidos hasta la fecha no han sido relacionadas con señales químicas, aunque Kay (1976) postuló la presencia de una feromona de agregación en *Aphis fabae*. Más recientemente Pettersson y Stephansson (1991) sugirieron que una feromona de agregación era emitida por morfos alados de los áfidos *B. brassicae* y *Lipaphis erysimi*. En experimentos de laboratorio y de campo, Pettersson (1994) mostró el posible rol de una feromona de agregación en la migración otoñal de *R. padi*. En estudios de la migración otoñal de *P. humuli*, Campbell y col. (1990) sugirieron la participación de una feromona de agregación. Pettersson (1994), a través de la olfactometría y de experimentos de atrapamiento en el campo, mostró que migrantes de primavera de *R. padi* emitían una feromona con un efecto de atracción sobre otros migrantes de primavera. Hasta la fecha esta posible feromona de agregación no ha sido identificada.

En resumen, en los fenómenos de agregación y migración de áfidos se ha postulado la participación de señales químicas, pero los posibles compuestos químicos involucrados en tales hechos no han sido identificados. En esta tesis se estudiará la participación de compuestos volátiles en los fenómenos de agregación y espaciamiento en poblaciones del áfido *R. padi*.

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha postulado que fenómenos tales como la selección de un hospedero, las migraciones de áfidos ápteros y/o alados, la agregación y el espaciamiento del áfido *R. padi* en su relación con sus plantas hospederas y con conespecíficos, serían gobernados por estímulos odoríficos, pero hasta la fecha los compuestos semioquímicos involucrados en tales fenómenos no han sido identificados.

Debido a los escasos antecedentes químicos informados en la literatura hasta el momento que permitan apoyar la idea de que los estímulos odoríficos afectan el comportamiento de *R. padi*, es que en esta tesis se plantea la identificación de los compuestos semioquímicos involucrados en la interacción de individuos de *R. padi* con otros individuos de la misma especie y con sus plantas hospederas.

La hipótesis de trabajo es la siguiente: los áfidos, ya sea alados o ápteros, son atraídos por compuestos volátiles emitidos por su potencial hospedero. Una vez sobre el hospedero, los áfidos

alados emiten una señal química de llamada hacia otros individuos alados (feromona de agregación). Luego que se han desarrollado las colonias de individuos ápteros y alcanzado una densidad poblacional alta, una señal química de espaciamiento es emitida por los áfidos ápteros que provoca un distanciamiento de los áfidos entre si.

En nuestro país, el ciclo de vida de *R. padi* es anholocíclico, habiéndose detectado sólo formas partenogénicas, principalmente en cereales cultivados durante el verano y en especies silvestres de las familias Gramineae o Cyperaceae durante el invierno. La investigación se centró en la relación de morfos partenogénicos de *R. padi* con dos cereales hospederos: la avena y el trigo.

## OBJETIVOS

**Objetivo 1 : evaluar el rol de los compuestos volátiles de cereales en la aceptación o rechazo de éstos por *R. padi*.** Para ello se recolectarán e identificarán los compuestos volátiles producidos por cultivares de trigo y de avena, y se determinarán sus efectos sobre *R. padi* en un olfatómetro.

**Objetivo 2 : evaluar el rol del aumento de la población de áfidos sobre una planta hospedera en la emisión de compuestos volátiles.** Para ello se recolectarán e identificarán los compuestos volátiles producidos por tres sistemas: a) planta sola; b) planta con una población de áfidos de baja densidad y c) planta con población de áfidos de alta densidad, y se compararán sus efectos sobre áfidos.

La identificación de los componentes de las mezclas activas de compuestos volátiles se llevará a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Esta identificación será confirmada determinando los índices de Kováts (Kováts, 1957; Van den Dool y Krats, 1963; Gaskin y col., 1971) y co-inyectando estándares comerciales o sintéticos.

Debido a que no se cuenta rutinariamente con una técnica, tal como la electroantenografía o el registro electrofisiológico de una célula en particular (SCR, single cell recording) acopladas a un cromatógrafo de gases, que permitan detectar directamente los componentes potencialmente activos presentes en una mezcla, es que todos los compuestos aislados e identificados serán probados en un olfatómetro.

## MATERIALES

### Afidos

Generaciones monoclonales de verano del áfido *Rhopalosiphum padi* (L.) fueron criadas sobre *Avena sativa* (L.) en un invernadero a una temperatura entre 18-22 °C y con régimen de luz de 18 h luz/6 h oscuridad. Los áfidos utilizados en las olfatometrías fueron adultos ápteros de no más de dos días de edad. Las olfatometrías fueron llevadas a cabo entre las 10:00 y las 15:00 horas, a temperaturas entre 20 y 22 °C, y humedad relativa entre 60 y 85%.

### Plantas

Las plantas para los experimentos (*Avena sativa* L. cv. Nahuén y *Triticum aestivum* L. cv. Ciko) fueron producidas en un invernadero bajo las mismas condiciones que los áfidos. En todos los experimentos las plantas usadas estaban en el estado de crecimiento 12 de la escala de Zadoks (Zadoks y col., 1974)

### Solventes

Todos los solventes fueron destilados y secados previo a su uso. Su pureza fue controlada por medio de análisis por cromatografía de gases.

### Reactivos químicos

Todos los reactivos fueron obtenidos de Aldrich Chem. Co. y su pureza fue confirmada por cromatografía de gases con detector de masas iónicas.

## METODOS

## Colección de compuestos volátiles

Los compuestos volátiles fueron recolectados mediante la técnica descrita por Blight (1990). Se empleó un método de atrapamiento diferencial de volátiles, en el cual fueron recolectados simultáneamente los volátiles provenientes de dos líneas separadas (Figura 2). Se hizo circular aire previamente purificado a través de dos jarros-campana, en cuyo interior se pusieron los materiales biológicos que se deseaba comparar. Los volátiles fueron atrapados en sendas trampas de Porapak Q a la salida del sistema. Los atrapamientos se prolongaron por 48 horas y las columnas de Porapak-Q fueron lavadas con 250  $\mu$ l de éter etílico recién destilado. El extracto fue concentrado en frío hasta un volumen de 25  $\mu$ l mediante flujo de  $N_2$  previamente purificado. Los concentrados fueron envasados en ampollas de vidrio selladas bajo corriente de  $N_2$  y fueron mantenidos a  $-5^\circ\text{C}$ . Los extractos fueron analizados como se describe más abajo.

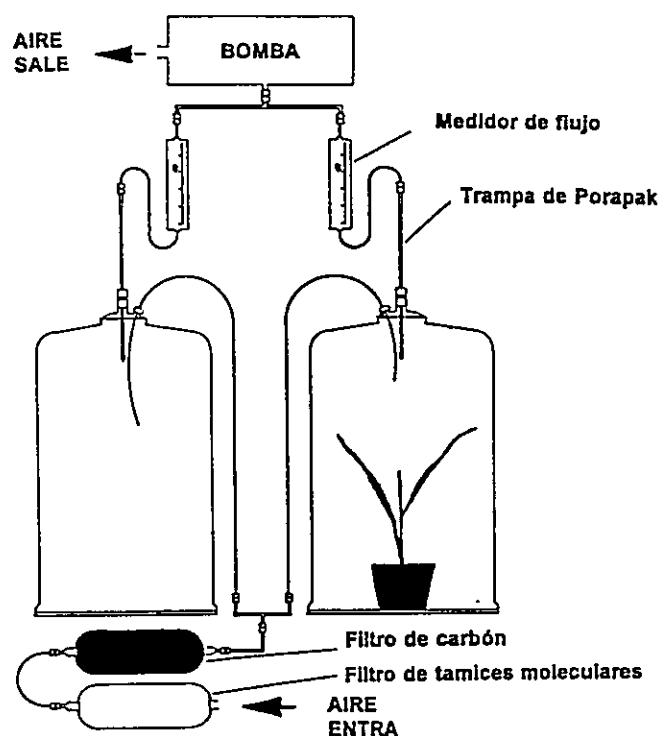


Figura 2. Equipo de atrapamiento de volátiles

## Olfatometría

La olfatometría ha sido exitosamente usada en estudios de feromonas de áfidos. Esta técnica está basada en los movimientos individuales de los áfidos dentro de un espacio llamado "arena" (Pettersson, 1970). La arena está dividida en 5 secciones, una zona central cuadrada y 4 zonas (brazos) que contienen aire enriquecido con los contenidos de los tubos con muestras (Figura 3), que consisten en 10  $\mu$ l ya sea del extracto o del compuesto puro diluido en n-hexano, sobre un pedazo de papel de filtro Whatman Nr 2. Un áfido de prueba es confinado en la arena bajo un flujo de aire proveniente de las cuatro esquinas del olfactómetro obtenido por su extracción por el centro de la arena.

Los datos se registraron de dos formas. En un comienzo la posición del áfido fue observada y registrada cada tres minutos. Después de 10 observaciones el experimento finalizaba y el número acumulado de visitas en los diferentes brazos era tratado como una observación experimental. Posteriormente, se elaboró un sistema computarizado de adquisición de datos en el cual se registraba el tiempo que el áfido permanecía en cada una de las 4 zonas. Después de 15 minutos el experimento finalizaba y el tiempo total que permanecía el áfido en cada una de las zonas era tratado como una observación experimental. En ambos casos el experimento es repetido 10 veces. Las comparaciones de las frecuencias o duración de visitas fue hecha usando la estadística no paramétrica de Wilcoxon para una prueba de suma de rangos de una cola para dos grupos.

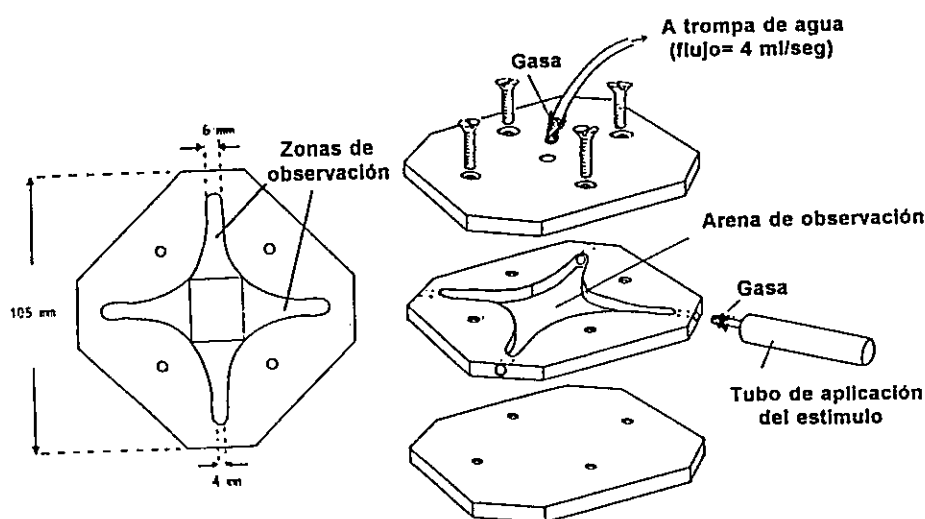


Figura 3. Olfatómetro

## Electroantenografía

Esta técnica registra la respuesta total de una preparación de antena provocada por la aplicación de un estímulo odorífico. Se utilizaron cabezas amputadas de áfidos ápteros de *R. padi*. Los electrodos de vidrio, llenados con una solución de KCl 0,1 M, fueron conectados, uno a la base de la antena (electrodo indiferente) a través de la parte posterior de la cabeza del insecto y el otro a la punta de la antena (electrodo registrador). Se emplearon alambres de Ag-AgCl para conectar la preparación con los aparatos de amplificación (AM-05, SYNTECH) y de registro de las señales (IDAC-1, SYNTECH).

La preparación de antena fue estimulada constantemente con aire purificado que fluía a razón de 30 ml/s por un tubo metálico de 15 cm de largo por 1 cm de diámetro externo (Figura 4, letra A). Los estímulos químicos (100 ng) fueron aplicados sobre papel de filtro (0,5 x 30 mm) Whatman N°2 e introducidos, 10 s después de ser aplicados sobre el papel, dentro de una pipeta Pasteur cuya punta se insertaba en un orificio del tubo metálico (Figura 4, letra B). Se aplicaron pulsos de 2 s de aire purificado con un flujo de 30 ml/s, que empujaron los compuestos de prueba a través de la pipeta Pasteur. Los promedios de los controles y los estímulos fueron comparados usando la estadística de Wilcoxon para datos pareados.

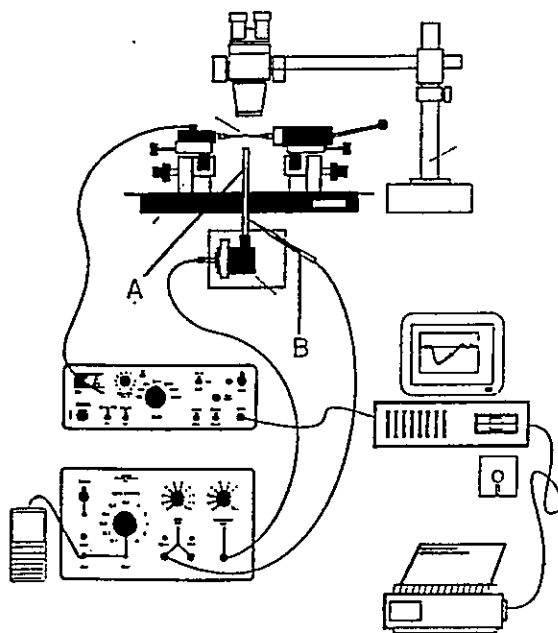


Figura 4. Electroantenógrafo

## Ensayos de movilidad de áfidos en colonias de distinto tamaño sobre avena

Este experimento fue diseñado para examinar los efectos mostrados por compuestos odoríficos en ensayos olfatométricos en condiciones algo más naturales.

El arreglo experimental se muestra en la figura 5 y consistió en una plancha de poliestireno expandido (Plumavit®) de 12 mm de espesor sobre una bandeja con agua, dispuesta de tal manera que la parte inferior de las hojas que atravesaban el Plumavit quedaran sumergidas en el agua. Estas hojas fueron tomadas de plantas de avena en estado de desarrollo 20 en la escala de Zadoks y col. (1974). La superficie alrededor de las hojas fue cubierta con papel de filtro. Para restringir los movimientos de los áfidos entre los diferentes tratamientos, se colocó un anillo de polietileno de 2 mm de altura por 15 mm de diámetro rodeando la base de la hoja.

Se colocaron ápteros de *R. padi* en grupos de diferente tamaño en la base de la hoja. Se registraron seis observaciones cada diez minutos del número de áfidos que estaban caminando sobre la hoja o en la zona comprendida entre los bordes del anillo y la base de la hoja, y se calculó el promedio de áfidos caminando.

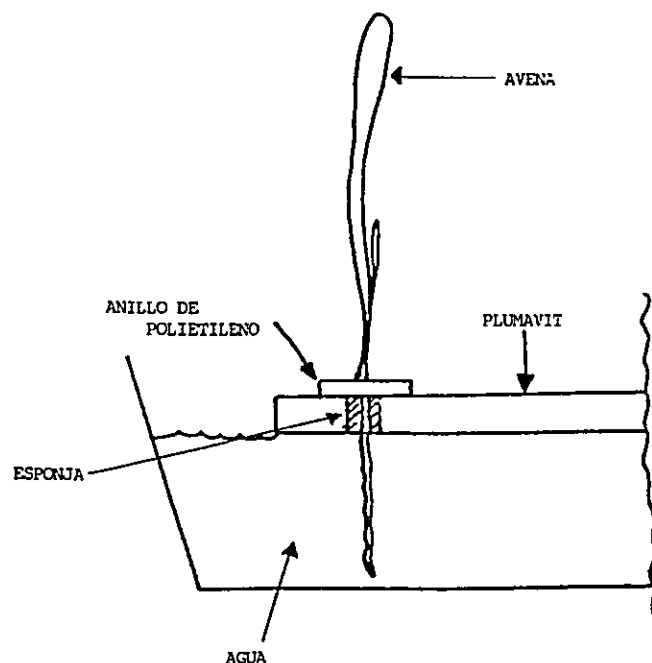


Figura 5. Experimento de movilidad de áfidos

## Análisis de mezclas de volátiles

Los extractos fueron inyectados (1  $\mu$ l) en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890 acoplado a un detector de masas iónicas Hewlett-Packard modelo 5972 y provisto de una columna capilar apolar HP-1 de 25 m de longitud y de 0,22 mm de diámetro interno o de una columna polar CBP20 de 25 m de longitud y de 0,25 mm de diámetro interno, y de un sistema de análisis de datos. Se empleó ionización por impacto electrónico a 70 eV con una temperatura del detector de 280 °C. Para producir la separación cromatográfica de los compuestos presentes en los extractos, el cromatógrafo de gases fue mantenido a una temperatura de 35 °C por 5 minutos, programado para subir 5 °C/min hasta 200 °C y finalmente mantenido a 200 °C por 10 min. Los picos en el espectro de masas pertenecen a tres categorías, que fueron analizadas de distintas maneras:

A) *Picos con abundancias relativas máximas mayores que 1000 en alguno de los extractos provenientes de una misma especie vegetal.* En este caso, los picos pudieron ser tentativamente identificados combinando tres criterios : i) búsqueda en la biblioteca de espectros de masas usando un algoritmo de comparación con una técnica de búsqueda reversa que verifica que los picos principales de los compuestos de referencia estén presentes en el espectro problema. Esta comparación puede ser imperfecta, debiendo recurrirse a criterios adicionales para una asignación efectiva; ii) comparación visual de los espectros propuestos por la búsqueda en la biblioteca con el espectro del pico en cuestión ; iii) comparación con estudios previos de aislamiento de compuestos de extractos de las mismas especies ; y iv) consideraciones biogénicas. Esta identificación tentativa fue corroborada por determinación de los índices de retención de Kovats (Kováts, 1957; Van den Dool y Krats, 1963; Gaskin y col., 1971), en dos columnas de diferente polaridad, de los compuestos en el extracto y luego comparación con los índices determinados para los compuestos estándares puros. Los compuestos de este grupo están identificados en las tablas mediante números. En el apéndice (pp. A36 a A-42) muestran la metodología en detalle en tres casos.

B) *Picos con abundancias relativas máximas menores que 1000 en alguno de los extractos provenientes de una misma especie vegetal.* En este caso, los espectros obtenidos resultaron en general bastante "sucios". En estas condiciones, la búsqueda en la biblioteca de espectros resultó



prácticamente inútil, y las identificaciones tentativas fueron realizadas por análisis de fragmentos de masas y tomando en cuenta los criterios iii) y iv) del párrafo anterior, y comparación eventual de los espectros de las estructuras propuestas con el espectro del compuesto puro, si estaba en la biblioteca de espectros del sistema de datos del instrumento. Estos compuestos están identificados en las tablas correspondientes mediante letras.

C) *Picos correspondientes a compuestos que sangraban de la columna y compuestos que provenían del sistema sin materiales biológicos.* En estos casos se propone la estructura por comparación con los espectros de la biblioteca disponible y comparación con lo informado para las columnas cromatográficas empleadas.

Cada uno de los compuestos identificados fue cuantificado por intrapolación desde curvas de calibración que fueron construidas con soluciones de los compuestos puros en cuatro diluciones distintas (1, 25, 50 y 100 ng/ $\mu$ l) preparadas por dilución sucesiva de una solución inicial concentrada. Se utilizó docosano como estándar interno en cada una de las inyecciones. Los resultados, expresados en ng de cada uno de los compuestos producidos por el sistema biológico en cuestión durante el lapso de 1 día, corresponden a un promedio de tres determinaciones (repeticiones) realizadas con tres atrapamientos de volátiles distintos llevados a cabo bajo condiciones similares.

#### **Cuantificación de enantiómeros del ( $\pm$ )-6-metil-5-hepten-2-ol en mezclas de volátiles**

Uno de los compuestos activos que se encontraron en las mezclas de volátiles provenientes de cereales infestados con una alta densidad de áfidos fue el 6-metil-5-hepten-2-ol. El centro quiral en esta molécula hizo necesaria la identificación del (o de los) isómeros ópticos presentes. Uno de los procedimientos generales más utilizados para resolver una mezcla racémica involucra su conversión a un par de derivados diastereoisoméricos por medio de una reacción con un reactivo quiral. La mezcla de alcoholes se resolvió haciendo reaccionar la mezcla racémica del alcohol con un cloruro de ácido ópticamente activo, el cloruro de (*S*)-(-)-canfánilo. Este cloruro de ácido ha sido empleado previamente para resolver mezclas racémicas de alcoholes (Lampe y col., 1992). Posteriormente la

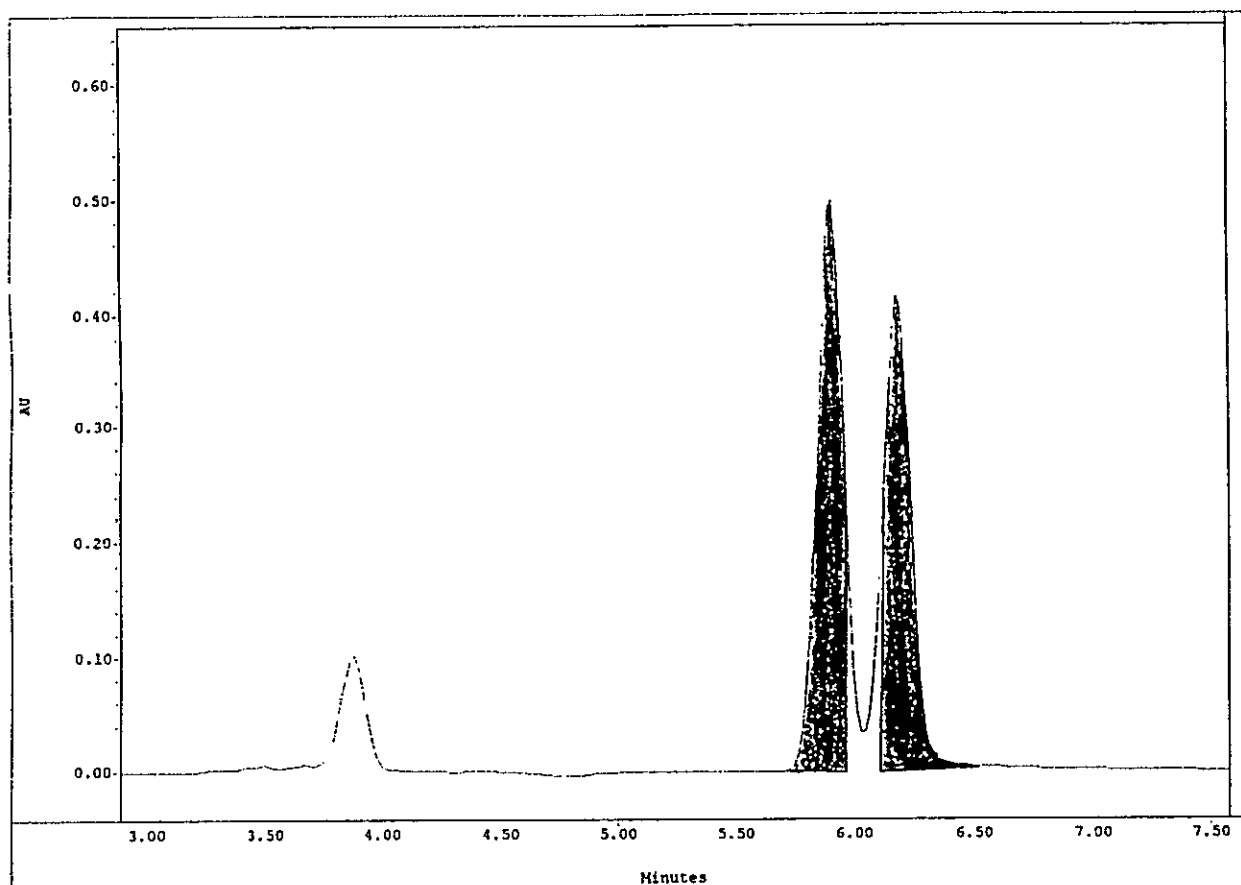
mezcla de diastereoisómeros se separó por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución y los ésteres puros fueron hidrolizados para dar origen a los respectivos alcoholes enantioméricamente puros. Los detalles se describen a continuación.

*Síntesis de los ésteres diastereoméricos del (±)-6-metil-5-hepten-2-ol.* La síntesis consistió en hacer reaccionar 0,7 ml (4,6 mmol) de (±)-6-metil-5-hepten-2-ol con 2 g (9,2 mmol) de cloruro de (S)-(-)-canfánilo en 3 ml de piridina anhidra. La mezcla fue agitada por una hora a temperatura ambiente y luego enfriada en un baño de hielo, agregándose posteriormente 50 µl de agua destilada con el fin de crear una fase acuosa que contenga la piridina y de la cual se extraiga el producto con un solvente apolar. La desaparición del reaccionante y la aparición del producto fueron controladas por cromatografía en capa fina de gel de sílice, utilizando como fase móvil una mezcla de éter etílico: éter de petróleo (1:1) ( $R_f$  0,65 y 0,80, respectivamente). Posteriormente se adicionó diclorometano (4 ml) y éter etílico (8 ml) a la mezcla de reacción. Esta fase orgánica fue lavada sucesivamente con 16 ml de solución saturada de cloruro de potasio, 16 ml de solución de ácido clorhídrico 1 N, 16 ml de solución saturada de cloruro de potasio y 16 ml de solución saturada de carbonato de sodio, con el fin de remover desde la fase orgánica las sales de piridinio residuales. La fase orgánica fue secada con sulfato de magnesio. La evaporación de los solventes dejó un aceite amarillo que pesó 1,3 g. Se verificó la presencia de los dos diastereómeros inyectando 1 µl de una solución diluida del aceite en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas iónicas.

El aceite amarillo fue purificado por medio de cromatografía de columna de media presión, según la técnica descrita por Bäckström (1996) utilizando Silicagel 60 y mezclas de solventes de polaridad creciente utilizando éter de petróleo y éter etílico. Se obtuvo 1,23 g de mezcla de diastereómeros (87 % de rendimiento).

*Separación de los ésteres diastereoméricos del (±)-6-metil-5-hepten-2-ol.* La mezcla de diastereómeros fue separada por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución. Para ello se utilizó una columna semipreparativa (7,8 mm de diámetro por 300 mm de largo) Waters Nova-Pak de alta resolución rellena con gel de sílice. Se usó como fase móvil una mezcla de hexano:2-propanol (500:1) con un flujo de 3 ml/min. La separación fue controlada por medio de un detector de UV-Vis multidiodo, utilizando una longitud de onda de 203 nm. Se inyectaron volúmenes de 20 µl con una

concentración de ésteres de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . En total se separaron 250 mg de mezcla de ésteres, obteniéndose 90 mg del (*S*)-(-)-canfanato de (-)-1,5-dimetil-4-hexenilo y 120 mg de (*S*)-(-)-canfanato de (+)-1,5-dimetil-4-hexenilo. La recuperación sólo parcial de los ésteres presentes en la mezcla se debió a que la separación cromatográfica no fue óptima, habiéndose recogido solamente aquellas fracciones donde los compuestos aparecían puros (Figura 6).



**Figura 6.** Cromatograma de líquidos de la separación de los ésteres diastereoméricos. Las áreas achuradas corresponden a las zonas colectadas.

Los ésteres distereoméricos fueron identificados por: i) sus distintos tiempos de retención en el cromatógrafo de gases y el mismo espectro de masas; ii) generación por hidrólisis de los alcoholes enantioméricos; y iii) la fragmentación en sus espectros de masas (Figura 7) : EIMS  $m/z$  (int. rel.) : 181 [ $M^+$  -  $\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ] (1), 153 (4), 125 (5), 110 (87), 95 (100), 69 (46), 55(30), 41 (68).

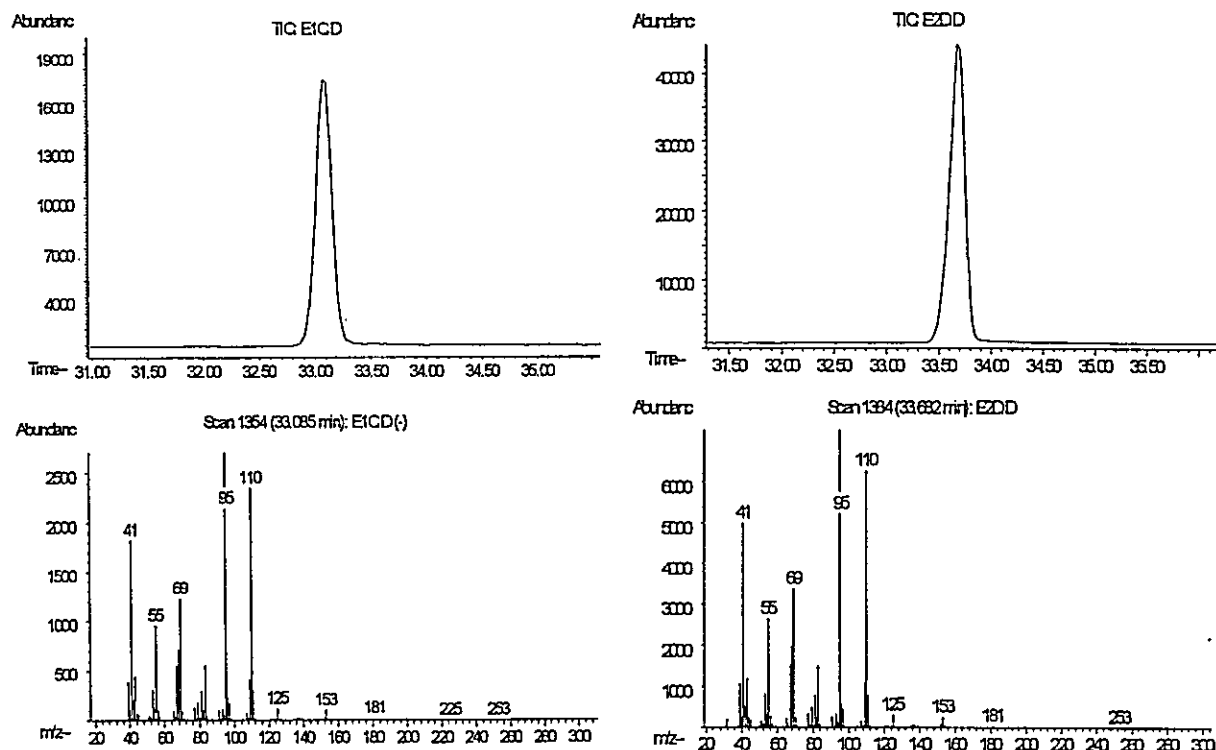


Figura 7. Espectros de masas de los (S)-canfanatos de los enantiómeros del 6-metil-5-hepten-2-ol

*Obtención de los enantiómeros del (±)-6-metil-5-hepten-2-ol.* Los ésteres (90 mg de uno y 120 mg del otro) fueron disueltos en 10 ml de metanol. A esta solución se agregaron 90 y 120 mg de hidróxido de sodio, respectivamente. Las mezclas de reacción fueron calentadas a reflujo por una hora. Posteriormente se adicionaron 10 ml de agua destilada y estas mezclas fueron extraídas tres veces con cloroformo. Las fases orgánicas fueron secadas con sulfato de magnesio. La evaporación del solvente permitió la recuperación de 50 mg del (-)-6-metil-5-hepten-2-ol (94 %) con  $[\alpha]^{20} = -14,1$  (578 nm) y  $-13,9$  (589 nm) (c 0,01, metanol) y 65 mg del (+)-6-metil-5-hepten-2-ol (92 %) con  $[\alpha]^{20} = +15,3$  (578 nm) y  $+15,2$  (589 nm) (c 0,013, metanol). La identidad de los alcoholes fue comprobada por espectrometría de masas (Figura 8). Estos alcoholes enantioméricos han sido producidos por reducción asimétrica de la cetona respectiva con sistemas enzimáticos y por resolución enzimática (Belan y col., 1987), dando origen a rotaciones ópticas de  $[\alpha]^{25}_D = -14,3$  (578 nm) (método de resolución; pureza óptica de 98%) y  $[\alpha]^{25}_D = +14,8$  y  $+15,3$  (578 nm) (reducción y resolución, respectivamente; pureza óptica >99% en ambos casos). Estos valores indican que los enantiómeros aislados en esta tesis tienen un exceso enantiomérico mayor que 97 y 99% para los isómeros (-) y (+), respectivamente.

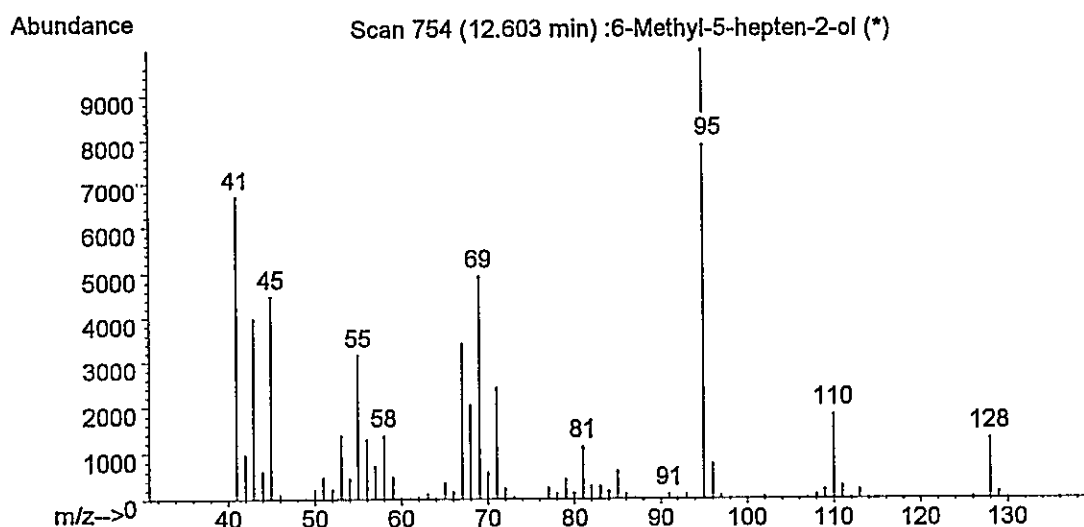


Figura 8. Espectro de masas del (+)-6-metil-5-hepten-2-ol

*Esterificación de mezcla de compuestos volátiles de trigo y cuantificación indirecta de los enantiómeros del (±)-6-metil-5-hepten-2-ol.* La mezcla original de compuestos volátiles de trigo fue esterificada con el objeto de determinar el o los enantiómeros del 6-metil-5-hepten-2-ol presentes en ella. Para ello se hizo reaccionar con agitación una solución de 100 ng de cloruro de (*S*)-(-)-canfanilo en 500  $\mu$ l de hexano con una solución de 250 ng de la mezcla original de compuestos volátiles de trigo con alta densidad de ácidos en 500  $\mu$ l de hexano. El progreso de la esterificación fue controlado cada 15 minutos por cromatografía en capa fina de gel de sílice, y cada 1 hora por medio de CG-EM. La desaparición del alcohol de partida fue completa al cabo de 3 horas de reacción. Posteriormente se determinó la composición relativa de ambos enantiómeros presentes en el extracto de volátiles por cromatografía de gases de los diastereómeros formados. Con el objeto de comprobar que el ácido liberado en la reacción de esterificación no condujera a productos secundarios, se comparó la reacción de esterificación de cada uno de los enantiómeros del 6-metil-5-hepten-2-ol con cloruro de (*S*)-(-)-canfanilo (0,78 nmoles de cada compuesto en hexano) en presencia y en ausencia del compuesto secuestrador de protones 4-dimetilaminopiridina (1 nmol), constatándose en ambos casos por CG-EM la presencia sólo de los ésteres respectivos.

## RESULTADOS

### Comunicación química entre *R. padi* y avena

Los resultados olfatométricos de la Tabla 1 muestran que los compuestos volátiles emitidos por hojas de avena producen una atracción hacia ya sea un alado o un áptero de *R. padi* colocado en la arena de observación. Además la tabla muestra un efecto de atracción de alados de *R. padi* hacia un alado de *R. padi*, y un efecto de repelencia entre ápteros de *R. padi* y un áptero de *R. padi*. Por otra parte no se observó interacción de alados hacia ápteros o de ápteros hacia alados, ya sea solos o sobre avena.

**Tabla 1:** Olfatometrías con hojas de avena, y con *R. padi* alados o ápteros, solos y sobre una hoja de avena.

Estímulos aplicados	Afido de prueba					
	<i>R. padi</i> alado			<i>R. padi</i> áptero		
	Promedio de visitas en cada brazo	n	p	Promedio de visitas en cada brazo	n	p
Hoja de avena	3,3	10	0,045	2,9	10	0,045
Blanco	2,1			1,8		
5 <i>R.p.</i> alados sobre hoja de avena	3,4	12	0,009	2,3	10	0,85
Hoja de avena	1,8			2,4		
5 <i>R.p.</i> alados	2,7	12	0,12	2,5	10	0,71
Blanco	2,1			2,2		
5 <i>R.p.</i> ápteros sobre hoja de avena	2,7	10	0,26	1,5	10	0,05
Hoja de avena	2,2			2,7		
5 <i>R.p.</i> ápteros	2,4	10	0,54	3,0	10	0,07
Blanco	2,2			2,1		

La tabla 2 muestra que una hoja de avena que ha sido previamente colonizada por áfidos tiene el mismo efecto que una hoja de avena fresca. Además se puede observar en la misma tabla que los ápteros que habían mostrado un efecto de repelencia hacia otro áptero cuando estaban sobre la hoja de avena, ahora muestran un efecto de atracción sobre un áptero de prueba.

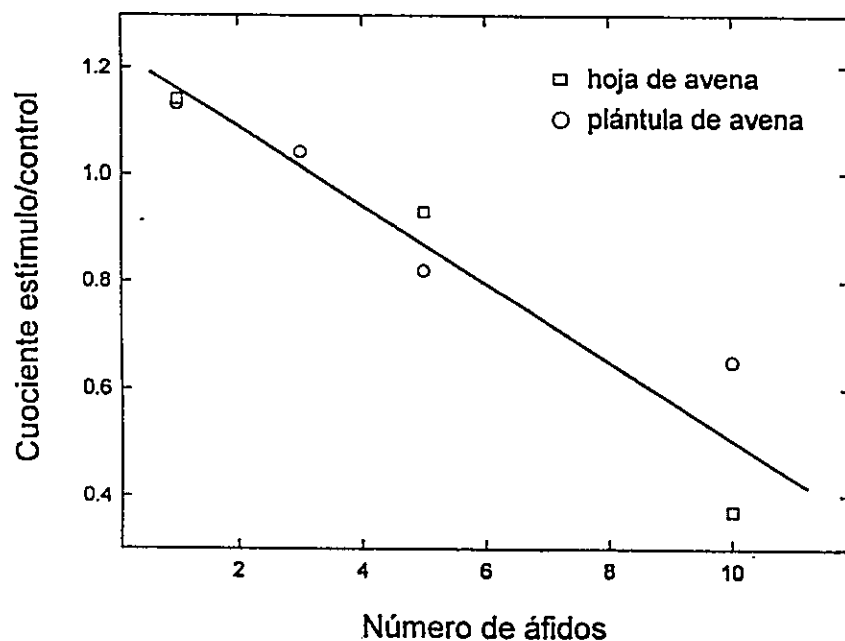
**Tabla 2.** Olfatometrías con hojas de avena con ápteros de *R. padi*, y luego con las hojas de avena y los áfidos por separado.

Estímulos aplicados	Promedio de visitas en cada brazo	n	p
10 <i>R.p.</i> ápteros sobre una hoja de avena (ca. 9 áfidos/cm <sup>2</sup> )	1,8	9	0,008
Hoja de avena	3,7		
Hoja de avena usada previamente	3,3	9	0,91
Hoja de avena fresca	3,2		
10 <i>R.p.</i> usados previamente	5,3	9	0,013
Blanco	2,6		

Por otra parte, la repelencia observada en la tabla 1, aumentó linealmente cuando un número creciente de ápteros sobre hojas de avena cortadas fueron usados como estímulo contra hojas de avena como controles (Figura 9). Se obtuvo el mismo efecto lineal al emplear plantas de avena no dañadas. Más aún, los puntos para ambos experimentos cayeron sobre la misma recta de correlación.

Con el objeto de verificar si el efecto de aumento lineal de la repelencia mostrado en la figura 9 estaba asociado simplemente al aumento en el número de áfidos o, alternativamente, al aumento de su densidad poblacional, se estudió la movilidad de áfidos en grupos de distinto tamaño en hojas de avena de dos tamaños distintos, originando así variabilidad tanto en número de individuos como en densidad poblacional de ellos. La repelencia fue medida como el número

promedio de áfidos moviéndose ya sea sobre la hoja o alrededor de ella. Como era esperable sobre la base de los resultados de la figura 9, en ambas hojas se observó una dependencia lineal con el número de individuos (Figura 10). Sin embargo, al utilizar la densidad poblacional en el eje de las abscisas, los resultados con ambas hojas generaron un gráfico común (Figura 11). Este resultado permite postular que la movilidad de los áfidos es determinada por su densidad poblacional y que existe un umbral de densidad (ca. 5 áfidos/cm<sup>2</sup>) bajo el cual no se observa movilidad.



**Figura 9.** Efecto de grupos de diferente tamaño de ápteros de *R. padi* en una hoja de avena cortada (□) o en una plántula entera de avena (○), sobre la conducta de un áfido áptero de *R. padi* en un olfatómetro.  $r^2 = 0,92$ .



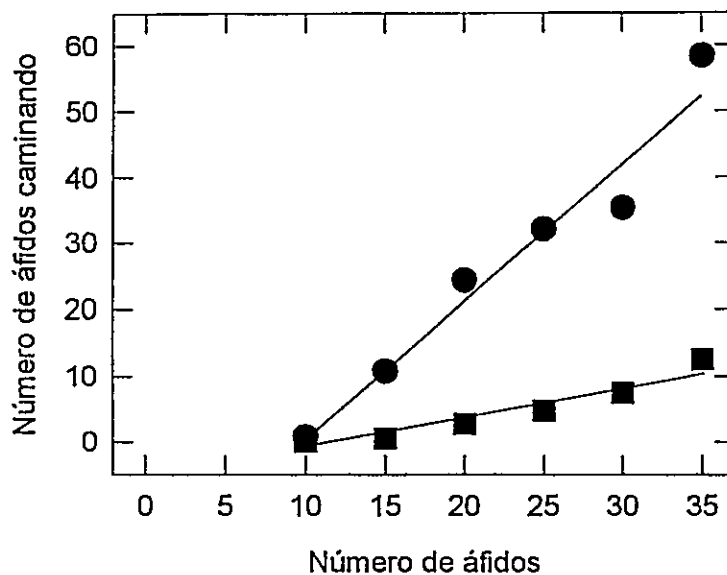


Figura 10. Movilidad de ápteros de *R. padi* en grupos de distinto tamaño sobre hojas cortadas de avena de dos tamaños, en función del número de áfidos en cada experimento. ● = superficie disponible en la planta = 2,3 cm<sup>2</sup>; ■ = superficie disponible en la planta = 4,6 cm<sup>2</sup>.

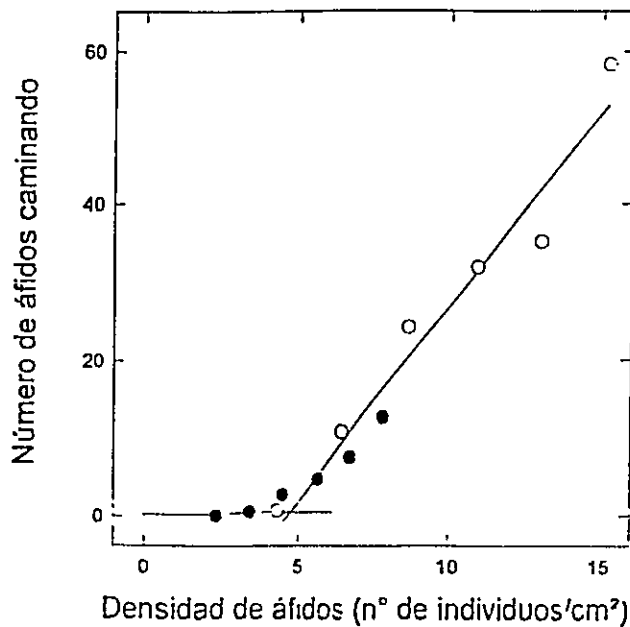


Figura 11. Movilidad de ápteros de *R. padi* en grupos de distinto tamaño sobre hojas cortadas de avena de dos tamaños, en función de la densidad poblacional de los áfidos en ambos experimentos. ○ = superficie disponible en la planta = 2,3 cm<sup>2</sup>; ● = superficie disponible en la planta = 4,6 cm<sup>2</sup>.

La posibilidad que las actividades olfatómicas mostradas anteriormente se deban a sustancias volátiles generadas a partir del daño ocasionado a las plántulas de avena, fue descartada por olfatometría. Los materiales volátiles utilizados como estímulo fueron extraídos directamente de sistemas vivos no dañados. Para ello, el aire dentro de un frasco campana en cuyo interior fueron colocados plantas con y sin áfidos, fue pasado directamente a través de uno de los brazos de un olfatómetro (Figura 12). En la tabla 3 se observa que se obtiene el mismo efecto de repelencia al usar como estímulo plántulas de avena intactas.

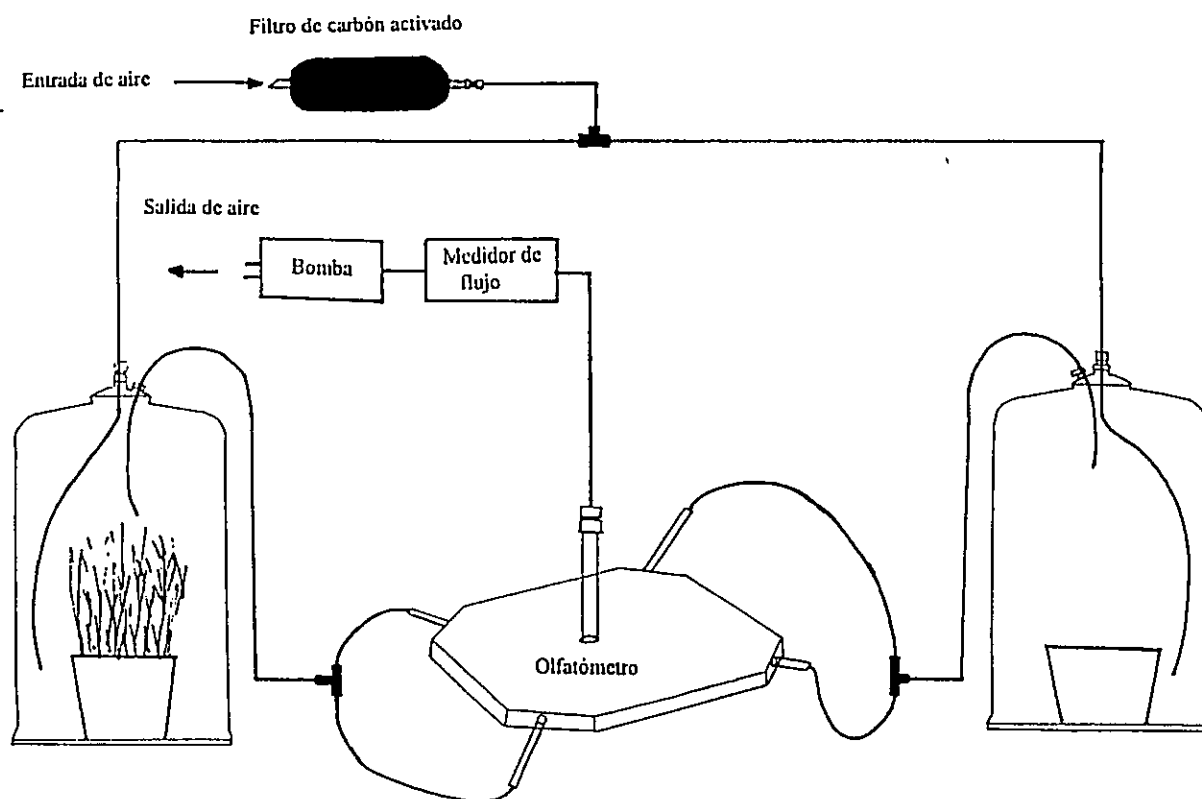


Figura 12. Olfatómetro conectado a frascos campana.

**Tabla 3.** Olfatometrías con plantas de avena enteras sin áfidos, y con bajo y alto número de ápteros de *R. padi*.

Estímulos aplicados	Promedio de visitas en cada brazo	n	p
Plantas de avena enteras	4,7	10	0,001
Blanco	2,3		
Plantas de avena enteras con un bajo número de ápteros de <i>R. padi</i> (ca. 1 áfido/cm <sup>2</sup> )	4,1	6	0,007
Plantas de avena enteras	2,0		
Plantas de avena enteras con un alto número de ápteros de <i>R. padi</i> (ca. 9 áfidos/cm <sup>2</sup> )	1,3	6	0,005
Plantas de avena enteras	3,6		

#### Actividad olfatométrica de extractos de compuestos volátiles de avena

Se atraparon compuestos volátiles provenientes de tres sistemas: a) plantas enteras de avena, b) plantas enteras de avena con una baja densidad de ápteros de *R. padi* (1 áfido/cm<sup>2</sup>) y c) plantas enteras de avena con una alta densidad de ápteros de *R. padi* (9 áfidos/cm<sup>2</sup>). Los extractos respectivos fueron usados como estímulo en ensayos olfatométricos. Los resultados (Tabla 4) muestran que los extractos recolectados mantienen la actividad de los sistemas vivos.

baja y alta densidad.

Estímulos aplicados	Tiempo promedio en cada zona (min)	n	p
Extracto de volátiles de plantas enteras de avena	3,9	10	0,024
Eter	3,1		
Extracto de volátiles de avena con una baja densidad de ápteros de <i>R. padi</i> (1 áfido/cm <sup>2</sup> )	4,0	10	0,036
Eter	3,2		
Extracto de volátiles de avena con una alta densidad de ápteros de <i>R. padi</i> (9 áfidos/cm <sup>2</sup> )	2,5	10	0,040
Eter	3,5		

#### Identificación de los componentes de los extractos de avena

En las figuras 13A, 13B y 13C se muestran los cromatogramas provenientes de la inyección de 1 µl de cada uno de los extractos de sustancias volátiles recolectados. Cada compuesto está identificado por un número, el que también aparece a la izquierda del nombre del compuesto en la tabla 5.

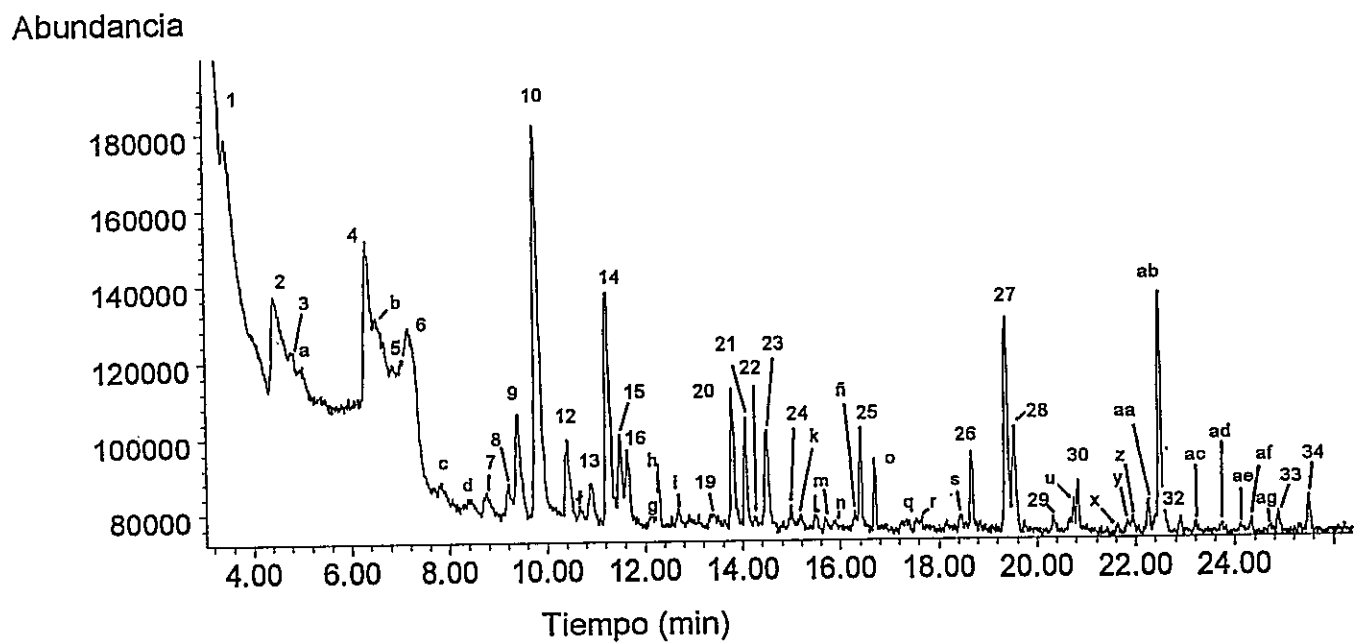
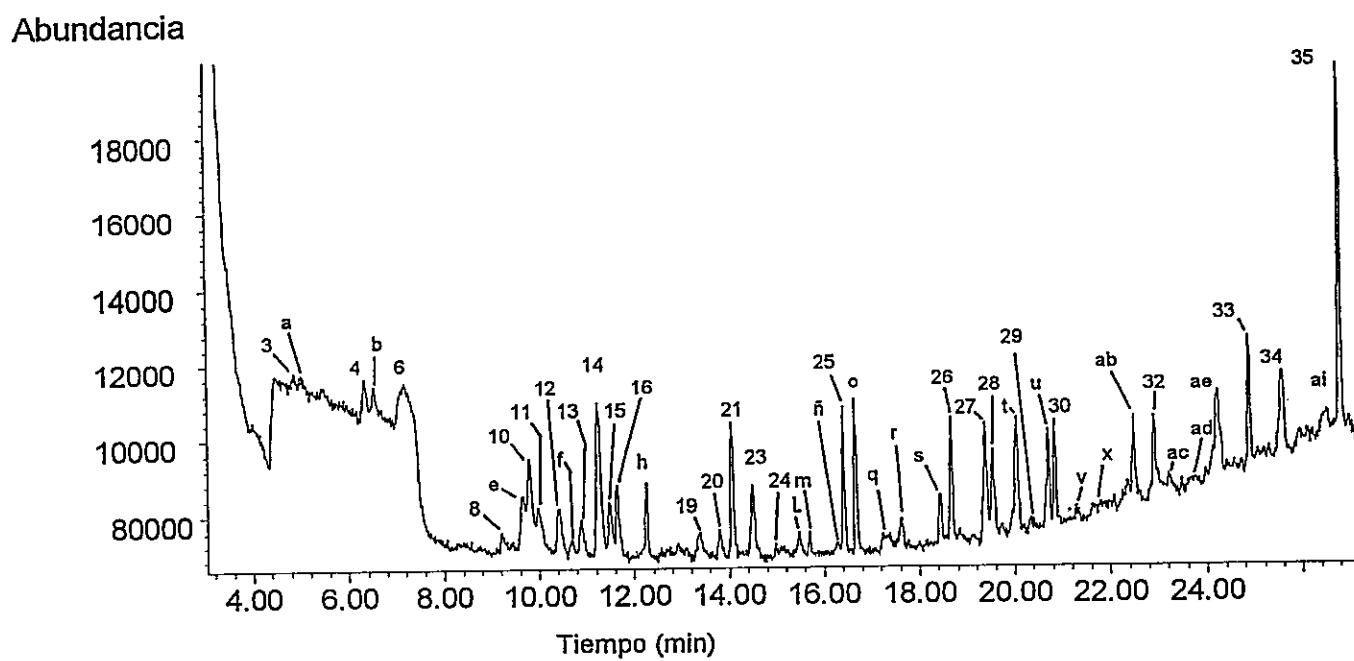
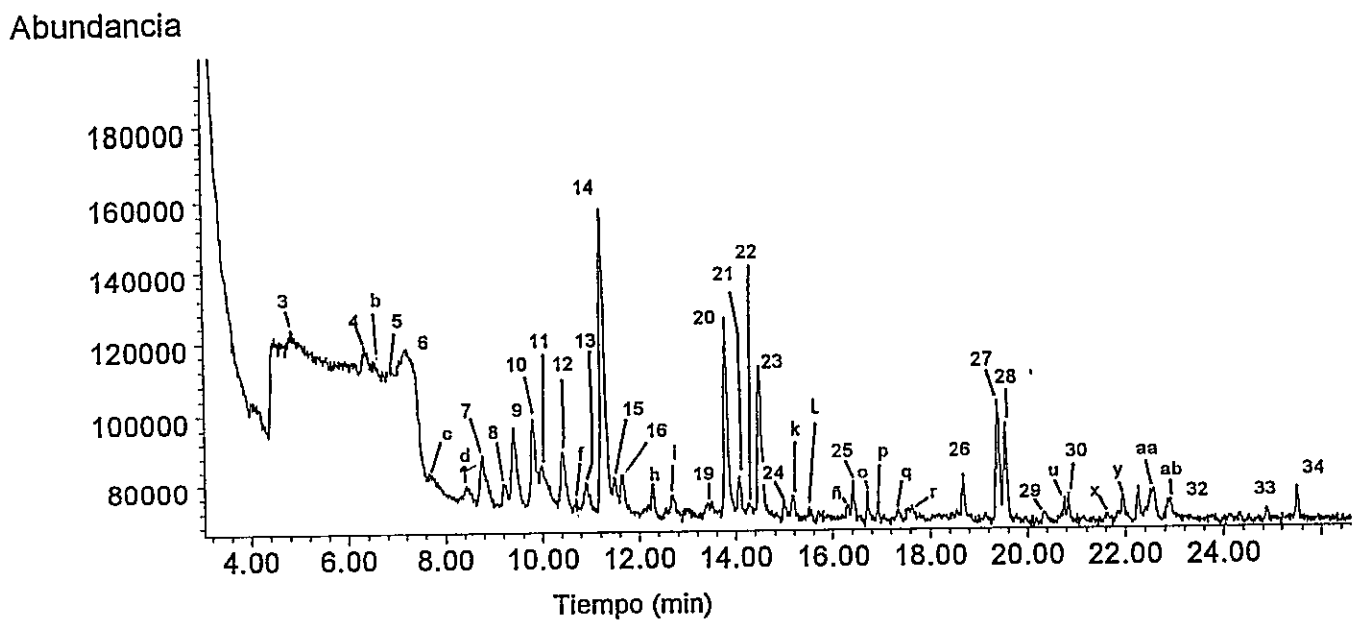


Figura 13 A. Cromatograma de gases (columna capilar polar CBP20) de un extracto de sustancias volátiles de avena (A)



**Figura 13 B.** Cromatograma de gases (columna capilar polar CBP20) de un extracto de sustancias volátiles de avena con una baja densidad de áfidos (ABD)



**Figura 13 C.** Cromatograma de gases (columna capilar polar CBP20) de un extracto de sustancias volátiles de avena con una alta densidad de áfidos (AAD)

Tabla 5. Compuestos identificados (y su tasa de producción en ng/día, promedio de tres determinaciones) en los extractos de sustancias volátiles recolectados de plantas de avena.

Pico	Compuesto	Indices de Kováts				Cantidad		
		CBP20		HP-1		(ng/día)		
		Extracto	Compuesto puro	Extracto	Compuesto puro	A	ABD	AAD
1	$\alpha$ -Pinoeno	1012	1008	941	942	n.c.	-	-
2	n-Hexanal	1071	1073	749	752	166,5	-	-
3	Undecano	1101	1100	1102	1100	n.c.	n.c.	n.c.
4	n-Heptanal	1172	1174	902	901	40,3	3,0	19,25
5	Dodecano	1200	1200	1201	1200	n.c.	-	n.c.
6	(Z)-2-Hexenal	1211	1213	808	809	75,0	8,87	35,0
7	n-Octanal	1279	1281	983	983	3,0	-	12,87
8	Tridecano	1301	1300	1302	1300	6,37	1,86	3,5
9	Acetato de (Z)-3-hexenilo	1306	1308	989	991	23,13	-	22,25
10	Acetato de (E)-2-hexenilo	1322	1324	995	996	81,63	12,75	7,0
11	6-Metil-5-hepten-2-ona	1330	1332	971	970	-	7,87	13,37
12	(E)-3-Hexen-1-ol	1351	1350	825	825	26,63	10,87	18,87
13	(Z)-3-Hexen-1-ol	1370	1370	831	832	11,13	6,37	4,13
14	n-Nonanal	1383	1383	1081	1081	44,63	19,0	49,5
15	(E)-2-Hexen-1-ol	1391	1394	850	851	25,0	10,13	7,63
16	Tetradecano	1402	1400	1400	1400	21,25	10,25	4,25
19	Indeno	1468	1470	1020	1023	2,75	6,23	1,5
20	n-Decanal	1486	1488	1181	1182	17,87	2,0	22,0
21	Pentadecano	1503	1500	1502	1500	22,13	14,25	6,25
22	Alcanfor	1505	1507	1121	1122	3,13	-	3,38
23	Benzaldehído	1517	1518	940	941	21,87	10,87	31,63
24	Linalol	1538	1539	1083	1084	4,0	-	2,63
25	Hexadecano	1604	1600	1603	1600	16,87	13,37	4,5
26	Heptadecano	1701	1700	1700	1700	16,0	12,87	4,87
27	Naftaleno	1731	1732	1159	1159	36,75	14,0	18,5
28	4-Etilbenzaldehído	1739	1740	1147	1148	9,63	5,13	7,75



29	Salicilato de metilo	1778	1777	1167	1168	2,25	2,5	3,0
30	Octadecano	1802	1800	1802	1800	8,25	10,37	3,13
32	Nonadecano	1901	1900	1903	1900	4,0	10,75	2,5
33	Eicosano	2001	2000	2002	2000	4,87	18,12	1,75
34	Tetradecanoato de isopropilo	2031	2032	1798	1799	0,61	-	3,5
35	Eneicosano	2104	2100	2102	2100	4,87	45,63	2,13

### Identificación tentativa de los componentes minoritarios en los extractos de avena

Los compuestos señalados con letras en la figura 13 fueron identificados tentativamente por medio del análisis de fragmentación de sus espectros de masas y se detallan en la Tabla 6. Los respectivos análisis de fragmentación se muestran en el Apéndice I.

**Tabla 6.** Identificación tentativa de otros componentes minoritarios presentes en extractos de volátiles de plantas de avena (A), trigo (T), avena con una baja densidad de áfidos (ABD), trigo con una baja densidad de áfidos (TBD), avena con una alta densidad de áfidos (AAD) y trigo con una alta densidad de áfidos (TAD).

Pico	Nombre	Extracto					
		A	ABD	AAD	T	TBD	TAD
a	10-Metilundeceno	X	X				
b	3-Hexanol	X	X	X	X	X	X
c	Estireno	X		X	X		
d	2-Pentilfenol	X		X			
e	Ciclohexasiloxano *	X	X				
f	2-Metiltridecano		X	X	X		
g	Ciclohexasiloxano *	X					X
h	Ciclohexasiloxano *	X	X	X	X	X	
i	8-Metil-1-trideceno	X		X			
j	3,7-Dimetil-1-octen-3-ol	X			X	X	X
k	7-Metil-1-tetradeceno			X			

l	5-Metil-1-tetradeceno	X	X	X	X		
m	3,4-Dimetiltetradecano	X	X		X		
n	Alcano insaturado	X			X		
ñ	Octanonitrilo	X	X	X			
o	Ciclohexasiloxano *	X		X	X	X	X
p	(4-Fenil- <i>n</i> -butil)metiléter	X		X			
q	Hidrocarburo ramificado		X	X			
r	Acetofenona	X	X	X			
s	3,11-Dimetiltetradeceno	X	X				
t	Ciclohexasiloxano *	X	X				
u	Ciclohexasiloxano *		X	X	X	X	X
v	1-Fenil-4,5-dimetilhexano	X	X				
x	1-Fenil-3,7-dimetilnonano		X	X	X		
y	2-Metilnaftaleno	X		X			
z	6,10-Dimetil-5,9-undecadien-2-ona	X					
aa	2-metil-propanoato de 7-octenilo **	X	X	X			
ab	Butanoato de 2-metil-7-octenilo **	X	X	X	X		
ac	Compuesto no identificable	X	X				
ad	Naftaleno dimetilado	X	X				
ae	Ciclohexasiloxano *	X	X				
af	Ciclohexasiloxano *	X			X	X	X
ag	Bifenilo	X					
ah	2-Metil-15-hexadecen-8-ona		X		X		
ai	Ftalato de dibutilo **		X			X	

\* Compuesto originado por sangramiento de la columna.

\*\* Compuesto presente en el solvente utilizado.

### Comunicación química entre *R. padi* y trigo

También fue investigada la interacción a través de olores entre ápteros de *R. padi* y otro de sus hospederos de verano, el trigo. La tabla 7 muestra que los volátiles de trigo producen un efecto similar al de los volátiles de avena.

**Tabla 7.** Olfatometrías con plantas de trigo enteras sin áfidos, y con áfidos a baja y alta densidad poblacional.

Estímulos aplicados	Tiempo promedio en cada zona (min)	n	p
Plantas de trigo enteras	4,3	6	0,007
Blanco	2,5		
Plantas de trigo enteras con una baja densidad de ápteros de <i>R. padi</i> (1 áfido/cm <sup>2</sup> )	4,7	6	0,001
Plántulas de trigo enteras	2,04		
Plántulas de trigo enteras con una alta densidad de ápteros de <i>R. padi</i> (6 áfidos/cm <sup>2</sup> )	1,85	6	0,037
Plántulas de trigo enteras	3,4		

### Actividad olfatométrica de extractos de volátiles de trigo

Se atraparon compuestos volátiles provenientes de tres sistemas: a) plantas enteras de trigo, b) plantas enteras de trigo con una baja densidad de ápteros de *R. padi* (1 áfido/cm<sup>2</sup>), y c) plantas enteras de trigo con una alta densidad de ápteros de *R. padi* (9 áfidos/cm<sup>2</sup>). Los extractos respectivos fueron usados como estímulos en ensayos olfatométricos. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Olfatometrías con extractos de volátiles de trigo sin áfidos, y con áfidos a baja y alta densidad

Estímulos aplicados	Tiempo promedio en cada zona (min)	n	p
Compuestos volátiles de trigo	5,0	6	0,0043
Eter	2,2		
Extracto de compuestos volátiles de trigo con una baja densidad de ápteros de <i>R. padi</i> (1 áfido/cm <sup>2</sup> )	5,3	6	0,017
Eter	1,9		
Extracto de compuestos volátiles de trigo con una alta densidad de ápteros de <i>R. padi</i> (6 áfidos/cm <sup>2</sup> )	1,6	6	0,023
Eter	3,2		

#### Identificación de los componentes de los extractos de trigo

En la figura 14 se muestran los cromatogramas provenientes de la inyección de 1 µl de cada uno de los extractos de volátiles colectados. Cada compuesto está identificado por un número, el que también aparece a la izquierda del nombre del compuesto en la tabla 9. Cada uno de los compuestos identificados fue cuantificado por intrapolación desde curvas de calibración obtenidas con los compuestos puros. Los resultados se expresan en ng de compuestos producidos por el sistema biológico en cuestión durante el lapso de 1 día.

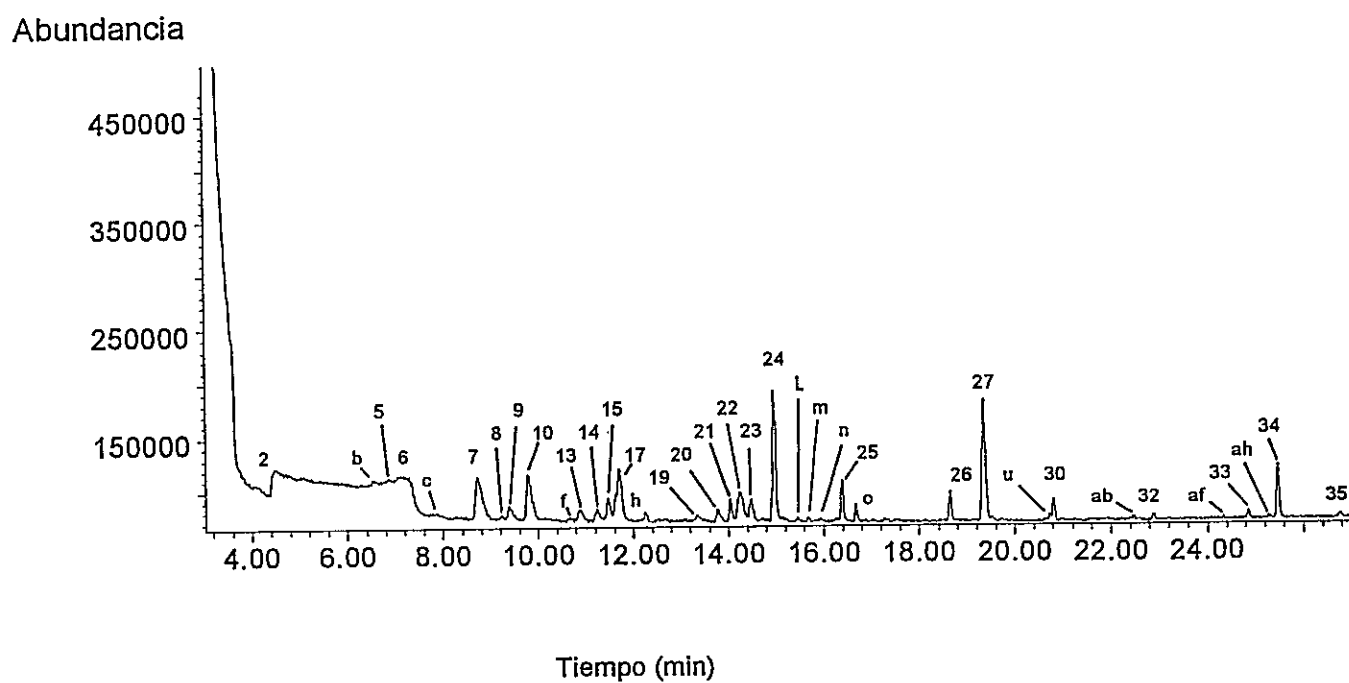
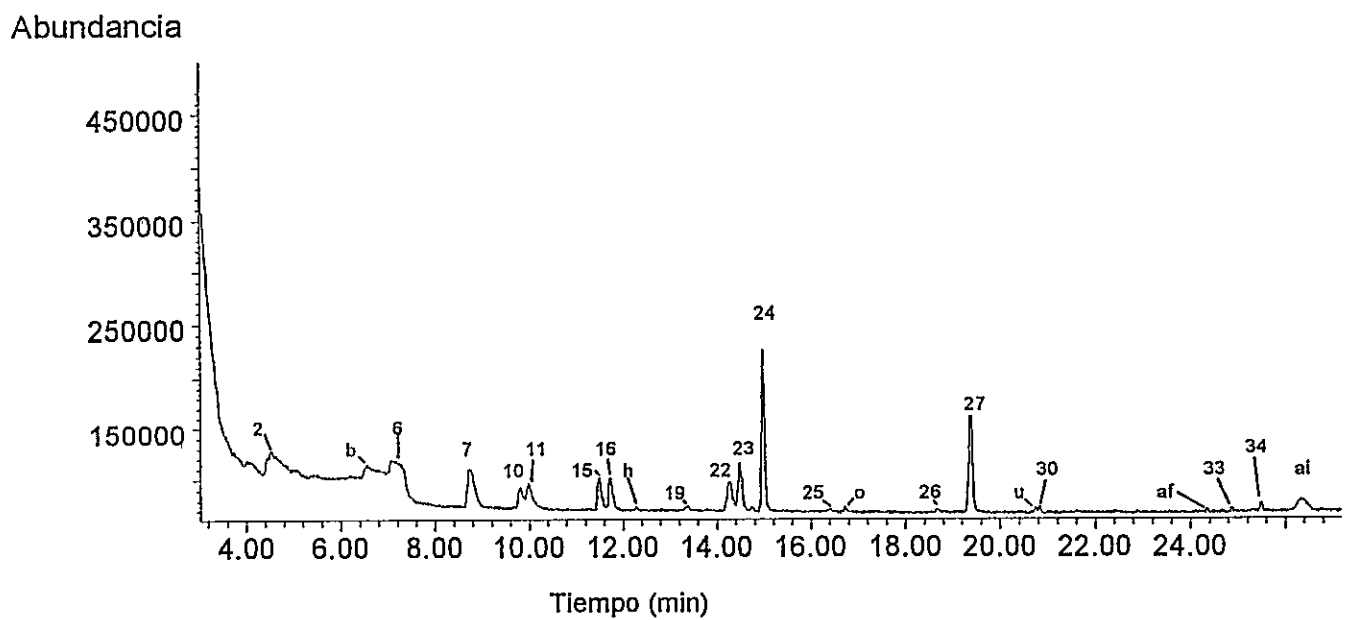
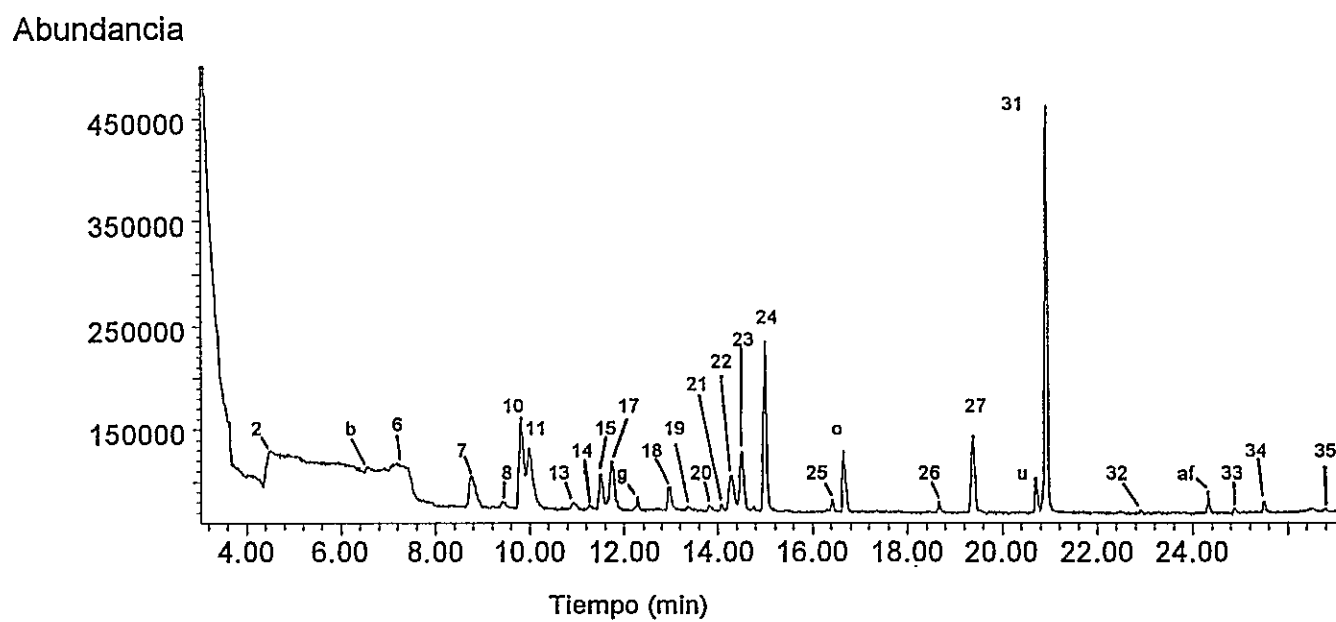


Figura 14A. Cromatogramas de gases (columna capilar polar CBP20) de un extracto de sustancias volátiles de trigo (T)



**Figura 14B.** Cromatogramas de gases (columna capilar polar CBP20) de un extracto de sustancias volátiles de trigo con una baja densidad de áfidos (TBD)



**Figura 14C.** Cromatogramas de gases (columna capilar polar CPB20) de un extracto de sustancias volátiles de trigo con una alta densidad de áfidos (TAD)

Tabla 9. Compuestos identificados (y su tasa de producción en ng/día, promedio de tres determinaciones) en los extractos de volátiles colectados de plantas de trigo.

Pico	Compuesto	Indices de Kovats				Cantidad		
		CBP20		HP-1		(ng/día)		
		Extracto	Compuesto puro	Extracto	Compuesto puro	T	TBD	TAD
2	n-Hexanal	1074	1073	773	752	60,13	13,75	29,75
5	Dodecano	1202	1200	1201	1200	33,75	-	-
6	(E)-2-Hexenal	1214	1213	809	810	32,13	4,0	30,25
7	n-Octanal	1280	1281	982	984	34,63	28,38	29,25
8	Tridecano	1303	1300	1302	1300	1,75	-	-
9	Acetato de (Z)-3-hexenilo	1305	1308	988	989	7,25	-	3,87
10	Acetato de (E)-2-hexenilo	1323	1324	995	996	24,0	8,87	46,25
11	6-Metil-5-hepten-2-ona	1330	1331	970	970	-	8,87	44,63
13	(Z)-3-Hexen-1-ol	1371	1370	831	830	6,37	-	0,37
14	n-Nonanal	1382	1384	1081	1081	5,25	-	2,13
15	(E)-2-Hexen-1-ol	1393	1393	850	851	14,25	18,75	25,5
16	Tetradecano	1400	1400	1400	1400	-	14,38	-
17	(Z)-2-Hexen-1-ol	1401	1402	855	854	38,75	17,0	34,75
18	6-Metil-5-hepten-2-ol	1453	1454	981	980	-	-	11,37
19	Indeno	1472	1470	1025	1023	5,13	2,37	3,25
20	n-Decanal	1489	1488	1181	1182	4,5	-	1,75
21	Pentadecano	1502	1500	1501	1500	7,25	-	2,75
22	Alcanfor	1507	1507	1121	1122	9,37	7,87	1,75
23	Benzaldehído	1519	1517	940	941	13,37	22,63	35,0
24	Linalol	1536	1538	1083	1084	43,38	46,13	62,37
25	Hexadecano	1605	1600	1601	1600	11,87	1,85	4,5
26	Heptadecano	1702	1700	1700	1700	8,9	1,5	4,0
27	Naftaleno	1731	1731	1159	1160	52,13	39,13	37,5
30	Octadecano	1801	1800	1805	1800	5,63	1,63	-
31	2-Tridecanona	1804	1804	1474	1475	-	-	13,9
32	Nonadecano	1903	1900	1900	1900	1,75	-	0,81
33	Eicosano	2003	2000	2002	2000	2,65	1,25	1,75
34	Tetradecanoato de isopropilo	2035	2032	1798	1799	16,4	2,75	3,0
35	Eneicosano	2102	2100	2101	2100	2,87	-	1,63



## **Identificación tentativa de los componentes minoritarios en los extractos de trigo**

Los compuestos señalados con letras en la figura 14 fueron identificados tentativamente por medio del análisis de fragmentación de sus espectros de masas. La tabla 6 muestra los compuestos identificados. Los respectivos análisis de fragmentación se detallan en el Apéndice I.

### **Identificación de (+) y (-)-6metil-5-hepten-2-ol en el extracto de volátiles de trigo con una alta densidad de áfidos**

La metodología que se pensó en un comienzo para determinar el o los enantiómeros del 6-metil-5-hepten-2-ol presentes en el extracto de volátiles de trigo con una alta densidad de áfidos, se basaba en : i) síntesis de los dos enantiómeros, ii) separación analítica de los enantiómeros por cromatografía gaseosa en una columna capilar quiral, y iii) análisis de los extractos de trigo infestados con alta densidad de áfidos por cromatografía de gases en dicha columna quiral. Se estudiaron las separaciones con una columna recomendada para estos fines, de 30 m de largo y de 0,25 mm de d.i. y de 0,25  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula (alfa-DEX 120, SUPELCO). Sin embargo, a pesar de exhaustivas variaciones de programas de temperatura de la columna, flujo y presión de gas portador, esta columna no logró resolver la mezcla racémica del alcohol.

En vista de estos resultados, se adoptó una estrategia alternativa, que consistió en i) obtención de los enantiómeros por resolución de la mezcla racémica con un reactivo quiral, ii) separación de los diastereómeros formados por cromatografía de líquidos preparativa y iii) hidrólisis básica para generar los alcoholes enantioméricos, cuyas rotaciones específicas fueron determinadas. Por medio de la esterificación de la mezcla de sustancias volátiles provenientes de trigo infestado con alta densidad de áfidos y posterior análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometrías de masas, se determinó que dicha mezcla contenía (-) y (+)-6-metil-5-hepten-2-ol en una relación de 3:1. En esta tesis se utilizó como reactivo quiral para resolver la mezcla de alcoholes enantioméricos el cloruro de (-)S-canfanilo.

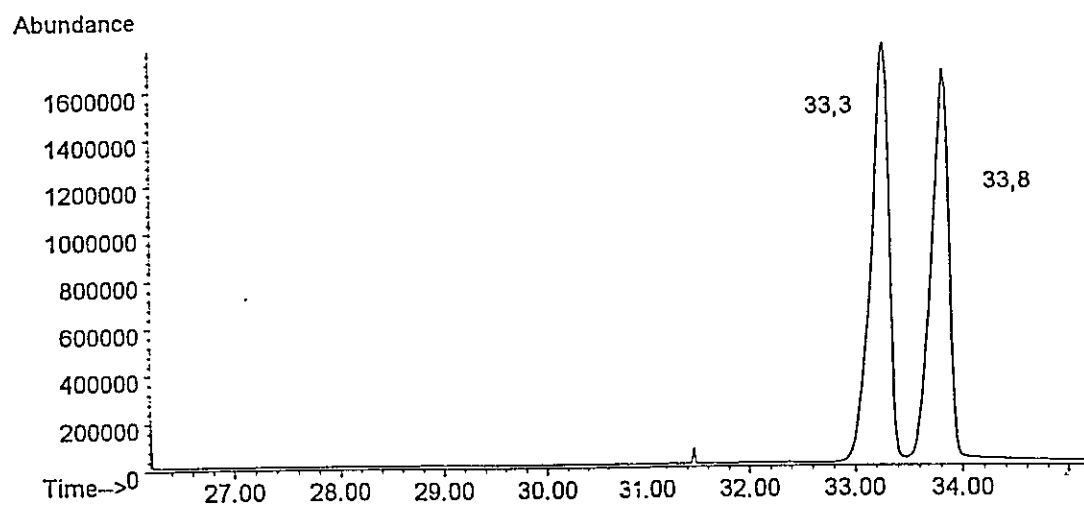


Figura 15. Corriente iónica total obtenida por impacto electrónico de los ésteres diastereoméricos de la mezcla racémica de ( $\pm$ )-6-metil-5-hepten-2-ol

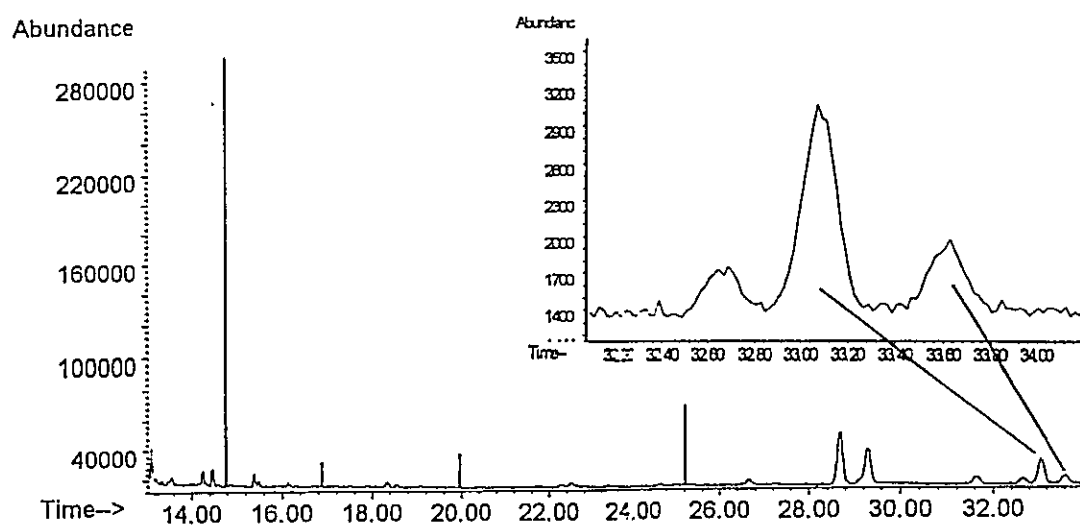


Figura 16. Corriente iónica total obtenida por impacto electrónico de un extracto de sustancias volátiles de trigo con una alta densidad de áfidos esterificados con el cloruro de (S)-(-)-canfanoilo

### Actividades olfatométricas de estándares de los compuestos presentes en extractos

Las actividades olfatométricas de los compuestos identificados fueron probadas usando olfatometría. Los compuestos fueron agrupados en 3 grupos: a) sustancias volátiles emitidas por hojas verdes de plantas ("green leaf volatiles") de avena o trigo; b) otras sustancias volátiles emitidas por avena o trigo; c) sustancias volátiles emitidas por avena o trigo infestadas con una alta densidad de áfidos. Se utilizaron 10 ng de cada uno de los compuestos en un papel de filtro como estímulo y el solvente en que el estímulo estaba disuelto como control. En el olfatómetro se puso un áptero de *R. padi* como individuo de prueba. Los datos se muestran en la Tabla 9.

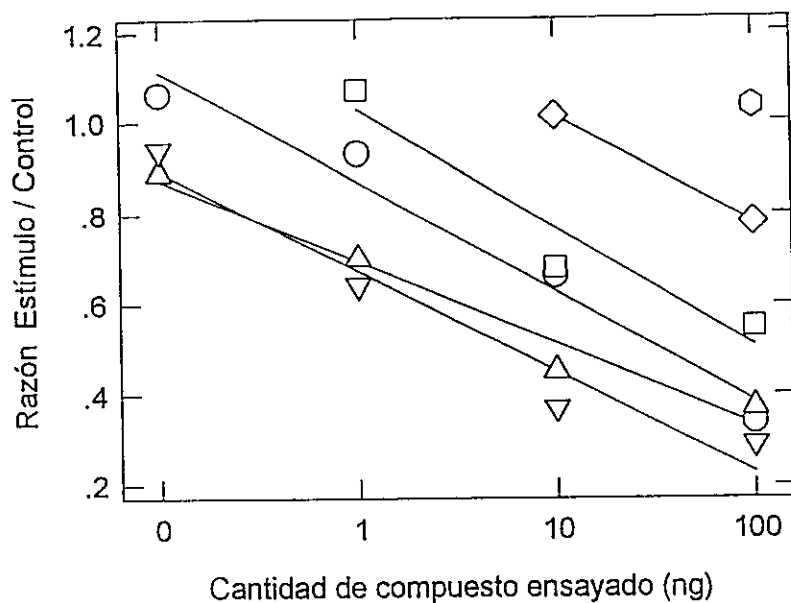
Tabla 10. Olfatometrías de volátiles de extractos de avena o trigo con o sin áfidos.

Origen	Pico	Compuesto	Razón entre promedios estímulo/control	n	p
<b>Hojas verdes de trigo o avena</b>					
	1	$\alpha$ -Pinoeno	0,99	10	0,463
	2	n-Hexanal	1,31	10	0,0035
	4	n-Heptanal	1,69	10	0,003
	6	(Z)-2-Hexenal	1,04	10	0,92
	9	Acetato de (Z)-3-hexenilo	2,00	6	0,04
	10	Acetato de (E)-2-hexenilo	2,54	6	0,035
	12	(E)-3-Hexen-1-ol	0,81	6	0,14
	13	(Z)-3-Hexen-1-ol	1,07	6	0,27
	15	(E)-2-Hexen-1-ol	1,58	6	0,025
	17	(Z)-2-Hexen-1-ol	1,68	6	0,023
<b>Otros componentes de trigo o avena</b>					
	3	Undecano	0,98	6	0,88
	5	Dodecano	0,94	6	0,68
	7	n-Octanal	1,54	6	0,031
	8	Tridecano	1,03	6	0,95
	14	n-Nonanal	1,75	6	0,025
	16	Tetradecano	1,04	6	0,18

	19	Indeno	1,1	6	0,11
	20	n-Decanal	1,41	6	0,027
	21	Pentadecano	1,04	6	0,9
	22	Alcanfor	0,85	6	0,25
	23	Benzaldehído	1,3	10	0,003
	24	Linalol	1,61	10	0,0004
	25	Hexadecano	0,9	6	0,95
	26	Heptadecano	1,03	6	0,85
	27	Naftaleno	1,06	6	0,13
	28	4-Etilbenzaldehído	1,02	6	0,46
	30	Octadecano	1,07	6	0,58
	32	Nonadecano	1,09	6	0,56
	33	Eicosano	1,03	6	0,75
	34	Tetradecanoato de isopropilo	0,99	6	0,9
	35	Eneicosano	1,05	6	0,65
<b>Trigo o avena con alta densidad de áfidos</b>					
	11	6-Metil-5-hepten-2-ona	0,66	10	0,0375
	18	(+)-6-Metil-5-hepten-2-ol	0,97	10	0,8
	18	(-)-6-Metil-5-hepten-2-ol	1,00	10	1,0
	18	(-) 6-Metil-5-hepten-2-ol + (+)-6-metil-5-hepten-2-ol (3:1)	0,37	10	0,0025
	29	Salicilato de metilo	0,45	10	0,0005
	31	2-Tridecanona	0,68	10	0,045

### Curvas dosis-respuesta para compuestos repelentes de áfidos

En el caso de los compuestos olfatoméricamente activos encontrados en avena o trigo infestado con una alta densidad de áfidos, se confeccionaron relaciones dosis-respuesta, como se muestra en la figura 17. Las concentraciones utilizadas cumplieron con dos criterios: i) que fueran iguales o menores que 100 ng, y ii) que no fueran menores que aquellas que generan una respuesta indiferente de los áfidos (razón estímulo/control = 1).



**Figura 17.** Relaciones dosis-respuesta para los compuestos repelentes de áfidos: 6-metil-5-hepten-2-ona (○), 2-tridecanona (□), (-)-6-metil-5-hepten-2-ol (▽), (+)-6-metil-5-hepten-2-ol (◁), (-)-6-metil-5-hepten-2-ol (▽) y (+)-6-metil-5-hepten-2-ol (3:1) (▽), y salicilato de metilo (Δ).

### Olfatometrías con combinación de compuestos repelentes

En el caso de los compuestos volátiles repelentes hacia ápteros de *R. padi*, se probaron también en el olfatómetro una combinación de los compuestos puros en la proporción que éstos se encuentran en la mezcla natural de sustancias volátiles. El resultado (Tabla 11) indica una actividad semejante a la de los extractos con una alta densidad de áfidos, induciendo a pensar que estas mezclas constituyen la totalidad de los compuestos activos en la mezcla natural.

**Tabla 11.** Olfatometrías con una mezcla de compuestos repelentes en proporciones semejantes a los extractos naturales

Estímulos aplicados	Promedio de visitas en cada brazo	n	p
20 ng de MHO :Salicilato de metilo en relación 6 :1	2,37	10	0,007
Hexano	3,95		
20 ng de extracto de sustancias volátiles de avena infestada con alta densidad de ápteros de <i>R. padi</i> (ca. 9 áfidos/cm <sup>2</sup> )	2,52	10	0,040
Hexano	3,54		
20 ng de MHO :MHOH :2-T en relación 3 :1 :10	2,11	10	0,005
Hexano	3,97		
20 ng de extracto de sustancias volátiles de trigo infestado con alta densidad de ápteros de <i>R. padi</i> (ca. 9 áfidos/cm <sup>2</sup> )	1,59	10	0,023
Hexano	3,16		

Abreviaciones utilizadas :

MHO : 6-metil-5-hepten-2-ona

MHOH : 6-metil-5-hepten-2-ol

2-T : 2-tridecanona

### Electroantenografías

Aunque la olfatometría es la técnica más apropiada para el estudio del efecto de compuestos químicos sobre el comportamiento de áfidos, en esta tesis se utilizó como técnica complementaria a la olfatometría, la electroantenografía. Estos estudios se hicieron en la Estación Experimental de Rothamsted, no pudiéndose realizar estudios más allá de los informados en esta tesis. Es así como la figura 18 muestra ejemplos de respuestas electroantenográficas de *R. padi* hacia la 6-metil-5-hepten-2-ona y la 2-tridecanona. El hecho que la concentración activa en electroantenografía fue más alta que en las olfatometrías puede atribuirse a daños provocados en los receptores olfativos, responsables de la detección de los compuestos probados, durante la manipulación de la antena.

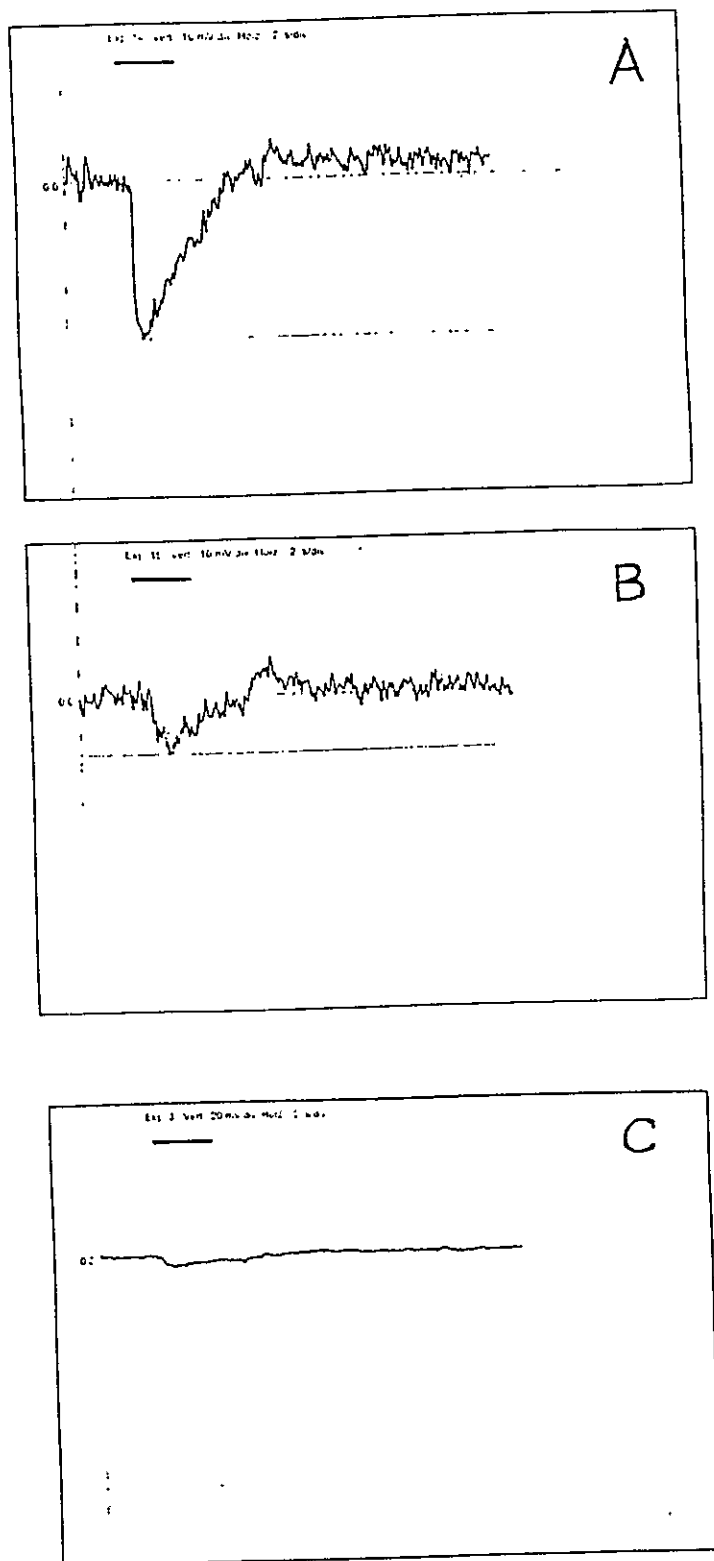


Figura 18. Electroantenografías obtenidas con ápteros de *R. padi* con los siguientes compuestos: 6-metil-5-hepten-2-ona (A), 2-tridecanona (B) y control (C).

## DISCUSION

Los resultados olfatométricos de la Tabla 1 muestran que los compuestos volátiles emitidos por hojas de avena producen un efecto de atracción hacia un alado de *R. padi* colocado en la arena de observación, en un comportamiento compatible con la migración de los alados hacia los cereales en primavera. Los ápteros de *R. padi* provocaron un efecto de repelencia hacia un áptero de *R. padi* (Tabla 1). Este efecto no puede ser interpretado en términos de la acción de una feromona de alarma, ya que no se observó repelencia cuando se probó el mismo número de áfidos sin hoja de avena (Tabla 2). La posibilidad que estas actividades olfatométricas se deban exclusivamente al daño ocasionado a las plántulas fue desechada debido a que la repelencia desaparece cuando se incluye como estímulo tan solo la planta previamente infestada por áfidos (Tabla 2). Los datos de la tabla 2 permiten concluir también que es la interacción entre planta y áfidos la que provoca los estímulos descritos. Finalmente, no se observó interacción entre alados y ápteros, ya sea solos o sobre avena (Tabla 1).

Los ápteros de *R. padi* atraen a otros ápteros cuando están presentes en pequeños números, pero repelen a otros ápteros cuando están presentes en números grandes (Tabla 3). La repelencia aumentó linealmente con el número de áfidos (Figura 9). Este resultado puede ser explicado de dos formas: i) los ápteros siempre producen un olor repelente. Desde este punto de vista, el estímulo total producido sería proporcional al número de áfidos que lo emiten, y sólo sobre un cierto umbral del número de áfidos, el estímulo sería percibido por el áfido de prueba; ii) los ápteros producen un olor repelente sólo cuando su densidad de población alcanza un cierto umbral. Con el objeto de distinguir entre estas posibilidades se realizó un experimento de movilidad de áfidos. La figura 11 muestra experimentos en los que se varía tanto el número de áfidos como el área de la planta donde ellos se distribuyen. Los resultados de la figura 11 avalan la segunda alternativa, ya que la variable densidad poblacional da cuenta de todos los resultados. La figura 11 muestra además la existencia de un umbral de densidad (ca. 4 áfidos/cm<sup>2</sup>) sobre el cual el movimiento de los áfidos se hace dependiente de la densidad.

Efectos similares de atracción y repelencia entre ápteros a distintas densidades poblacionales fueron obtenidos empleando como estímulos extractos de sustancias volátiles (comparar tablas 3 y 4), indicando que los estímulos que median estas interacciones se deben a compuestos volátiles que pueden ser recolectados desde el aire que rodea el material biológico según el montaje de la figura 2.



Por medio de cromatografía de gases acoplada a un detector de masas fue posible separar e identificar una serie de compuestos volátiles emitidos por plantas de cereales solas o con una baja o alta densidad de ápteros de *R. padi* sobre ellas, como lo indican las tablas 5, 6 y 8.

Estudios anteriores han informado sobre la existencia de compuestos volátiles en extractos de cereales (Hamilton-Kemp & Andersen, 1984 ; Buttery y col., 1982 , 1985). Estos estudios tienen dos limitaciones : i) los compuestos aislados pueden corresponder a compuestos que la planta no libere efectivamente al ambiente por encontrarse en algún compartimento al interior de la planta, y ii) los compuestos aislados pueden no existir en la planta intacta sino ser productos de alguna reacción enzimática que se produzca en el momento de dañar el tejido vegetal para producir el extracto. Al comparar estos estudios con los resultados presentados en las tablas 5, 6 y 9, se observa que existen elementos comunes : por ejemplo, el nonanal, el benzaldehído, el heptanal, el octanal, el (Z)-3-hexenol, el acetato de (Z)-3-hexenilo, la 6-metil-5-hepten-2-ona y el salicilato de metilo fueron descritos anteriormente en extractos de sustancias volátiles de hojas de avena (Buttery y col., 1982, Siri, 1993) y el nonanal, el acetato de (Z)-3-hexenilo y el linalol fueron identificados en extractos de hojas de trigo (Buttery y col., 1985).

Los compuestos descritos en las tablas 5, 6 y 9 pueden acomodarse en tres grupos (Tabla 10): i) sustancias volátiles comunes en hojas verdes de plantas ("green leaf volatiles") (Whitman y col., 1990) tales como el *n*-hexanal, el (Z)-2-hexenal, el (Z)-3-hexen-1-ol, el (E)-3-hexen-1-ol, el (E)-2-hexen-1-ol, el (Z)-2-hexen-1-ol, el (E)-2-hexen-1-ol, el acetato de (Z)-3-hexenilo y el acetato de (E)-2-hexenilo, considerados como productos del rompimiento oxidativo de los ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico (Hatanaka, 1993). Estos compuestos fueron encontrados entre los compuestos volátiles tanto de la avena como del trigo, y han sido descritos como los elementos principales que utilizan los insectos para orientarse olfativamente hacia las plantas, condición que fue verificada con los resultados de la tabla 10, que muestra que todos ellos resultaron atractivos hacia ápteros de *R. padi* ; ii) otros compuestos volátiles, que pueden estar presentes en avena o en trigo, y que resultaron ser mayoritariamente indiferentes en olfatometrías con ápteros de *R. padi* (Tabla 10) ; iii) compuestos que fueron identificados como responsables de la repelencia entre ápteros de *R. padi* a partir del análisis comparativo de los cromatogramas de gases de trigo y trigo infestado con áfidos. Estos últimos compuestos son la 6-metil-5-hepten-2-ona y el salicilato de metilo en el caso de la avena, y la 6-metil-5-hepten-2-ona, el 6-metil-5-hepten-2-ol y la 2-tridecanona, en el caso del trigo (Tabla 11).

La presencia de aldehídos y alcoholes de 6 átomos de carbono ha sido relacionada con daños o heridas inflingidas a la planta. Por otra parte, se ha involucrado algunos de estos compuestos, tales como el (*Z*)-3-hexen-1-ol y el (*E*)-2-hexen-1-ol, como agentes reductores de la fertilidad del áfido del tabaco *Myzus nicotianae* (Hildebrand y col., 1993).

La 6-metil-5-hepten-2-ona es un compuesto frecuente en insectos. Por ejemplo, ha sido informado como compuesto de defensa en las secreciones cefálicas de abejas (Davies y Madden, 1985; Hefetz y col., 1982; Tomalski y col., 1987; Wittmann y col., 1990) y secreciones glandulares de hormigas (Bernardi y col., 1967), como uno de los componentes de las secreciones de la glándula mandibular del hiperparásito de áfidos *Alloxysta brevis* (Völkl y col., 1994), y como feromona sexual y de espaciamiento del hiperparásito de áfidos *Alloxysta victrix* (Micha y col., 1993). En el presente estudio, la 6-metil-5-hepten-2-ona fue repelente hacia ápteros de *R. padi* en el olfatómetro y también fue activa en un electroantenógrafo hacia antenas de la misma especie de áfido (Figura 18).

El salicilato de metilo ha sido previamente detectado en extractos de compuestos volátiles de *Prunus padus*, el hospedero de invierno de *R. padi* en Escandinavia, y su actividad electroantenográfica ha sido informada previamente por Pettersson y col. (1994). El salicilato de metilo es también repelente hacia el áfido *Aphis fabae* e inhibidor del poder attractante de los compuestos volátiles emitidos por su hospedero *Vicia faba* (Hardie y col., 1994). La repelencia evidenciada en la figura 17 se añadiría a la alta actividad que ha manifestado este compuesto en diferentes especies de áfidos, especialmente la capacidad inhibitoria de los efectos atractantes de extractos de compuestos volátiles de plantas hospederas de *R. padi* y *Phrodus humuli* (Pettersson y col., 1994, Campbell y col., 1990).

El 6-metil-5-hepten-2-ol apareció sólo en las sustancias volátiles recolectadas desde trigo en presencia de una alta densidad de áfidos, lo que hizo suponer que se trataba de un compuesto repelente hacia áfidos. Sin embargo, los enantiómeros puros del 6-metil-5-hepten-2-ol no mostraron repelencia en el olfatómetro (Tabla 10). Se determinó posteriormente que la mezcla natural de compuestos volátiles de trigo con alta densidad de áfidos contenía los dos enantiómeros del 6-metil-5-hepten-2-ol en proporciones de aproximadamente 3 : 1 [isómero *R*(-) / isómero *S*(+)]. Ensayos olfatométricos mostraron que esta mezcla de enantiómeros es repelente hacia ápteros de *R. padi* (Tabla 10), confirmando nuestra suposición inicial. El 6-metil-5-hepten-2-ol ha sido descrito como feromona de agregación del escarabajo *Gnathotrichus sulcatus* (Byrne y col., 1974). En este caso, también se

observó sinergismo por los enantiómeros del 6-metil-5-hepten-2-ol, aunque en la relación 1 : 2 [isómero *R*(-) / isómero *S*(+)].

La 2-tridecanona ha sido descrita como un compuesto tóxico hacia el áfido *Aphis gossypii* (Williams y col., 1980).

Los resultados mostrados confirman la hipótesis planteada al comienzo de esta tesis, ya que demuestran la existencia de sustancias volátiles que provocan : i) atracción de áfidos hacia su planta hospedera, ii) atracción intraespecífica de áfidos cuando están agrupados en baja densidad sobre la planta hospedera, y iii) repulsión intraespecífica de áfidos cuando están agrupados en alta densidad sobre la planta hospedera.

Estos resultados podrían estar relacionados con una estrategia de manejo de recursos por parte de los áfidos. El estímulo agregativo afectaría la conducta de poblaciones de baja densidad de áfidos cuando el áfido ha aterrizado recientemente sobre la planta y podría necesitar modificar el sustrato con el objeto de alcanzar una alimentación sostenida (Miles, 1987), cuando el recurso no es una limitante, o cuando busca protección de los predadores (Arakaki, 1989). El estímulo repulsivo sería activo a altas densidades sobre la planta, cuando las ventajas de la agregación a corto plazo son sobrecompensadas por las posibilidades de un desarrollo más pobre debido a una sobreexplotación de los recursos. Los resultados confirman informes sobre las ventajas de colonias conespecíficas de áfidos (Way, 1973; Way y Cammell, 1970; Chongrattanmeteekul y col., 1991; Klingauf, 1987; Turchin y Kareiva, 1989).

La posesión de un mecanismo rápido de comunicación intraespecífica, que lleve el mensaje sobre calidad del sustrato de alimentación o su condición de recurso sobreexplotado, representa una considerable ventaja para un áfido que se acerca a un sitio para alimentarse, ya que la evaluación de una planta como un potencial hospedero a través de probar y comer requiere de varios minutos a horas (Givovich y Niemeyer, 1991; 1994). En consecuencia con este mecanismo, se ha informado que ápteros de *R. padi* ocuparon significativamente menos tiempo evaluando plántulas de trigo cuando ellos fueron colocados en un alto número que cuando fueron colocados individualmente sobre ellas (Chongrameteekul y col., 1991).

La dispersión de la colonia de áfidos ha sido atribuida a fenómenos climáticos o de calidad de sustrato de alimentación. También podría ser causada por el aumento de la población de áfidos (Lees, 1967; Dixon y Glen, 1971; Watt y Dixon, 1981; Ankersmith y Dijkman, 1983), provocada

a su vez por cambios en la calidad del sustrato (Harrewijn, 1978; Howard y Dixon, 1992). Sin embargo el tiempo que toma este proceso es varios órdenes de magnitud más largo que la respuesta de un áfido a estímulos volátiles. La capacidad de los áfidos ápteros de *R. padi* para reaccionar a un sobrecrecimiento poblacional antes de que prevalezcan condiciones de sustrato alimenticio pobre, es definitivamente de una significancia adaptativa positiva.

El hecho que los fenómenos de repelencia hayan sido demostrados en dos gramíneas diferentes conduce a pensar que la naturaleza de la fuente de alimentación no es determinante para el áfido en la elección o rechazo del hospedero.

El análisis químico comparativo de los extractos de componentes volátiles provenientes del hospedero solo, del hospedero con una baja densidad de áfidos y del hospedero con una alta densidad de áfidos, reveló la existencia de al menos cuatro compuestos que poseían una alta actividad repelente, capaces de contrarrestar la actividad atractora del hospedero. Estos compuestos presentan la potencialidad de ser utilizados en la protección de estos cultivos contra la colonización por áfidos. Cabe hacer notar que estos mecanismos de comunicación química demostrados bajo condiciones controladas en el laboratorio pueden en la naturaleza complementarse con otros tipos de comunicación mediadas por sentidos distintos al del olfato.

## BIBLIOGRAFIA

- Ankersmith, G.W. & Dijkman, H. (1983) Alatae production in the cereal aphid *Sitobion avenae*. **Netherlands Journal of Plant Pathology** 89 : 105-112.
- Arakaki, N. (1989) Alarm pheromone eliciting attack and escape responses in the sugar cane aphid, *Ceratoyacuna lanigera* (Homoptera, Pemphigidae). **Journal of Ethology** 7 : 83-90.
- Baeckström, P. (1996) Choice of gradients for minimizing adsorbent consumption in preparative liquid chromatography. En **Techniques in Plant-Insect Interactions and Biopesticides. Proceedings of an IFS Workshop**. International Foundation for Science (IFS), pp. 122-136.
- Belan, A., Bolte, J., Fauve, A., Gourcy, J.G. & Veschambre, H. (1987) Use of biological systems for the preparation of chiral molecules. 3. An application in pheromone synthesis : preparation of sulcatol enantiomers. **Journal of Organic Chemistry** 52 : 256-260.
- Bernardi, R., Cardani, C., Ghiringhelli, D. & Selva, A. (1967) On the components of secretion of mandibular glands of the ant *Lasius (Dendrolasius) fuliginosus*. **Tetrahedron Letters** 40 : 3893-3896.
- Blight, M. (1990) Techniques for isolation and characterization of volatile semiochemicals of phytophagous insects. En: **Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones**. A.R. McCaffery y I.D. Wilson (eds.) pp. 281-288. Plenum Press. New York & London.
- Bowers, W.S., Nault, L.R. Webb, R.E. & Dutky, S.R. (1972) Aphid alarm pheromones. **Science** 177: 1121-1122.
- Buttery, R.G., Ling, L.C. & Wellso, S.G. (1982) Oat leaf volatiles : possible insect attractants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 30 : 791-792.
- Buttery, R.G., Xu, C.-j & Ling, L.C. (1985) Volatile components of wheat leaves (and stems): possible insect attractant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 33: 115-117.
- Byrne, K.J., Swigar, A.A., Silverstein, R.M., Borden, J.H. & Stokkink, E. (1974) Sulcatol : Population aggregation pheromone in the scolytid beetle, *Gnathotrichus sulcatus*. **Journal of Insect Physiology** 20 : 1895-2000.
- Campbell, C.A.M., Dawson, G.W., Griffiths, D.C., Pettersson, J., Pickett, J.A., Wadhams, L.J. &

- Woodcock, C.M. (1990) Sex attractant pheromone of damson-hop aphid *Phorodon humuli* (Homoptera: Aphididae). **Journal of Chemical Ecology** 16: 3455-3465.
- Campbell, C.A.M., Pettersson, J., Pickett, J.A., Wadhams, L.J. & Woodcock, C.M. (1993) Spring migration of damson-hop aphid *Phorodon humuli* (Homoptera, Aphididae), and summer host plant-derived semiochemicals released on feeding. **Journal of Chemical Ecology** 19: 1569-1576.
- Chapman, R.F., Bernays, E.A. & Simpson, S.J. (1981) Attraction and repulsion of the aphid, *Cavariella aegopodii*, by plant odours. **Journal of Chemical Ecology** 7: 881-888.
- Chongrattanamateekul, W., Foster, J.E., Shukle, R.H. & Araya, J.E. (1991) Feeding behavior of *Rhopalosiphum padi* (L.) and *Sitobion avenae* (F.) (Hom., Aphididae) on wheat as affected by conspecific and interspecific interactions. **Journal of Applied Entomology** 111 : 361-364.
- David, C.T. & Hardie, J. (1988) The visual responses of free-flying summer and autumn forms of the black bean aphid, *Aphis fabae*, in an automated flight chamber. **Physiological Entomology** 13: 277-284.
- Davies, N.W. & Madden, J.L. (1985) Mandibular gland secretions of two parasitoid wasps (Hymenoptera : Ichneumonidae). **Journal of Chemical Ecology** 11 : 1115-1127.
- Dawson, G.W., Griffiths, D.C. Janes, N.F., Mudd, A., Pickett, J.A., Slawin, A.M.Z., Wadhams, L.J. & Williams, D.J. (1989) The aphid sex pheromone. **Pure and Applied Chemistry** 61: 555-558.
- Dawson, G.W., Griffiths, D.C. Janes, N.F., Mudd, A., Pickett, J.A., Wadhams, L.J. & Woodcock, C.M. (1987) Identification of an aphid sex pheromone. **Nature** 325: 614-616.
- Dawson, G.W., Griffiths, D.C. Janes, N.F., Mudd, A., Pickett, J.A., Wadhams, L.J. & Woodcock, C.M. (1990) Aphid semiochemicals- A review, and recent advances on the sex pheromone. **Journal of Chemical Ecology** 16: 3019-3030.
- Dawson, G.W., Griffiths, D.C., Merritt, L.A., Mudd, A., Pickett, J.A., Wadhams, L.J. & Woodcock, C.M. (1988) The sex pheromone of the greenbug, *Schizaphis graminum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 48: 91-93.
- Dixon, A.F.G. & Glen, D.M. (1971) Morph determination in the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* L.. **Annals of Applied Biology** 68 : 11-21.

- Edwards, L.J., Siddall, J.B., Dunham, L.L., Uden, P. & Rislow, C.J. (1973) Trans- $\beta$ -farnesene, alarm pheromone of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Nature* 241: 126-127.
- Gaskin, P., MacMillan, J., Firn, R.D. y Pryce, R.J. (1971) "Parafilm": A convenient source of n-alkane standards for the determination of gas chromatographic retention indices. *Phytochemistry* 10: 1155-1157.
- Givovich, A. & Niemeyer, H.M. (1991) Hydroxamic acids affecting barley yellow dwarf transmission by the aphid *Rhopalosiphum padi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 59 : 79-85.
- Givovich, A. & Niemeyer, H.M. (1994) Effect of hydroxamic acids on feeding behavior and performance of cereal aphids in wheat. *European Journal of Entomology* 91 : 371-374.
- Hamilton-Kemp, T.R. y Andersen, R.A. (1984) Volatile compounds from *Triticum aestivum*. *Phytochemistry* 23: 1176-1177.
- Hardie, J., Isaacs, R., Pickett, J.A., Wadhams, L.J. & Woodcock, C.M. (1994) Methyl salicylate and (-)-(1*R*,5*S*)-myrtenal are plant-derived repellents for black bean aphid, *Aphis fabae* Scop. (Homoptera:Aphididae). *Journal of Chemical Ecology* 20: 2847-2855.
- Harrewijn, P. (1978) The role of plant substances in polymorphism of the aphid *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 24 : 398-414.
- Hatanaka, A. (1993) The biogeneration of green odour by green leaves. *Phytochemistry* 34 : 1201-1218.
- Hefetz, A., Eickwort, G.C., Blum, M.S., Cane, J. & Bohart, G.E. (1982) A comparative study of the exocrine products of cleptoparasitic bees (*Holcopasites*) and their hosts (*Calliopsis*) (Hymenoptera : Anthophoridae, Andrenidae). *Journal of Chemical Ecology* 8 : 1389-1397.
- Hildebrand, D.F., Brown, G.C., Jackson, D.M. & Hamilton-Kemp, T.R. (1993) Effects of some leaf-emitted volatile compounds on aphid population increase. *Journal of Chemical Ecology* 19 : 1875-1887. .
- Howard, M.T. & Dixon, A.F.G. (1992) The effect of plant phenology on the induction of alatae and the development of populations of *Metopolophium dirhodum* (Walker), the rose-grain aphid, on winter wheat. *Annals of Applied Biology* 120 : 203-213.

- Isaacs, R., Hardie, J., Hick, A.J., Smart, L.E. & Wadhams, L.J. (1992) En: S.B.J. Menken, J.H. Visser & P. Harrewijn (eds.), **Proceedings of the 8th International Symposium Insect-Plant Relationships**. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. Pp.112-114.
- Klingauf, F.A. (1987) Host plant finding and acceptance. En: A.A. Minks y P. Harrewijn (eds.) **Aphids. Their Biology, Natural Enemies and Control**, Elsevier, Amsterdam, pp. 209-220.
- Kováts, E. (1958) Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1 : Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. **Helvetica Chimica Acta** 41: 1915-1932.
- Kring, J.B. & Kring, T.J. (1990) Aphid flight behaviour. En: D.C. Peters, J.A. Webster y C.S. Chlouber (eds.), **Aphid-Plant Interactions: Populations to Molecules**. USDA/Agricultural Research Service, Oklahoma State University, pp. 203-214.
- Lampe, D., Mills, S.J. & Potter, B.V. (1992) Total synthesis of the second messenger analogue *D-myo*-inositol 1-phosphorothioate 4,5-bisphosphate : optical resolution of DL-1-*O*-allyl-2,3,6-tri-*O*-benzyl-*myo*-inositol and fluorescent labelling of *myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate. **Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions I**, 2899-2906.
- Lees, A.D. (1967) The production of the apterous and alate forms in the aphid *Megoura viciae* Buckton, with special reference to the role of crowding. **Journal of Insect Physiology** 13 : 289-318.
- Micha, S.G., Stammel, J. & Höller, C. (1993) 6-methyl-5-hepten-2-one, a putative sex and spacing pheromone of the aphid hyperparasitoid, *Alloxysta victrix* (Hymenoptera, Alloxystidae). **European Journal of Entomology** 90 : 439-442.
- Miles, P.W. (1987) Feeding process of Aphidoidea in relation to effects on their food plants. En : A.K. Minks & P. Harrewijn (eds.), **Aphids : Their Biology, Natural Enemies and Control**, Vol. 2A, Elsevier, Amsterdam, pp. 321-339.
- Nault, L.R. & Bowers, W.S. (1974) Multiple alarm pheromones in aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 17: 455-457.
- Nottingham, S.F. & Hardie, J. (1993) Flight behaviour of the black bean aphid, *Aphis fabae*, and the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae*, in host and non-host plant odour.



**Physiological Entomology** 18: 389-394.

Pettersson, J. (1970a) An aphid sex attractant. **Entomologia Scandinavica** 1 : 63-73.

Pettersson, J. (1970b) Studies on *Rhopalosiphum padi* (L.). I. Laboratory studies of olfactometric responses to the winter host *Prunus padus* (L.). **Lantbrukshogskolan Annalen** 36: 381-399.

Pettersson, J. (1994) The bird-cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (L.) (Homoptera: Aphididae). En S.R. Leather, A. Wyatt, N.A.C. Kidd y K.F.A. Walters (eds.), **Individuals, Population and Patterns in Ecology**. Intercept Ltd., Andover, pp. 3-12.

Pettersson, J. & Stephansson D. (1991) Odour communication in two *Brassicaceae* feeding aphid species (Homoptera: Aphididae). **Entomologia Generalis** 16: 241-247.

Pettersson, J., Pickett, J.A., Pye, B.J., Quiroz, A., Smart, L.E., Wadhams, L.J. & Woodcock, C.M. (1994) Winter host component reduces colonization by bird-cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (L.) (Homoptera, Aphididae), and other aphids in cereal fields. **Journal of Chemical Ecology** 20: 2565-2574.

Pettersson, J., Quiroz, A., Stephansson, D & Niemeyer, H.M. (1995) Odour communication of *Rhopalosiphum padi* on grasses. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 76 : 325-328.

Siri, N. (1993) Analysis of host finding behaviour of two aphid hyperparasitoids (Hymenoptera: Alloxystidae, Megaspilidae). Disertación enviada a la facultad de Agricultura de la Universidad de Christian-Albrechts de Kiel de Kiel para obtener el grado de Doctor en Ciencias Agrarias.

Tomalski, M.D., Blum, M.S., Jones, T.H., Fales, H.M., Howard, D.F. & Passera, L. (1987) Chemistry and functions of exocrine secretions of the ants *Tapinoma megalocephalum* and *T. erraticum*. **Journal of Chemical Ecology** 13 : 253-263.

Turchin, P. & Kareiva, P. (1989) Aggregation in *Aphis varians* : An effective strategy for reducing predation risk. **Ecology** 70 : 1008-1016.

Van den Dool, H. & Kratz, P. D. (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography** 11: 463-471.

- van Giessen, W.A., Peterson, J.K. & Barnett, O.W. (1992) Electroantennogram responses of aphids to plant volatiles and alarm pheromone. En S.B.J. Menken, J.H. Visser & P. Harrewijn (eds.), **Proceedings of the 8th International Symposium in Insect-Plant Relationships**. Dordrecht, Kluwer Acad. Publ. Pp. 117-118..
- Völkl, W., Hübner, G. & Dettner, K. (1994) Interaction between *Alloxysta brevis* (Hymenoptera, Cynipoidea, Alloxystidae) and honeydew-collecting ants: How an aphid hyperparasitoid overcomes aggression by chemical defense. **Journal of Chemical Ecology** 20: 2901-2915.
- Watt, A.D. & Dixon, A.F.G. (1981) The role of cereal growth stages and crowding in the induction of alatae in *Sitobion avenae* and its consequences for population growth. **Ecological Entomology** 6 : 441-447.
- Way, M.J. (1973) Population structure in aphid colonies. En : H.J.B. Lowe (ed.), **Perspectives in Aphid Biology**. **Entomological Society of New Zealand Bulletin** 2, pp. 76-84.
- Way, M.J. & Cammell, M. (1970) Aggregation behaviour in relation to food utilization by aphids. En : A. Watson (ed.) **Animal Populations in Relation to Their Food Resources**. 10<sup>th</sup> **Symposium British Ecological Society**. Blackwell, Oxford, pp. 229-247.
- Whitman, D.W. & Eller, F.J. (1990) Parasitic wasps orient to green leaf volatiles. **Chemoecology** 1 : 69-75.
- Williams, W.G., Kennedy, G.G., Yamamoto, R.T., Thacker, J.D. & Bordner, J. (1980) 2-Tridecanone: A naturally occurring insecticide from the wild tomato *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum*. **Science** 207: 888-889.
- Wittmann, D., Radtke, R., Zeil, J., Lübke, G. & Francke, W. (1990) Robber bees (*Lestrimelitta limao*) and their host chemical and visual cues in nest defense by *Trigona (Trigona) augustula* (Apidea : Meliponinae). **Journal of Chemical Ecology** 16 : 631-641.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T. & Konzak, C.F. (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. **Weed Research** 14 : 15-21.

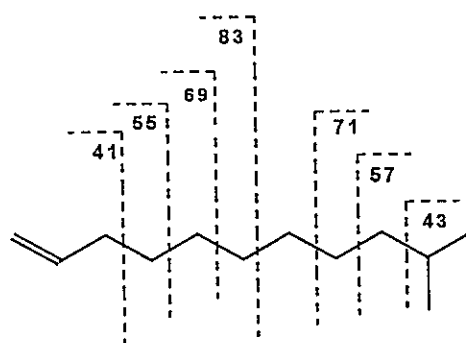
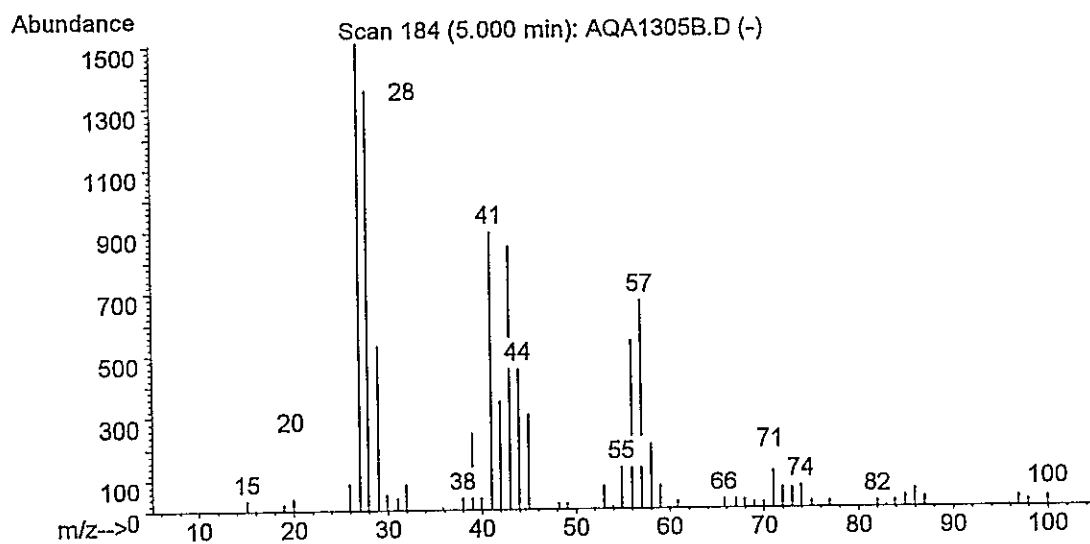
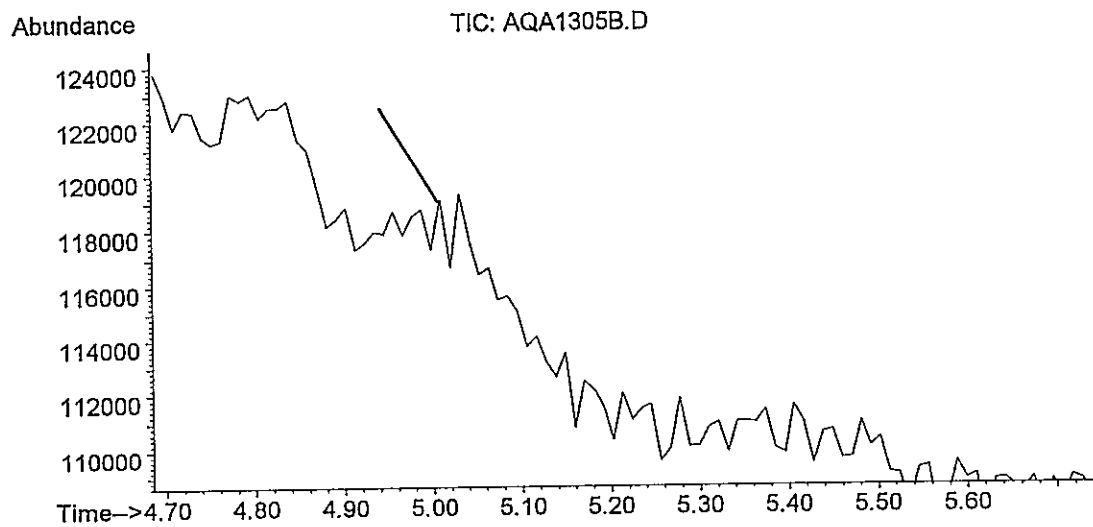
## APENDICE

En las páginas A-1 a la A-35 del apéndice se muestran : a) la zona del cromatograma de gases que fue estudiada por espectromería de masas ; b) el espectro de masas del máximo de la zona o, en los casos donde el máximo no está bien definido, un espectro promedio ; y c) una aproximación a la estructura en la mayor parte de los casos, basada principalmente en análisis de los fragmentos en el espectro y expectativas basadas en tiempos de retención en el cromatograma.

Los picos o zonas analizadas muestran señales que en muchos casos son difícilmente distinguibles del ruido o están cercanas a otros picos de intensidad semejante, y no corresponden entonces a compuestos puros. En consecuencia, la interpretación de estos espectros está sujeta a considerable error.

En las páginas A-36 a la A-42 del apéndice se muestra la metodología de asignación de estructuras a los espectros de masas obtenidos.

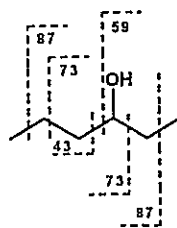
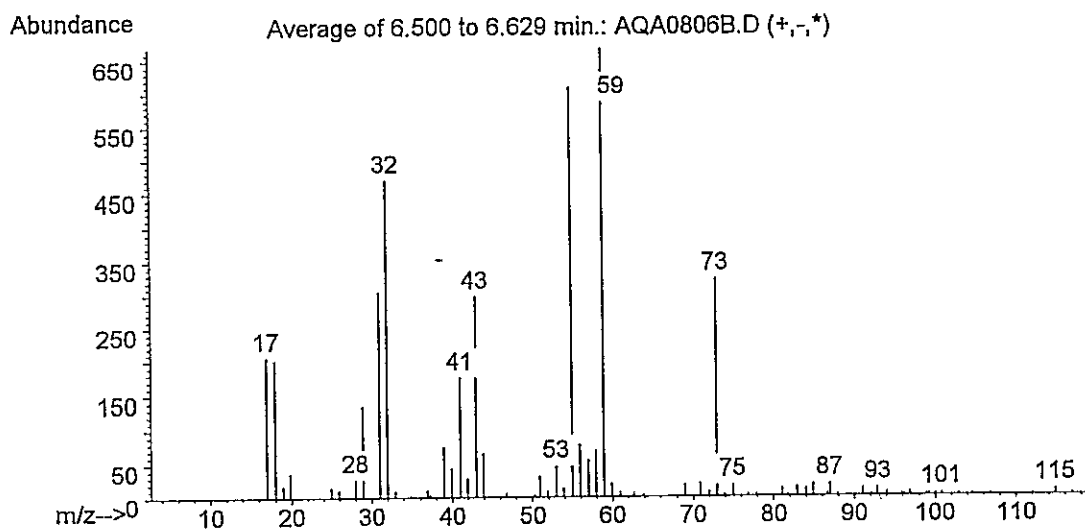
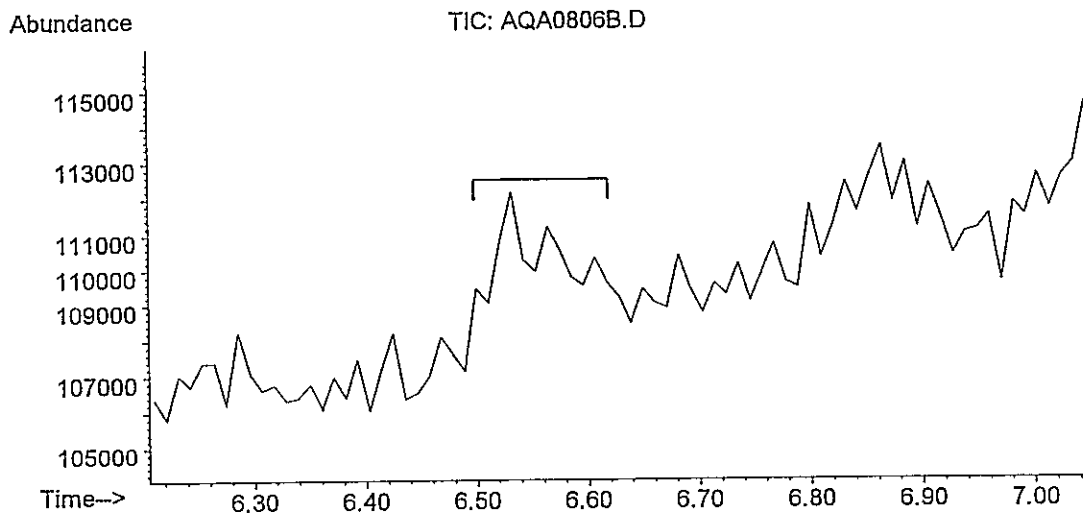
## Compuesto a



10-Metil-undeceno

Tiempo de retención supone hidrocarburo de entre 11 y 12 átomos de carbono.

# Compuesto b



3-Hexanol

Otros fragmentos:

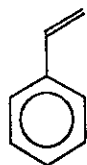
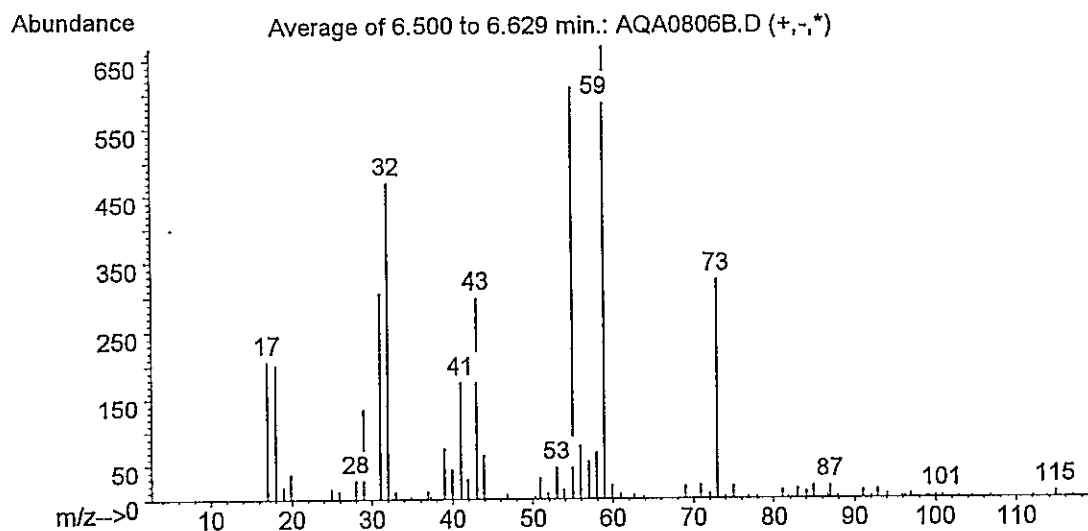
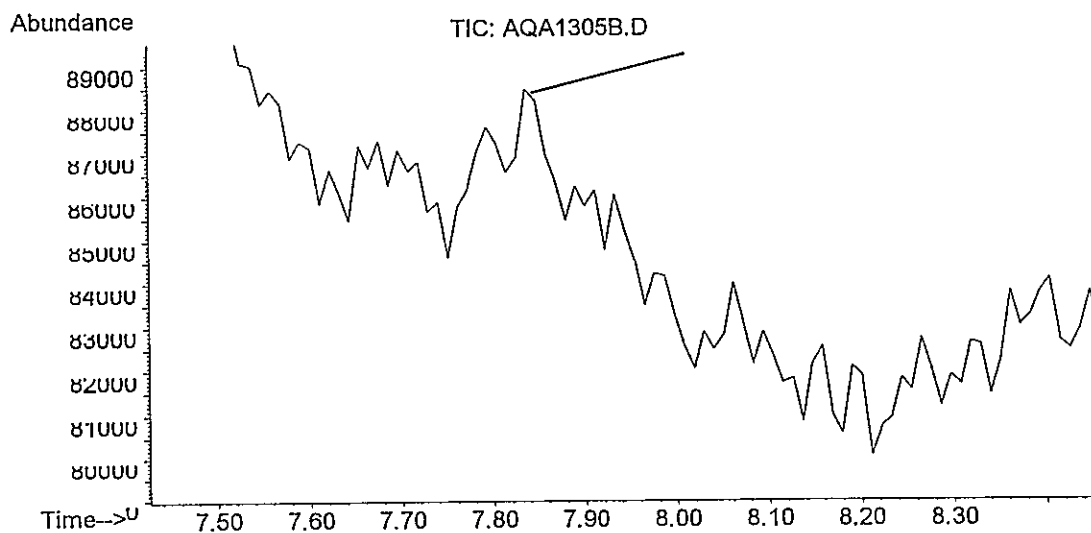
101:  $M^+ - H$

55:

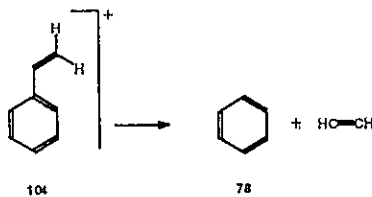


por pérdida de agua desde el ión 73

## Compuesto c

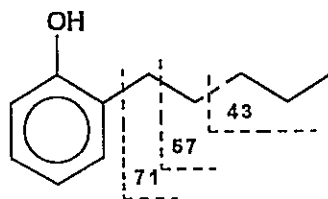
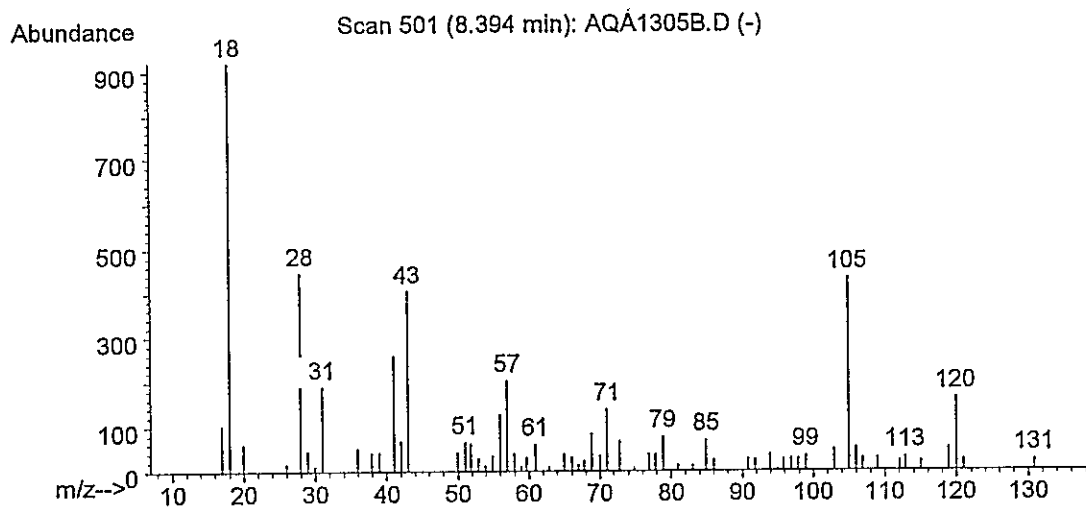
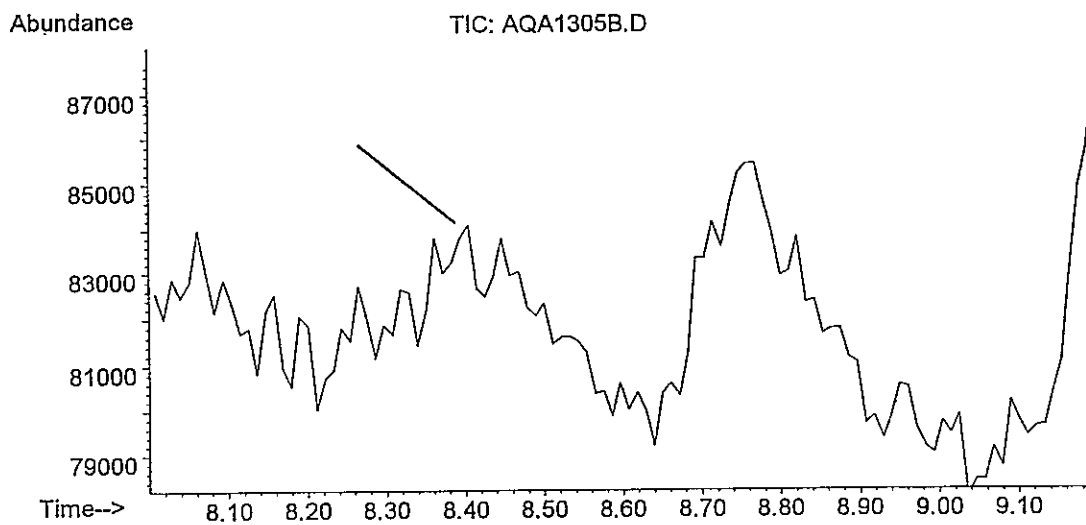


Estireno  $[M^+] = 104$  m/z



Otros fragmentos: 39,51 y 63 originados por el anillo aromático

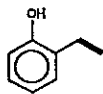
## Compuesto d



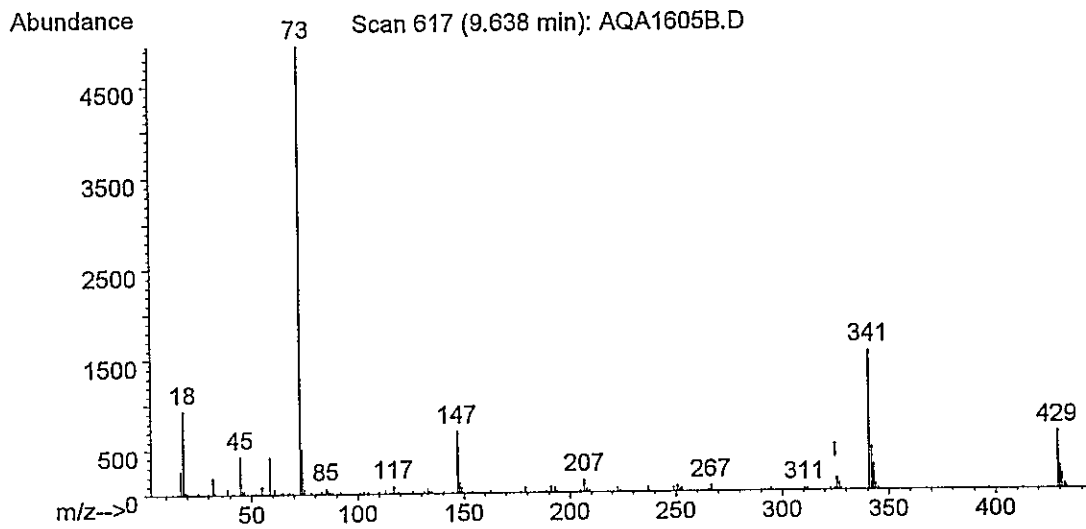
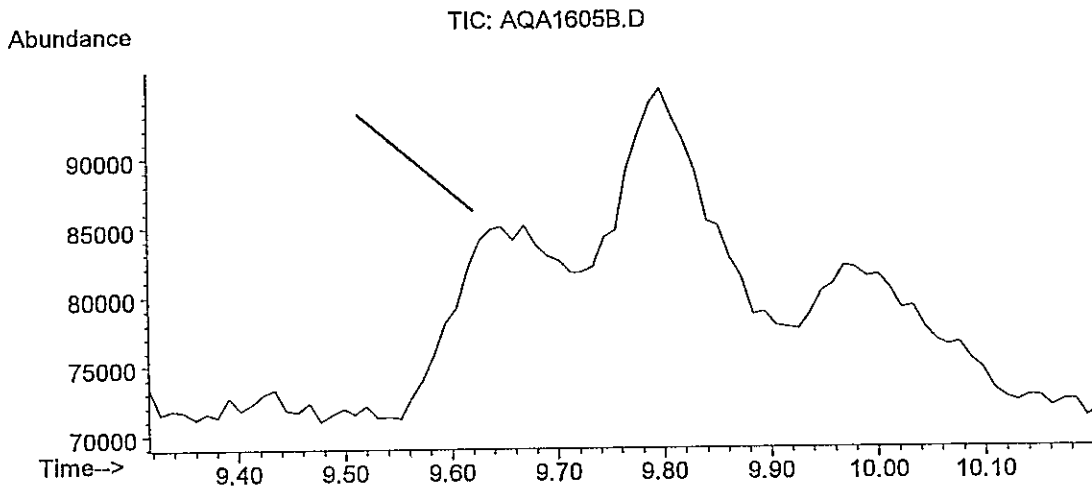
2-Pentil-fenol

Otros fragmentos:

120:



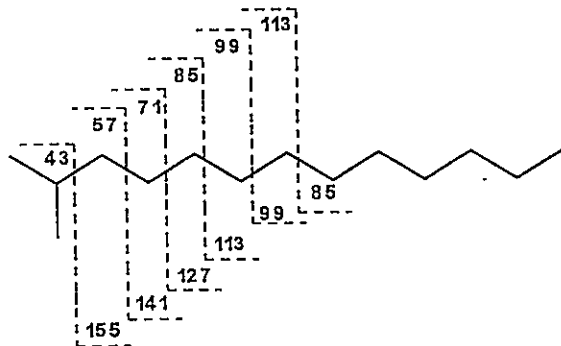
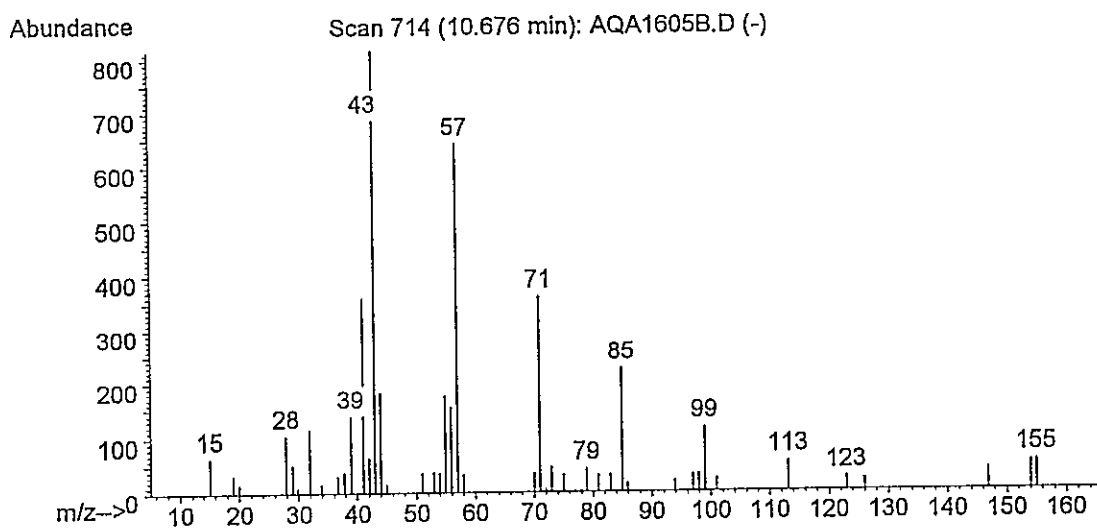
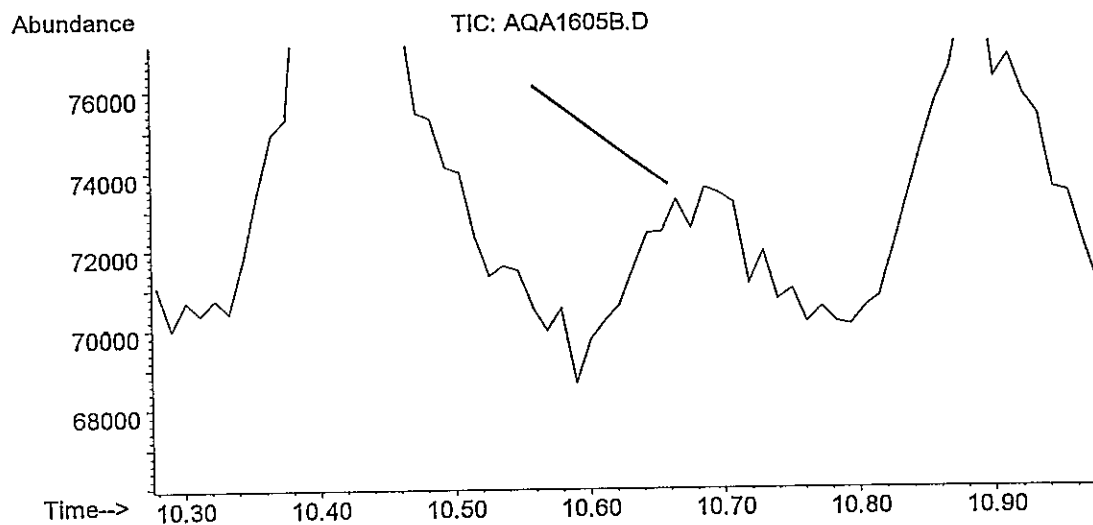
## Compuesto e



Este compuesto es identificado como una impureza producto del sangrado de la columna.

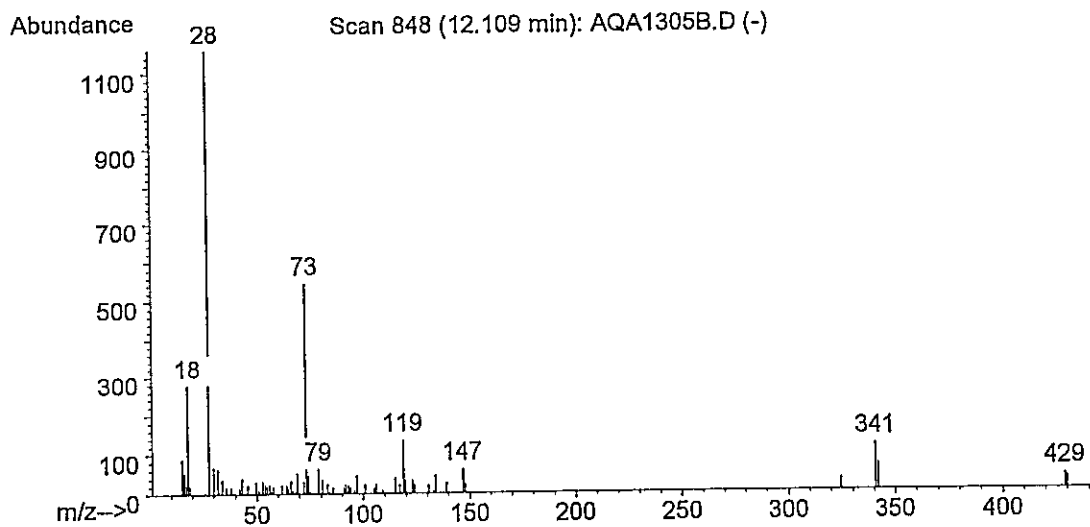
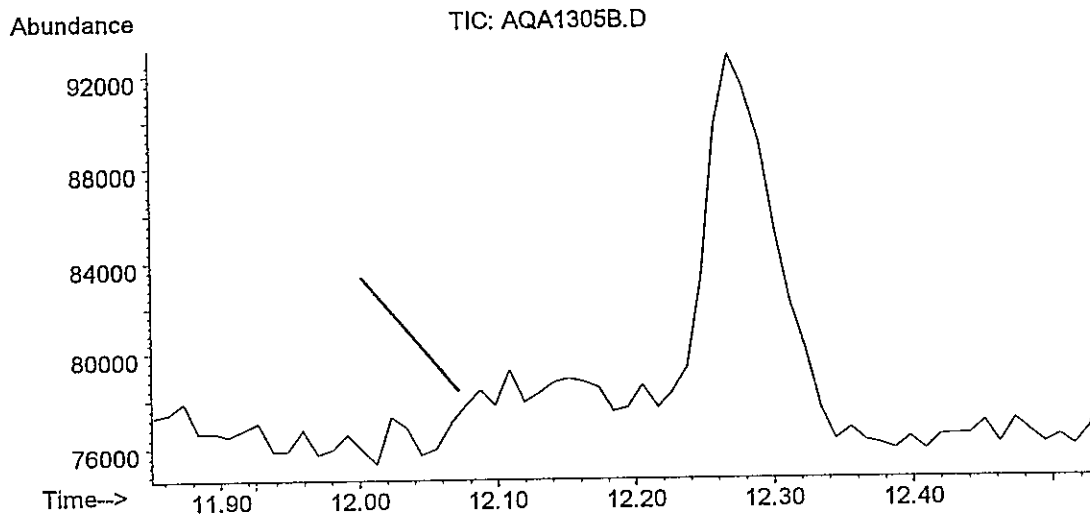


## Compuesto f



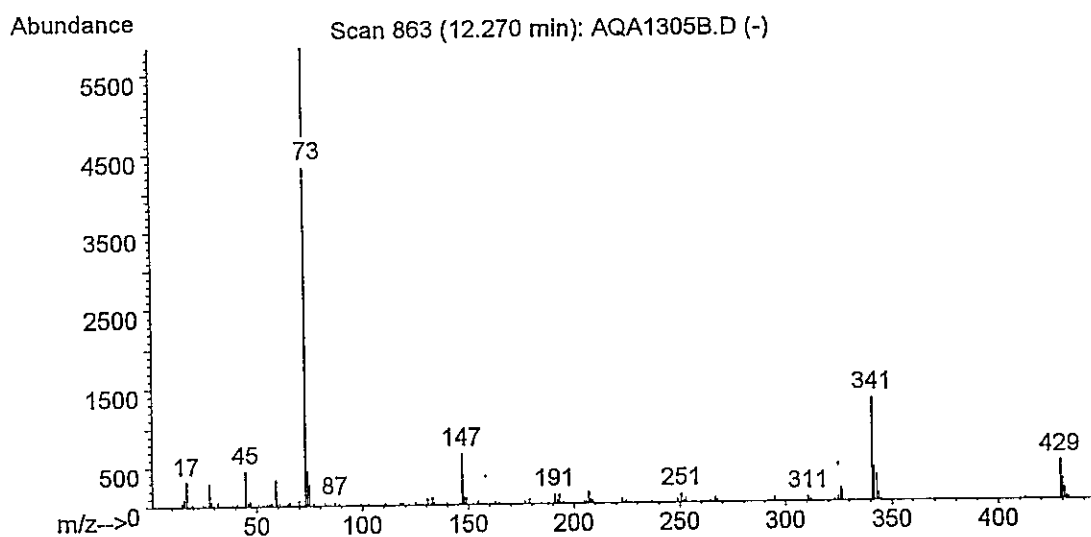
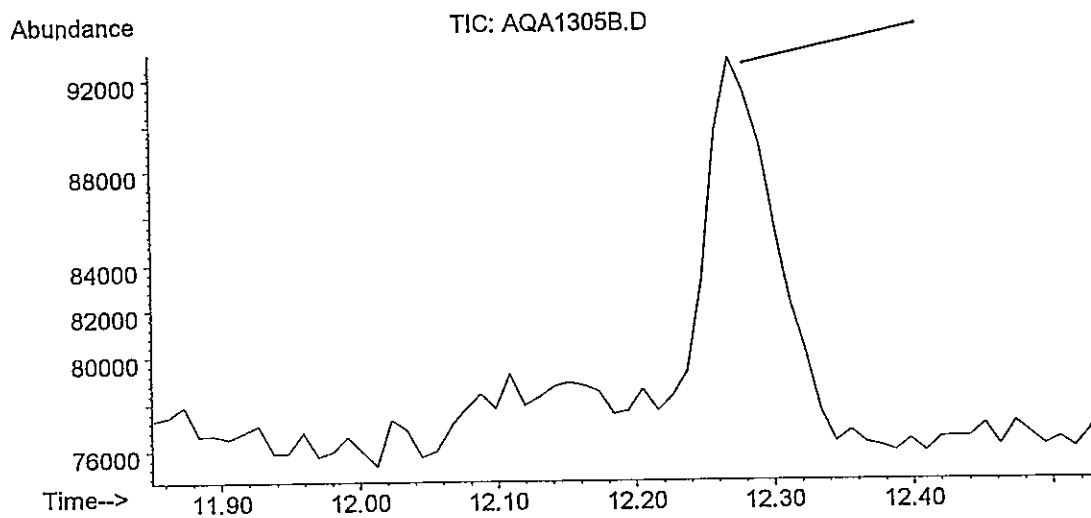
2-Metil-tridecano

## Compuesto g



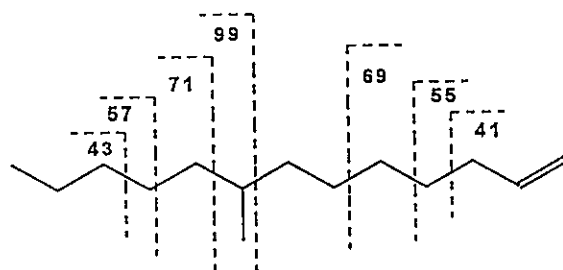
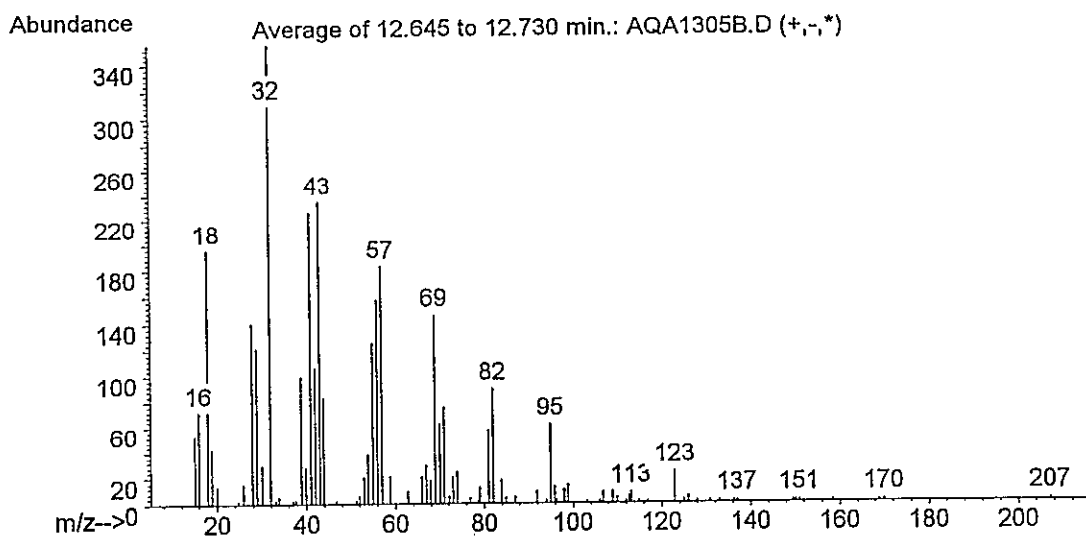
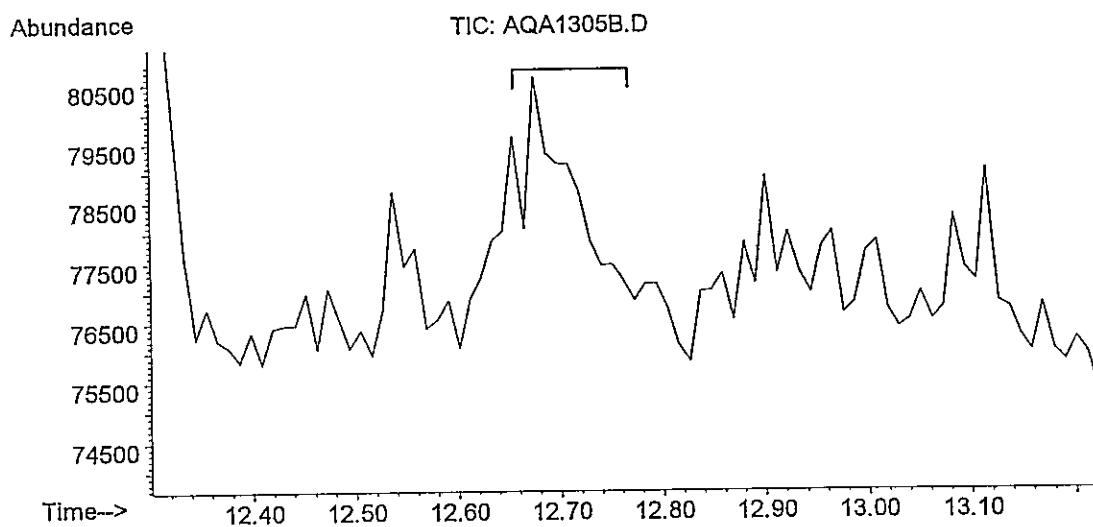
Impureza producto del sangrado de la columna .

## Compuesto h



Impureza producto del sangrado de la columna .

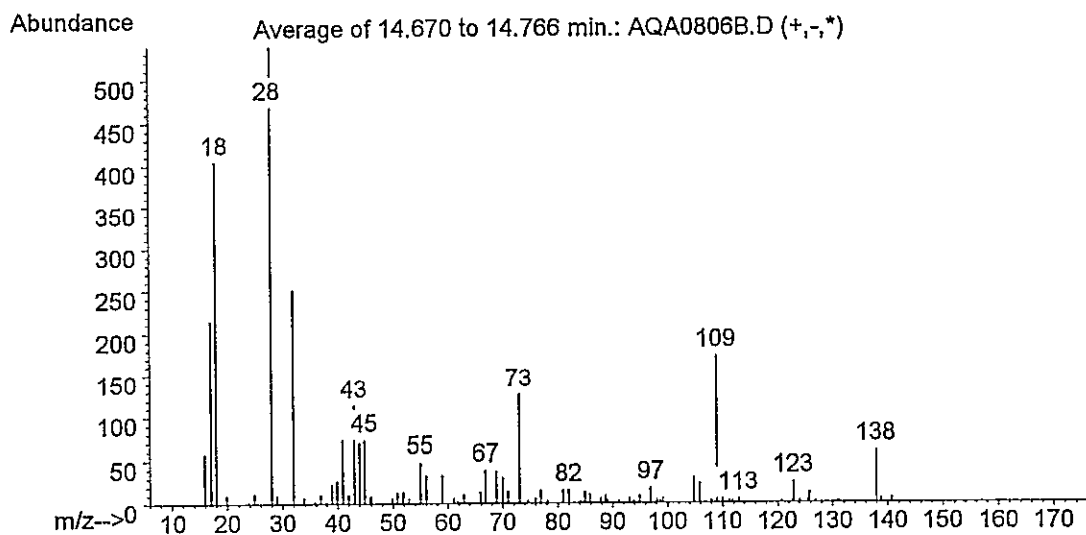
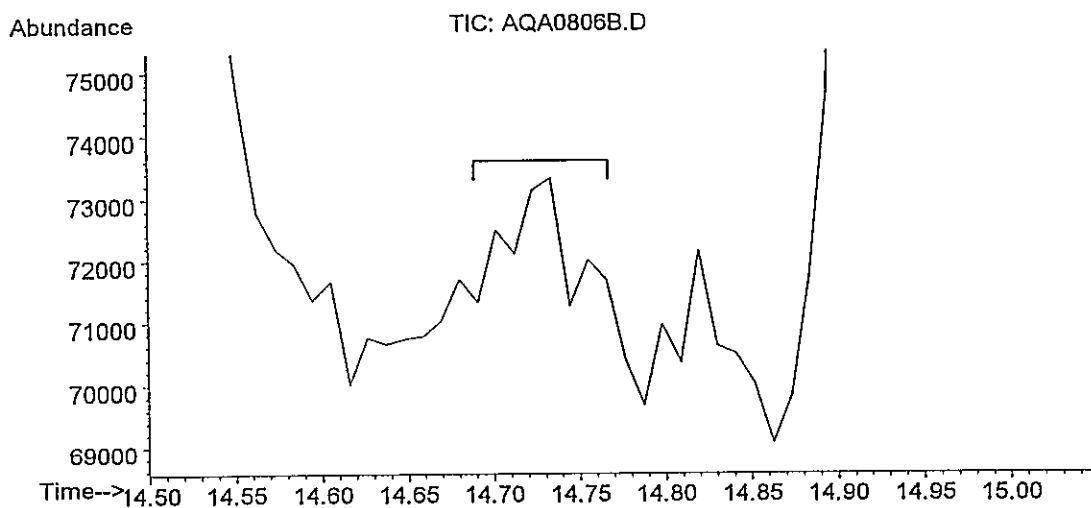
## Compuesto i



8-Metil-1-trideceno

Este compuesto debe ser un hidrocarburo ramificado de 14 átomos de carbono por tiempo de retención.

## Compuesto j

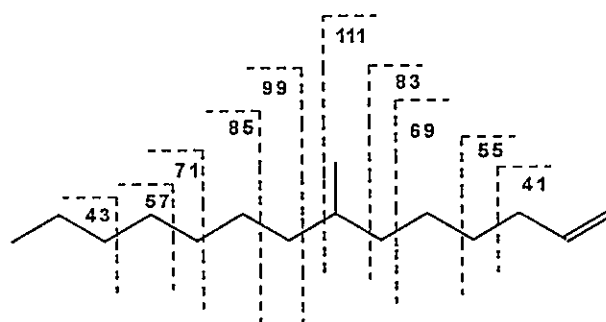
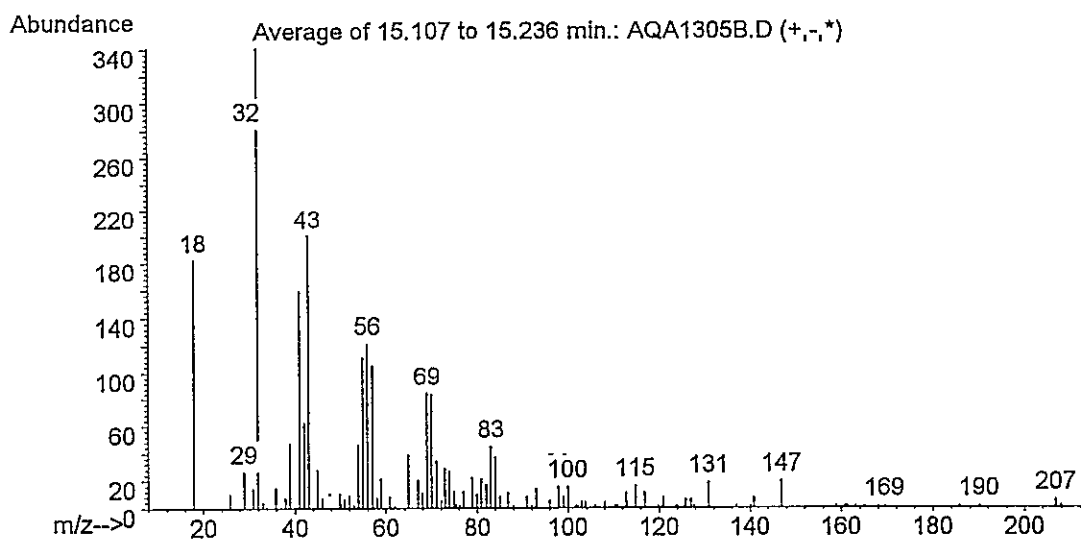
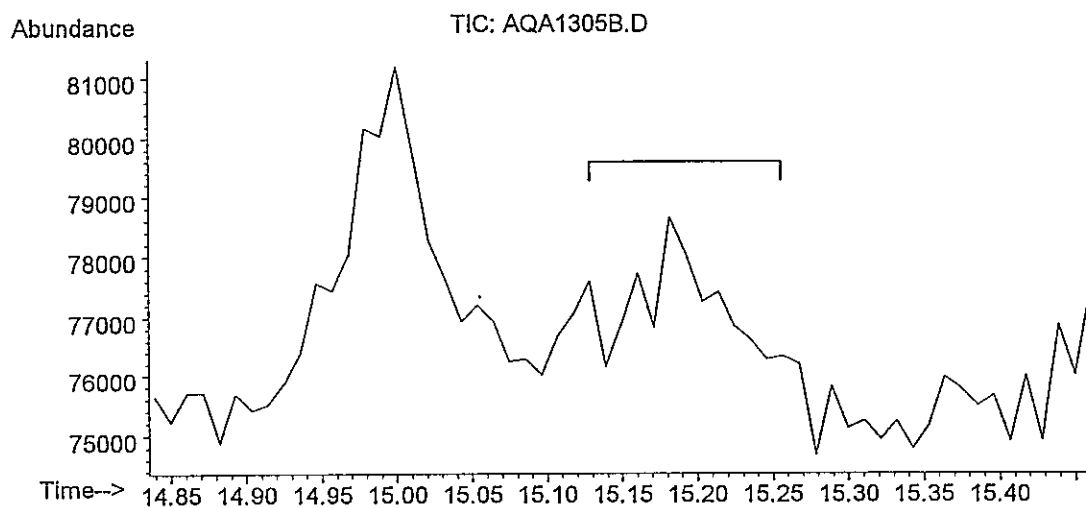


3,7-Dimetil-1-octen-3-ol

Fragmentos:

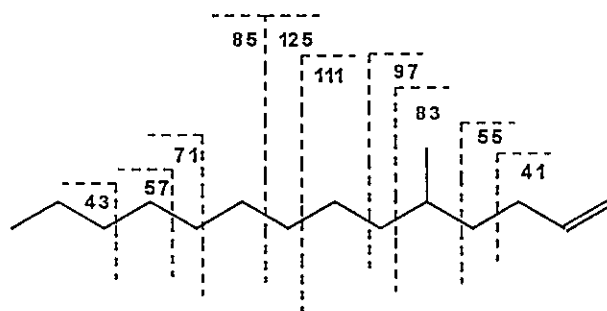
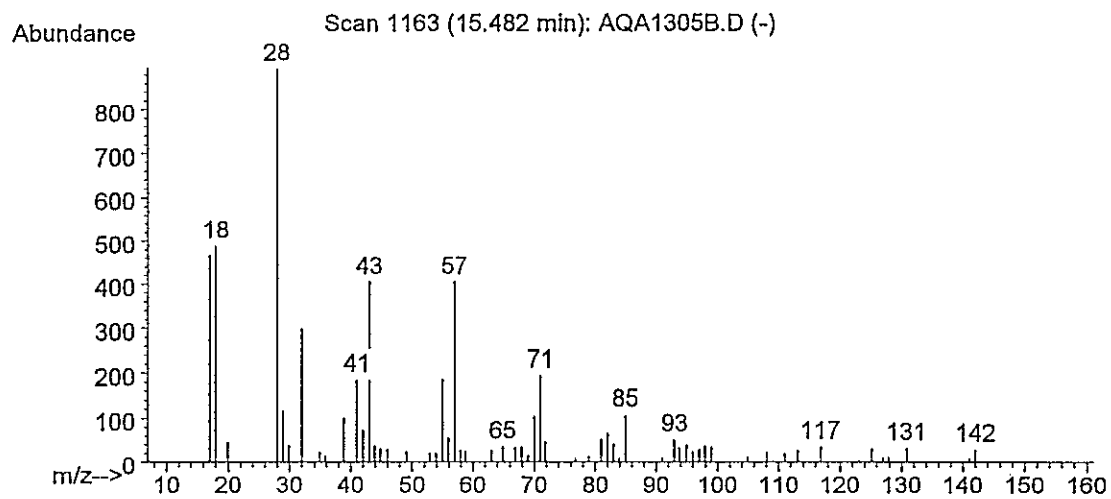
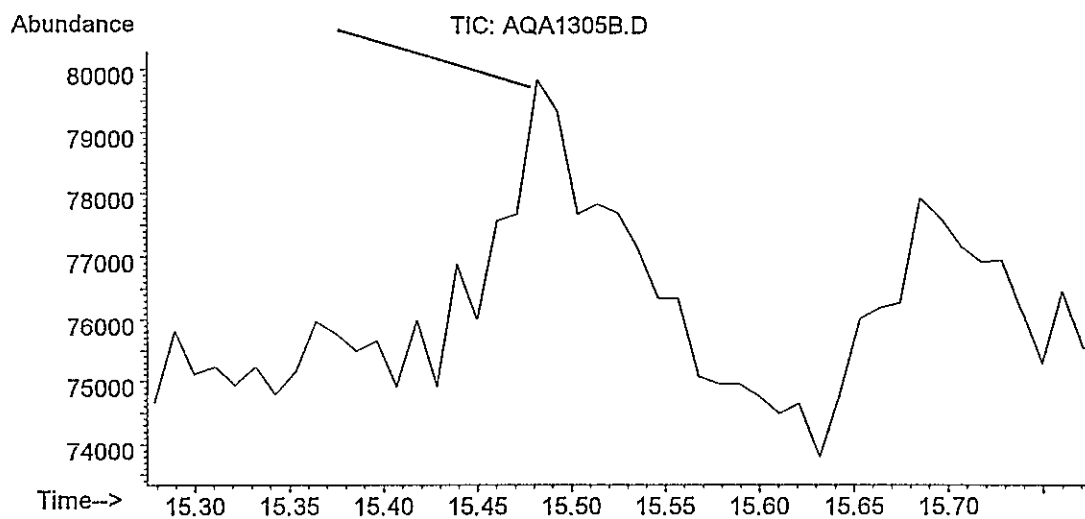
138 :  $[M^+] - H_2O$ 109 :  $[M^+] - H_2O - CH_3$

## Compuesto k



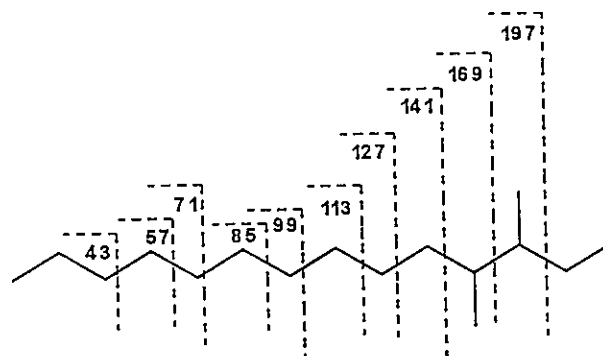
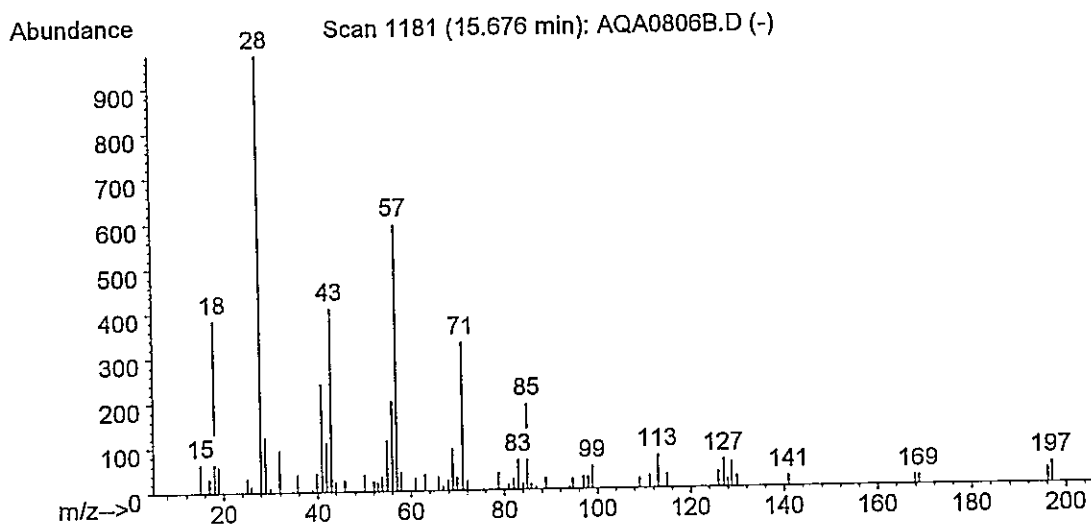
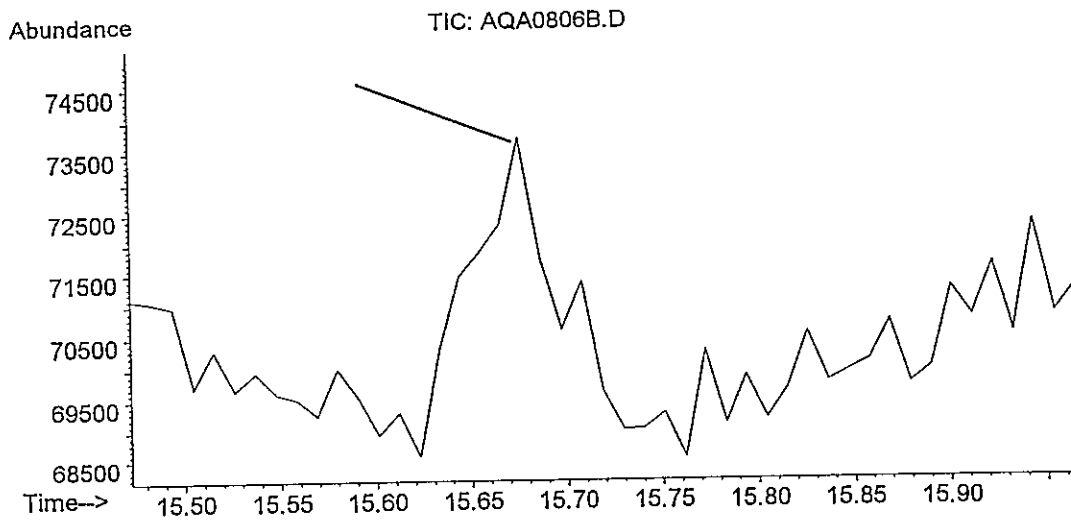
7-Metil-1-tetradeceno

## Compuesto I



5-Metil-1-tetradeceno

## Compuesto m

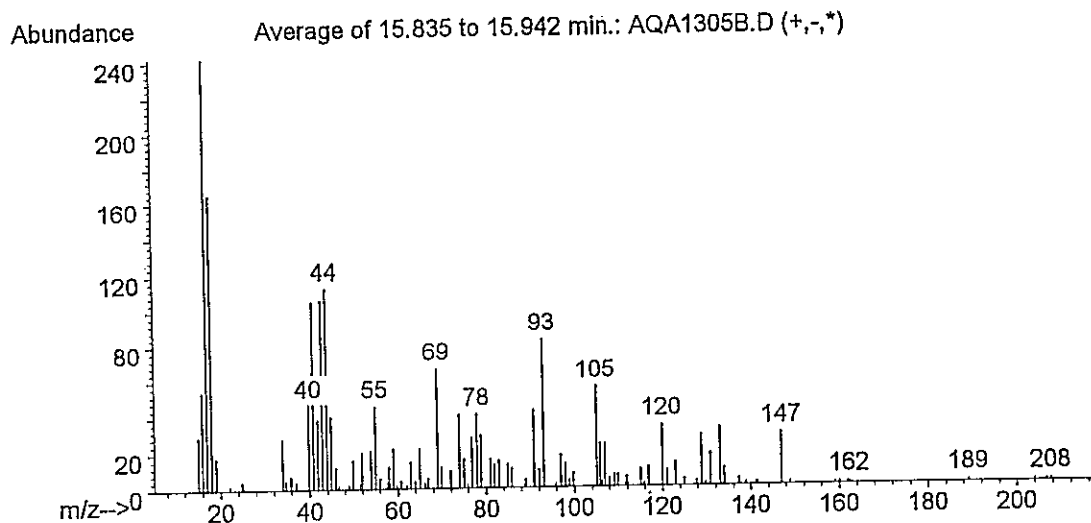
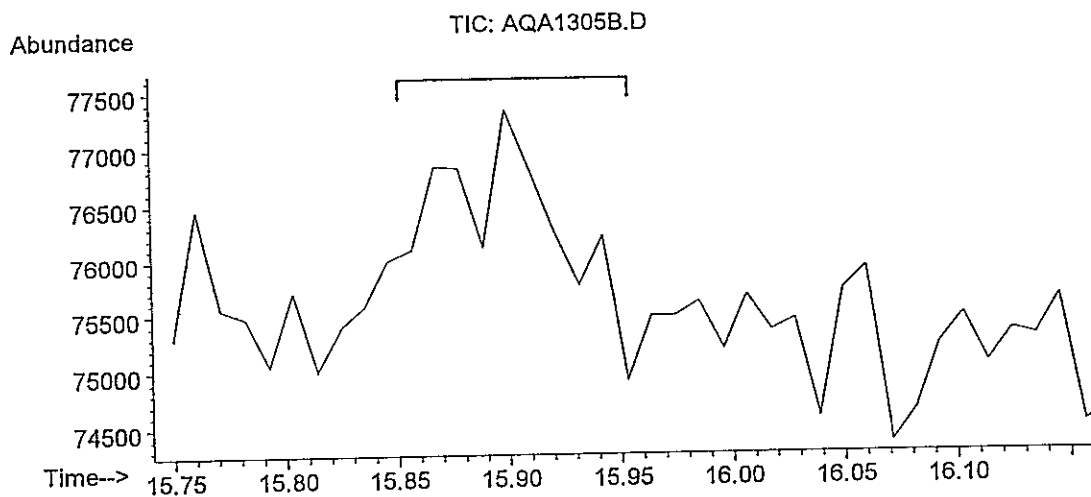


3,4-Dimetil-tetradecano

Las ramificaciones explican la abundancia del ión 197 y la ausencia de 155 y 183.

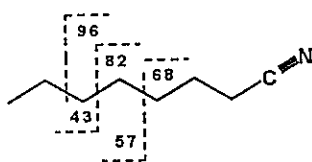
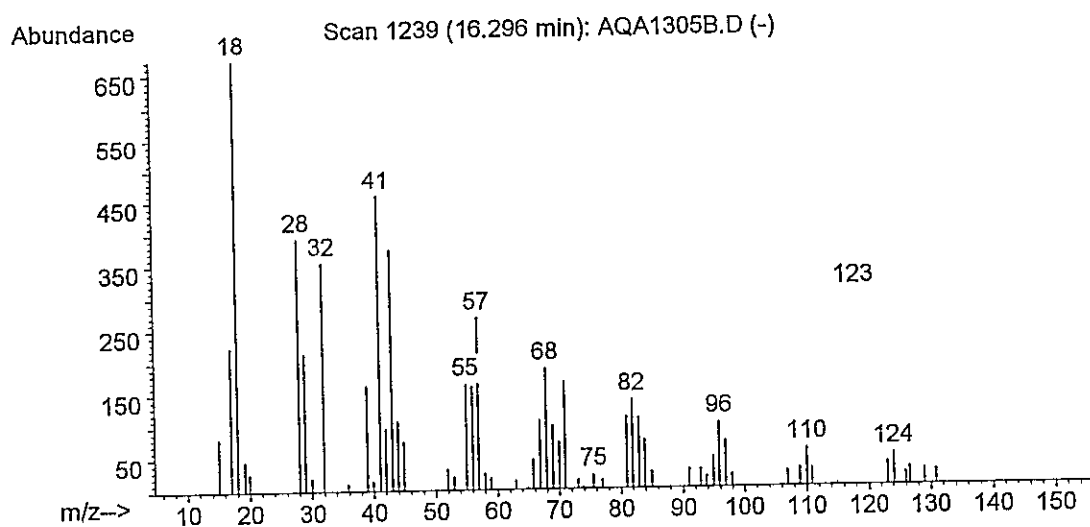
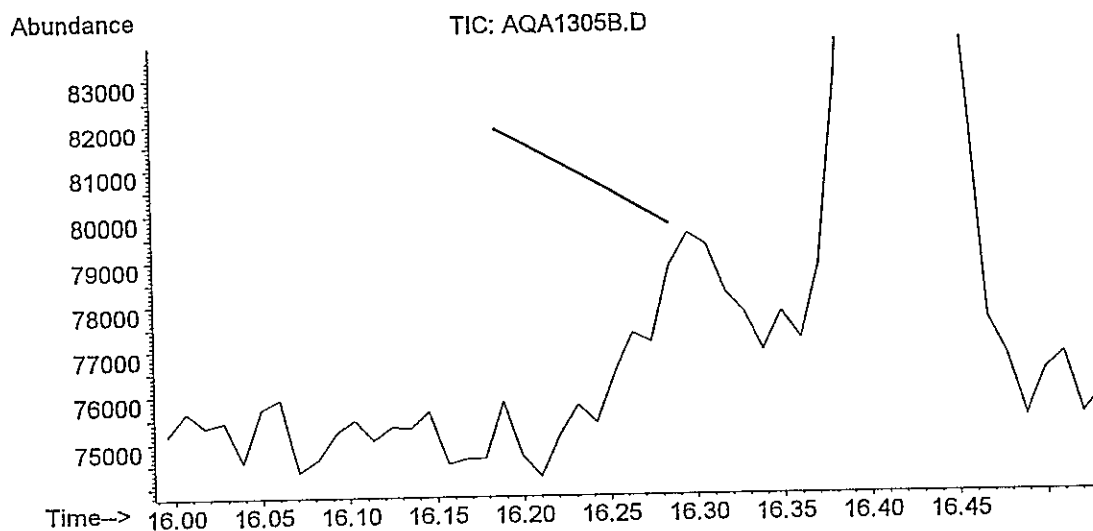


## Compuesto n

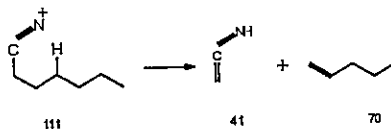


Espectro de masas promedio y de muy baja abundancia de iones. No es interpretable.

## Compuesto ñ



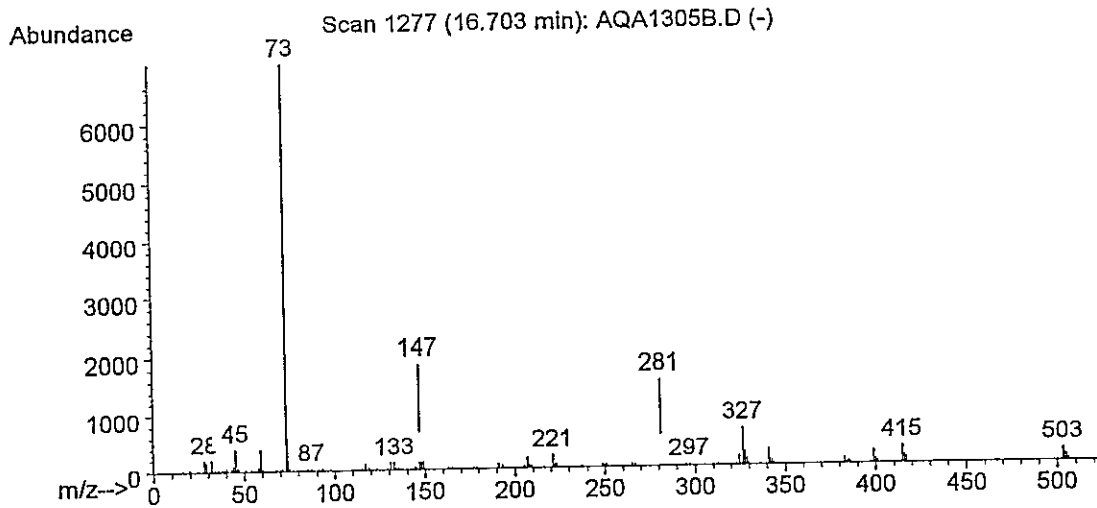
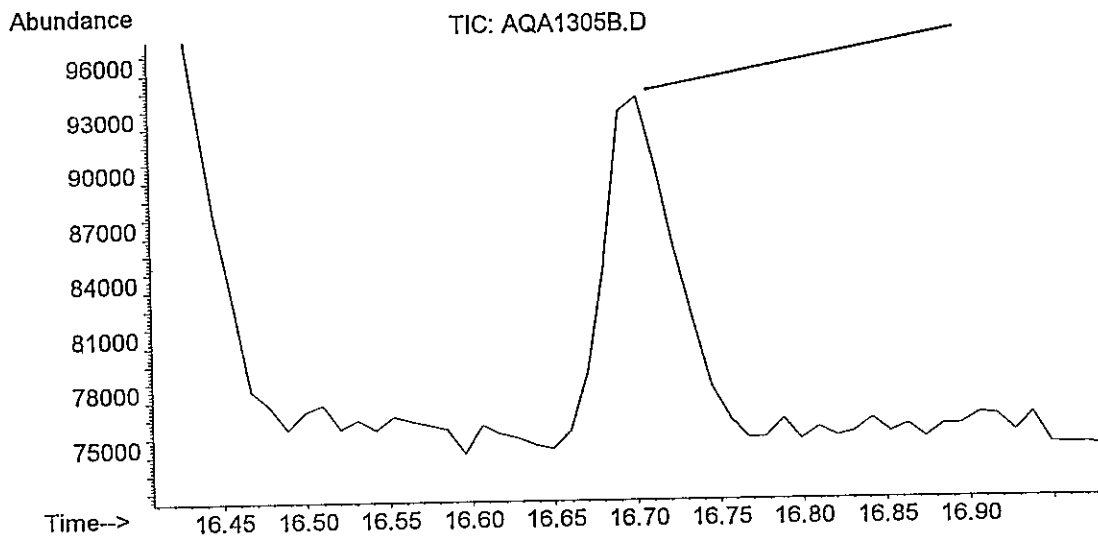
Octanonitrilo



Otros fragmentos:

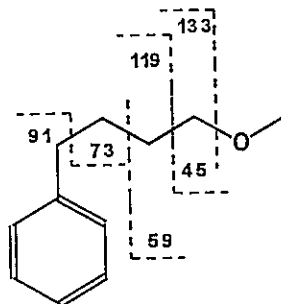
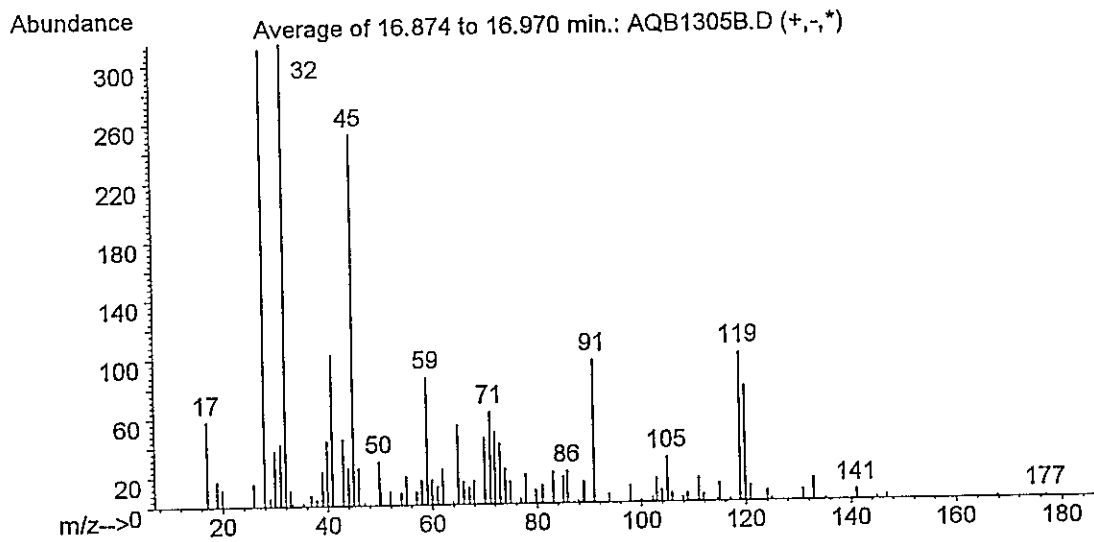
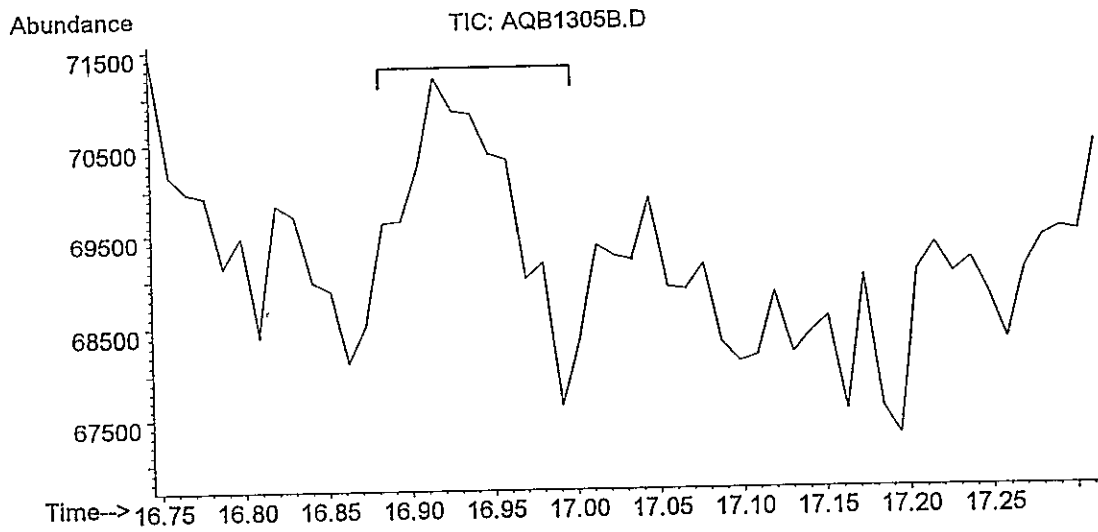
125:  $[M^+]$ 124:  $[M^+] - H$ 110:  $[M^+] - CH_3$

## Compuesto o



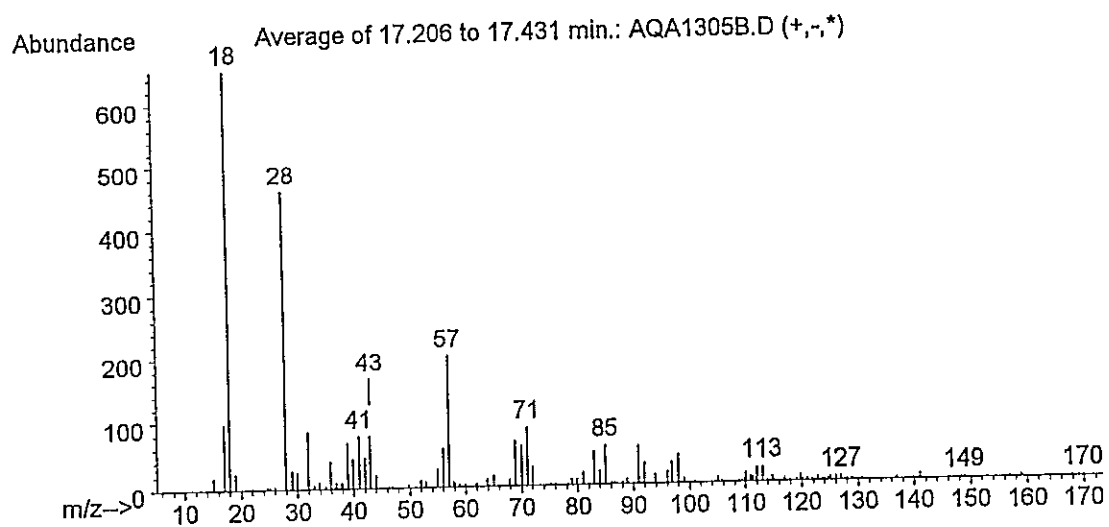
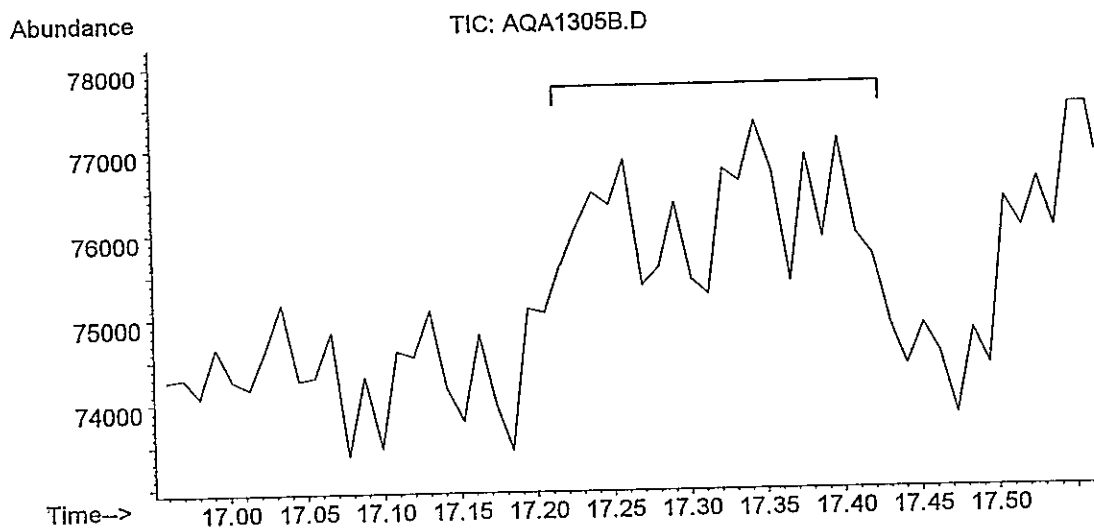
Impureza debido al sangrado de la columna .

## Compuesto p



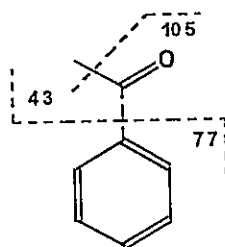
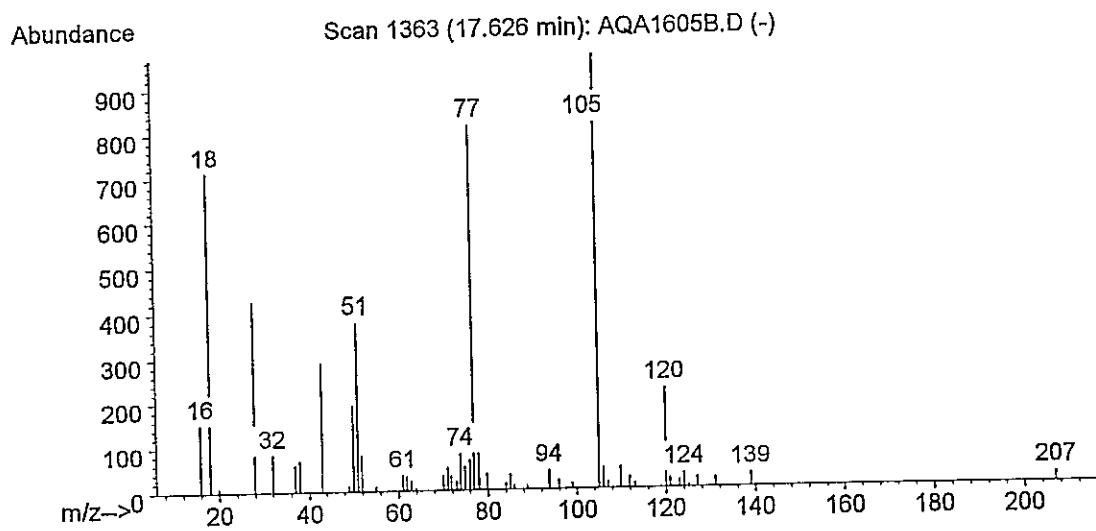
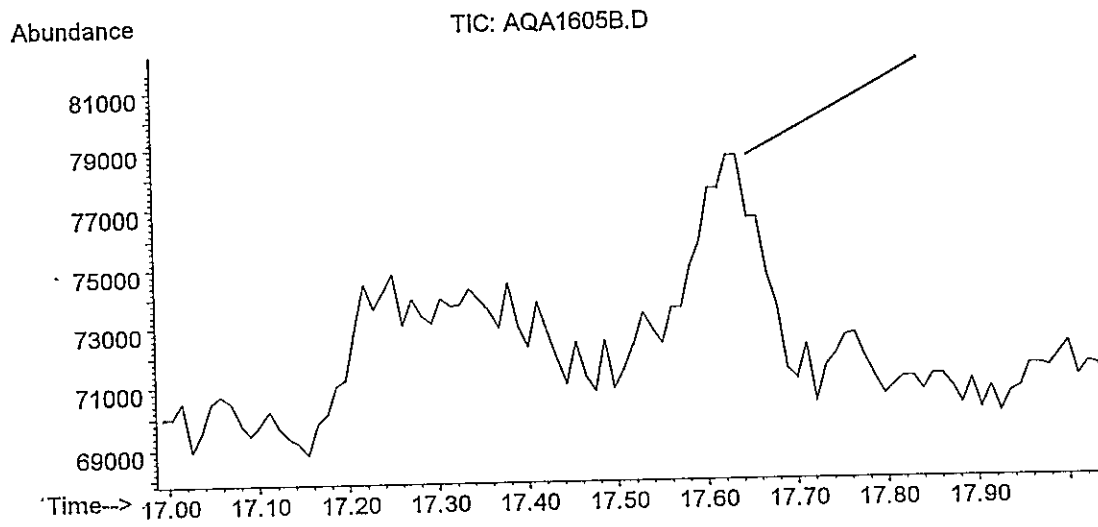
4-Metioxibutil-benceno

## Compuesto q



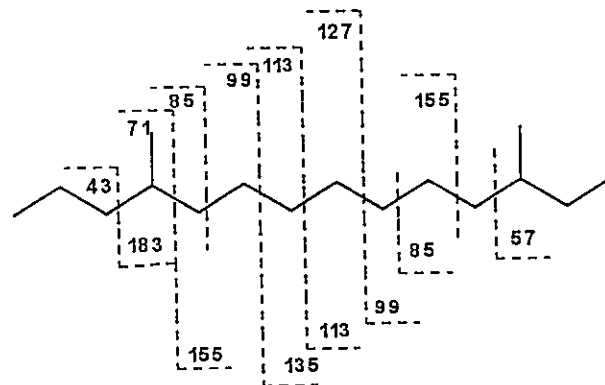
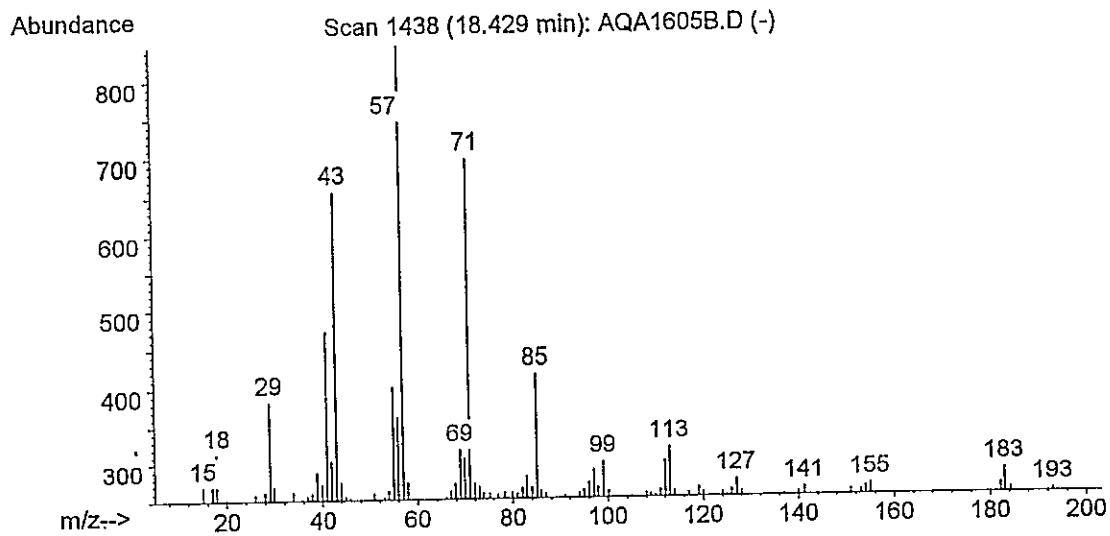
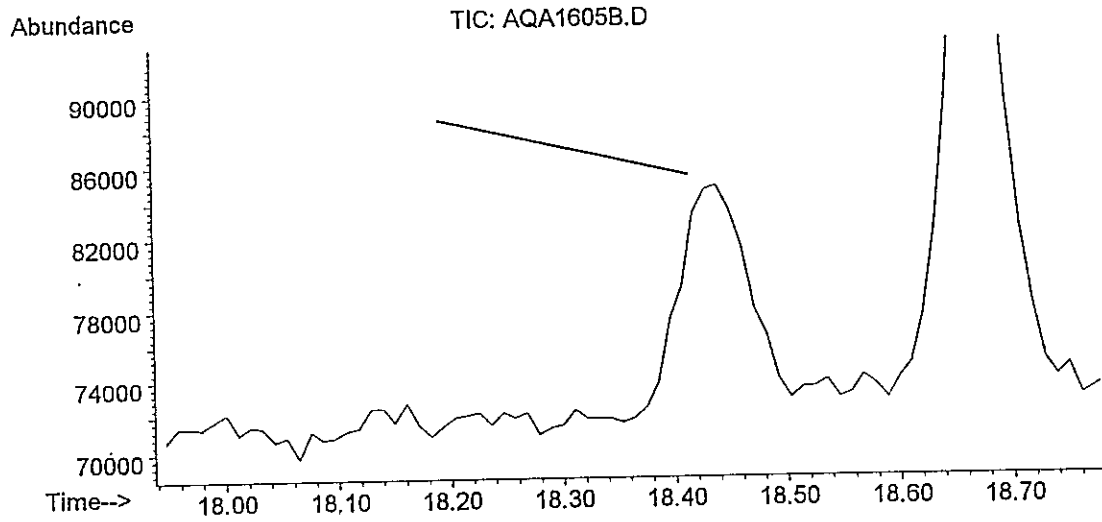
Hidrocarburo ramificado con número aproximado de 16 a 17 átomos de carbono con al menos 7 átomos de carbono en línea

## Compuesto r



Acetofenona [ $M^+$ ] = 120 m/z

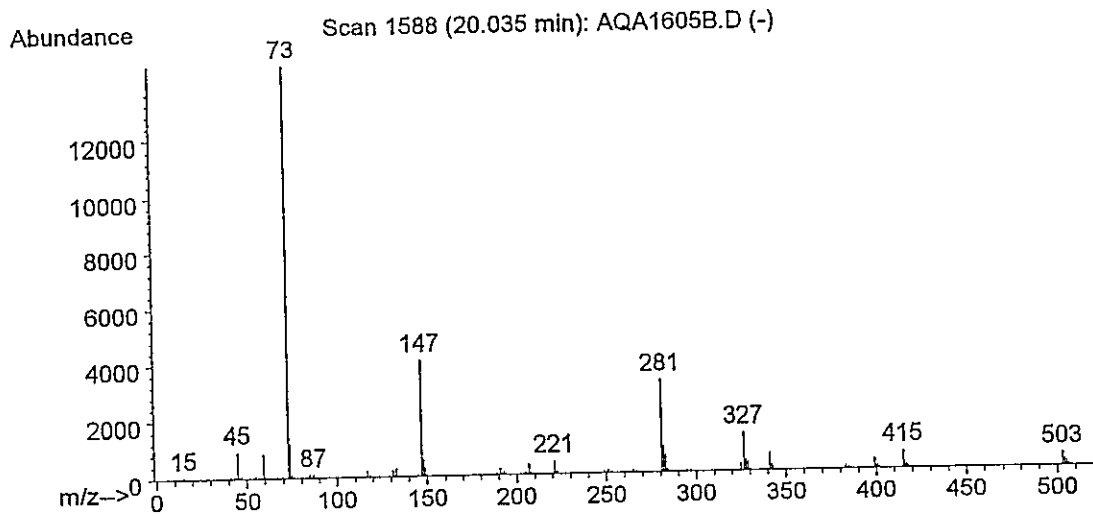
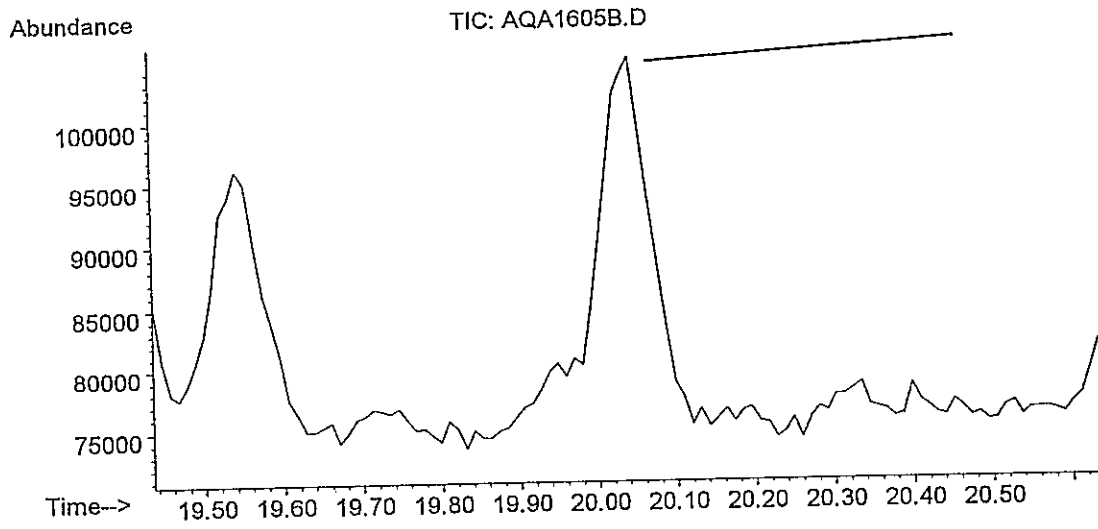
## Compuesto s



3,11-Dimetil-tetradecano

Las ramificaciones explican el tiempo de retención y la abundancia de los fragmentos 71, 155 y 183.

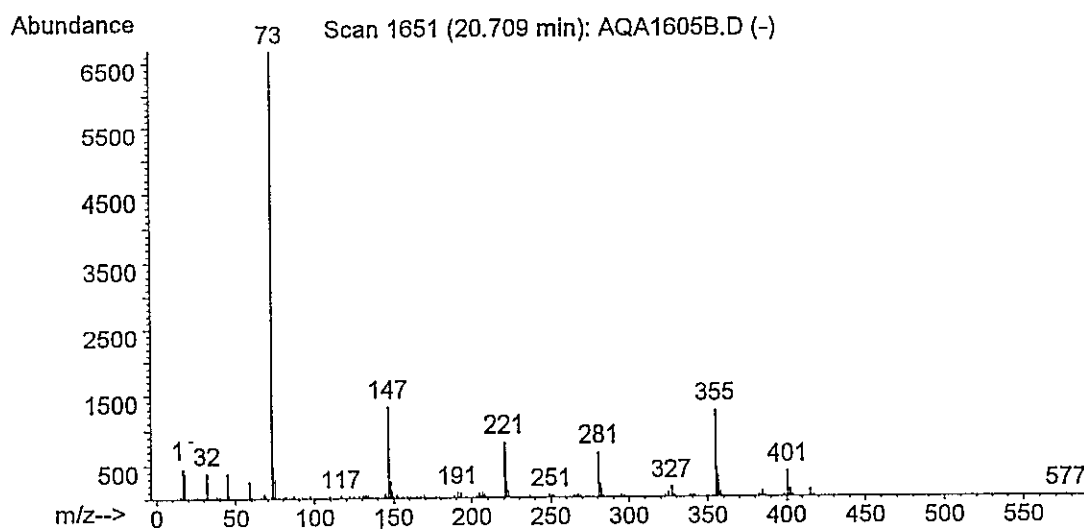
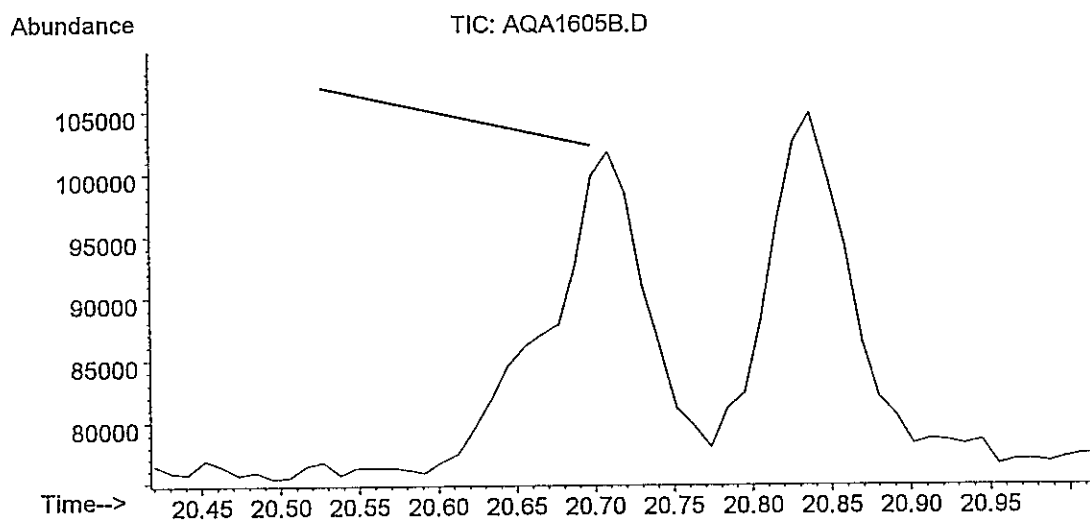
## Compuesto t



Impureza debido al sangrado de la columna .

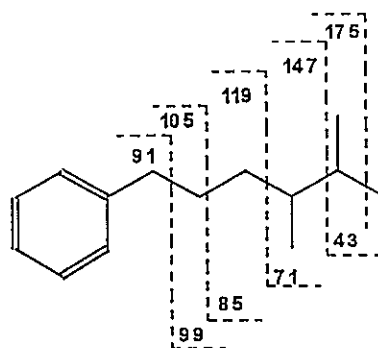
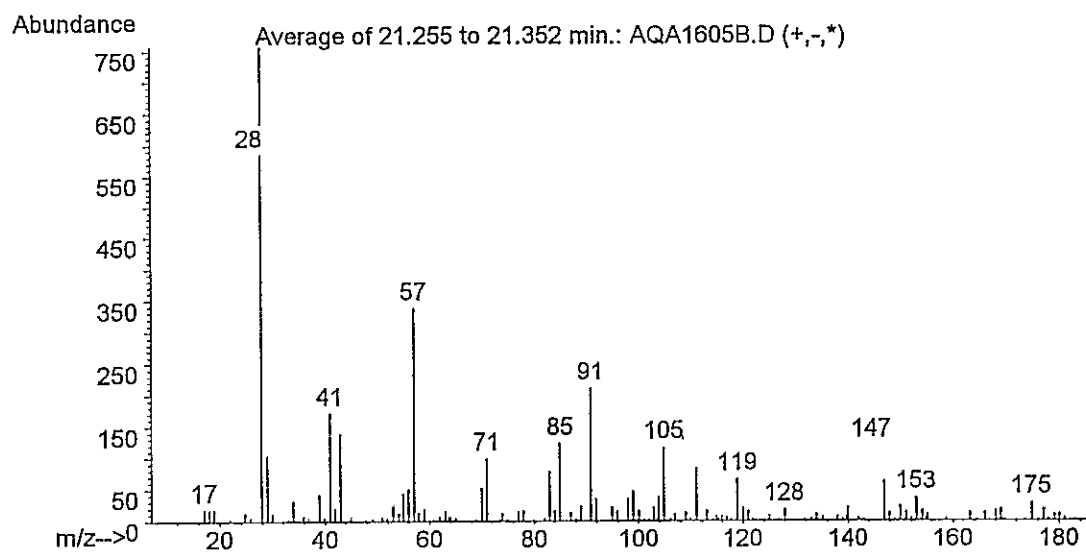
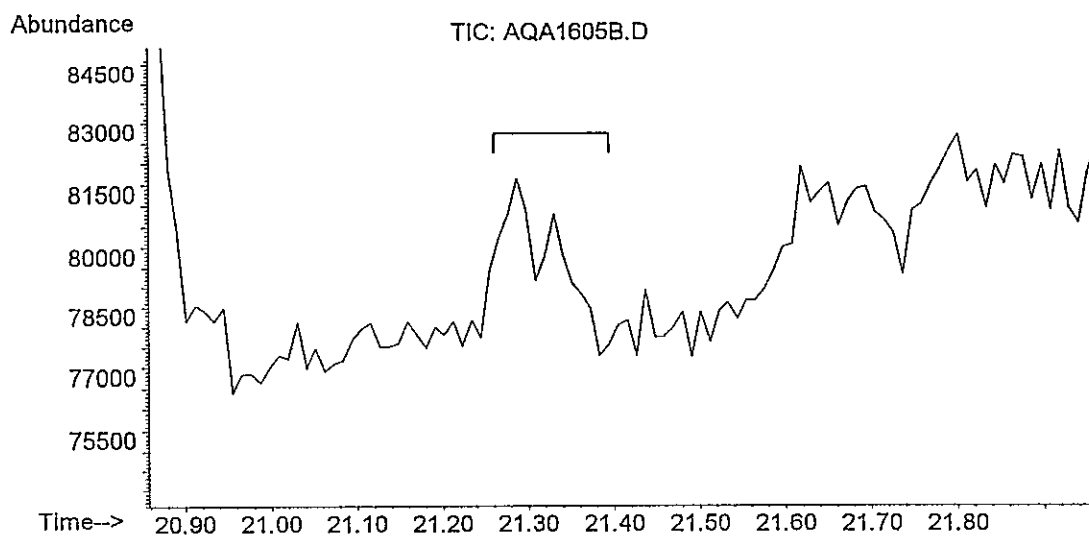


## Compuesto u



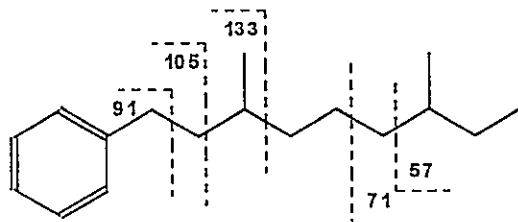
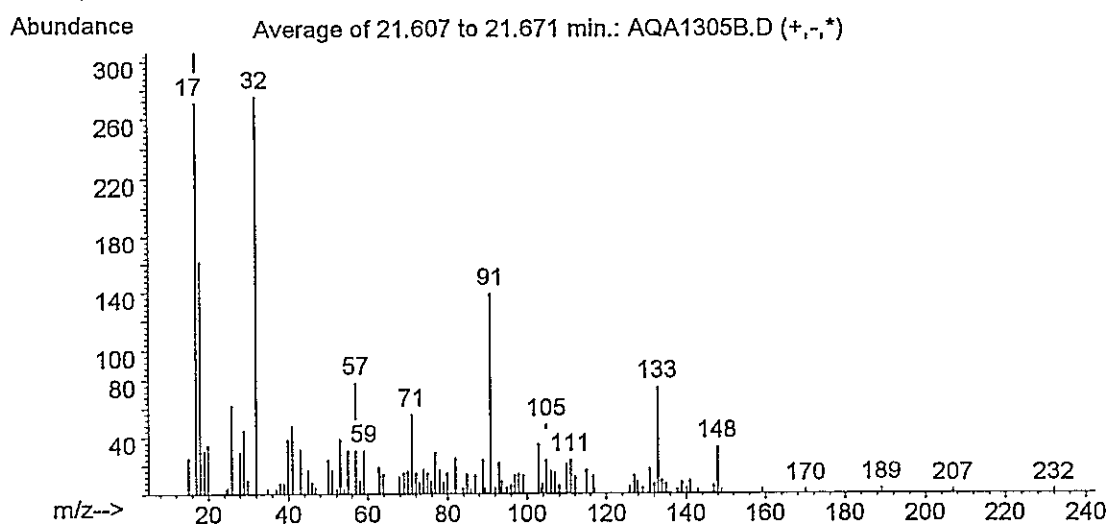
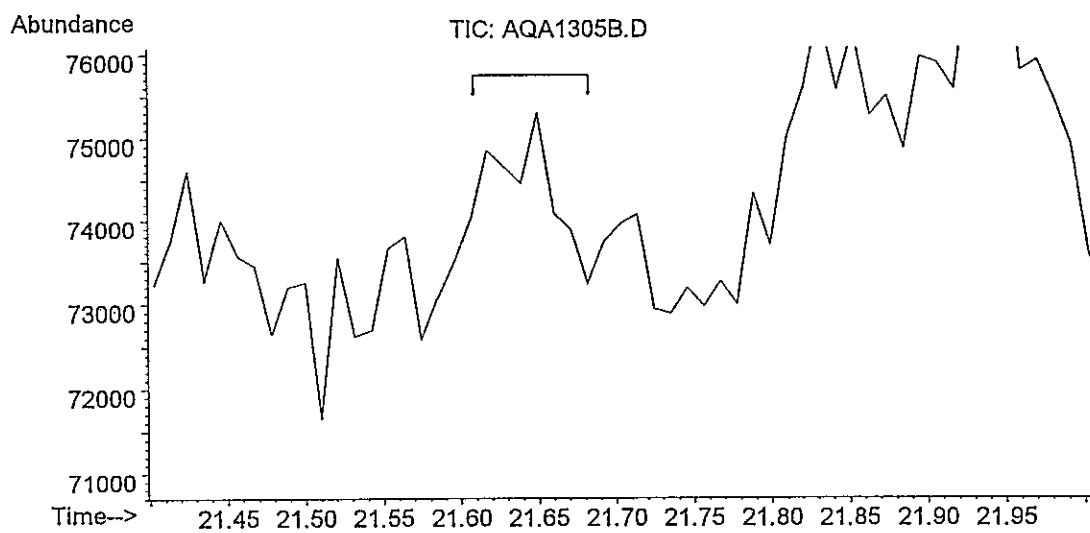
Impureza debido al sangrado de la columna.

## Compuesto v



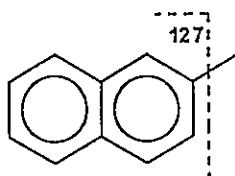
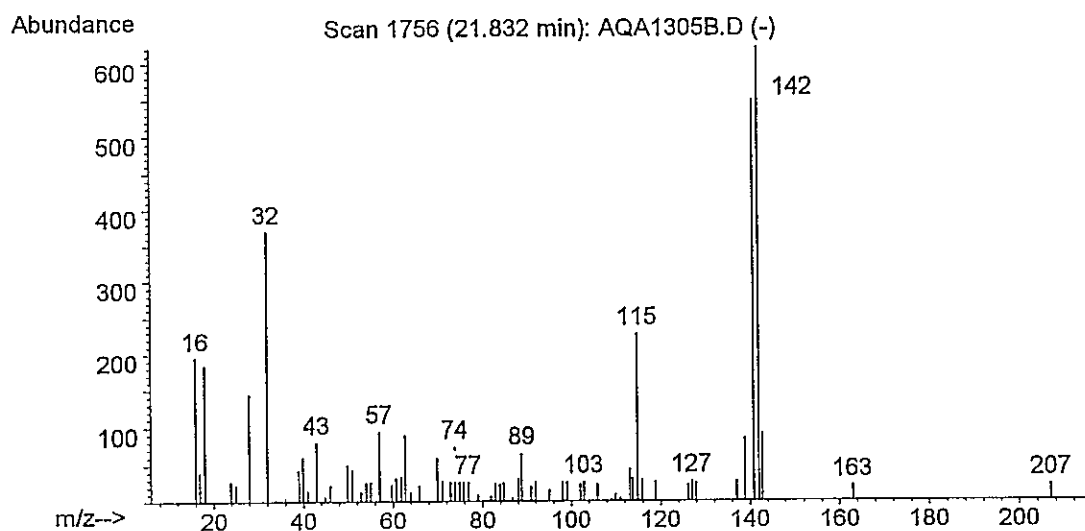
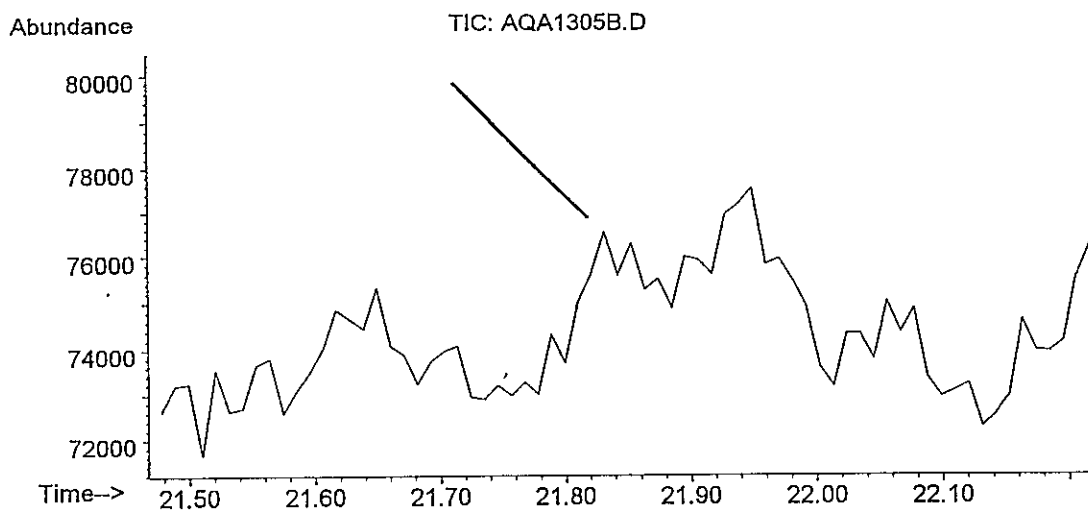
2,3-Dimetil-6-fenilhexano

## Compuesto x



1-Fenil-3,7-dimetilnonano  $[M^+] = 232$  m/z

## Compuesto y

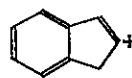


2-Metil-naftaleno [ $M^+$ ] = 142 m/z

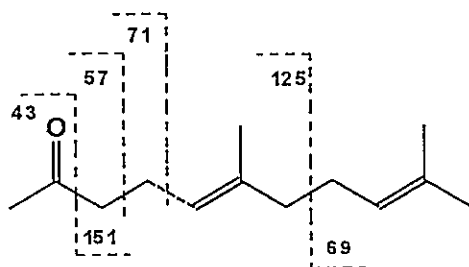
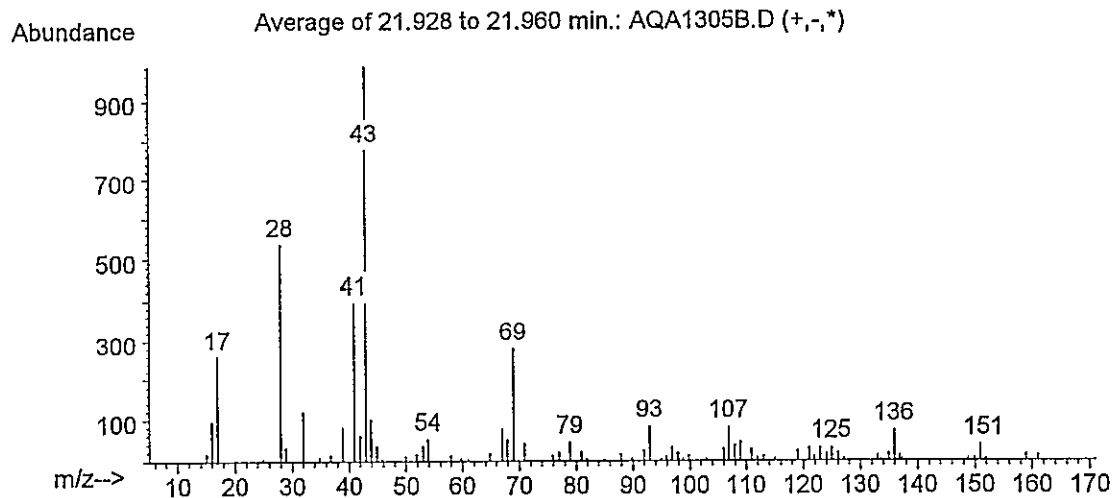
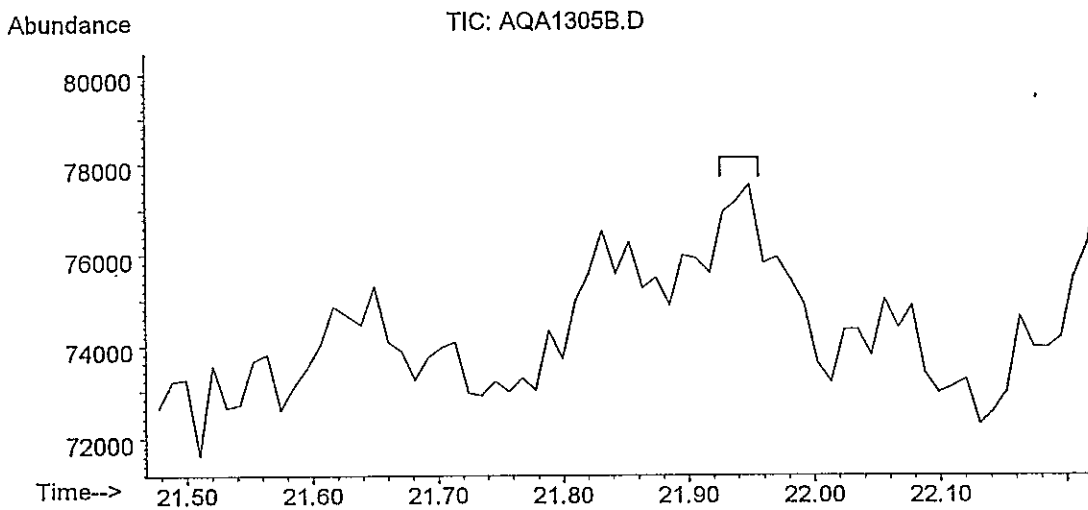
Otros fragmentos:

141: [ $M^+$ ] - H

115:

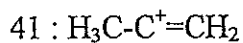
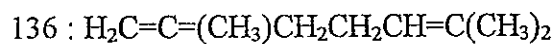


## Compuesto z

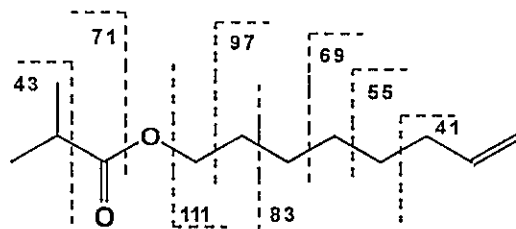
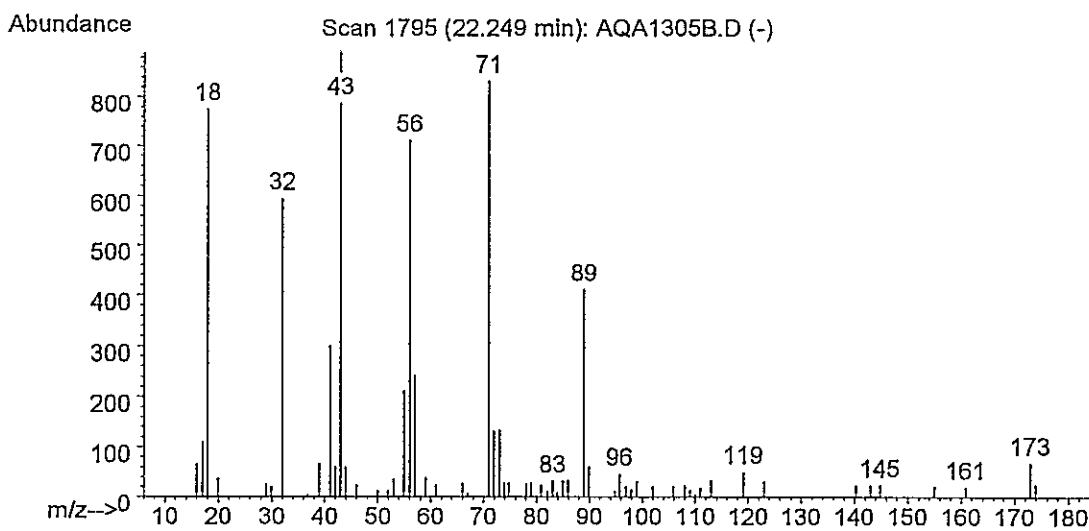
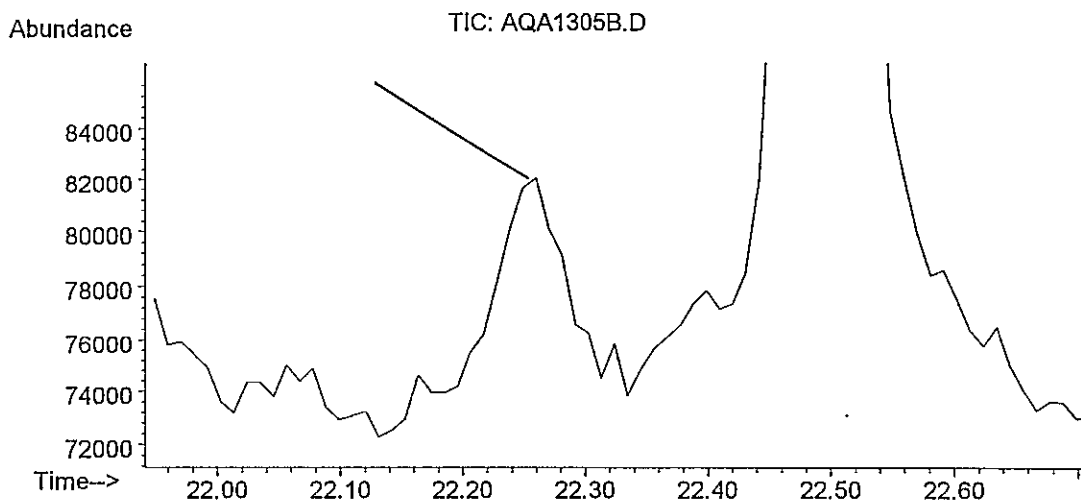


6,10-Dimetil-5,9-undecadien-2-ona [ $M^+$ ] = 194 m/z

Otros fragmentos producto de reordenamientos:

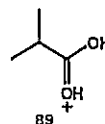


## Compuesto aa

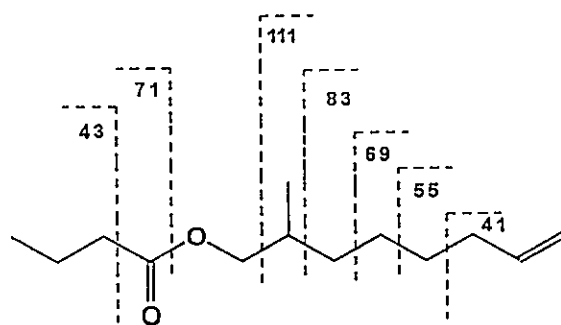
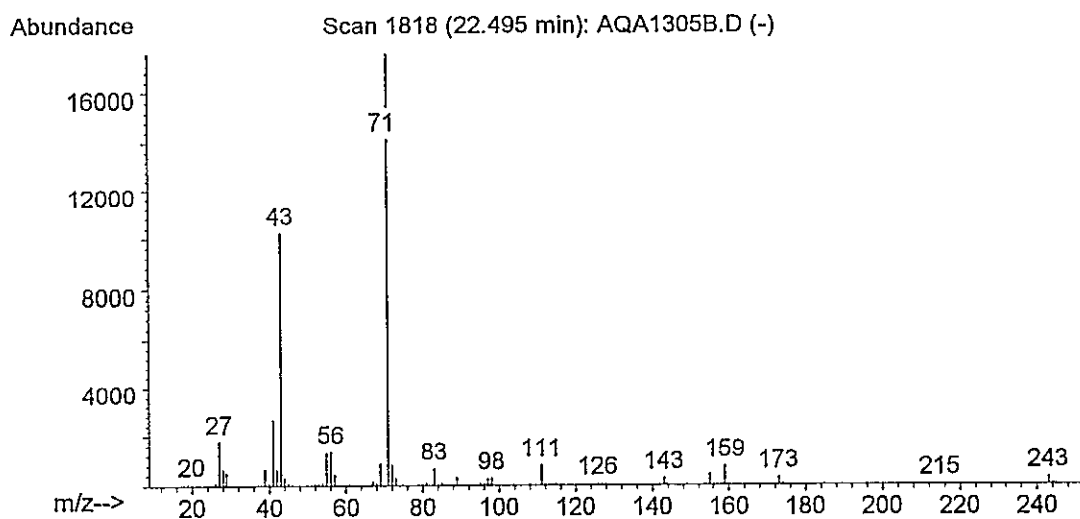
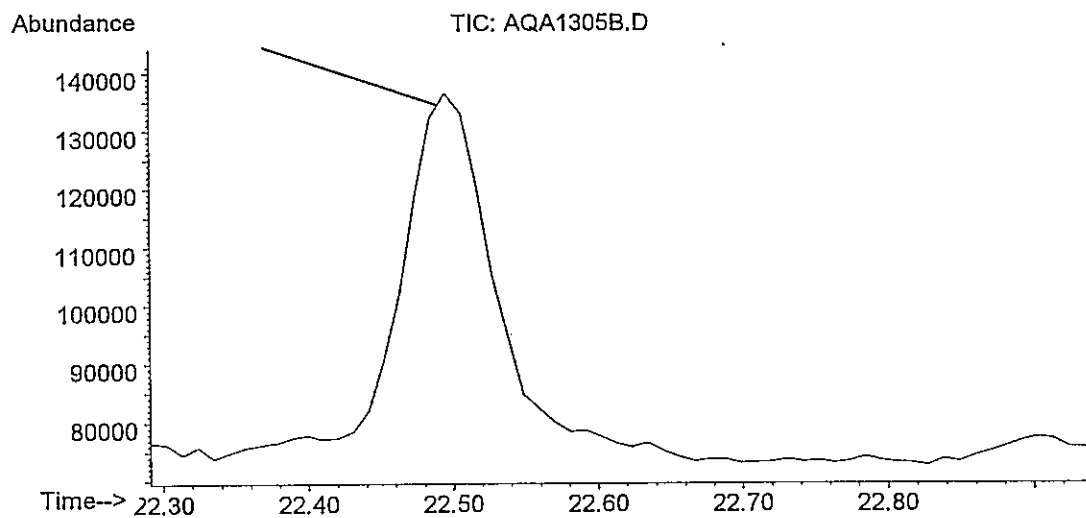


2-Metil-propanoato de 7-octenilo

Otros fragmentos:  $\text{H}_3\text{CCH}=\text{C}=\text{O}$  (56)

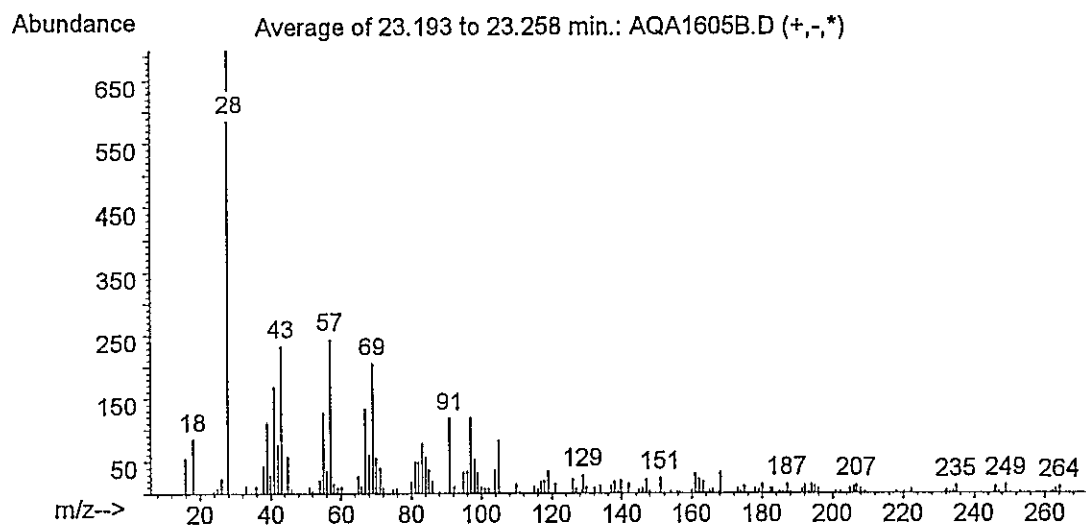
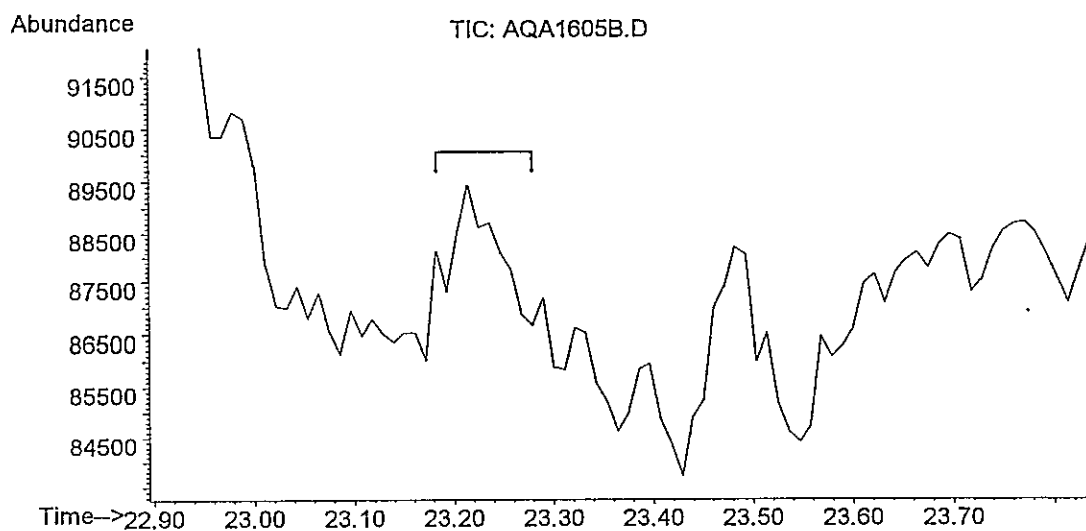


## Compuesto ab



Butanoato de 2-metil-7-octenilo

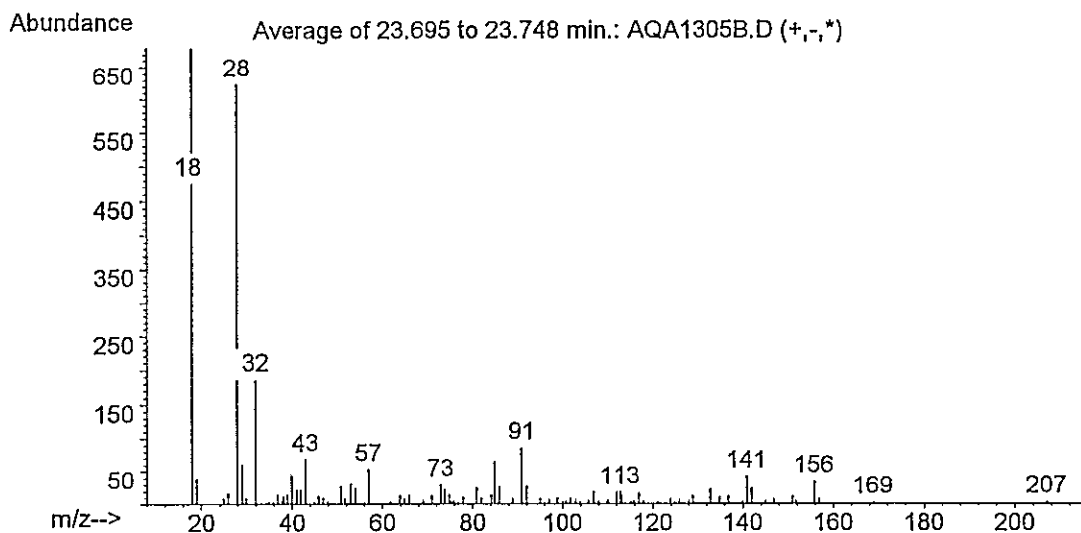
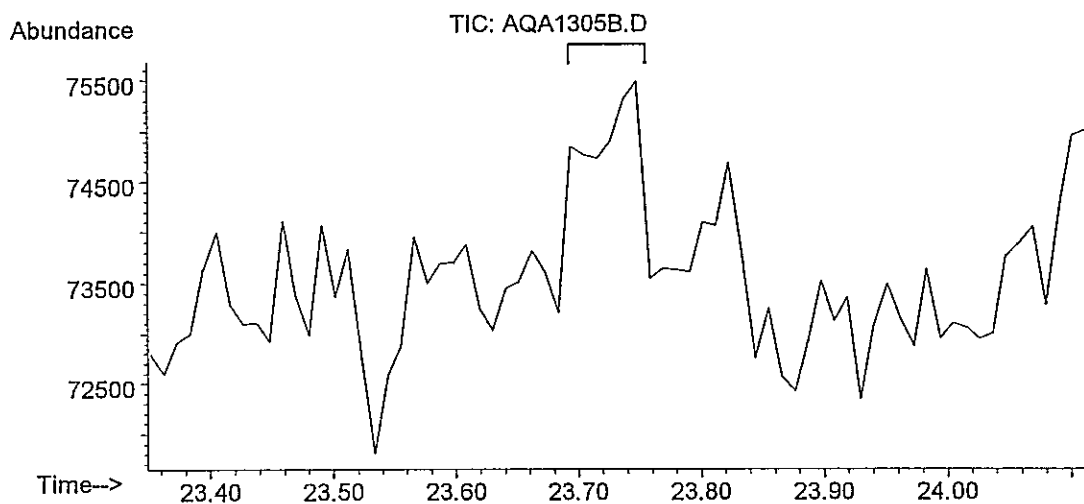
## Compuesto ac



Espectro de masas promedio con abundancias de iones pequeñas. No es posible interpretarlo.

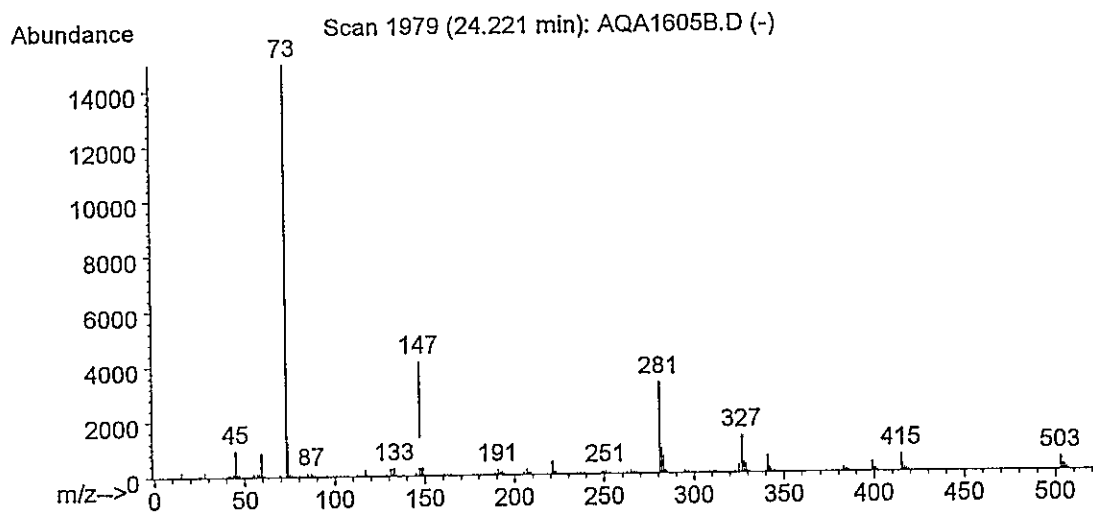
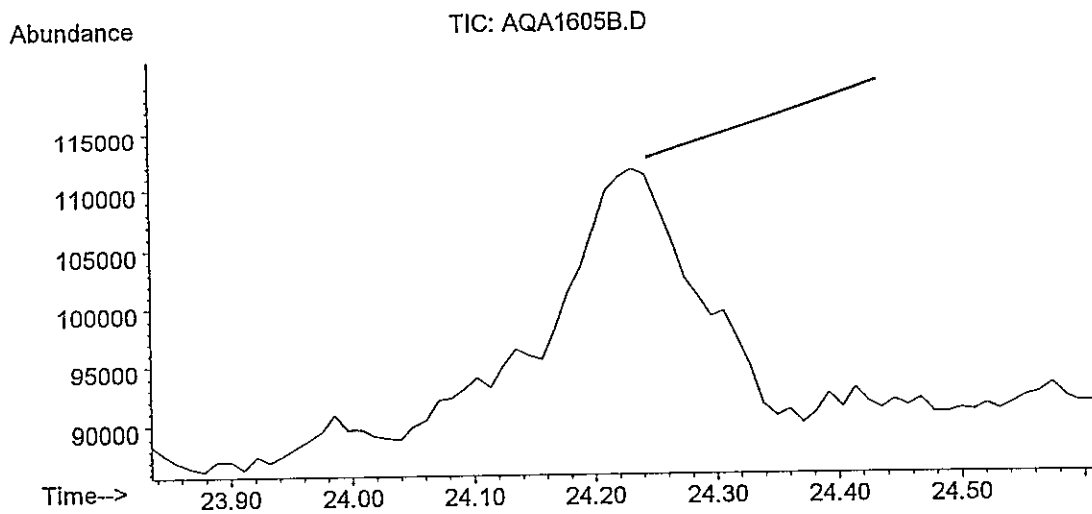


## Compuesto ad



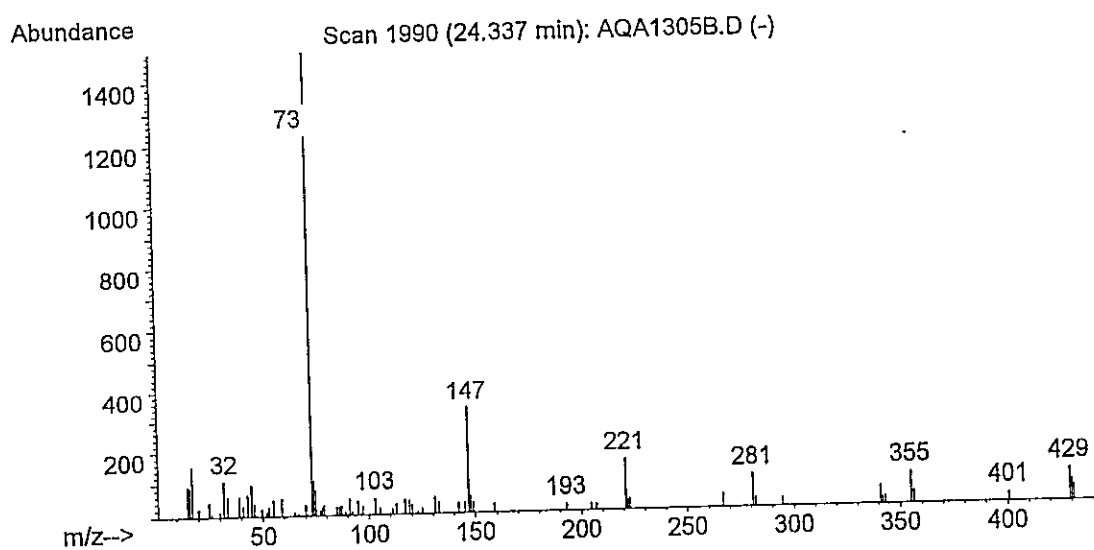
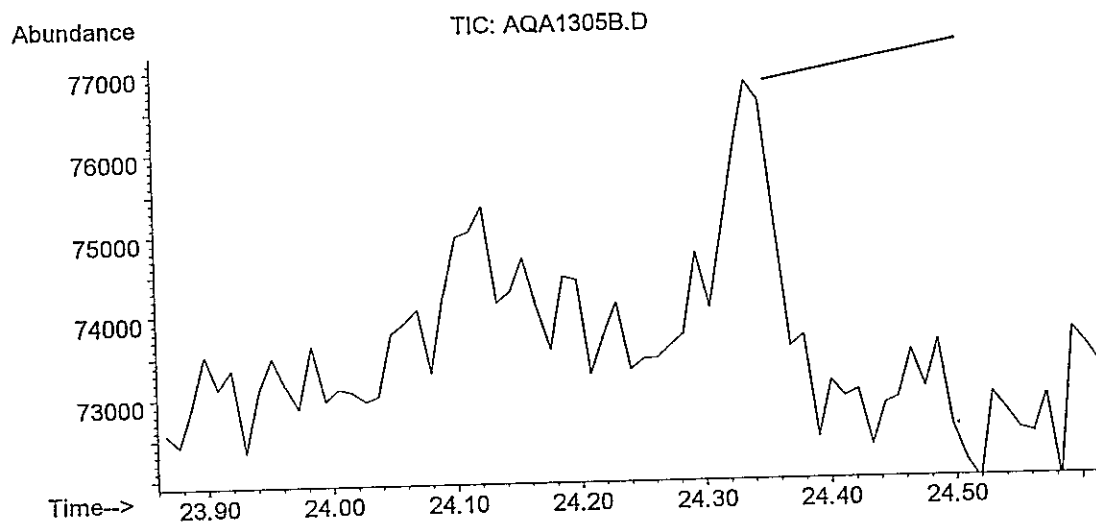
Espectro de masas promedio de muy baja intensidad. Este espectro tiene cierta semejanza con el descrito en la página A-25 de este apéndice. Se postula un naftaleno dimetilado con un probable ión molecular igual a 156 m/z.

## Compuesto ae



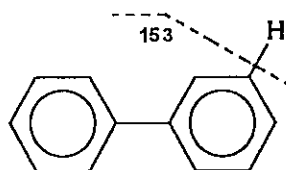
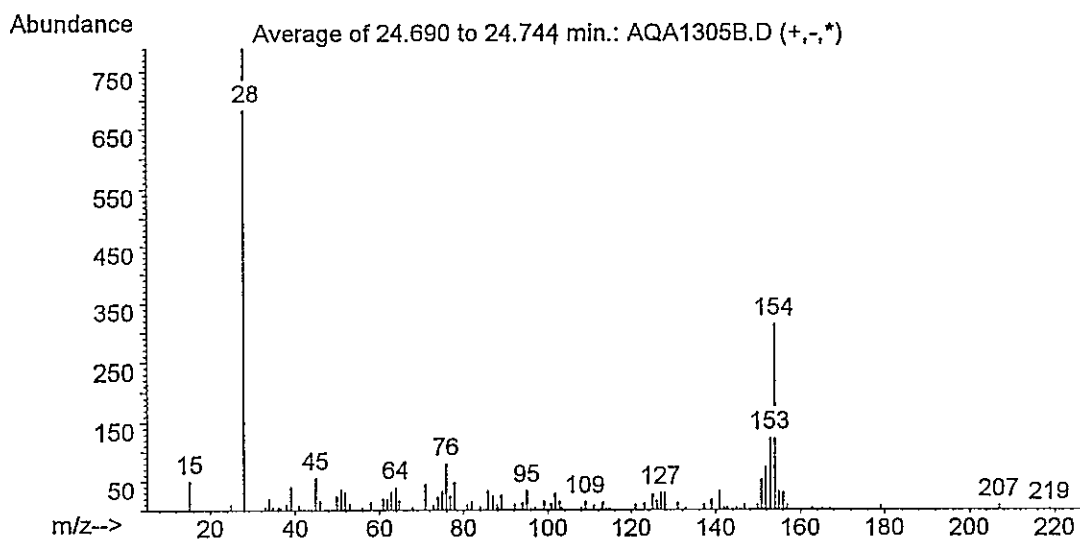
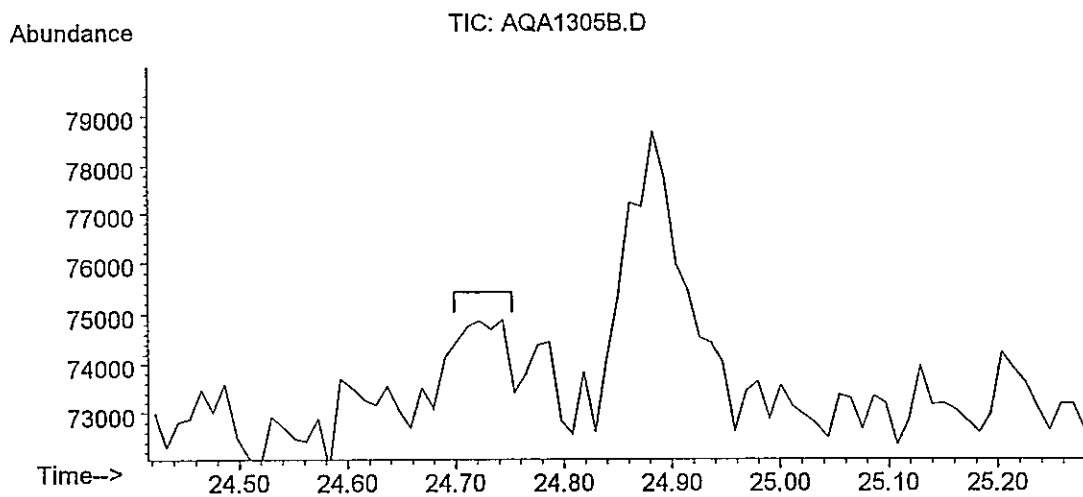
Impureza debido al sangrado de la columna .

## Compuesto af



Impureza debido al sangrado de la columna.

## Compuesto ag

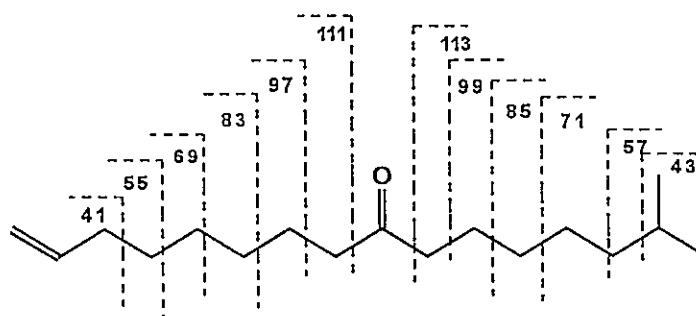
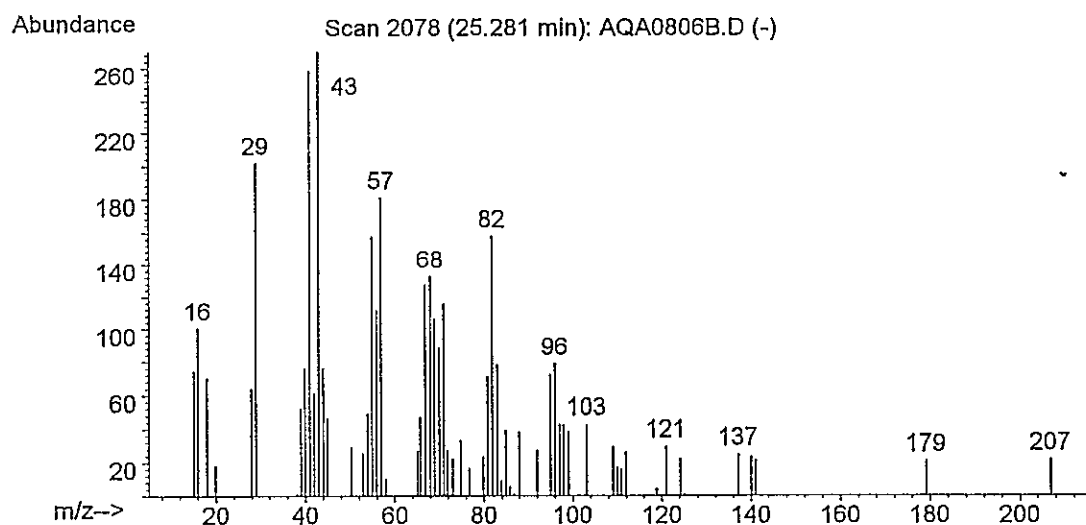
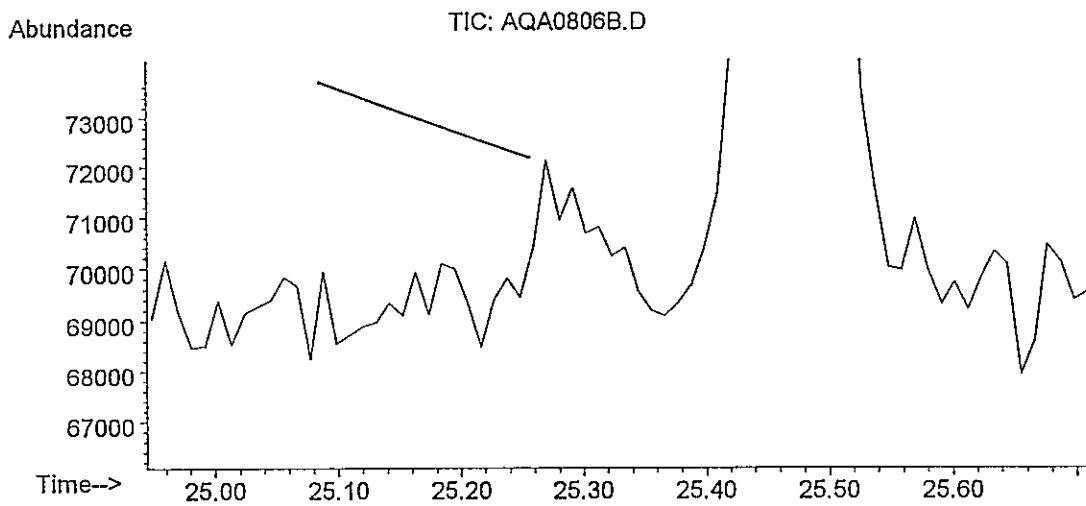


Bifenilo [ $M^+$ ] = 154 m/z

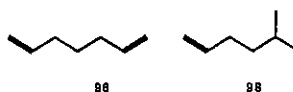


Otros fragmentos:

## Compuesto ah

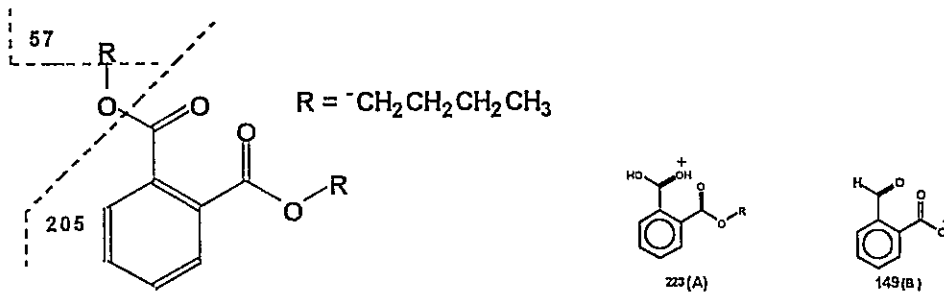
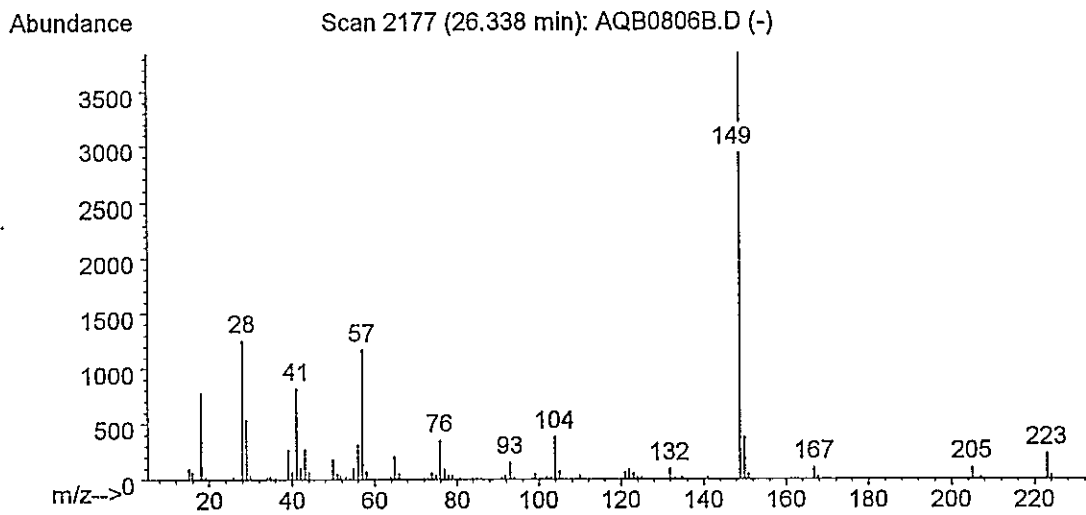
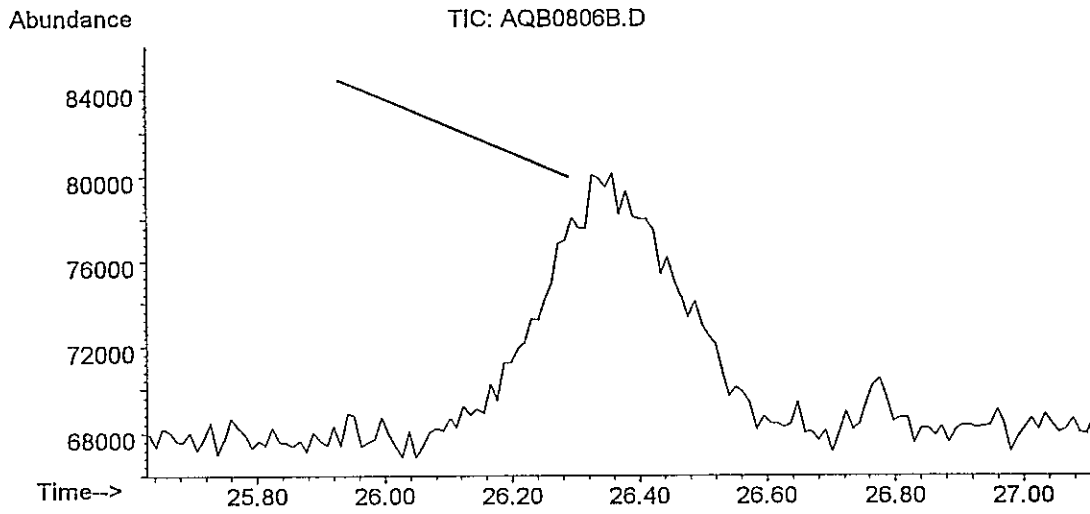


2-Metil-15-hexadecen-8-ona



Otros fragmentos:

## Compuesto ai



Ftalato de dibutilo

Otros fragmentos: A y B

## Identificación de compuestos por medio de Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas (CG/EM)

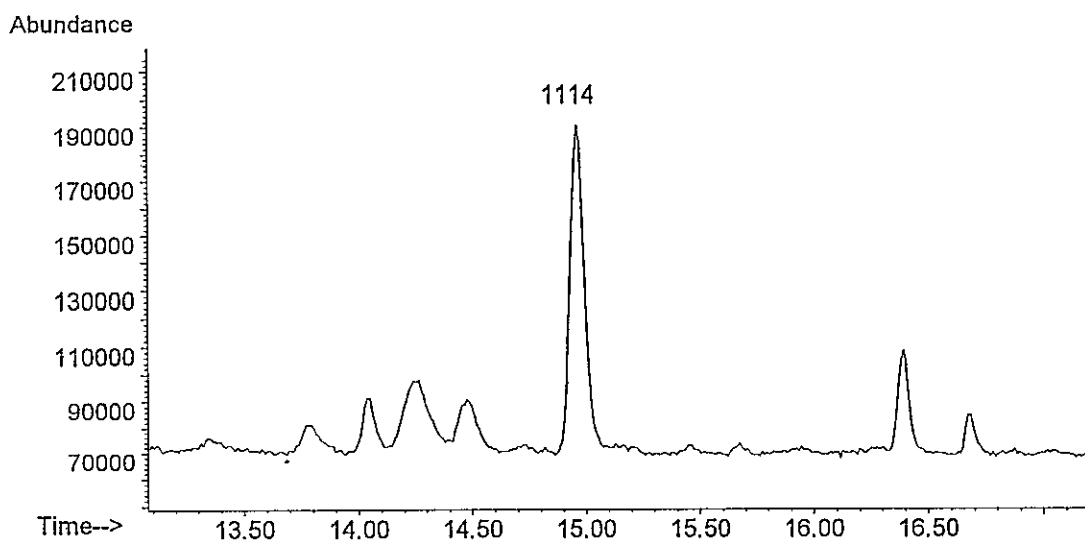
La metodología usada en la identificación de compuestos por medio de CG/EM.

fue la siguiente :

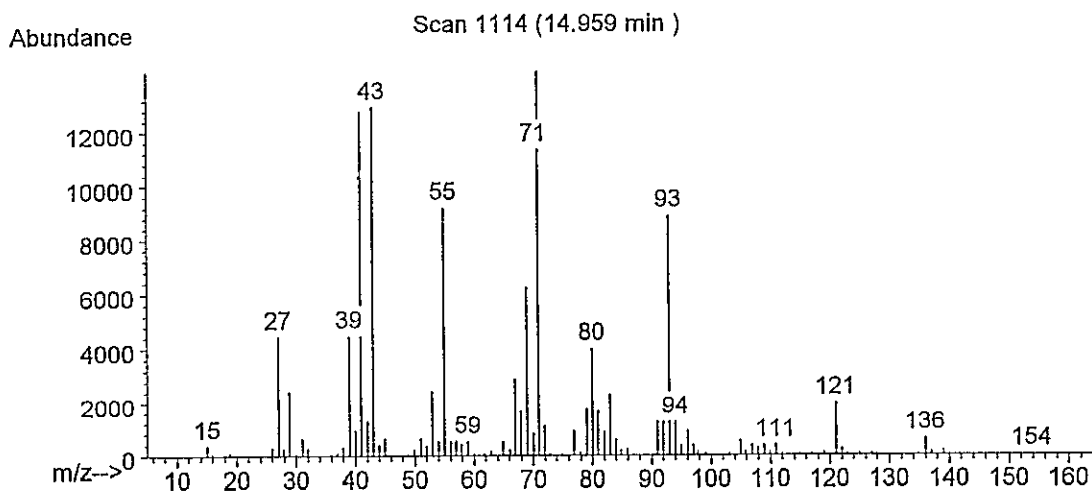
- 1) búsqueda en biblioteca de espectros de masas.
- 2) comparación visual de los espectros propuestos por la búsqueda en la biblioteca con el espectro de masas correspondiente al pico en cuestión.
- 3) determinación y comparación de los índices de retención de Kováts para los compuestos estándares y los respectivos compuestos presentes en los extractos.

A continuación se presentan tres casos en los cuales se aplican los pasos enumerados más arriba.

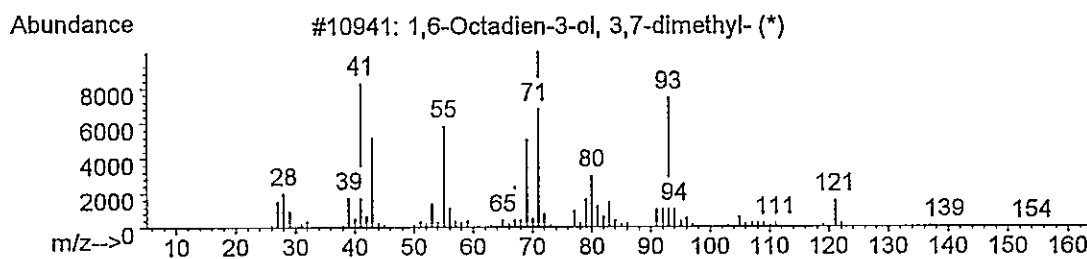
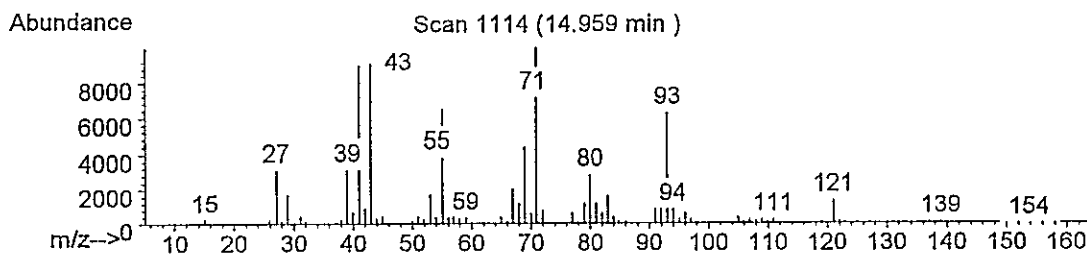
CASO 1 : En este ejemplo se muestra un buen ajuste entre lo sugerido por la biblioteca de espectros de masas y el espectro de masas del compuesto a identificar.



El espectro de masa correspondiente al barrido 1114 y a un tiempo de retención de 14,96 minutos se muestra a continuación :



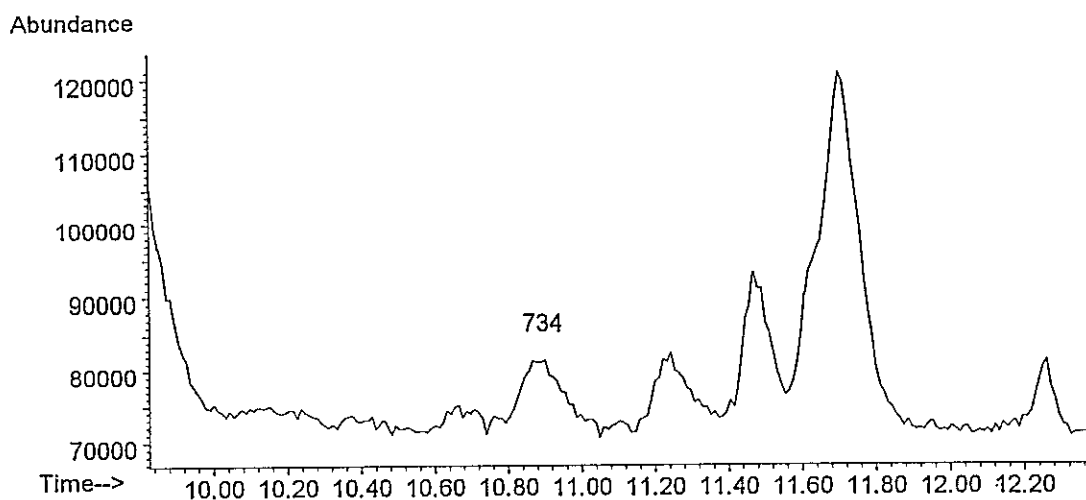
Posteriormente se efectuó una búsqueda en la biblioteca de espectros de masas la que arrojó los siguientes resultados :



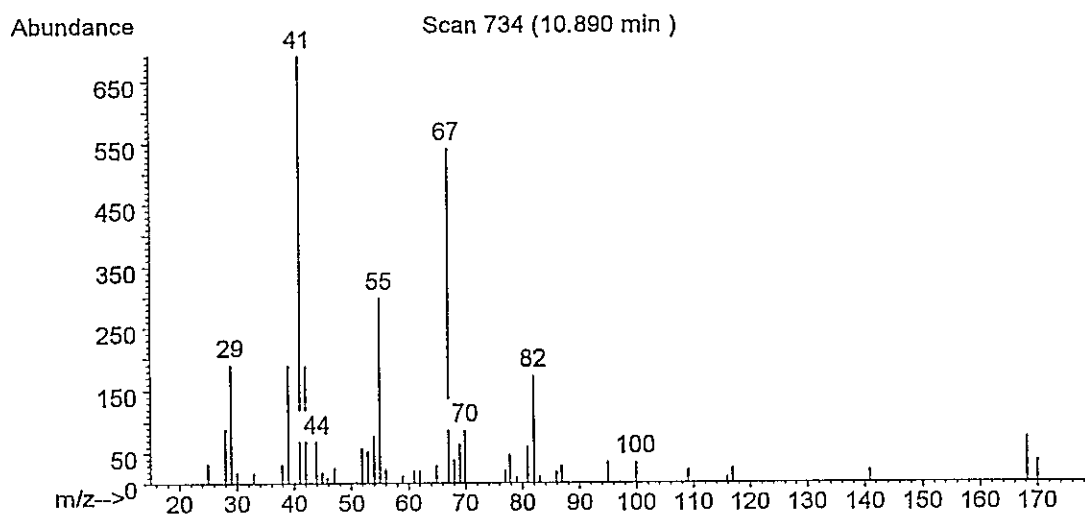
Este ejemplo muestra un caso en el cual se observó una buena correlación entre el compuesto sugerido por la búsqueda en la biblioteca de espectros de masas y el análisis visual [puntos 1) y 2)]. Los índices de Kováts para el compuesto en el extracto y para el estándar respectivo resultaron ser muy similares (1536 y 1538 respectivamente) [punto 3)]. La buena concordancia de todos estos hechos permitió identificar al barrido 1114 como linalol.



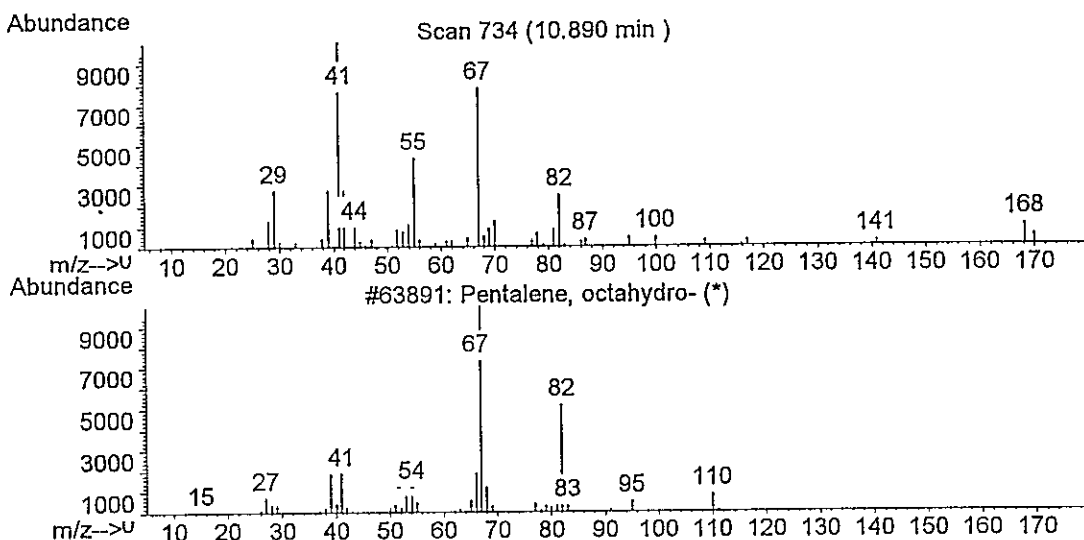
CASO 2 : Este ejemplo muestra un mal ajuste entre lo sugerido por la biblioteca de espectros y el espectro de masas correspondiente a un compuesto de baja abundancia.



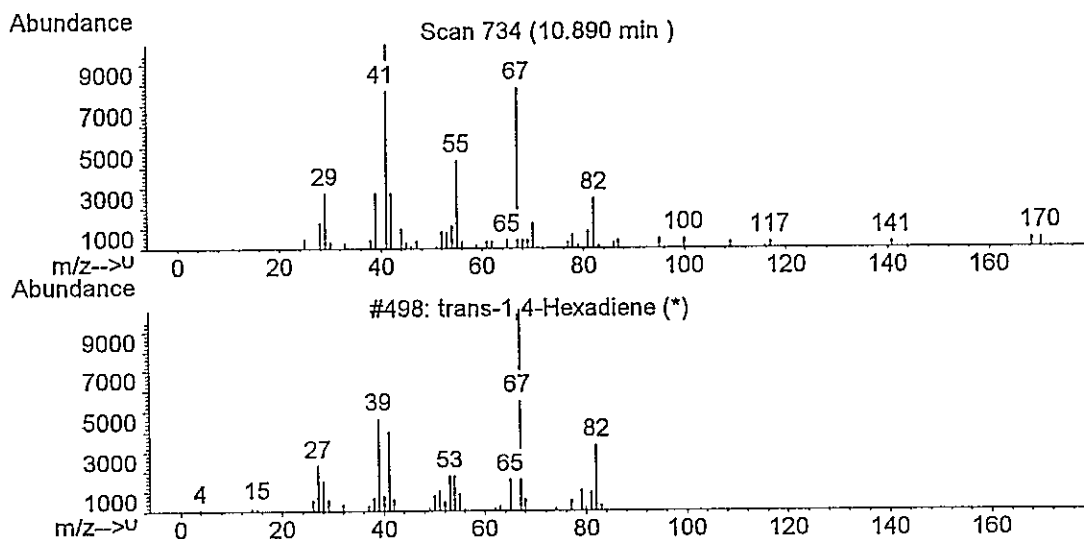
El espectro de masa correspondiente al barrido 734 y a un tiempo de retención de 10,89 minutos se muestra a continuación :



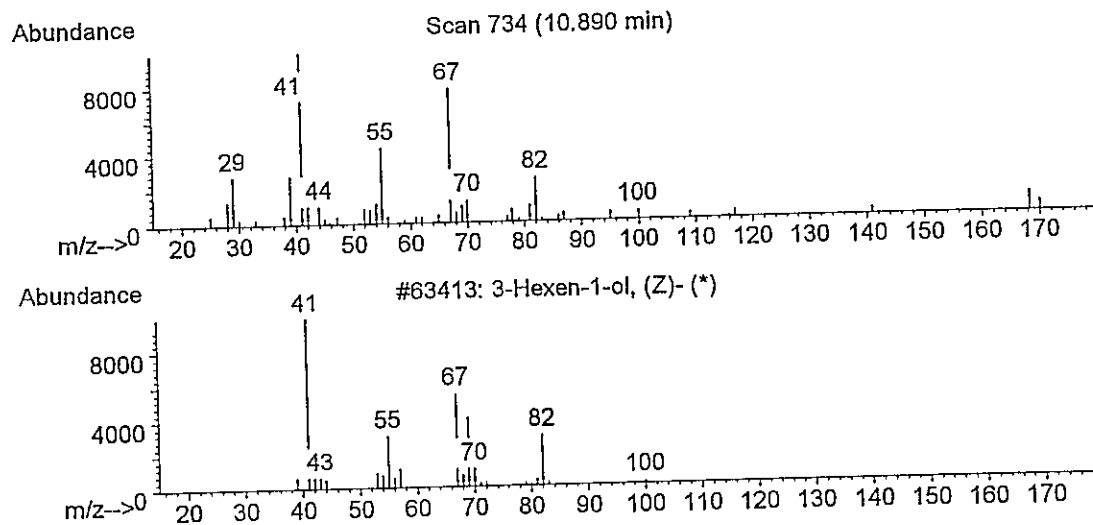
Posteriormente se efectuó una búsqueda en la biblioteca de espectros de masas la que arrojó los siguientes resultados :



Este fue el primer compuesto sugerido por la búsqueda en biblioteca cuyo índice de probabilidad fue de 50%. Este compuesto fue descartado ya que al compararlo visualmente se observó que el ión de  $m/z$  41 en el espectro de masas del compuesto de referencia no fue considerado como ión principal. La segunda opción se muestra a continuación. El índice de probabilidad fue de 47% y al igual que el ejemplo anterior, el espectro de masas del *trans*-1,4-hexadieno no presenta al ión de  $m/z$  41 como ión principal. Por lo tanto esta posibilidad también fue eliminada.

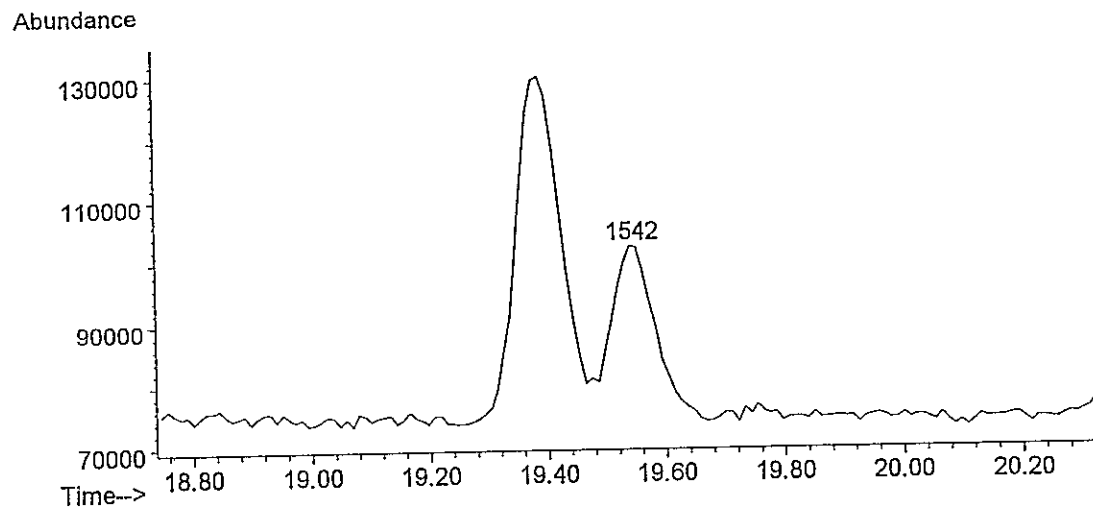


La tercera opción se muestra a continuación. El índice de probabilidad fue de 45%. En este caso el análisis comparativo visual permitió detectar la presencia de casi la totalidad de los iones en ambos espectros de masas

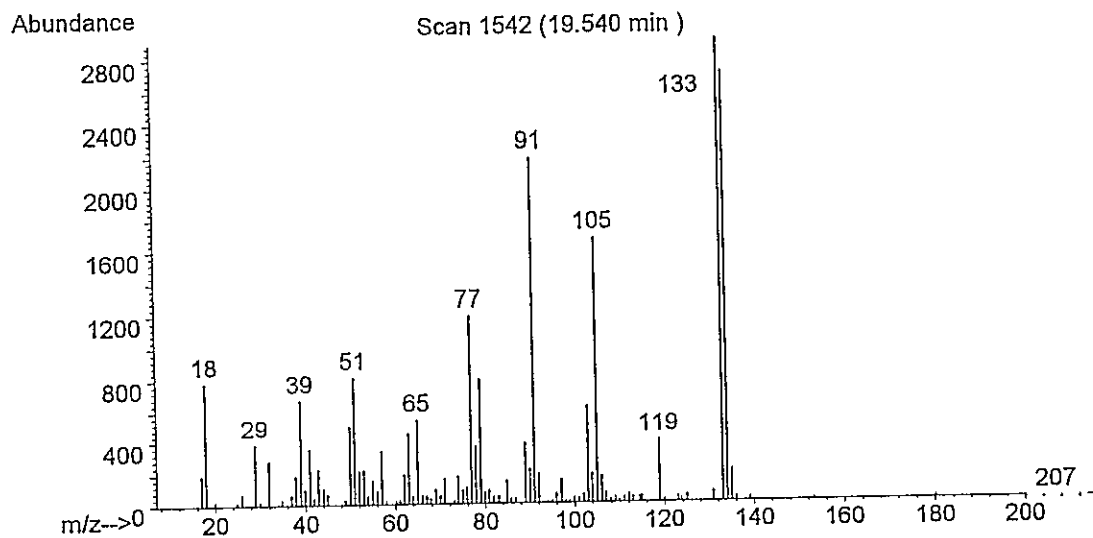


Los índices de Kováts para el compuesto en el extracto y para el estándar respectivo resultaron ser muy similares (1371 y 1370 respectivamente) [punto 3)]. La buena concordancia de todos estos hechos permitió identificar al barrido 734 como el (Z)-3-hexenol.

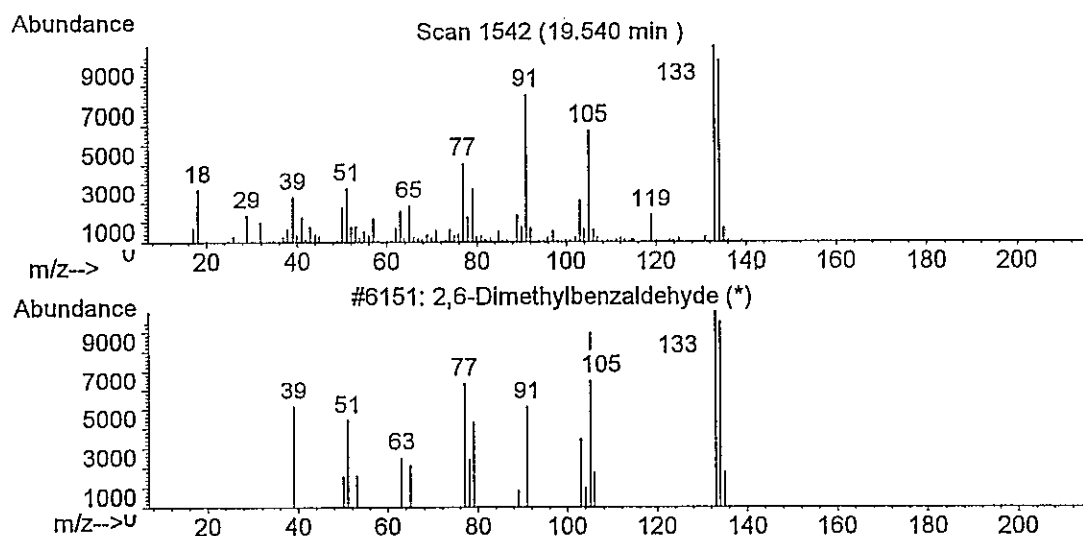
CASO 3 : Este ejemplo muestra un mal ajuste entre lo sugerido por la biblioteca de espectros y el espectro de masas correspondiente a un compuesto con una alta abundancia de iones.



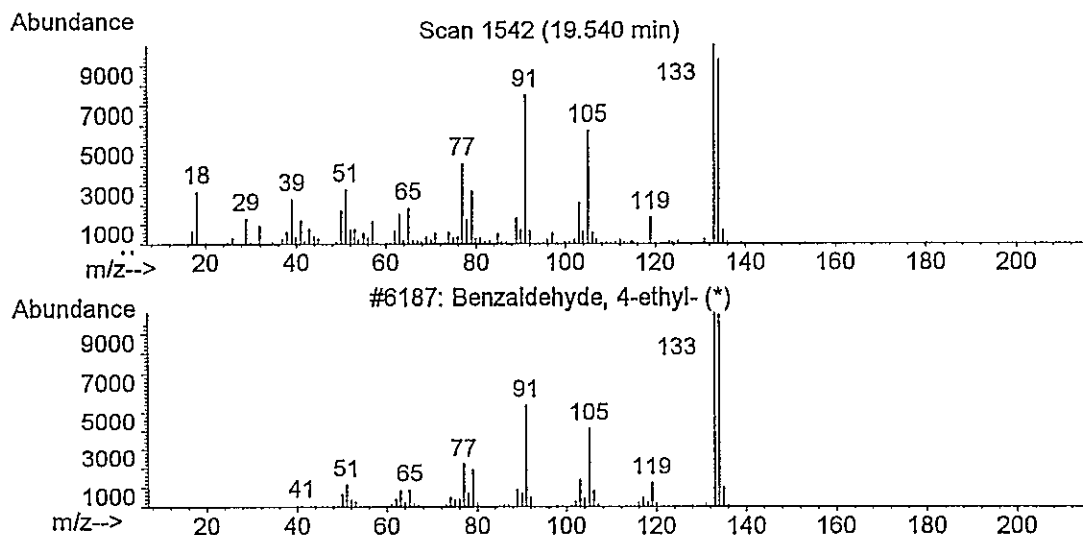
El espectro de masa correspondiente al barrido 1542 y a un tiempo de retención de 19,54 minutos se muestra a continuación :



Posteriormente se efectuó una búsqueda en la biblioteca de espectros de masas que arrojó los siguientes resultados :



A pesar de que el 2,6-dimetilbenzalhído fue el primer compuesto sugerido por la biblioteca (85% de probabilidad), este no contiene el ión de m/z 119. el cual sí se encuentra en el espectro de masas del 4-etilbenzalhído (83% de probabilidad).



Los índices de Kováts para el compuesto en el extracto y para el estándar del 4-etilbenzalhído resultaron ser muy similares (1739 y 1740 respectivamente) [punto 3].

La buena concordancia de todos estos hechos permitió identificar al barrido 1542 como el 4-etilbenzaldehído.