

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS UPERIORES
I Z T A C A L A**

**“Determinación de la concentración de flavonoides y lignina en
hojas de dos líneas de maíz con respuesta diferencial frente al
ataque por *Spodoptera frugiperda*. J. E. Smith (Lepidoptera:
Noctuidae)”**

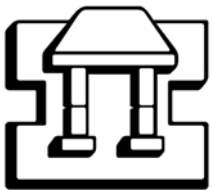
T E S I S P R O F E S I O N A L

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

N A N C Y L Ó P E Z G A S C A



IZTACALA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Fitoquímica del Departamento de Ecología y Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Patricia Guevara Fefer y la asesoría técnica de la M. en C. Josefina Herrera Santoyo y de el M. en C. José Luis Villarruel Ordaz.

El ensayo biológico se llevó a cabo en la unidad de Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la asesoría de el Dr. Eduardo Aranda.

Los estándares de maisina y apimaisina utilizados en el análisis por HPLC fueron aportados por el Dr. Snook (de Richard Russel Research Center, Athens, Georgia).

La siembra e infestación del material se llevo a cabo en la estación experimental Tlaltizapán, Mor. Del centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo con el apoyo del Dr. Bergvinson.

Dedico esta tesis especialmente a José López Jiménez y a Martha Gasca Durán.

Papá esta tesis es también uno de los frutos que sigues cosechando después de una vida llena de esfuerzos, trabajo, constancia, dedicación, entrega y entusiasmo; y como tu dices.

¡El que trabaja, tiene derecho!

Mamá porque siempre has sido un fuerte apoyo para mi, y de no ser por ti y los ánimos que me diste cada vez que flaqueaba, este trabajo seguiría esperando en una pc a ser concluido.

¡Con Amor para los dos!

¡Gracias!

A Ges, que has estado conmigo en los momentos felices y en los difíciles de mi vida, por todo el apoyo y porque siempre he visto en ti el significado de la fortaleza, la tenacidad y la responsabilidad.

A Bombis, por tu ejemplo de seguir adelante sin importar que tan adversas sean las circunstancias.

A mi Amor Salvador, que con tu ejemplo de vida he aprendido que todo esfuerzo tiene una recompensa y que no hay mejor recompensa que la que te dan el Amor, la Confianza, la Justicia y el Conocimiento.

¡Te Amo Chavi!

A mi tesoro Zoé porque al saber que venias al mundo me diste el ánimo para terminar esta Tesis.

¡Con Amor por ti y para ti mi beba hermosa!

A mi abuelita Sol por confiar en mi, por su apoyo y por enseñarme lo fuerte que puede ser una madre.

A mi abuelo Pas por su entusiasmo y enseñanza de vida.

Abel Gasca que siempre estuvo pendiente de mis logros académicos y personales y por sus consejos.

A Beto Gasca.

A mi tío Gustavo Ramírez.

A la Familia Uvalle Gasca.

A mis Amigos: Claudia, Lulú, Bety, Dolores, Gladis, de Marañ-Atha, de Danzarte.

AGRADECIMIENTOS

Especialmente a la Dra. Patricia Guevara Fefer por dirigirme en este trabajo, por sus consejos paciencia y todo su apoyo incondicional. ¡Por tu amistad!

A mis sinodales por su valiosa colaboración y comentarios para mejorar este trabajo.

M. en C. Cesar Mateo Flores Ortiz.

M en C. Alberto Arriaga Frías.

M en C. Ana Lilia Muñoz Viveros.

De una manera muy especial a la M. en C. Josefina Herrera Santoyo por ser, de cierta manera quien me exhortó a realizar la tesis en la Fac. de Ciencias, por su asesoría, su apoyo, consejos y comprensión. ¡De corazón, gracias Jose!

Un sincero agradecimiento al Dr. Eduardo Aranda por el apoyo en la realización del ensayo biológico y asesoría brindada para el análisis estadístico.

Al M. en C. José Luis Villarruel por el apoyo brindado en el análisis de HPLC y sus comentarios para mejorar este trabajo.

A la Biol. Beatriz Zúñiga por la información y asesoría brindada, por hacer la estancia en el lab. más amena y por ser amiga y hermana, ¡Gracias Bety!.

Al Maestro José Luis Contreras, al Biol. Michael González, Alvaro Filio y a todas las personas del lab. de Fitoquímica, que de un modo u otro me apoyaron en la realización de este trabajo.

A mis compañeros y amigos de Iztacala: Yeni, Alf, José Luis, Felipe, Gaby, Victor López, Elbita, Jaime, Claudia, Lety, Luis A. Cons, Fredy, Paco y todos.

Mis Maestros: Norma Ulloa, Rafael Quintanar, Beto Morales, José Luis Tello, Edith Franco, Sergio Chazaro, Francisco López, Gumersindo de la Cruz y Rocío.

A Milton Muñoz y Dora Robles por su apoyo incondicional y por todo lo que hemos compartido en estos últimos años.

A todas las personas que estuvieron conmigo en este largo proceso de estudio y titulación, que sin interés alguno me brindaron ayuda y consejos.

¡Gracias!

CONTENIDO

Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	4
- El Maíz	5
- Principales plagas de insectos que atacan al maíz	5
- Estudios químicos	7
- Flavonoides	9
Justificación	17
Objetivos	18
- Objetivo General	18
- Objetivos Particulares	18
Hipótesis	19
Diagrama metodológico	20
Material y Métodos	21
- Siembra e infestación del material	21
- Recolecta del material	21
- Secado y molienda del material	21
- Extracción de flavonoides	21
- Análisis de los extractos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución	22
- Determinación del porcentaje de lignina y celulosa	23
- Ensayo biológico	23
Resultados y Discusión	26
- Determinación de la concentración de flavonoides por HPLC	26
- Determinación del porcentaje de lignina y celulosa	34
- Ensayo biológico	36
Conclusiones	41
Bibliografía	44
Apéndice	48

RESUMEN

Considerando la importancia de los compuestos de tipo fenólico y su participación en ciertos cultivares frente al ataque por plagas de insectos, este trabajo realizó una evaluación acerca de la concentración de compuestos de tipo flavonoidico, lignina y celulosa en dos líneas de maíz con diferente tolerancia al ataque por el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*. Se colectaron hojas de ambas líneas en cuatro diferentes estadios de desarrollo y se hizo la determinación de seis flavonoides.

Los resultados obtenidos mostraron diferencias importantes en cuanto a la concentración de flavonoides, dándose un elevado contenido en la línea de maíz resistente en los primeros tiempos de recolecta.

El porcentaje de lignina también fue mayor en la línea resistente, sin embargo, la celulosa fue similar para ambas líneas durante los tiempos evaluados.

Por otra parte se realizó un ensayo biológico para determinar el efecto de las hojas recolectadas que se suministraron en la dieta artificial de *S. frugiperda* a fin de evaluar su desarrollo en términos de peso.

Los resultados acerca del ensayo muestran diferencias significativas en larvas alimentadas con las diferentes líneas, presentando mayor peso aquellas que estuvieron sometidas a la dieta con línea resistente; esto pudo deberse a los azúcares asociados tanto a flavonoides como a celulosa y lignina contenidos en dicha línea.

INTRODUCCIÓN

Es conocido que numerosas especies vegetales se encuentran afectadas por una gran cantidad de organismos, entre los que se incluyen hongos, bacterias, plantas parásitas e insectos, entre otros. Frecuentemente, una especie vegetal puede ser atacada por diferentes organismos y los daños pueden ser de diferente intensidad.

Las condiciones de estrés a las que se encuentran constantemente sometidas las plantas, pueden ser de tipo biótico y abiótico. Dentro de las condiciones de tipo biótico cabe destacar el estrés producido por especies de insectos plaga, siendo varias las respuestas que suelen exhibir las especies vegetales que se ven atacadas. Una de las respuestas de las plantas (ampliamente estudiada) es la producción de compuestos químicos, derivados del metabolismo secundario.

Gran parte del conocimiento sobre la química de las plantas, tanto en calidad nutricional, como de compuestos secundarios, se debe a las investigaciones realizadas en plantas de interés agrícola y sus plagas asociadas (Granados y López,1996). Las investigaciones sobre variedades de plantas resistentes a plagas, abarcan principalmente aspectos biológicos y bioquímicos; teniendo en cuenta aspectos de alimentación, oviposición y reproducción de la plaga, auxiliándose de técnicas de infestación, muestreo y evaluación de las plantas.

El uso de la resistencia varietal en las plantas cultivadas constituye un método promisorio en la lucha y combate contra los enemigos naturales y el conocimiento de los mecanismos que rigen la respuesta en los principales cultivos algunas veces es poco conocido.

Las plantas pueden desarrollar diferentes mecanismos de respuesta frente a las condiciones adversas a las que se encuentran sometidas, estos pueden ser las modificaciones morfológicas (espinas, púas o pelos irritantes) (Anaya, et al.,2001 y Harborne,1985) así como los mecanismos que implican la producción

de compuestos secundarios que a su vez tienen importancia ecológica ya que pueden funcionar como sustancias alelopáticas o bien como fitoalexinas (disuasorios nutritivos) repelentes de insectos o insecticidas muy potentes (Azcon,1993). Entre estos compuestos secundarios se encuentran las quinonas, alcaloides, terpenos y flavonoides entre otros (Granados y López,1996).

Teniendo en cuenta la importancia del maíz en nuestro país, el grado de ataque al que se ve constantemente expuesto por plagas de insectos en sus diferentes etapas de desarrollo, así como trabajos previos en los que se informa la participación de compuestos químicos; en este trabajo se realizó la evaluación y determinación de algunos flavonoides presentes en plantas de dos líneas de maíz con respuesta diferencial frente al ataque por el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E. SMITH (Lepidoptera: Noctuidae).

ANTECEDENTES

En la biosfera las plantas se encuentran sometidas a diversas condiciones a las que se adaptan en tanto lo permita su genoma. En un sentido amplio, algunas condiciones ambientales son desfavorables en cuanto se apartan del intervalo óptimo de crecimiento y multiplicación de la planta (Barceló,1992). Son numerosas las condiciones de estrés a las que pueden estar sometidas las plantas, estrés que conlleva a una alteración de los procesos fisiológicos de las mismas y, por lo tanto, a una disminución en el aprovechamiento de las especies que son potencialmente importantes en la agricultura.

Es frecuente que bajo condiciones consideradas como adversas para la mayoría de las plantas, las especies han desarrollado mecanismos para soportar estos cambios drásticos y viven de una forma habitual en esos ambientes extremos. Las plantas poseen cierta resistencia inherente contra algunos herbívoros. Dicha resistencia va, desde los mecanismos de escape temporal (fenológicos), a la biosíntesis de moléculas orgánicas complejas. Entre ambos mecanismos existe una vasta serie de características físicas y morfológicas que afectan el comportamiento y los procesos metabólicos del herbívoro al utilizar la planta como huésped.

Desde el punto de vista del aprovechamiento práctico de la resistencia de las plantas a los insectos, el mayor interés existe en torno a características que vuelven a la planta inadecuada para un insecto que, de otra manera, estará bien adaptado para alimentarse u ovipositar sobre las variedades "no resistentes" de la misma especie vegetal (Maxwell, et. al.,1984)

Entre los mecanismos de defensa que han desarrollado las plantas se pueden citar los siguientes:

- físicos (espinas y tricomas, follaje fibroso o resinoso, cutícula y corteza endurecidas, gruesas y suberizadas, paredes celulares lignificadas)
- fenológicos (etapas del ciclo de las plantas que se desfasan de los tiempos en que aparecen los herbívoros o patógenos)

- de asociación (relaciones mutualistas con diversos organismos, por ejemplo; hormigas, hongos, bacterias)
- químicos de gran importancia para las plantas, basados en los metabolitos secundarios tóxicos o repelentes que las plantas producen (ductos o cavidades llenos de resinas, paredes celulares impregnadas de fenoles, células que contienen metabolitos secundarios diversos) (Anaya, 2003).

EL MAÍZ

Es importante considerar que existen especies de interés agronómico entre ellas las gramíneas y dentro de este grupo el maíz, especie muy importante en la agricultura de numerosos países.

En México el maíz representa uno de los cultivos más importantes ya que es una de las principales fuentes alimenticias de la familia mexicana y su consumo por persona es de 180 kg anuales. Otro aspecto de importancia radica en que la superficie dedicada a la producción de este grano es del 43% de la superficie agrícola. Del total de la superficie que se dedica al cultivo del maíz, el 75% está sujeto a las condiciones del temporal así como a una serie de factores limitantes entre los que se encuentran los problemas de plagas y enfermedades, las cuales en algunas ocasiones llegan a mermar considerablemente la cosecha y a causar grandes pérdidas. De aquí la importancia económica sin dejar de mencionar el aspecto cultural (Castañeda,1990; Raven y col., 1992; SARH,1980).

PRINCIPALES PLAGAS DE INSECTOS QUE ATACAN AL MAÍZ

En la mayoría de los ambientes donde se cultiva el maíz, existen diversos factores que limitan su producción; uno de los factores bióticos de mayor influencia en las pérdidas de este cultivo está representado por las plagas de insectos ya que son capaces de infestar y atacar, destruir o consumir a la planta en cualquier etapa de su desarrollo, frecuentemente con graves consecuencias (Serratos,1993; SARH,1980).

Entre los insectos que son considerados como plagas importantes que afectan los sistemas de cultivo de maíz se han reportado 28 especies de las cuales se mencionan algunas como: *Diabrotica undecimpunctata* (catarinita), *Oligonychus mexicanus* (araña roja), *Mochis latipes* (gusano falso medidor) *Heliothis zea* = *Helicoverpa zea* (gusano elotero), *Heliothis virescens*, *Diatraea grandiosella* (gusano barrenador) y *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero) (Ortega,1987; Kennedy, 2000; García,1981).

Spodoptera frugiperda J. E. SMITH (Lepidoptera:Noctuidae)

Esta plaga es conocida como gusano cogollero y se encuentra dentro del grupo de las palomillas. Está distribuida desde el Norte de Estados Unidos hasta América del Sur, en México se encuentra en toda la república, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, registrándose los mayores daños en los estados de Michoacán, Morelos, Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Yucatán y Quintana Roo. Este insecto ataca a la planta de maíz, causando destrozos desde la etapa de plántula hasta la premadurez, se ha encontrado también en cultivos como: sorgo, caña de azúcar, algodón, entre otros (Ortega,1987; SARH,1980; Robles,1994).

Biología y Hábitos.

El adulto es una palomilla de color café grisáceo que mide de 20 a 25 mm de largo por 3.5 cm de expansión alar.

El gusano es de color café con tres bandas de color claro en el dorso a lo largo del cuerpo y en su máximo desarrollo llega a medir 3 cm de longitud.

La palomilla es de hábitos nocturnos; durante el día permanece escondida en las grietas del suelo. Durante el ciclo biológico de este insecto la hembra deposita los huevecillos de color blanco rosado o verde claro en grupos de 50 a 100 sobre el envés de las hojas los cuales quedan cubiertos por un material algodonoso de color blanco. En 4 ó 5 días ocurre el nacimiento de los gusanos; después de la eclosión las larvas comienzan a alimentarse raspando el envés de las hojas tiernas (en las primeras dos etapas) causando un manchado característico, más

tarde pasan al verticilo foliar (cogollo), donde comen de manera voraz; en gran densidad pueden matar a las plantas jóvenes por defoliación o destruir los puntos de crecimiento. Las larvas pasan en 14 ó 21 días por 5 ó 6 etapas, dependiendo de la temperatura y el tipo de alimento. Las larvas grandes también pueden actuar como gusanos cortadores, enterrándose en el suelo durante el día y por la noche cortando plantas hasta de un mes de desarrollo, mediante túneles que perforan en la base del tallo. Las larvas completamente desarrolladas se introducen a pocos centímetros del suelo para iniciar la etapa de pupa; las pupas son de color café de 18 a 20 mm de largo. Al paso de una semana emergen los adultos (Ortega,1987; SARH,1980).

ESTUDIOS QUÍMICOS

Se tiene registro de estudios realizados con plantas de maíz y algunas plagas de insectos que lo atacan, en los cuales se destaca la importancia de aspectos químicos y morfológicos como mediadores en la resistencia de los cultivares, considerándolos como repelentes o inhibidores de la oviposición y desarrollo de los insectos considerados plaga.

En 1987 Serratos y col., reportaron el efecto de extractos de granos de maíz que contenían ácidos fenólicos, adicionados a dietas artificiales de *Sitophilus zeamais*, encontrando que los extractos inhiben el consumo alimenticio del insecto.

Se han realizado trabajos donde se reporta que la resistencia de ciertos genotipos de maíz como el "Zapalote chico" frente a *Heliothis zea*, está asociada con la toxicidad de sus estigmas. En 1989, Snook y col., hicieron un análisis de flavonoides utilizando cromatografía líquida de alta resolución, y demostraron que la actividad de los estigmas puede atribuirse a un flavonoide identificado como maisina (2"-O- α -L- ramnosil-6-C-6-desoxi- xilo-hexo-4-ulosil luteolina), siendo un factor de antibiosis en la resistencia.

En 1992 Wiseman y col., evaluaron el efecto de la maisina, ácido clorogénico, apimaisina y 3- metoximaisina, compuestos presentes en estigmas de

diferentes variedades de maíz sobre el crecimiento de las larvas de *Helicoverpa zea*, encontrando que el peso de las larvas disminuye al suministrarles estos compuestos. Además se encontró que la maisina es un factor de antibiosis en la resistencia en mayor proporción que el ácido clorogénico.

Bergvinson (1993) registró que la resistencia del maíz frente al barrenador europeo del maíz *Ostrinia nubilalis* (Hübner), es atribuido a DIMBOA (2,4-dihidroxy-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona), un ácido hidroxicinámico, el cual disminuye el desarrollo e incrementa la mortalidad.

Guang Yong y Wiseman (1994) estudiaron la importancia que ejercen los lípidos cuticulares en las hojas de plantas frente a *Spodoptera frugiperda*. Las larvas muestran preferencia sobre hojas a las que se les ha removido los lípidos cuticulares.

Smith (1994) reporta la resistencia de algunas variedades de maíz basada en el ácido hidroxicinámico DIMBOA (2,4-dihidroxy-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona) presente en hojas de variedades resistentes. La presencia de glucósidos de flavonas como la maisina y glucósidos de luteolina se ha encontrado en estigmas de variedades resistentes, considerados como aleloquímicos que afectan el crecimiento de muchas plagas insectiles del maíz. Así mismo se reportan factores morfológicos incluyendo el incremento en el contenido de fibras en hojas así como un aumento en el contenido de sílice y tricomas en tallos y hojas.

Por otro lado, Williams y Davis (1994) indican que el suministro de hojas de variedades resistentes en la dieta artificial de larvas de *S. frugiperda* y *D. grandiosella*, provoca efectos negativos en su crecimiento y desarrollo.

Wiseman y col.,(1995) citan que el suministro de estigmas en la dieta artificial de *D. grandiosella* y *S. frugiperda*; prolonga el tiempo de desarrollo larval y reduce el peso de la pupa; así como el porcentaje de fecundidad de los insectos.

En otra investigación se encontró que diferentes genotipos de maíz tienden a reducir el valor nutricional cuando son atacadas por larvas, disminuyendo el contenido de nitrógeno y elevando los niveles de ácidos fenólicos en fibras de la pared celular (Bervinson y col.,1995).

Guevara y col. (1996) determinaron con perfiles cromatográficos de flavonoides, ácido clorogénico y ferúlico en cuatro líneas de maíz con respuesta diferencial al ataque de *Spodoptera frugiperda*, en dos etapas de crecimiento de la hoja; que las líneas resistente e intermedia para la primer etapa presentan mayor cantidad de flavonoides. Mencionan una posible participación de los compuestos analizados en la resistencia de hojas al ataque de insectos.

Zúñiga (1998) encontró que la concentración de ácidos fenólicos tales como: ácido ferúlico, ácido cumárico; y flavonoides como la maisina y compuestos análogos, fue mayor en plantas de maíz resistentes al ataque por gusano barrenador y gusano cogollero, lo que puede indicar la participación de estos compuestos en la resistencia de las plantas frente a dichas plagas.

Raven y col. (1998) (citado en Contreras,2001) reportan la presencia de compuestos fenólicos implicados en la resistencia de plantas ante estrés abiótico (herbicidas) y biótico (plagas), encontrando quercetina, campferol y ácidos hidroxicinámicos en hojas, así como derivados del ácido sinápico en semillas.

En 1998 Guevara y col. determinaron la concentración de ácido cumárico y ferúlico en hojas de líneas de maíz resistente y susceptible a gusano cogollero y barrenador, en tres etapas de desarrollo. Encontraron que las plantas infestadas con gusano cogollero muestran mayor concentración de ácidos fenólicos que las infestadas con gusano barrenador.

Guevara y col. (2000) encontraron que el contenido de flavonas en estigmas de maíz difiere entre líneas con respuesta diferencial al ataque por *Diatraea grandiosella* y *Spodoptera frugiperda*, reportan que el principal compuesto para las líneas resistente e intermedia es la apimaisina, y para la susceptible es 3metoximaisina. Sugieren un mecanismo de defensa de la planta diferente frente a cada insecto.

FLAVONOIDES

Los flavonoides constituyen uno de los grupos más característicos de compuestos secundarios en angiospermas, gimnospermas y helechos. Su nombre

proviene de la coloración amarilla (Lat. *flavus* = amarillo) de algunas sustancias pertenecientes a este grupo (Hess,1980). Su estructura química se basa en un esqueleto de 15 átomos de carbono. Los flavonoides son compuestos producidos por una síntesis mixta debido a que parte de la molécula se forma por la ruta del ácido shiquímico (anillo B), mientras que el anillo A se sintetiza a partir de los policétidos y el oxígeno del anillo central se deriva de unidades proporcionadas por el Acetil CoA .

La diferencia entre los distintos grupos de flavonoides se presenta en la estructura básica (tipo de compuesto, grado de hidroxilación, metilación y/o isopentilsustitución), el grado de polimerización (monómero, dímero y oligómero) y el tipo de conjugación (glucósidos ésteres malónicos, ésteres sulfato) (Azcon, 1993). La mayoría de los flavonoides tienen hidroxiladas las posiciones 5, 7 y 4' variando únicamente en el nivel de oxidación en el anillo A y B. Los grupos hidroxilo sirven como puntos de unión para varios azúcares que incrementan la solubilidad de los flavonoides en agua. Los tres grupos de flavonoides más abundantes y de particular interés en fisiología vegetal son las antocianinas, las flavonas y los flavonoles (Avendaño,1996).

Entre las antocianinas encontramos a la cianidina, delphinidina, poenidina, malvidina y pelargonidina. Entre las flavonas encontramos a la luteolina, apigenina y crisina. Ejemplo de los flavonoles son quercetina, miricetina, morina, rutina y campferol (Harborne,1985). (cuadro 1)

Grupo de flavonoides más abundantes	
Flavonoides: Antocianinas	Ejemplos cianidina, delphinidina, poenidina malvidina, pelargonidina
Flavonas	luteolina, apigenina, crisina
Flavonoles	quercetina, miricetina, morina rutina, campferol

Cuadro1.- Ejemplos de diversos grupos flavonoides (Harborne,1985)

Los flavonoides, desempeñan funciones importantes para la planta productora y para el medio que la rodea (interacciones ecológicas). La biosíntesis de diversos flavonoides en plantas ha evolucionado respondiendo a cambios en el ambiente. Han sido implicados en la fisiología y su contenido en tejidos vegetales está fuertemente influenciado por factores ambientales y hormonales (Barceló,1992).

Por otro lado, los flavonoides también incrementan la protección en hojas expuestas a excesos de rayos UV. La mayoría de los autores sugieren que la acción fundamental de los flavonoides es esencialmente ecológica, ya que proporcionan a las plantas y flores colores que atraen a los polinizadores y dispersores de semillas y como contraparte pueden funcionar como disuasorios nutritivos frente a herbívoros, patógenos y en general animales fitófagos (Azcon 1993). Algunos flavonoides pueden actuar como guías- miel o marcas-guía formando parte de la pigmentación floral.

Entre las sustancias secundarias estimulantes de la alimentación de insectos encontramos los diferentes flavonoides con función atrayente (cuadro 2) (Harborne, 1985).

Atrayente químico	Planta anfitriona	Especie de insecto
Flavona: 6-metoxiluteolina-7- ramnosido	<i>Alternanthera</i> <i>phylloxeroides</i>	Escarabajos: <i>Agasicles sp.</i>
Flavonoides: taxifolina, pinocembrina, dihidrocampferol	<i>Prunus spp</i>	Escarabajo: <i>Scolytus mediterraneus</i>
Flavonoide: catequina-7-xilósido	<i>Ulmus europea</i>	Escarabajo: <i>S. Multistriatus</i>
Flavonoides: Isoquercetina, Morina	<i>Morus nigra</i>	Mariposa nocturna: <i>Bombyx mori</i>

Cuadro 2.- Flavonoides con función atrayente en diferentes especies.
Tomado de Harborne, 1985.

Cabe mencionar que la simple sustitución de un azúcar por otro en la molécula del flavonoide pueda tener efectos drásticos en la alimentación del insecto y pasar de ser un estimulante alimentario a un disuasorio. Por ejemplo, si la quercetina 3-glucósido es reemplazado por el 3-ramnósido o por el 3-rutinósido, es activado un receptor sensitivo a repelentes químicos, y el insecto deja de comer (Horowitz, 1964 citado en Harborne, 1985). Lo mismo ocurre con otras moléculas como el aminoácido L-alanina que es un estimulante alimentario del perforador de maíz europeo *Ostrinia nubilialis* (Hübner), mientras que el isómero β -alanina es disuasorio (Becker, 1960 citado en Harborne, 1985). La sacarosa y la glucosa suelen ser los compuestos preferidos por los insectos, pero se piensa que no sólo su valor energético es el responsable de su popularidad, su dulce sabor parece ser definitivo para la selección (Bernays, 1991). Diversos glicósidos de flavonas y flavonoles que se encuentran en las hojas pueden ser importantes disuasorios; se sabe que glicósidos de flavonoles corrientes como la rutina y la isoquercetina son tóxicos para varios insectos que se alimentan de plantas de algodón y tabaco (Barcelo, 1992).

Entre los flavonoides disuasorios encontramos los glicósidos de quercetina de la planta *Gossypium barbadense* que funcionan como repelentes de comensales como *Heliothis zea* (Harborne,1985).

Se ha encontrado que en plantas de avena los flavonoides se localizan en etioplastos de las hojas y se encuentran en forma de glucósidos. En hojas de plantas de tomate a medida que alcanzan la madurez, muestran una disminución en el contenido de quercetina y un aumento en el de campferol. El fotoperiodo y las diferencias nutritivas también influyen sobre el contenido de flavonoides (Barceló,1992).

Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se encuentran presentes en la gran mayoría de las plantas y son importantes porque se transforman en varios derivados combinados con proteínas, como fitoalexinas, diversos flavonoides (antocianinas) y lignina que además de la función de sostén, también proporciona protección contra el ataque de patógenos y el consumo por insectos (Swain,1979., Salisbury,1994). En los diferentes estadios de desarrollo de la planta la concentración de estos compuestos puede incrementar, según el daño en la planta en defensa ante el ataque de un depredador (Morse, y col. 1991).

Los ácidos fenólicos se pueden dividir en dos grupos: los solubles o libres y los ligados a pared celular; generalmente el contenido de ácidos fenólicos conjugados es más abundante en comparación de los ácidos fenólicos libres (Bergvinson,1993). Los ácidos ferúlico y cumárico son los principales constituyentes fenólicos de la pared celular de las gramíneas, y los que más prevalecen en hoja y grano de maíz (Hartley y col.,1978 citado por Bergvinson, 1993).

Por otro lado la pared celular está compuesta principalmente de azúcares dispuestos en polisacáridos de composición y estructura variable, ácido hidroxicinámico, lignina, proteínas, iones y agua, esta pared se comienza a formar entre las células que finalizan su división. La celulosa está constituida principalmente por microfibrillas cristalinas, lineales de alto peso molecular,

formando polímeros de moléculas de D-Glucosa, Las microfibrillas de celulosa están inmersas en una matriz de otros materiales que son químicamente más complejos. Entre estos los principales son las hemicelulosas; otras sustancias muy relacionadas son las sustancias pépticas.

La presencia de paredes celulares condiciona de forma fundamental la fisiología celular y participa en numerosos procesos, por ejemplo:

- Permite a las células vivir en ambientes hipotónicos, acumulando solutos en su protoplasto a concentraciones superiores a las del apoplasto.
- Proporciona la forma a las células así como resistencia mecánica, siendo la principal responsable de la textura de los vegetales.
- Constituye una barrera física y química frente a los patógenos.
- Controla el transporte intercelular en base a la porosidad de sus redes estructurales y/o a la acumulación de sustancias impermeables.

Las hojas y tallos juveniles están formados por células que tienen principalmente paredes primarias (Salisbury,1994). Las paredes secundarias se componen de un 41 a 45% de celulosa, 30% de hemicelulosa y en algunos casos un buen porcentaje de lignina. La lignina es mucho más rígida que la celulosa (Salisbury,1994).

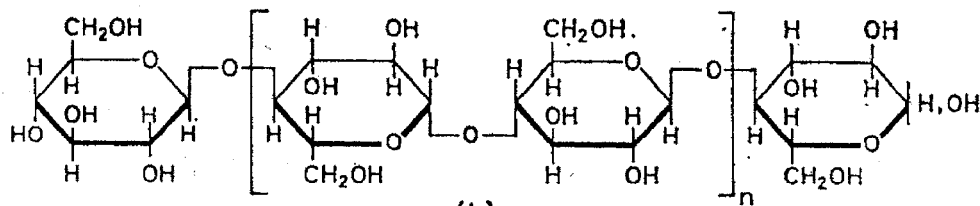


Figura 1.- Estructura de la Celulosa. Tomado de Gascoigne, et al., 1960

Las ligninas son componentes de la pared celular de varios tipos de células vegetales como fibras, vasos y traqueidas; constituyendo entre un 20 y 30 % del peso seco de la pared. Son grandes polímeros que se encuentran en forma de masas amorfas incrustadas en las fibras de celulosa, confiriendo rigidez a la pared, a la vez que protegen a las células frente al ataque de patógenos y al

consumo por insectos y vertebrados (Salisbury,1994). Se encuentran distribuidas en todas las plantas terrestres (Azcon,1993).

Las ligninas se forman a partir de derivados glucosilados de los alcoholes *trans*-cumarílico, *trans*-coniferílico, y *trans*-sinapílico. Estos compuestos son incorporados en diferentes cantidades, según el nivel de evolución alcanzado por los vegetales, en los organismos más evolucionados aumenta la cantidad de alcohol cumarílico y sinapílico en las ligninas (Azcon,1993); también puede variar según la edad y la especie vegetal (Hess,1980).

En la siguiente figura se muestra la ruta de biosíntesis general de la lignina.

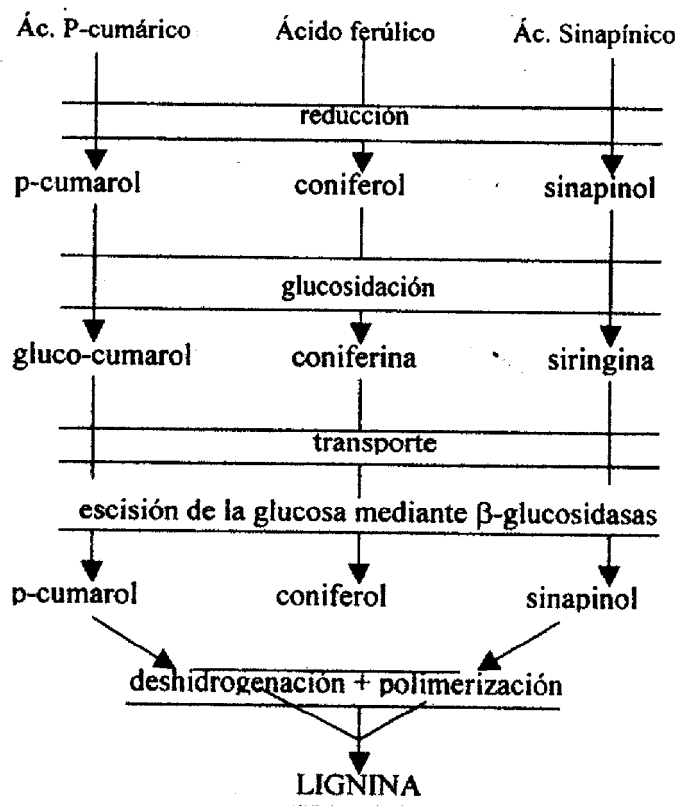


Figura 2.- Ruta de biosíntesis de la lignina (Hess,1980).

La lignina es insoluble en la mayoría de los disolventes, esto se debe en gran parte a su peso molecular elevado; además en estado natural se encuentra químicamente unida a la celulosa y otros polisacáridos de la pared celular

mediante enlaces éter y quizá de otros tipos a los grupos hidroxilo de los polisacáridos. Todos los alcoholes aromáticos de la lignina se originan en la ruta del ácido shiquímico (Salisbury, 1994)

JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia del maíz y teniendo en cuenta los efectos negativos que se generan por causa de las diversas plagas de insectos, se han realizado estudios al respecto de la biología de estos organismos; así como análisis fitoquímicos orientados a conocer los mecanismos de respuesta de numerosas especies vegetales de importancia agrícola como lo es el maíz.

Con base en trabajos previos y bajo la premisa de que algunos compuestos secundarios del grupo de los flavonoides tienen un papel importante en el mecanismo de respuesta ante el ataque de plagas como *S. frugiperda*, se consideró importante realizar el presente trabajo a fin de analizar el contenido de flavonoides así como de lignina y celulosa en dos líneas de maíz, además de la realización de un ensayo biológico, suministrando hojas de las dos líneas en la dieta artificial de *S. frugiperda*.

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes acerca de los compuestos de tipo fenólico en plantas de maíz, en este trabajo se plantea como Objetivo General.

- ❖ Evaluar la concentración de algunos flavonoides, así como el porcentaje de lignina y de celulosa, en hojas de maíz de dos líneas infestadas con *Spodoptera frugiperda* y con respuesta diferencial frente al ataque por la misma especie, a fin de correlacionar estos parámetros con diferentes estados de desarrollo de las hojas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Determinar si la concentración de flavonoides, el porcentaje de lignina y celulosa varían durante el desarrollo activo de las hojas en dos líneas de maíz previamente infestadas con larvas de *S. frugiperda*.
- ❖ Evaluar el desarrollo y crecimiento del insecto en términos de talla y peso, después del suministro de hojas de maíz de diferente estado de desarrollo en la dieta artificial de las larvas.

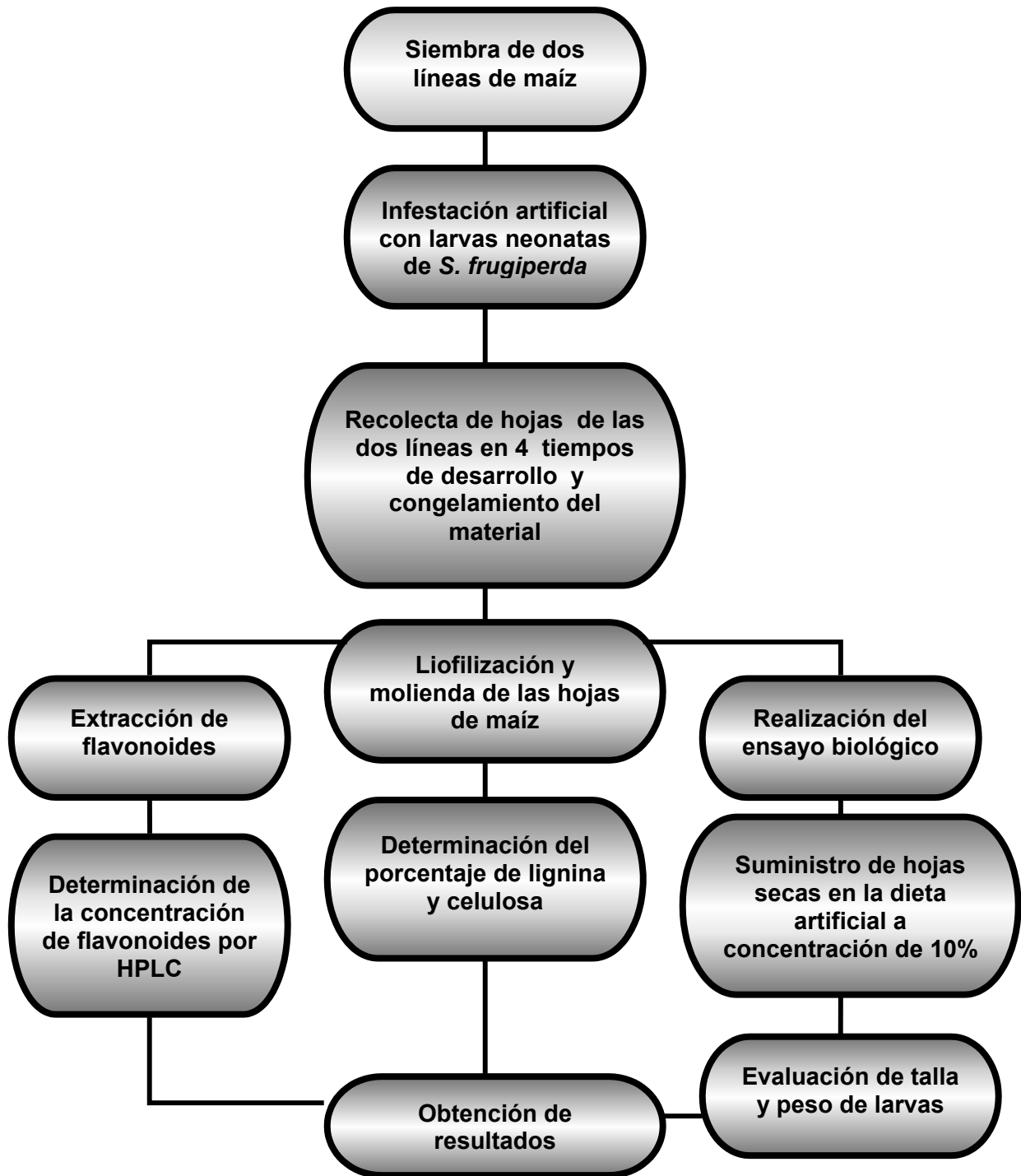
HIPÓTESIS

Considerando la presencia de los compuestos de tipo fenólico y flavonóidico como una respuesta a diferentes condiciones de estrés en especies vegetales como el maíz, se plantean las siguientes hipótesis:

- Si la producción de flavonoides es una respuesta de defensa ante el ataque por *Spodoptera frugiperda*, entonces la línea resistente (CML67) presentará una mayor concentración y/o presencia de estos compuestos .con respecto a la línea susceptible (CML131)

- Si el aumento de lignina y celulosa es una respuesta “mecánica” de defensa ante el ataque por insectos, entonces la línea resistente (CML67) presentará un mayor contenido de los mismos con respecto a la línea susceptible (CML131)

DIAGRAMA METODOLÓGICO



Material y Métodos

Siembra e infestación del material

El material utilizado fue proporcionado por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMyT). Las semillas se sembraron en el campo de la Estación Experimental del CIMMyT, Tlaltizapan, Morelos en el Ciclo 98-B. Se sembraron semillas de las líneas CML67 (resistente) y CML131 (susceptible), después de cuatro semanas de siembra; cuando las plantas presentaron de 6 a 8 hojas completamente desarrolladas, se infestaron con larvas neonatas (30 larvas por planta) de *Spodoptera frugiperda* en la axila de la hoja, de acuerdo a las técnicas de infestación empleadas por CIMMyT (Mihm,1984).

Recolecta del Material

Se realizaron cuatro recolectas, 1, 2, 3 y 4 semanas después de la infestación. En cada recolecta se tomaron al azar cuatro plantas por línea cortando 6 hojas por planta; se reunieron las seis hojas de las cuatro plantas para obtener cada muestra (24 hojas). El material se congeló hasta su secado y preparación para el análisis en el laboratorio.

Secado y molienda del material

Las hojas recolectadas se secaron utilizando un liofilizador marca Heto Modelo FD3 y posteriormente se molieron hasta obtener un polvo fino y proceder a la extracción de flavonoides.

Extracción de flavonoides

La extracción de los flavonoides se realizó de acuerdo al método citado por Bergvinson (1995).

De cada muestra se pesaron 0.5 g de hoja seca pulverizada (por triplicado) y se adicionaron 20 ml de MeOH al 70%. Posteriormente se homogenizó con un polytron (modelo PT-1200, Brinkmann, Westbury, N.Y.) a temperatura ambiente

durante 20 seg. Enseguida se centrifugó a 500 g durante 10 min, se reunieron los sobrenadantes y el metanol fue evaporado en un rotavapor (35°C). El extracto resultante se ajustó a un pH 2.0 utilizando HCl 1M., y fue extraído a temperatura ambiente con 50 ml de acetato de etilo, repitiendo la extracción tres veces; se llevó a sequedad en un rotavapor. Las muestras se refrigeraron hasta su posterior análisis por HPLC.

Análisis de los extractos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Para el análisis de HPLC se utilizó un cromatógrafo Agilent Technologies 1100 SERIES constituido por una bomba cuaternaria G1311A y un detector Agilent G1365B UV 350 nm. Se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 3.0x250mm (tamaño de partícula 5 μ).

Los extractos se redisolviaron en 10 ml de metanol grado HPLC inyectando 50 μ l de cada muestra en la columna. Para la fase móvil se utilizó un gradiente que consistió de una mezcla inicial de H₂PO₄ 10 mM (A) en una proporción de 75% y metanol (B) 25%. Esta mezcla eluyó durante 15 min, al final de este tiempo se llegó a una proporción de 45% (A) y 55% (B) y se dejó eluir durante 5 min, alcanzando al final de este tiempo una proporción de 20% (A) y 80% (B) eluyendo por 2 min, llegando a 100% (B). Al cabo de 8 min, la proporción cambia a 75% (A) y 25% (B) manteniéndose así durante 7 min. El flujo se mantuvo constante a 0.843 ml/min.

Los picos de los flavonoides en los cromatogramas fueron identificados por comparación con estándares de luteolina, rutina, crisina, campferol, maisina y apimaisina. Se tomaron en cuenta los tiempos de retención del **cuadro 3** para cada flavonoide y se determinó la concentración de éstos en cada una de las muestras con el programa Agilent ChemStation for LC and LC/MS Systems Rev. A.09.01 (1206)

Compuesto (flavonoide)	maisina	rutina	luteolina	apimaisina	campferol	crisina
Tiempo de Retención	11. 25	12. 68	15. 6	18. 14	20. 49	21. 21

Cuadro 3.- Tiempos de Retención de los estándares (Bergvinson,1995).

Determinación del porcentaje de lignina y celulosa

La determinación del porcentaje de lignina y celulosa en hojas de las dos líneas de maíz, se determinó con base al método de Van Soest (1994). Este análisis se llevó a cabo en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Ensayo Biológico

Para determinar el efecto de hojas con diferente desarrollo de las dos líneas de maíz estudiadas en larvas de *S. frugiperda*; se procedió a realizar un ensayo. El método empleado se basó en la incorporación de hojas molidas en la dieta artificial (Singh,1977) modificada por Mihm (1984) (Ver apéndice).

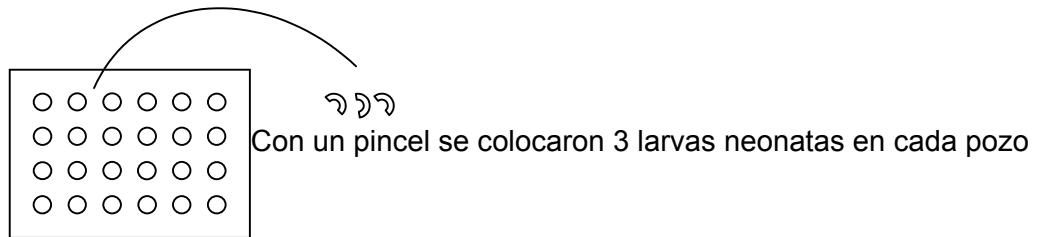
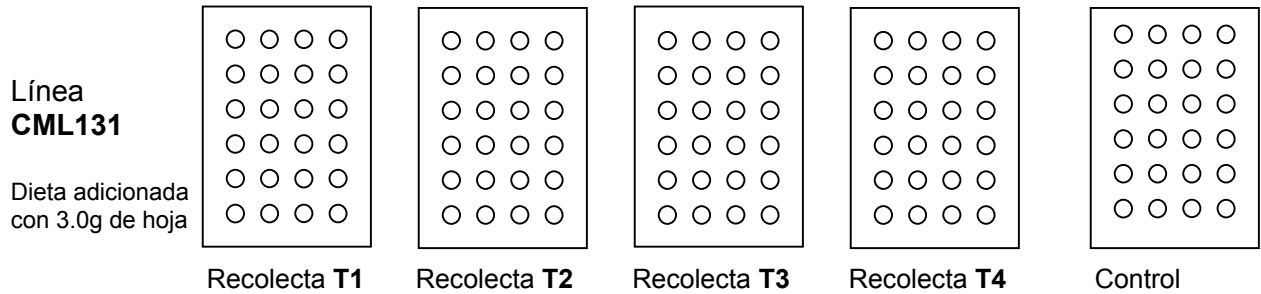
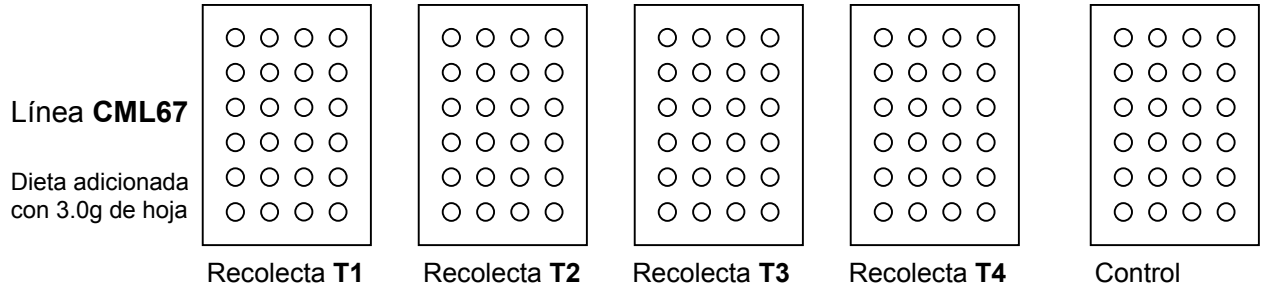
Se prepararon 30 ml de dieta artificial añadiendo 3.0 g de hoja (el 10% estandarizado en ensayos anteriores, Heraso, C.C.,1998) para cada charola experimental (8 charolas con 24 pozos cada una), se prepararon dos charolas control, una para cada línea, las cuales sólo contenían dieta artificial.

Para la realización de este ensayo con la ayuda de un pincel fino, se colocaron tres larvas neonatas a fin de asegurar su permanencia dentro del pozo. Una vez colocadas, fueron cubiertas las charolas (con plástico autoadherible kleen pack, una toalla de papel y la tapa de plástico de la charola asegurándola con bandas elásticas, a fin de evitar que las larvas escaparan).

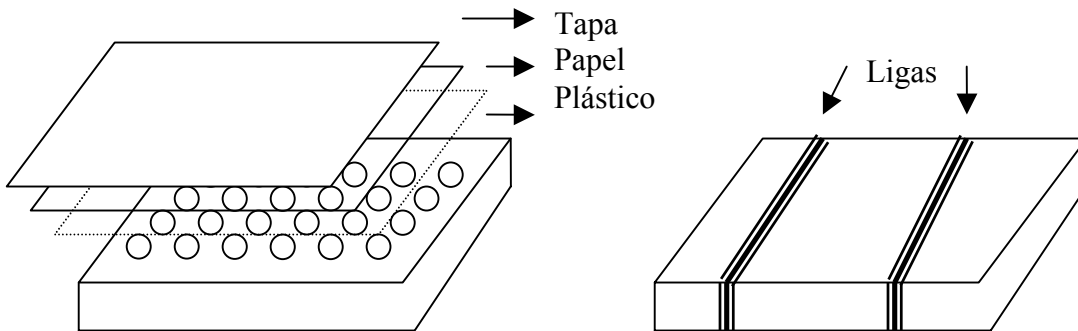
Las condiciones de incubación para el ensayo fueron: temperatura 27°C, humedad relativa 70 ± 5%, así como un fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad durante 14 días. Una vez montado el ensayo, al transcurrir los primeros siete días se evaluó talla y peso de las larvas (1er tiempo de medición) y al término de los siguientes siete días se evaluaron los mismos parámetros (2º tiempo de medición).

DIAGRAMA DEL ENSAYO BIOLÓGICO

Preparación de 30 ml de dieta artificial para cada charola con 24 pozos



Colocadas las larvas, se sellaron las charolas con plástico, papel, tapa de la charola y ligas



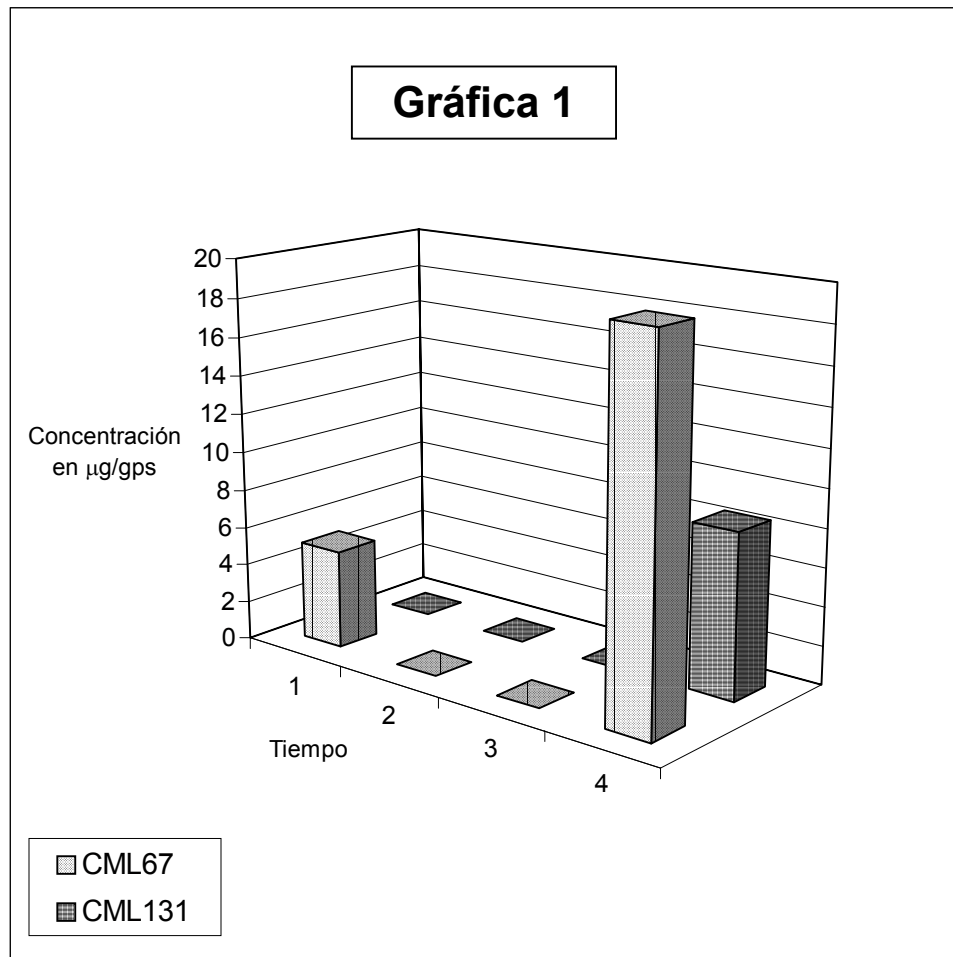
Se dejaron incubar durante 14 días. El 7º día se evaluó talla y peso (1ª medición); al completarse los 14 días se realizó la 2ª medición.

Los análisis de resultados del ensayo biológico se realizaron con el programa estadístico SPSS versión 9.0 para Windows. Los datos se procesaron mediante un análisis multivariado. Para determinar las diferencias significativas se realizó la prueba de "t".

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

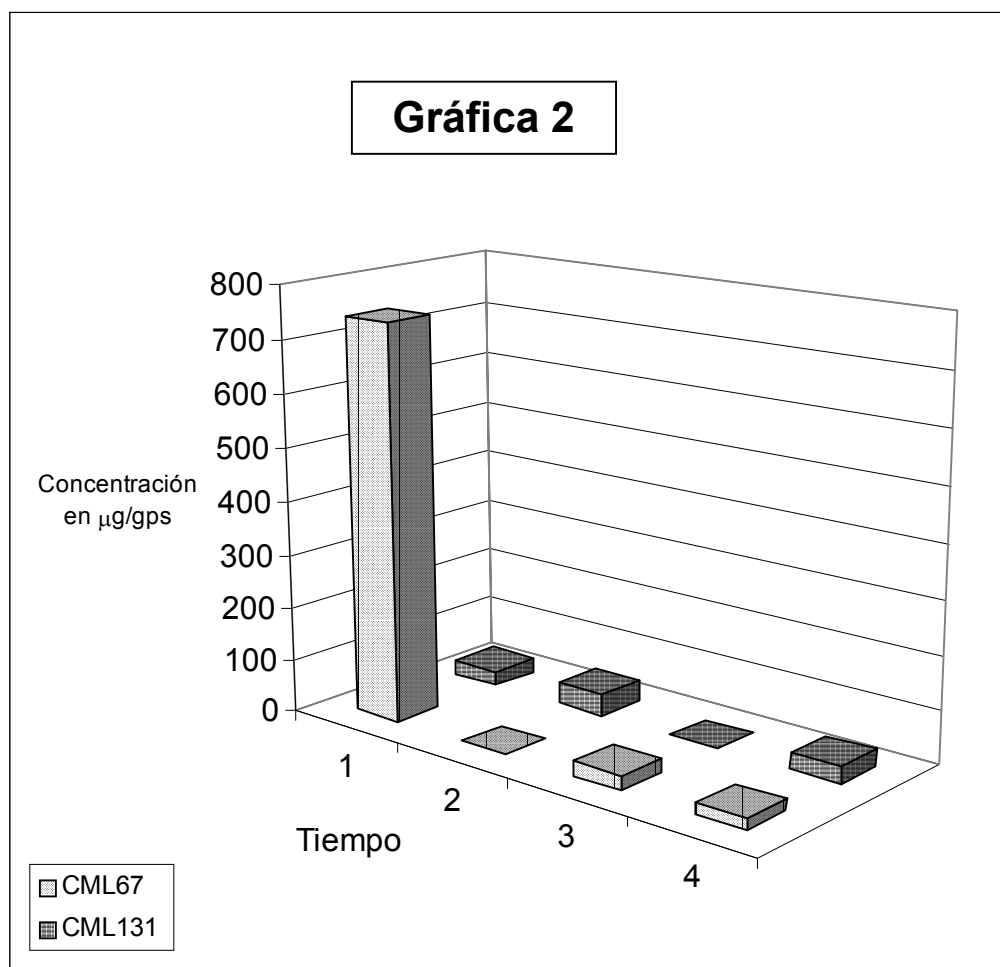
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES POR HPLC.

Los resultados obtenidos acerca de la determinación de la concentración de flavonoides, presentes en hojas de las dos líneas de maíz estudiadas se muestran en las gráficas 1- 6. En las gráficas se muestra la concentración encontrada por cada flavonoide evaluado en ambas líneas durante los cuatro tiempos de recolecta (tiempo de desarrollo de la planta).



Concentración de maisina en hojas de las dos líneas de maíz durante los cuatro tiempos evaluados

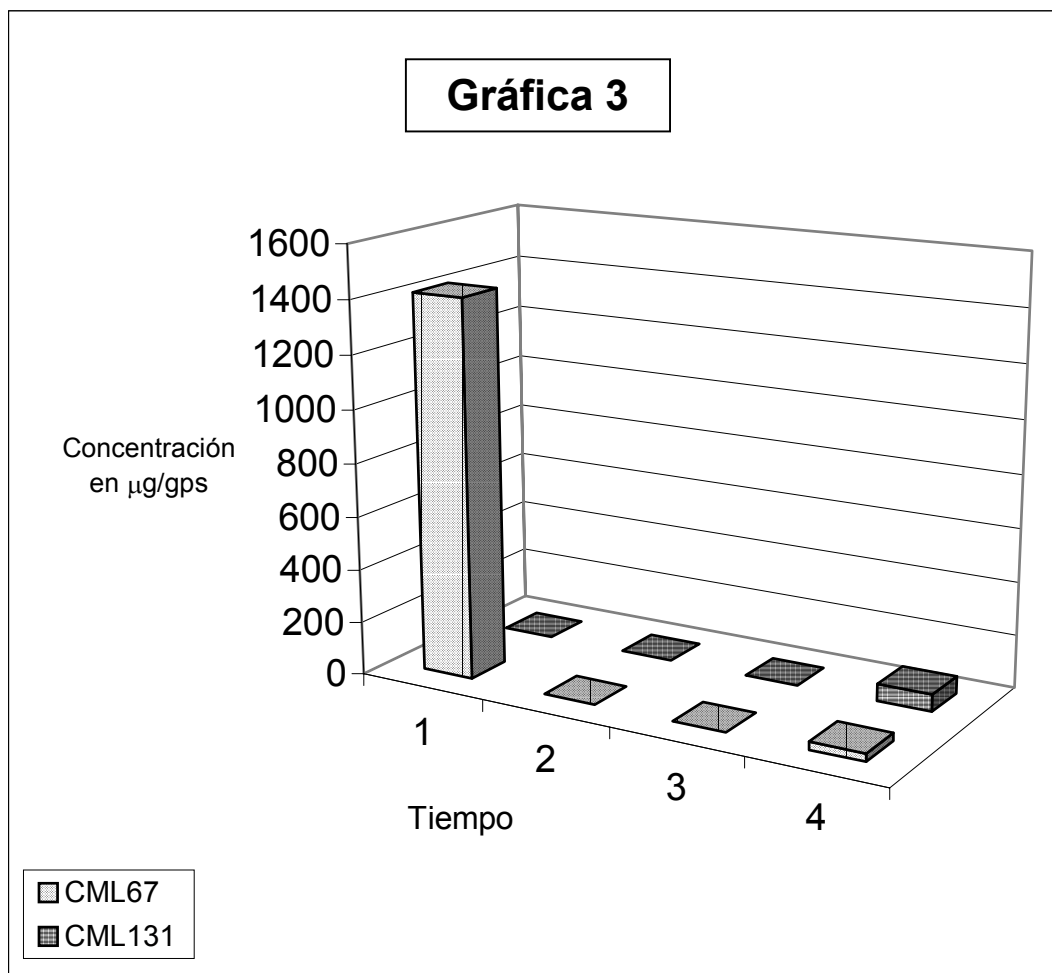
En la línea CML67 al T1 se observó una pequeña concentración de maisina que ya no se detectó en los tiempos 2 y 3, pero en T4 se incrementó considerablemente. En la línea CML131 hasta el T4 se detectó la presencia del compuesto. Estos resultados nos indican que ambas líneas respondieron con una producción de maisina al final del crecimiento activo, aunque la mayor concentración fue para CML67.



Concentración de apimaisina en hojas de las dos líneas de maíz durante los cuatro tiempos evaluados

Se detectó que la concentración de apimaisina en la línea CML67 fue mayor en T1; en T2 no se detectó, mientras que en T3 hubo un ligero incremento con respecto a T4. Para la línea CML131, se observó en T2 la mayor concentración

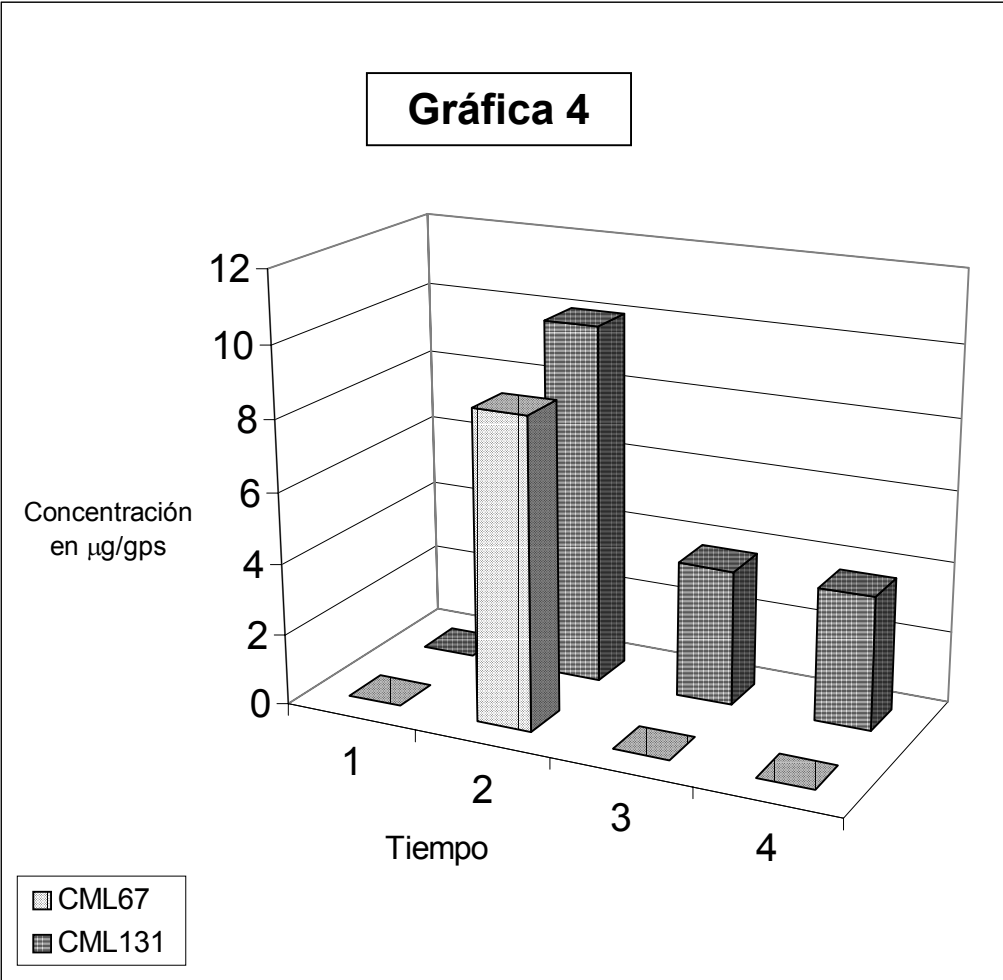
con respecto a los demás tiempos. Excepto T1 de la línea CML67 no se apreció gran diferencia entre ambas líneas.



Concentración de crisina en hojas de las dos líneas de maíz durante los cuatro tiempos evaluados

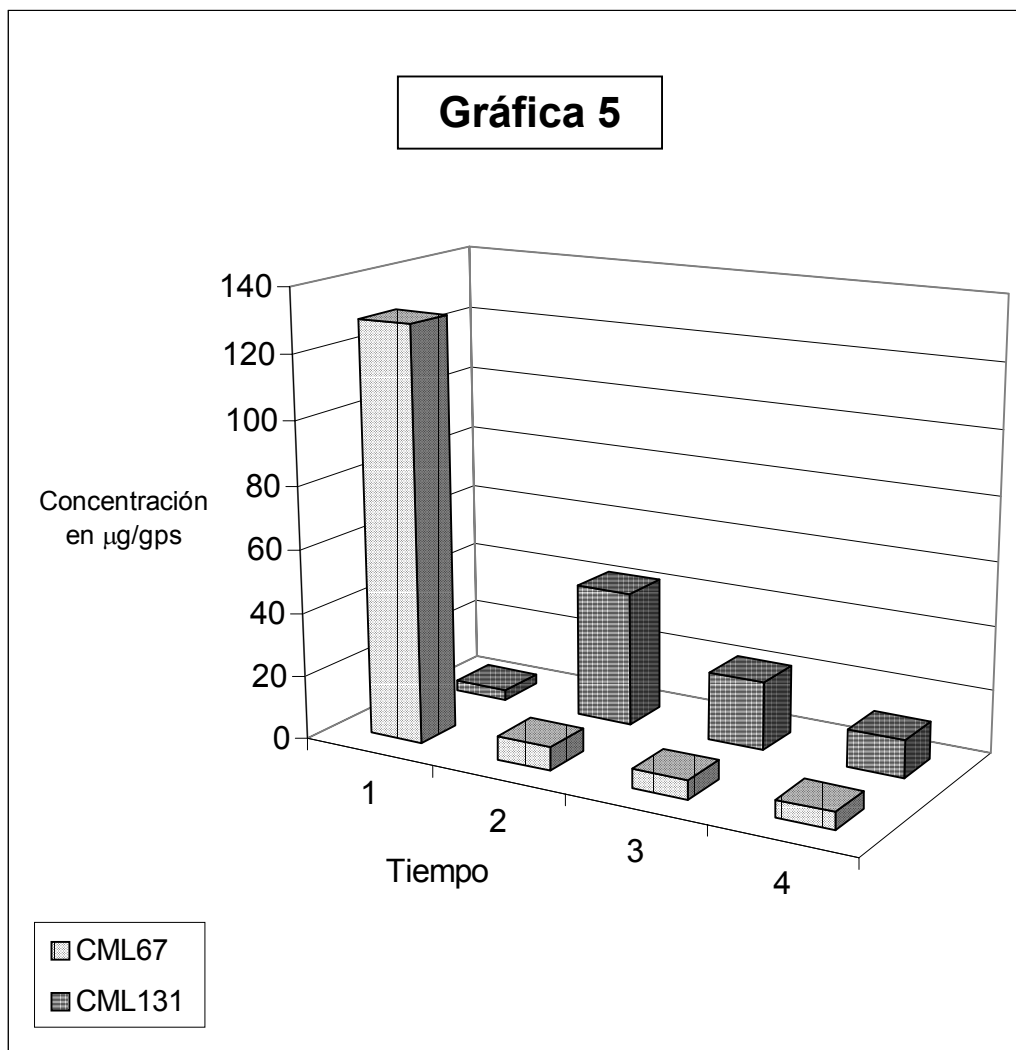
En cuanto a la crisina, se observó que la mayor concentración fue para la línea CML67 en el T1, mientras en T2 y T3 no se detectó la presencia de dicho compuesto, en T4 su concentración fue mínima. Para la línea CML131 sólo en T4 se observó una pequeña concentración del compuesto.

Pese a que CML67 presentó apimaisina y crisina en concentración más elevada con respecto a CML131 y a los diferentes tiempos, la ausencia o baja concentración nos indica que CML67 respondió al ataque con una producción de dichos compuestos al inicio del desarrollo.



Concentración de campherol en hojas de las dos líneas de maíz durante los cuatro tiempos evaluados

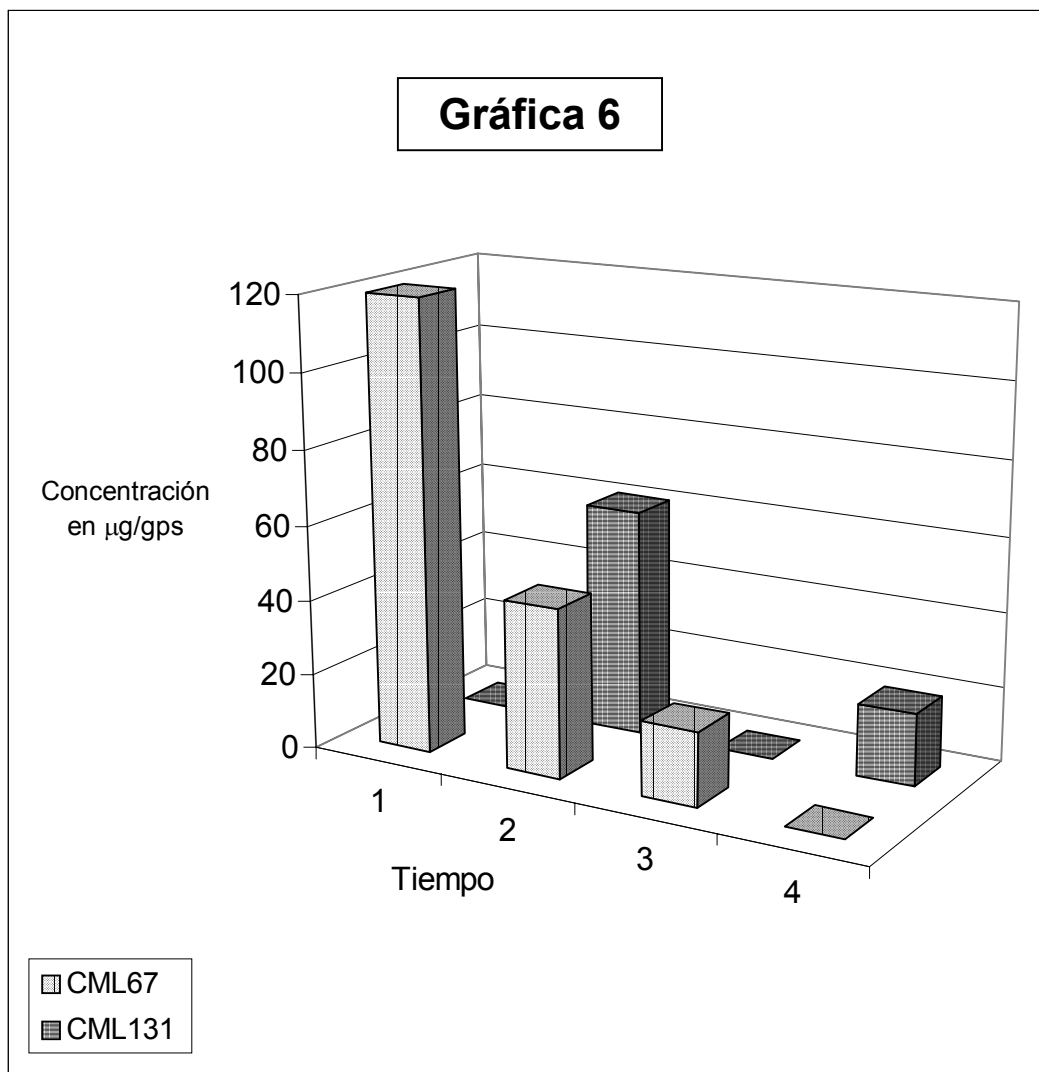
Estos resultados indicaron que en ambas líneas se detectó la presencia de campherol en el tiempo 2, en CML131 los valores disminuyeron en T3 y T4 de forma constante. Sin embargo CML67 ya no presentó el compuesto. Se puede decir que las dos líneas respondieron al mismo tiempo en la producción de campherol.



Concentración de luteolina en hojas de las dos líneas de maíz durante los cuatro tiempos evaluados

Para CML67 la concentración más alta de luteolina se observó en T1 que, disminuyó en los tiempos 2, 3 y 4. Sin embargo en CML131 se detectó hasta el T2 disminuyendo en T3 y T4. Comparando en los diferentes tiempos se observó que la línea CML131 presentó las concentraciones más elevadas.

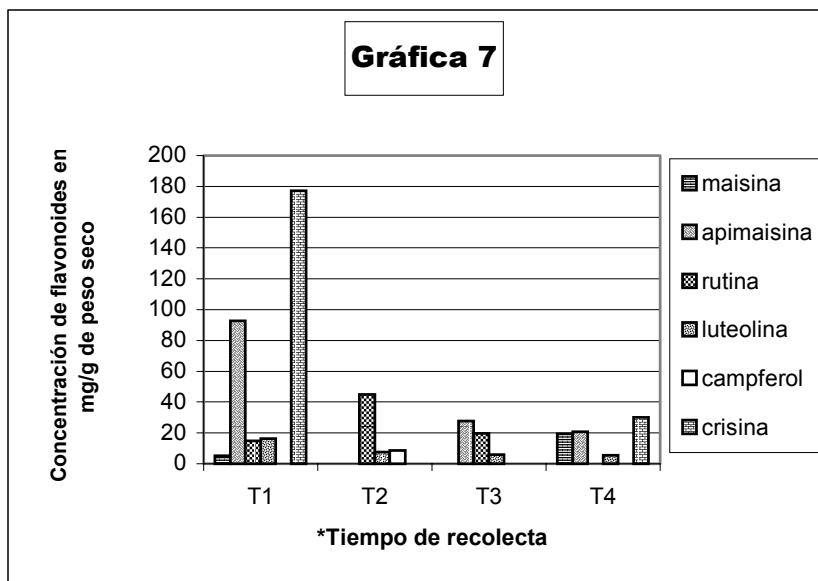
Se puede observar que la línea 67 respondió inmediatamente con una alta producción de luteolina, y conforme se desarrolla la planta disminuye, manteniendo una concentración constante; CML131 responde más tarde con una producción menor del compuesto.



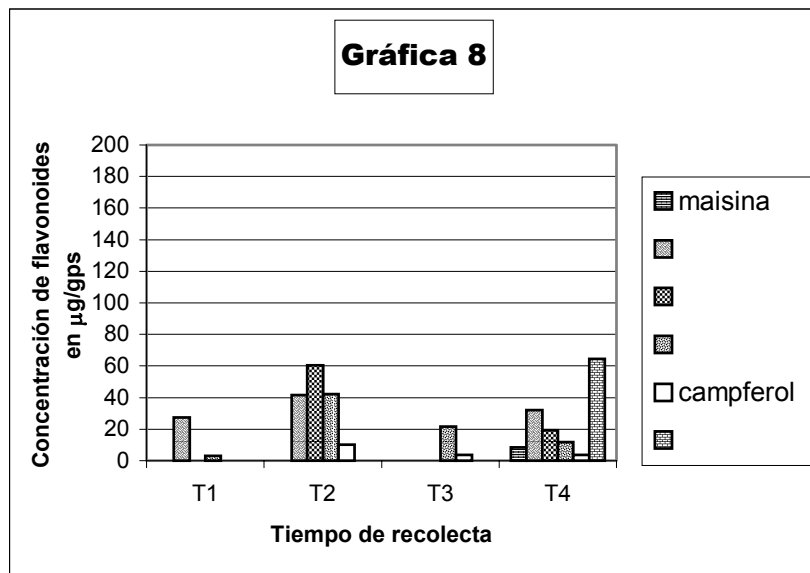
Concentración de rutina en hojas de las dos líneas de maíz durante los cuatro tiempos evaluados

La línea CML67 mostró el nivel más alto de rutina en T1, disminuyendo para tiempo 2 y 3, en T4 fue nulo. En la línea CML131 se detectó hasta el T2, y alcanzó en este tiempo una concentración elevada, en T3 no se detectó, mientras que en T4 apareció en baja concentración. Probablemente la respuesta inmediata de la línea resistente (CLM67) ante el ataque fue el incremento de la concentración de este compuesto en T1; ya que, en otros estudios se encontró que la rutina es tóxica para varios insectos que se alimentan de plantas (Barceló, 1992).

Haciendo una comparación entre las líneas estudiadas durante los cuatro tiempos de recolecta para los 6 compuestos analizados se obtuvieron las gráficas 7 y 8 que a continuación se muestran



Concentración de flavonoides en los cuatro tiempos de colecta para la línea CML67



Concentración de flavonoides en los cuatro tiempos de colecta para la línea CML131

Se pudo observar que tanto la presencia como la concentración de los flavonoides evaluados en ambas líneas para las cuatro etapas de desarrollo de las plantas, fueron diferentes ya que la línea resistente (CML67) en la primer etapa de desarrollo presentó cinco compuestos de los seis evaluados, registrando aquí las concentraciones más elevadas; algo similar se encontró en otro estudio en donde la línea de maíz resistente a *S. frugiperda* presentó en la primer etapa de desarrollo, mayor cantidad de flavonoides (Guevara y col.1996). Mientras que CML131 presentó los seis flavonoides evaluados hasta la 4a etapa; en T2 registra las mayores concentraciones. Esto nos indica que efectivamente la respuesta de cada línea frente al ataque fue diferencial. En la línea resistente (CML67), encontramos una respuesta inmediata en presencia y mayor concentración de crisina al inicio de la infestación con larvas, produciéndose nuevamente en la 4ª etapa. Puede indicarnos que la producción de este compuesto es clave en la respuesta de la planta ya que en la línea susceptible (CML131) se encontró el compuesto hasta la etapa final. Un patrón similar se observó en maisina; CML67 presentó este compuesto en la primera etapa y al final del desarrollo activo mientras que CML131 presentó maisina sólo en el último estadio de desarrollo. Esto concuerda con los reportes de otros trabajos donde encontraron que la concentración de maisina se incrementa durante la etapa previa a la polinización (Snook,1989).

Por otro lado, luteolina se encontró en las dos líneas durante los cuatro tiempos evaluados, sin embargo, la línea resistente presenta mayor concentración en T1; este resultado se explica si tomamos en cuenta que muchos compuestos con actividad alelopática, al superar un determinado umbral, actúan negativamente sobre herbívoros e insectos fitófagos (Sampietro,2004).

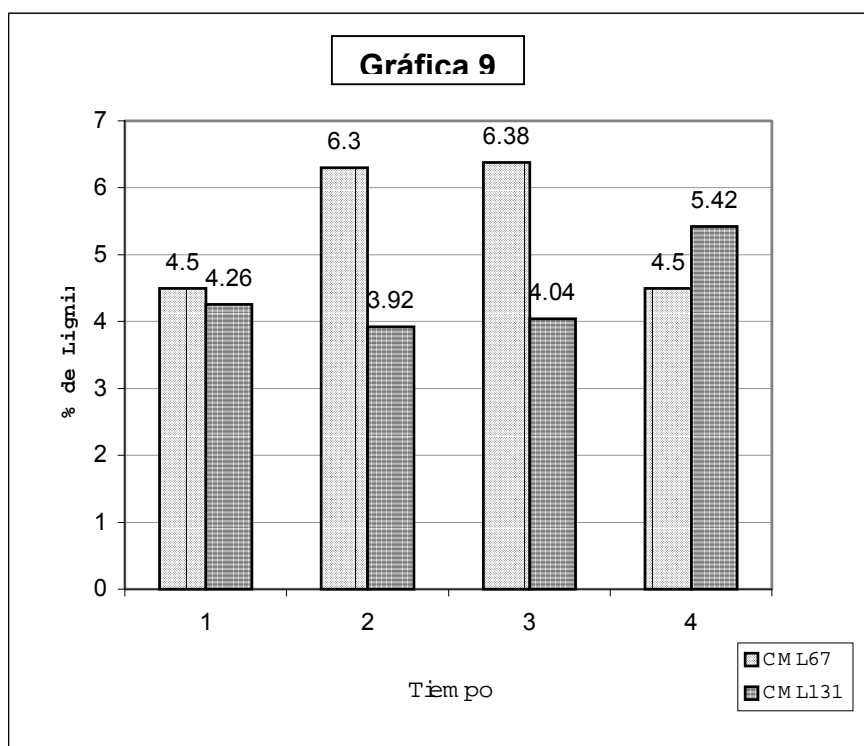
En cuanto al campferol, para CML67 se detectó en la segunda etapa; en CML131 a partir de su detección en T2, se mantiene presente hasta la etapa final de evaluación.

En los resultados encontramos que la concentración de flavonoides es variable y esto también puede deberse al tipo de planta, ritmo de biosíntesis, almacenamiento y degradación de la planta; así mismo se ve afectada esta concentración, por los balances internos de reguladores de crecimiento vegetal y

otros factores bióticos y abióticos como lo mencionan algunos autores (Sampietro,2004).

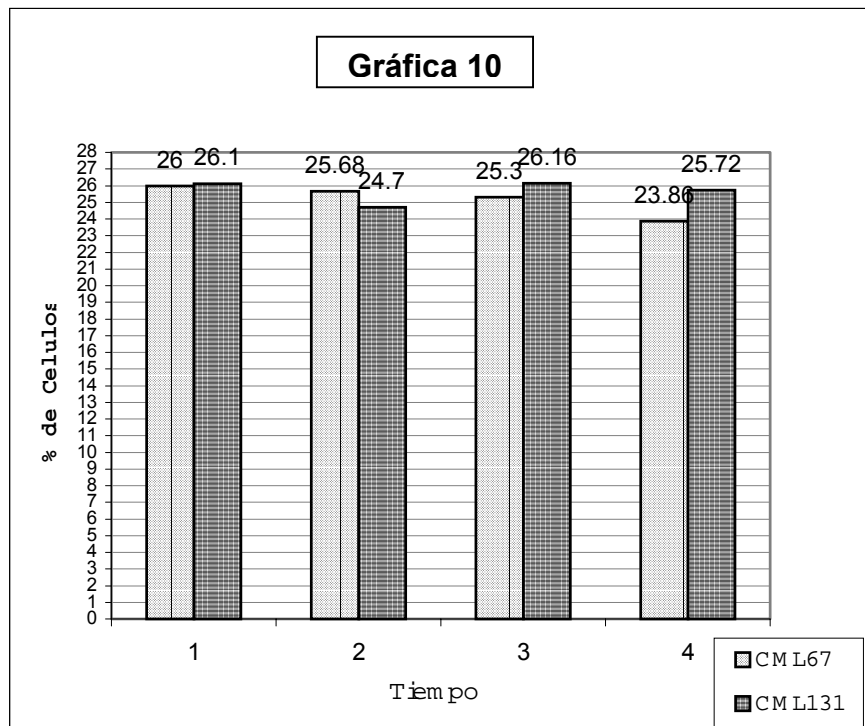
DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE LIGNINA Y CELULOSA

Los porcentajes de lignina y celulosa contenidas en hojas de las dos líneas de maíz estudiadas, se muestran en las gráficas 9 y 10.



Porcentaje de lignina en hojas de maíz de las líneas estudiadas durante los cuatro tiempos evaluados

Se observó que en CML67 con respecto de CML131, exceptuando en T4 el porcentaje de lignina fue mayor. En la línea CML131 el porcentaje de lignina fue muy similar en los primeros tres tiempos. Esto indica que las líneas entre sí, tienen un patrón diferente en la producción de lignina; CML67 tuvo incremento entre T2 y T3.



Porcentaje de celulosa en hojas de maíz de las líneas estudiadas durante los cuatro tiempos evaluados

Observamos que el porcentaje de celulosa fue muy similar en ambas líneas, en CML67 para T2 encontramos mayor porcentaje que la línea susceptible; esto sucedió con el registro para lignina en T2 en donde el porcentaje de la línea resistente fue más elevado que en CML131; así mismo se ha reportado que la celulosa puede tener una digestibilidad muy alta dependiendo de su grado de lignificación (Van Soest, 1965).

Es evidente que el porcentaje de celulosa para ambas líneas fue más elevado que de lignina; esto se corrobora con estudios realizados donde se ha mostrado que la pared celular de las gramíneas tienen mayor porcentaje de celulosa y en valores decrecientes hemicelulosa, y lignina (Parsi, J. et al., 2001).

La lignina está altamente asociada a los componentes de la pared celular, como la celulosa, hemicelulosa y con ciertas proteínas. De la proporción de lignina que tenga la pared celular dependerá su digestibilidad; es decir, a mayor cantidad de lignina habrá menor digestibilidad y la reducción de ésta se refleja en un menor consumo voluntario por parte del herbívoro (Parsi, J. et al 2001).

ENSAYO BIOLÓGICO

Las 192 larvas de *S. frugiperda* fueron medidas y pesadas para ambas líneas de maíz estudiadas (CML67 y CML131). En ambos casos hubo dos tiempos de medición, pudo notarse que el peso y la talla promedios fueron menores para las larvas alimentadas con la línea CML131 (Tabla 1).

Línea CML67						
		T1	T2	T3	T4	Control
1er tiempo de medición	peso g	0.054	0.052	0.013	0.013	0.003
2o tiempo de medición	"	0.376	0.34	0.333	0.309	0.059
1er tiempo de medición	talla cm	0.908	0.833	0.913	0.929	0.525
2o tiempo de medición	"	2.833	2.275	2.667	2.52	1.179
Línea CML131						
		T1	T2	T3	T4	Control
1er tiempo de medición	peso g	0.008	0.008	0.053	0.016	0.003
2o tiempo de medición	"	0.231	0.281	0.242	0.298	0.044
1er tiempo de medición	talla cm	0.808	0.779	0.796	0.862	0.475
2o tiempo de medición	"	2.367	2.629	1.746	2.145	1.116

Tabla 1 Resultados obtenidos de la evaluación en promedio de talla y peso de larvas alimentadas con hojas de diferente tiempo de desarrollo.

Por otro lado, mediante ANOVA FACTORIAL (AXBXC, Dowdy y Wearden, 1983), se analizó el efecto de línea genética, tiempo de medición y tiempo de colecta en la talla y peso de las larvas de *S. frugiperda* (Tabla 2).

Análisis Multivariado

Factores	Variable dependiente	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	TALLA	308.596 ^a	19	16.242	45.658	.000
	PESO	9.373 ^b	19	.493	38.125	.000
Intercept	TALLA	856.591	1	856.591	2408.010	.000
	PESO	6.582	1	6.582	508.664	.000
LIN	TALLA	4.654	2	2.327	6.541	.002
	PESO	.151	2	7.532E-02	5.821	.003
TMED	TALLA	181.270	1	181.270	509.577	.000
	PESO	4.884	1	4.884	377.438	.000
TCOL	TALLA	1.904	3	.635	1.784	.149
	PESO	4.184E-03	3	1.395E-03	.108	.956
LIN * TMED	TALLA	1.724	2	.862	2.423	.090
	PESO	.135	2	6.734E-02	5.204	.006
LIN * TCOL	TALLA	5.478	3	1.826	5.134	.002
	PESO	.114	3	3.788E-02	2.928	.033
TMED * TCOL	TALLA	2.329	3	.776	2.182	.089
	PESO	2.902E-02	3	9.674E-03	.748	.524
LIN * TMED * TCOL	TALLA	4.492	3	1.497	4.209	.006
	PESO	4.656E-02	3	1.552E-02	1.199	.309
Error	TALLA	163.278	459	.356		
	PESO	5.939	459	1.294E-02		
Total	TALLA	1501.953	479			
	PESO	24.094	479			
Corrected Total	TALLA	471.874	478			
	PESO	15.313	478			

a. R Squared = .654 (Adjusted R Squared = .640)

b. R Squared = .612 (Adjusted R Squared = .596)

Tabla 2 Resultados obtenidos del análisis estadístico. LIN = Líneas de maíz; TMED = Tiempo de medición de la larva; TCOL = Tiempo de colecta de la planta.

La talla y el peso de las larvas medidas mostraron diferencias significativas al evaluar las líneas de maíz investigadas (Flin, talla; 0.05; 2,459 = 6.54, Flin, peso; 0.05, 2.459 = 5.82, $p < 0.05$) y el tiempo de medición (Ftmed, talla; .05, 1.459 = 509.58; Ftmed, peso; .05; 1.459 = 377.44, $p < 0.05$). Las diferencias de talla y peso en las larvas no fueron, significativas en cuanto al tiempo de colecta ($p > 0.05$, tabla 2). Desde el punto de vista fisiológico, el peso de las larvas puede convertirse en una medida más real al analizar las interacciones de los factores (lin*tméd y lin*tcól, $p < 0.05$, tabla 2).

Para determinar en qué pares de variables se presentan las diferencias significativas antes descritas se agruparon los datos en diferentes matrices y se aplicó la prueba de t.

MATRICES Y PRUEBA DE T

En donde: A= Líneas de maíz, B= Tiempos de medición, C= Tiempos de colecta.

AB para Peso en g.

	A1 (CML67)	A2 (CML131)
B1	0.033	0.021
B2	0.340	0.263

Valor prueba	-17.12
α	0.05
D F	6
Valor tabla	-1.943

Al aplicar la prueba de t para identificar la diferencia en el peso de las larvas alimentadas con las dos líneas de maíz en los dos tiempos de medición, se encontró evidencia significativa ($F_{0.05}; -1.943, -17.12, P > 0.05$). Podemos concluir que al tiempo de medición 1, las larvas no se desarrollan en ambas líneas; mientras que al tiempo de medición 2, las larvas desarrollan menos en A2 (CML131).

En donde: A= Líneas de maíz, C= Tiempos de colecta.

AC para Peso en g

	A1(CML67)	A2 (CML131)
C1	0.215	0.119
C2	0.196	0.144
C3	0.173	0.147
C4	0.161	0.157

Valor prueba	0.487
--------------	-------

α	0.05
D F	2
Valor tabla	2.920

Al aplicar la prueba de t para determinar la diferencia en el peso de las larvas alimentadas con las dos líneas de maíz de la primera colecta no se encontró evidencia significativa ($F_{0.05;2.920}$, 0.487, $P>0.05$). Se puede decir que a medida que transcurre el tiempo, las larvas reducen su peso en A1 y difícilmente ganan peso en A2. Al cuarto tiempo de colecta, el peso de las larvas es prácticamente el mismo.

En donde: A= Líneas de maíz, C= Tiempos de colecta.

AC para Talla en cm.

	A1(CML67)	A2 (CML131)
C1	1.870	1.587
C2	1.554	1.704
C3	1.790	1.271
C4	1.725	1.504

Valor prueba	0.5203
α	0.05
D F	2
Valor tabla	2.920

Al aplicar la prueba de t para determinar la diferencia en la talla de las larvas alimentadas con las dos líneas de maíz de la tercer colecta no se encontró evidencia significativa ($F_{0.05;2.920}$, 0.5203, $P>0.05$). Se puede decir que la talla de las larvas alimentadas con CML67 de la tercer colecta no es mayor que las alimentadas con CML131 en la misma colecta.

Al tomar en cuenta los resultados obtenidos de los parámetros evaluados en las larvas; el parámetro talla no resultó ser muy confiable debido al error de medición, por ello se abocó el análisis a los resultados obtenidos en peso.

Se encontró diferencia considerable entre el peso de larvas control y las alimentadas con dieta adicionada con polvo de hojas. Las larvas control obtuvieron pesos más bajos; comparando los pesos de larvas alimentadas con las líneas problema se encontró diferencia en los pesos de las larvas alimentadas con CML67 y CML131. El peso de las larvas alimentadas con CML67 fue mayor que el de las larvas alimentadas con CML131; indicio de que no hubo correspondencia con el % de lignina, esto indica que la lignina no fue el único factor que puede intervenir como barrera frente al insecto. Es muy probable que estos resultados se deban al mayor contenido de glucósidos de la dieta adicionada, tomando en cuenta que los flavonoides tiene azúcares asociados, más aún si el porcentaje de celulosa es elevado y por consiguiente más digerible.

Analizando los pesos obtenidos con dieta de las cuatro etapas de desarrollo vegetal en ambas líneas, no se encontró diferencia significativa, esto indica que el factor tiempo de desarrollo de la planta no es determinante para las larvas.

Como dato complementario se observó que las larvas alimentadas con dieta adicionada al 2º tiempo de medición presentaron indicios de entrar a etapa de pupa, lo cuál no sucedió con las larvas control.

Podemos advertir que en condiciones naturales las cantidades en que se encuentran disponibles muchas sustancias alelopáticas son inferiores a las que presentan actividad en bioensayos en laboratorio. Frecuentemente existen interacciones sinérgicas y adivitas, lo cual dificulta determinar el efecto de cada compuesto o estructura de protección (Sampietro,2004).

CONCLUSIONES

- ❖ Los flavonoides evaluados rutina, maisina, luteolina, apimaisina, crisina, campferol, se encontraron en las dos líneas de maíz estudiadas; mostrando diferencias en concentración durante los tiempos de desarrollo.
- ❖ La línea resistente responde de manera inmediata (en el T1) produciendo 5 flavonoides mientras la línea susceptible presenta 4 flavonoides al T2 y los 6 compuestos en el T4, nos indica una reacción tardía ante el ataque de larvas.
- ❖ Para ambas líneas la crisina fue el compuesto con mayor concentración, sin embargo; la concentración del compuesto resultó superior en la recolecta T1 de la línea CML67; por su parte CML131 se encontró en T4 interpretándose como evidencia de la respuesta diferencial de ambas líneas.
- ❖ Las líneas estudiadas responden al estrés provocado por *Spodoptera frugiperda* produciendo flavonoides, la respuesta es distinta en cuanto al tiempo de producción, su concentración y probablemente la cantidad de glucósidos ligados a estos.
- ❖ Numerosas especies vegetales responden a la predación por insectos con la producción de lignina y materiales asociados a la pared celular, esto se relaciona con el porcentaje de lignina determinado en este estudio, ya que CML67 (resistente) en T1 registro el porcentaje más elevado y decreció al paso de las semanas de infestación. Sin embargo, fue mayor que en la línea susceptible lo cuál indica que la lignina y los componentes de la misma, tales como los ácidos fenólicos, confieren resistencia a las variedades de maíz. (Bergvinson, 1993) CML131 obtuvo menor porcentaje de lignina haciéndola más digerible.
- ❖ El porcentaje de lignina no es proporcional al de celulosa. La cantidad de celulosa resultó ser mayor que de lignina para las dos líneas estudiadas, como lo indican análisis hechos de pared celular para gramíneas.

- ❖ En resumen, CML67 en T1 presentó un incremento en los compuestos químicos evaluados, esto sugiere un mecanismo de respuesta a nivel de producción de flavonoides, aunque para T2 la concentración disminuyó y se detectó un aumento en el porcentaje de lignina, lo cual indica un mecanismo coordinado entre la producción de metabolitos secundarios y lignina como respuesta mecánica.
- ❖ En cuanto al ensayo biológico se encontró diferencia en el peso de las larvas alimentadas con ambas líneas, pero no hubo diferencia entre el peso de las mismas tomando en cuenta el tiempo de desarrollo de la planta con la que fueron alimentadas. Con ello se concluye que el tipo de línea marca la diferencia; las larvas sometidas a la dieta con línea resistente presentaron mayor peso en general que las alimentadas con línea susceptible. Esto se puede explicar en el sentido de que las larvas ingieren mayor cantidad de azúcares asociadas tanto a flavonoides como a celulosa.

Con base a las conclusiones de este estudio se sugiere realizar:

- La evaluación de compuestos precursores de flavonoides, intermediarios, así como las enzimas involucradas en la biosíntesis, es importante al tiempo de determinar el papel de los compuestos estudiados.
- La presencia de azúcares en las moléculas de los flavonoides, puede tener efectos drásticos en la alimentación del insecto, por lo tanto, el estudio de los glucósidos ligados a flavonoides es necesario, ya que diversos azúcares de flavonas y flavonoles pueden ser importantes disuasorios. De igual manera resulta importante hacer la determinación de polisacáridos involucrados en la pared celular.
- El estudio sistemático de la tasa nutricional en las especies estudiadas es importante ya que este estatus juega un papel importante a la hora de la selección por parte del insecto. Para el ensayo se sugiere probar por separado cada uno de los flavonoides estudiados y seguir el registro del desarrollo de las larvas hasta la etapa adulta.

APÉNDICE

Dieta artificial para larvas de *S. frugiperda* (Singh,1977) modificada por Mihm (1984).

Fórmula alimenticia para <i>S.frugiperda</i> (larvas)		Solución vitamínica: para 35ml	
harina de soya	35.6 g	pantotenato de calcio	0.42 g
germen de trigo	15.9 g	niacinamida	2.31 g
sales messon	5.3 g	riboflavina	0.105 g
sacarosa	6.5 g	ácido fólico	0.052 g
metil parafen	0.8 g	tiamina	0.052 g
ácido sórbico	0.5 g	biotina	0.004 g
agar	7.9 g	B 12	0.875 ml
solución vitamínica	1.8 ml		
ácido acético 25%	6.0 ml		
formalina 15%	3.7 ml		
aureomicina 14%	0.6 ml		

Se disuelve el agar en 500 ml de agua caliente, se hierve 10 min a fuego bajo; licuar ingredientes secos con 600 ml de agua destilada fría, agregar agar hervido, vitaminas e ingredientes líquidos, vaciar en charolas con pozos y esperar que endurezca, Mihm,1984.

BIBLIOGRAFÍA

- Anaya, A. L. 2003. Ecología Química. Plaza y Valdes. México. 349p.
- Anaya, A. L., Espinosa-García, F. J. y Cruz-Ortega, R., 2001. Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación. Instituto de Ecología UNAM, México.
- Avendaño, G. A. 1996. Estudio de las flavanonas y metabolitos secundarios de *Buddleia parviflora*. Tesis de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. pp 42.
- Azcon, J. B., Talon M. 1993. Fisiología y bioquímica vegetal. Interamericana McGraw-Hill. Madrid. pp 555.
- Barceló, C. J. y G. R. Nicolás. 1992. Fisiología Vegetal. Pirámide, S.A. Madrid, España. sexta edición. pp 662.
- Bergvinson, D. 1993. Role of phenolic acids in Maize resistance to the European Corn Borer, *Ostrinia Nubilialis* (Hübner). Tesis Doctoral de Filosofía en Biología. Universidad de Ottawa. 145p.
- Bergvinson, D., Hamilton, R. I. y Arnason, J. T. 1995. Leaf Profile of Maize Resistance Factors to European Corn, *Ostrinia nubilialis*. J. Chem. Ecol. 21(3): 343-354.
- Bernays, E. 1991. Plant interactions. Vol. I II III. CRC Press. Florida.
- Castañeda, R. P. 1990. El maíz y su cultivo. A G T Editor. S.A. México, D. F. 460 p
- Contreras, A. S. 2001. Efecto de la herbivoría foliar del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*, J. E. Smith) y del gusano barrenador (*Diatraea grandiosella*, Dyar) sobre la producción de compuestos fenólicos en cuatro líneas de maíz. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D. F. pp 18.
- Dowdy, S. y S. Wearden. 1983. Statistics for research. John Wiley Sons, Inc. New York, USA. pp 330-349.
- García, C. M. 1981. Lista de insectos y ácaros perjudiciales a los cultivos en México. Fitófilo. No. 86. año XXXV. SARH. Dirección General de Sanidad Vegetal. pp 20-23.
- Gascoigne, J. A., Gascoigne, M. M. 1960. Biological Degradation of Cellulose. Butterworths. London. pp 1-30.

Granados, D. S., López, R. G. F. 1996. Agroecología. Universidad autónoma de Chapingo. México. pp 333-338.

Goodwin, T. W. y E. I. Mercier. 1983. Introduction to plant Biochemistry. 2a. ed. Pergamon Press. Toronto, Canadá.

Guang Yong, R. y Wiseman, B. R. 1994. Effect cuticular lipids from silks of selected corn genotypes on the development of corn earworm larvae. *Entomol. Ent.* 29(2):239-246.

Guevara P., Pérez-Amador, C., Díaz, C. E. & Mihm, J. A. 1996. Flavonoid chromatographic profiles and phenolic acid determination in four Maize lines. *International Journal of Experimental Botany* 59(1/2):47-50 XII.

Guevara P., Pérez-Amador C., Zúñiga B., Herrera J., Ríos E., Rancel F. 1998. Phenolic acid content in leaves of two strains of Maize in three developmental stages. *International Journal of Experimental Botany*. 62(1/2): 213-216 VI.

Guevara P., Pérez-Amador C., Zúñiga B., Snook M. 2000. Flavones in corn silks & resistance attacks. *International Journal of Experimental Botany*. 69:151-156.

Harborne, J. B. 1985. Introducción a la bioquímica Ecológica. 2ª ed. Alambra. España, Madrid. Pp 355.

Heraso C. C. 1998. Evaluación de las actividades biológicas (insecticidas fitotóxicas) de extractos crudos de *Virtex trifolia* L. (*Verbenaceae*) Tesis Lic. Fac. de Ciencias Biológicas UAEM, Morelos.

Hess, D. 1980. Fisiología Vegetal. Omega. Barcelona. pp388

Kaufman, P. B., Cseke, L.J., Warber, S., Duke, J. A., Brielmann, H. L. 1998. Natural products from plants. Congress Cataloging-in-Publication Data. U.S.A. pp 51-53.

Kennedy, G. G. 2000. Life Systems of Polyphagous Arthropod Pests in Temporally Unstable Cropping Systems. *Annu. Rev. Entomol*, Vol. 45: 467- 493.

Maxwell, F. G., Jennings, P. R., 1984. Mejoramiento de plantas resistentes a insectos. Limusa. México. pp 44-80

Mihm, J. A. 1984. Técnicas eficientes para la crianza masiva e infestación de Insectos, en la selección de las plantas hospedantes para resistencia al gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda*. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, CIMMYT, El Batán, México.

Morse, S., Wratten, S. D., Edwards, P. J. y Niemeyer, H. M. 1991. Changes in the hydroxamic acid content of maize leaves with time and after artificial damage, implications for insect attack. *Ann. Appl. Biol.* 119:239-249.

Ortega, C. A. 1987. Insectos nocivos del maíz: una guía para su identificación en el campo. México, D. F. CIMMyT. 106 p.

Parsi, J., Godio L. Miazzo, R., Maffioli, R., Echevarria, A., Provencal, P. 2001. Cursos de introducción a la producción animal y producción animal I FAV UNRC. http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/16-valoracion_nutritiva_de_los_alimentos.htm

Pérez, E. M. 1995. Control Biológico de *Spodoptera fugiperda* Smith en Maíz. Departamento de Manejo de Plagas, INISAV. La Habana Cuba. <http://www.aguascalientes.gob.mx/agro/produce/SPODOPTTE.htm>

Raven P.H., Evert, R. F., Eichorn, S. E. 1992. Biología de las plantas. Reverté, México.

Robles, S. R. 1994. Producción de granos y forrajes. Limusa. México, D. F. pp 9-152.

Salisbury, F. B. 1994. Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamericana. México, D.F. pp 583- 585.

Sampietro, D. A. 2004. Alelopatía: Concepto, características, metodología de estudio e importancia. Cátedra de Fitoquímica. Instituto de Estudios Vegetales. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina. <http://www.biología.edu.ar/plantas/alelopatia.htm>

SARH. 1980. Principales Plagas del Maíz. Dirección General de Sanidad Vegetal. Pp 7-11, 33-35.

Serratos, A., Arnanson, J. T., Nozzolillo, C., Lambert, J.D.H. Philogene, B.J.R., Fulcher, G., Davison, K., Peacock, L., Atkinson, J., Morand, P. 1987. Factors contributing to resistance of exotic maize populations to maize weevil, *Sitophilus zeamais*. J. Chem. Ecol. 13:751-762.

Serratos, H. J. A. 1993. Análisis genético de algunas características bioquímicas y estructurales del grano de maíz (*Zea mays*) y su relación con la resistencia a la infestación de *Sitophilus zeamais* (Match). Tesis doctoral CINVESTAV Unidad Irapuato, Guanajuato.

Smith C. M. 1994. An overview of the mechanisms and bases of insect resistance in maize. citado en: Mihm, J. A. 1997. Insect, resistant maize: Recent Advances and Utilization; Proceedings of an International Symposium held at the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMyT). 27 november-3 december, 1994. México.

Snook, H. E., Widstrom, N. W. y Gueldner, R. C. 1989. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of maysin in corn silks. *J. Chromatography* 477:439-477.

Swain, T. 1979. Tannins and lignins. En: G. A. Rosenthal y D. H. Janzen (Eds) *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites*, Academic Press, New York. pp. 657-682.

Van Soest, P. J. and Moore, L. A. 1965. New Chemical methods for analysis of forages for the purpose of predicting nutritive value. *Proc. 9th. Intern. Grassld. Congr. Brasil.* 9:783-789.

Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional Ecology of the ruminant*. Cornell University Press. 2nd ed. 476 pp.

Williams W. P., Davis F. M. 1994. Mechanisms and bases of Resistance in Maize to Southwestern corn borer and Fall Armyworm. citado en: Mihm, J. A. 1997. *Insect, resistant maize: Recent Advances and Utilization; Proceedings of an International Symposium held at the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT)*. 27 november-3 december, 1994. México.

Wiseman, B R., and Carpenter J. E. 1995. Growth inhibition of corn earworm (*Lepidoptera:Noctuidea*) larvae reared on resistant corn silk diets. *J. Econ. Entomol.* 88:1037-1043.

Wiseman, B R., Wilson, R. L. y Isenhour, D. J. 1992. Allelochemical content of selected popcorn silks: effects on growth of corn earworm larvae (*Lepidoptera:Noctuidae*). *Plant Resistance. Journal of Economic Entomology* 85(6):2500-2504.

Zúñiga R. B., 1998, Análisis de compuestos fenólicos en hojas y estigmas de maíz como respuesta frente al gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* y al gusano barrenador *Diatraea grandiosella*. Tesis Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. pp 11.