

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS AMBIENTALES Y ECOLÓGICAS
POSTGRADO DE ECOLOGÍA TROPICAL
Y EL LABORATORIO DE QUÍMICA ECOLÓGICA

CIANOGENÉESIS EN LA INTERACCIÓN *PASSIFLORA*
CAPSULARIS (PASSIFLORACEAE) CON LEPIDÓPTEROS
ESPECIALISTAS Y GENERALISTAS

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
REALIZADO POR EL LIC. JORGE
LUIS AVILA N. BAJO LA TUTORÍA
DEL DR. MIGUEL ALONSO COMO
REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER LA MAESTRÍA EN
ECOLOGÍA TROPICAL

MÉRIDA, MAYO DE 2002.

VEREDICTO

Quienes suscriben, integrantes del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, para conocer y emitir veredicto sobre el TRABAJO DE GRADO DE MAESTRIA presentado por **AVILA N., JORGE LUIS**, para optar al titulo de **Magíster Scientae en Ecología Tropical** y que se titula:

“Cianogénesis en la interacción de *Passiflora capsularis* (Pasifloráceas) con lepidópteros especialistas y generalistas”

Hacen constar lo siguiente:

PRIMERO: Que el día 07 de marzo del 2002, a las 3:00 p.m. nos constituimos como jurado en las Oficinas del Grupo de Química Ecológica de la Facultad de Ciencias, siendo Presidente del Jurado el Dr. Miguel Alonso A. **SEGUNDO:** Luego de considerar las observaciones y críticas de cada miembro del jurado, acordamos por unanimidad, autorizar su presentación en su debido plazo. **TERCERO:** A las 4:00 p.m. del día 06 de mayo del 2002, el jurado se reunió en el Salón A-17 de la Facultad de Ciencias y se dio curso al acto público de presentación del trabajo de grado presentado a requerimiento del jurado. **CUARTO:** Una vez concluida la sustentación correspondiente, el jurado interrogó al aspirante sobre los diversos aspectos a que el trabajo se refiere y consideró satisfactorias sus respuestas. **QUINTO:** Seguidamente el Presidente del Jurado invitó al público asistente a formular preguntas y observaciones sobre el trabajo presentado. **SEXTO:** Una vez concluido el acto de presentación, el jurado procedió a su deliberación final y concluyo que: **SE APRUEBA EL TRABAJO DE GRADO DE MAESTRIA PRESENTADO A NUESTRA CONSIDERACIÓN**

Dr. Miguel Alonso A.
Tutor



Dr. Samuel Segnini
Jurado

Dra. María Pía Calcagno de López
Jurado

DEDICATORIA

Dios es mi fortaleza y mi escudo; en él confié mi corazón y fui ayudado, por lo que se gozó mi corazón y con mi cántico lo alabaré.

Salmo 28

Este logro adquiere verdadero significado cuando pienso en la gente que quiero y me motivó a conseguirlo: A mis Padres, Mis hijas Cecilia y Mercedes, Hermanos y Sobrinos. A todos mis amigos...

Agradecimientos

Muchas cosas he de agradecer al Dr. Miguel Alonso. Especialmente el permitirme ingresar en el Laboratorio de Química Ecológica y conocer el interesante mundo de las interacciones insecto-planta mediadas por compuestos químicos. Su motivación y apoyo resultaron determinantes para mi incorporación al Postgrado de Ecología Tropical y en su labor tutorial siempre conté con valiosas sugerencias para el desarrollo de éste trabajo.

Al Dr. Luis Daniel Otero, amigo valioso y estupendo conversador para orientar ideas aquí planteadas.

Mi reconocimiento al Dr. Samuel Segnini por su excelente disposición para asesorarme en el manejo de los datos, facilitarme literatura de apoyo y prestarme muchas herramientas de su bien surtido “almacén”.

La Dra. María Pía Calcagno participó activamente en la corrección de este trabajo, pero su distinción más notable proviene de su cálida condición humana que hizo más agradable el trabajo en el laboratorio..

Mi más expresiva manifestación de afecto para Alicia (Elbita), Dennys, Ibis Janet, Marisabel, Lianne, Milagros (“socia” en la colecta de las polillas), Shanti, Berioskha y Elida. Todo un harem de mujeres bellas y solidarias.

Gracias a Shantiluz Sánchez por su dedicación en la cría de las “Spodopteras”.

Al Prof. Alberto Oliveros por ayudarme en el manejo de las técnicas de medición de la cianogénesis y por aportarme literatura sobre el tema.

Mi gratitud a Vanesa Maldonado y Marjorie Machado por suministrarme especímenes de sus colonias para los bioensayos.

Mi hermano Leonardo Avila, siempre estuvo dispuesto a asistirme técnicamente en la digitalización de las imágenes de los bioensayos.

A los compañeros de reciente ingreso al laboratorio: Aira Yira, Marlene, Yamilet, Román y Reinaldo; siempre colaboradores.

La Prof. Mayerli Uzcátegui y el Br. Alfredo Ramos del SUMA (ULA) oportunamente prestaron su apoyo para la presentación audiovisual de la tesis.

A la querida Universidad de Los Andes, lugar donde he tenido el privilegio de forjar mi formación académica.

Esta tesis fué desarrollada en las instalaciones del Laboratorio de Química Ecológica (ULA) con el apoyo financiero del proyecto S1-97001302 del CONICIT.

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE CONTENIDO.....	iv
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	v
RESUMEN.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 La interfase planta/ insecto como modelo de interacción.....	3
1.2 Destino de los compuestos químicos defensivos en la interacción.....	5
1.3 La cianogénesis: Un ejemplo de interacción química entre plantas e insectos.....	10
1.3.1 La cianogénesis en las plantas.....	10
1.3.1.1 La función defensiva de los cianoglicósidos en las plantas.....	13
1.3.2 La cianogénesis en los insectos.....	16
1.4 La interfase Passifloraceae-Lepidoptera como modelo cianogénico	17
1.4.1 La asociación <i>Passiflora</i> -Heliconiinae.....	17
1.4.2 La asociación <i>Passiflora</i> -Dioptinae.....	23
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	27
3. OBJETIVOS.....	29
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
4.1 Breve descripción de las especies.....	30
4.2 Colecta y cría de los insectos.....	36
4.3 Descripción del método de cuantificación de la cianogénesis.....	38
4.4 Determinación del contenido cianogénico de <i>P. Capsularis</i>	39
4.5 Determinación del contenido cianogénico en las larvas del estudio.....	41
4.6 Medición de la capacidad defensiva de las larvas.....	43
4.7 Determinación de la liberación de HCN en larvas perturbadas.....	43
4.8 Evaluación de la responsabilidad de los cianoglicósidos en la defensa.....	43
4.9 Análisis estadístico de los resultados.....	45
5. RESULTADOS.....	46
5.1 Contenido de HCN en las hojas de <i>P. capsularis</i>	46
5.2 Cuantificación del consumo de las hojas de <i>P. capsularis</i>	52
5.3 Cantidad de HCN liberado en la alimentación larval.....	54
5.4 Destino de los cianoglicósidos ingeridos por las larvas.....	55
5.5 Cantidad de cianoglicósidos excretados en las heces.....	57
5.6 Capacidad defensiva de las larvas.....	58
5.8 Balance global del flujo de los cianoglicósidos en los sistemas estudiados.....	62
6. DISCUSIÓN.....	67
6. Cianogénesis de las hojas de <i>P. capsularis</i>	67
6.1 Comportamiento de las larvas cuando se alimentan de <i>P. capsularis</i>	69
6.2 Destino de los cianoglicósidos en las larvas.....	72
6.4 Capacidad defensiva de las larvas y su relación con los cianoglicósidos.....	76
7. CONCLUSIONES.....	81
8. REFERENCIAS.....	83
9. APÉNDICE.....	91

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.1 Asociaciones reconocidas entre mariposas y plantas.....	6
Tabla 1.1 Insectos que secuestran aleloquímicos.....	7
Figura 1.2 Destino de los aleloquímicos en la interacción planta-insecto.....	9
Figura 1.3 Degradación enzimática de los cianoglicósidos.....	11
Tabla 1.2 Ejemplos de plantas cianogénicas.....	12
Figura 1.4 Metabolismo de los cianoglicósidos en lepidópteros.....	14
Figura 1.5 Localización estructural de los cianoglicósidos.....	15
Tabla 1.3 Lepidópteros cianogénicos.....	15
Figura 1.6 Especies de Passifloraceas.....	20
Figuras 1.7 y 1.8 Estructuras de Cianoglicósidos.....	21
Figura 1.9 Especies de Heliconiinae.....	22
Figura 1.10 Especies de Josiini.....	24
Figura 1.11 Larvas de Josiini.....	25
Figuras 2.1 y 2.2 Rutas hipotéticas de los cianoglicósidos.....	28
Figura 4.1 <i>Passiflora capsularis</i>	31
Figura 4.2 Larva de <i>Josia radians</i>	34
Figura 4.3 Larva de <i>Heliconius erato</i>	34
Figura 4.4 Larva de <i>Spodoptera frugiperda</i>	35
Figura 4.5 Obrera de <i>Odontomachus chelifer</i>	35
Figura 4.6 Area de colecta.....	37
Figura 4.7 Sistema de detección de HCN.....	40
Figura 4.8 Dispositivo para el bioensayo de depredación.....	44
Tabla 5.1 Contenido cianogénico de <i>P. capsularis</i>	47
Figura 5.1 Relación entre capacidad cianogénica vs. Peso de la hoja.....	48
Figura 5.2 Relación entre capacidad cianogénica vs. Area de la hoja.....	48
Figura 5.3 Relación peso y área en hojas de <i>P. capsularis</i>	49
Tabla 5.2 Contenido cianogénico en hojas de <i>P. capsularis</i>	50
Figura 5.4 Contenido cianogénico de <i>P. capsularis</i> en los experimentos larvales.....	51
Tabla 5.3 Consumo de <i>P. capsularis</i> por las larvas de acuerdo al peso foliar.....	53
Tabla 5.4 Consumo de <i>P. capsularis</i> por las larvas de acuerdo al área foliar.....	53
Tabla 5.5 Comparación del consumo de <i>S. frugiperda</i>	54
Tabla 5.6 Cantidad de HCN liberado en la alimentación larval.....	54
Tabla 5.7 Distribución de Cianoglicósidos en los tejidos larvales.....	56
Tabla 5.8 Distribución de Cianoglicósidos en los tejidos larvales.....	57
Tabla 5.9 Cianoglicósidos en las heces.....	58
Figura 5.5 Comportamiento depredatorio de <i>Odontomachus chelifer</i>	59
Figura 5.6 Respuesta depredatoria de <i>Odontomachus chelifer</i>	60
Figura 5.7 Respuesta de ataque de <i>Odontomachus chelifer</i>	61
Tabla 5.10 HCN liberado en el acto de depredación.....	62
Figuras 5.8, 5.9, 5.10 Distribución de cianoglicósidos en los sistemas.....	64
Tabla 6.1 Comparación de la capacidad cianogénica entre especies vegetales.....	68
Tabla 9.1 Dieta artificial para <i>J. radians</i> y <i>H.erato</i>	91
Tabla 9.2 Dieta artificial para <i>S. frugiperda</i>	92
Tabla 9.3 Respuesta depredatoria de <i>Zelus sp</i>	93
Tabla 9.4 Capacidad cianogénica de adultos de <i>J. radians</i>	95

RESUMEN

Desde el reconocimiento en décadas pasadas que las plantas poseen mecanismos químicos defensivos para hacer frente al ataque de insectos herbívoros y que éstos a su vez han desarrollado la capacidad para secuestrar los metabolitos secundarios provenientes de las plantas para usarlos contra sus depredadores, existe un marcado interés por estudiar, a través de diferentes modelos de interacción, los patrones de uso de los aleloquímicos en un contexto que integre estos tres niveles tróficos. Dentro del sistema de interacción Passifloraceae-Lepidóptera existe una particularidad química que lo convierte en un modelo muy atractivo de estudiar. Esta familia de plantas tiene la capacidad para producir una importante carga de cianoglicósidos que mediante la hidrólisis enzimática puede descomponerse para producir el volátil tóxico ácido cianhídrico (HCN). Se considera que esta propiedad cianogénica ha sido desarrollada como estrategia para frenar la herbivoría, pero que procesos coevolutivos han permitido que lepidópteros, como los heliconiinae y dioptinae hayan logrado superar tal barrera química para especializarse en el uso de esta planta como recurso de alimentación, reforzada por el carácter protector contra la depredación que le confiere el paso de estos compuestos a sus tejidos.

El presente trabajo aborda la interacción de *P. capsularis* con dos lepidópteros especializados en el consumo de ésta: *Heliconius erato* y *Josia radians*, y con otro que posee hábitos de alimentación generalista como lo es *Spodoptera frugiperda*. Se propuso comparar los patrones de uso de los cianoglicósidos por estos insectos, verificando desde el punto inicial del reconocimiento del aleloquímico en la planta, pasando por las opciones que sigue el herbívoro de ingerirlo o rechazarlo, tolerarlo y absorberlo (o detoxificarlo y excretarlo), acumularlo y usarlo para su defensa contra la hormiga generalista *Odontomachus chelifer*. Este seguimiento se hizo a través de la determinación colorimétrica del HCN liberado de tejidos y excretas. El examen del comportamiento de estos modelos reveló que la especie generalista *S. frugiperda* presentó un menor consumo de tejido foliar que las larvas especialistas acompañada con una mayor tasa de liberación de HCN durante la alimentación. Las tres especies ingirieron más de 90% de la carga inicial de cianoglicósidos contenido en la porción de tejido foliar consumido. Dentro del cuerpo de las larvas, los cianoglicósidos siguieron rutas semejantes en las tres especies. Estos

compuestos fueron detectados , luego de 24 horas, en el tubo digestivo (*S. frugiperda* presentó la mayor fracción de éstos en este compartimiento), pared corporal y, en menor cantidad, en la hemolinfa. Otra ruta de destino de los cianoglicósidos resultó ser su eliminación a través de las heces, particularmente importante en la especie generalista. Del análisis del balance global de los cianoglicósidos en los tres sistemas se obtuvo que la mayor parte del contenido inicial ingerido resultó degradado posiblemente para provecho metabólico. Los bioensayos con el depredador señalaron una mayor capacidad defensiva en las larvas especialistas que en la generalista aunque la responsabilidad del HCN en la misma no pudo ser establecida. Se plantea que otros compuestos diferentes a los cianoglicósidos pudieran jugar un papel más importante en conferir esta propiedad.

1. INTRODUCCION

El estudio de las interacciones insecto-planta constituyen ejemplos apropiados para examinar la compleja y delicada red de relaciones que permiten la coexistencia de especies animales y vegetales en un ambiente y tiempo determinado. Independientemente de que la planta hospedera sea considerada por el insecto como recurso aprovechable para la nutrición, oviposición o refugio, su asociación con un rango específico de plantas está mediada esencialmente por relaciones de naturaleza química. En cuanto al uso de las plantas como recurso nutricional por parte de insectos herbívoros, se considera que los llamados metabolitos secundarios juegan un papel fundamental como agentes defensivos para las especies vegetales (Whittaker y Feeney, 1971; Rhoades y Cates, 1976; Rhoades, 1979). Estos compuestos se les ha denominado “secundarios” debido a que las funciones fisiológicas primarias en el organismo productor no son tan conocidas (Rosenthal, 2000). Estas sustancias pueden actuar en funciones muy diversas en las que pueden participar como reguladores del crecimiento vegetal, como compuestos de reserva energética y de heteroelementos, en la protección contra radiaciones solares excesivas, como agentes de competencia frente a otras especies vegetales o defensivos ante organismos herbívoros y microbianos patógenos (Chew y Rodman, 1979).

La presencia o ausencia de determinados metabolitos secundarios hace que cada herbívoro esté asociado a un universo específico de plantas hospederas. Aunque este espectro esté reducido a una única especie o incluya otras más, la estabilidad de la interacción planta-insecto estará en dependencia de la capacidad del insecto para localizar a la planta hospedera y poder sortear la estrategias defensivas que ésta posea, entre otras, la existencia de los compuestos que actúan para frenar el proceso de herbivoría.

Dentro de esta red de relaciones multitróficas, los insectos herbívoros a su vez han desarrollado respuestas para enfrentar este arsenal químico que poseen las plantas.

Muchas especies han conseguido adaptarse a estos mecanismos defensivos convirtiendo tales compuestos dañinos en fuentes de nutrición o protección contra otros organismos que actúan como sus depredadores, estableciéndose asociaciones aleloquímicas que pueden extenderse más allá de dos niveles tróficos (Whitman, 1988).

Existen diversas especies de insectos que incorporan compuestos químicos de sus plantas hospederas y los usan como defensas contra depredadores, fenómeno conocido como “secuestro” de metabolitos secundarios (Duffey, 1980). Muchos de los insectos impalatables para el gusto de los depredadores deben su protección al reciclaje de compuestos producidos por especies vegetales sobre las cuales especializan su alimentación. Un ejemplo clásico de un insecto que explota una defensa química producida por una planta es la mariposa monarca *Danaus plexippus*. En 1967, L. P. Brower y colaboradores observaron que las larvas de esta mariposa alimentadas sobre *Asclepia curassavica*, planta que produce grandes cantidades de cardenólidos tóxicos, eran menos susceptibles a ser aceptadas como alimento por pájaros depredadores. Aquellos que consumían estas mariposas sufrían casi inmediatamente de vómitos y espasmos, obligándolos a rechazar las mariposas ofrecidas posteriormente como alimento. El análisis de los cardenólidos en adultos y pupas de la monarca, reveló cerca de 10 tipos diferentes de estos compuestos secundarios que también fueron hallados en las plantas hospederas (Brower et al. 1982). Este ejemplo de asociación, así como otros casos de secuestro de compuestos secundarios, se han considerado como procesos recíprocos en los cuales las propiedades y características de un organismo evolucionaron adaptativamente en respuesta a las propiedades específicas del otro organismo (Bowers, 1990).

En este contexto de relaciones químicas multilaterales, otros insectos especialistas que se alimentan de determinadas especies vegetales han desarrollado la capacidad de desintoxicar los compuestos defensivos destinados a frenar la herbivoría y a su vez muchas de ellas también han logrado incorporar mecanismos de excreción de estas sustancias para sortear su acción deletérea (Bowers, 1990).

En años recientes ha crecido el interés por el estudio de estas relaciones tritróficas en las cuales ocurre la transferencia de metabolitos secundarios de especies

hacia los niveles tróficos de herbivoría y depredación (Bowers, 1990; Schaffner et al.1994; Dyer y Bowers, 1996; Bowers y Stamp, 1997; Camara, 1997a; Osborn y Jaffe, 1998).

En las páginas siguientes se abordará algunos aspectos conocidos de este tipo de relaciones insecto-planta, haciendo énfasis especial en las interacciones en las que los compuestos cianogénicos participan en la regulación de la herbivoría por lepidópteros.

Esta revisión conducirá posteriormente a desarrollar, como proyecto de tesis, el estudio de varios sistemas de interacción planta herbívoro-depredador y las posibles rutas de destino de este grupo de aleloquímicos ingeridos por insectos herbívoros. Se hará especial hincapié en determinar si ocurren procesos de secuestro y su uso potencial como estrategia defensiva ante la depredación.

1.1. La interfase Planta / Lepidoptera como modelo de interacción

El concepto de interfase fue originalmente utilizado por Ehrlich y Raven (1964) para describir aquella zona de interacción entre una planta y su herbívoro en la cual se generan respuestas adaptativas responsables de producir la gran diversidad orgánica terrestre observada actualmente. Este concepto está sustentado básicamente sobre la selectividad que muchas especies de insectos hacen al momento de escoger las plantas que les servirán de recurso alimentario. En esta selección cumple una función determinante, como ha sido señalado anteriormente, la química defensiva de las plantas, de tal manera que la evolución de las plantas y los animales que se alimentan de ellas es el resultado de la lucha permanente de las estrategias de ataque y defensa de los elementos que integran la asociación.

Las ideas de este enfoque coevolutivo han sido inspiradoras de diversos estudios relacionados con las interacciones en sistemas donde la herbivoría resulta una presión selectiva importante. Particularmente, las asociaciones planta / lepidoptera han acaparado marcado interés en entender los patrones de uso del hospedador en los que la defensa química se sospecha que sea el principal elemento modulador de estas relaciones.

Posteriormente a estas ideas pioneras sobre coevolución, Miller (1992), estudiando las asociaciones de mariposas y polillas con sus hospedadores, planteó que los procesos coevolutivos, tal como los visualizaron Ehrlich & Raven (1964) son fenómenos más bien raros y que pareciera en cambio que la mayoría de los grupos de insectos fitófagos colonizaron sus hospedadores sobre la base de una diversidad vegetal ya existente empleando el término “evolución secuencial” (acuñado por Jermy, 1984) para nombrar a este proceso.

Este nuevo enfoque se basa sobre el uso de la metodología cladística como herramienta para la reconstrucción de la filogenia de las asociaciones entre plantas e insectos. Se ha encontrado que cuando los cladogramas de ambos componentes se superponen, existen pocos ejemplos donde se muestren paralelismos que lleven a pensar que los dos linajes que interactúan se hayan afectado mutuamente. Generalmente, lo que se ha encontrado es que este tipo de asociaciones son inestables, exhibiendo altos niveles de reversión y reaparición. En algunos casos ha ocurrido que grupos de lepidópteros tales como los Heliconiinae (Nymphalidae) y los Dioprinae (Notodontidae) han hecho transición de la alimentación desde las Violáceas a las Passifloraceas, estando estos dos grupos de lepidópteros poco relacionados filogenéticamente entre sí.

La tendencia a utilizar espectros muy estrechos o muy amplios de hospedadores por parte de polillas y mariposas ha seguido patrones muy diversos. En algunos linajes se ha hallado que la selección de hospedadores incluye grupos de plantas que por taxonomía y por química no están muy relacionados como ha sido comentado en el párrafo anterior. En el otro extremo, existen casos en los que un clado de insectos se alimenta de una especie de planta en particular, o sobre un número reducido de plantas estrechamente emparentadas, que por lo general poseen tipos de compuestos secundarios en común. Este tipo de asociaciones resulta clave para entender el significado evolutivo que los compuestos secundarios hayan tenido en el establecimiento de determinadas asociaciones insecto- planta.

Dentro del grupo de los lepidoptera existen varios casos de asociaciones muy específicas entre especies de mariposas y polillas con grupos especiales de plantas. Como ejemplo, varias especies de Papilionidos basan su dieta principalmente sobre las

Aristolochiáceas, las Danainae especializadas sobre las Asclepiadáceas, los Heliconiinae con las Pasifloráceas y los Ithomiinae con las Solenáceas (Fig 1.1).

1.2. Destino de los compuestos químicos defensivos de las plantas en la interacción Planta/ Insecto:

El enfoque integracionista del estudio de las asociaciones entre insectos y plantas condujo a despertar interés en develar las posibles rutas de destino de los compuestos tóxicos una vez que son ingeridos por los insectos herbívoros especialistas.

Un mecanismo importante dentro de este esquema de relaciones es el referente a la habilidad de ciertas especies de insectos herbívoros para desintoxicar los aleloquímicos ingeridos en su dieta. Este proceso de conversión metabólica se cumple por la acción de oxigenasas, reductasas, hidrolasas y transferasas que están localizadas principalmente en el cuerpo graso y los tejidos digestivos de los insectos (Johnson, 1999). Estos complejos enzimáticos convierten a los compuestos tóxicos ingeridos en formas más solubles en agua o los asocian por conjugación con productos más hidrofílicos (azúcares, fosfatos, sulfatos y otros) que poseen una mayor facilidad para ser excretados (Brattsten et al., 1977) (Fig.1. 2).

Otra ruta probable de destino de los metabolitos secundarios en la interfase insecto/ planta surge de la posibilidad de utilizar estos compuestos como estrategia defensiva antidepredador por parte de los insectos herbívoros. Esta propiedad de secuestrar compuestos tóxicos de sus plantas hospederas para su propia defensa está ampliamente señalada para varios órdenes de insectos (Bowers, 1990) (Tabla 1.1). Dentro del grupo de lepidópteros se han señalado mecanismos de secuestro de metabolitos secundarios a partir de plantas que fungen de hospederas para las formas larvales y/o adultas. En particular los estudios pioneros sobre *Danaus plexippus* y los cardenólidos, *Euphydryas phaeton* y los glicoiridoides, *Tyria jacobae* y los alcaloides pirrolizidínicos son reconocidos antecedentes en este campo de trabajo (Reichstein et al. 1968, Bowers, 1980, Aplin y Rothschild, 1968) .

Estudios posteriores han revelado que aunque muchas de las especies de lepidópteros que secuestran metabolitos son especialistas, este fenómeno también ha

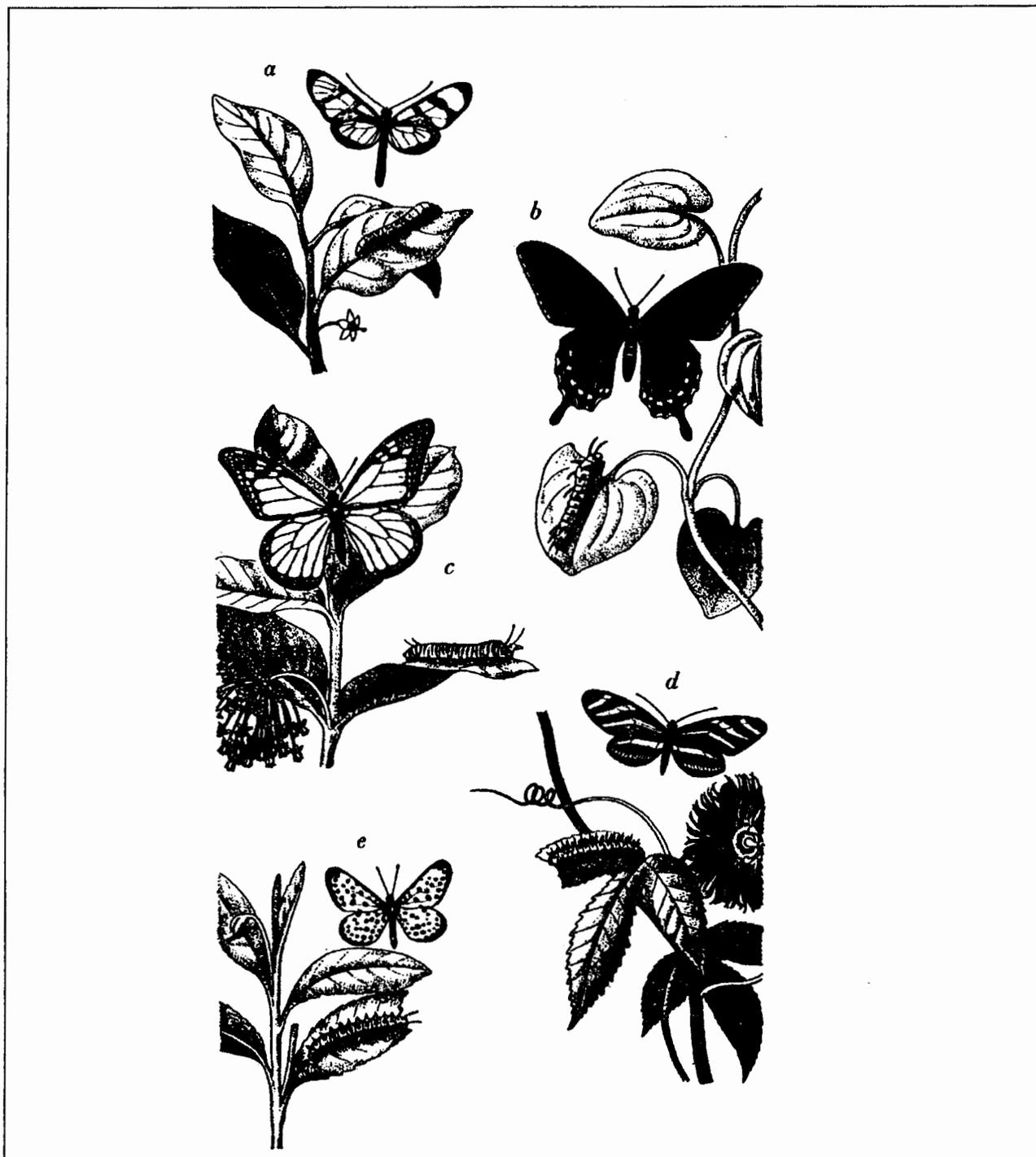


Fig.1.1. Asociaciones reconocidas entre mariposas y sus plantas hospederas. **a.** *Thyridia themisto* y las Solanáceas; **b.** *Battus phylenor* y las Aristolochiáceas; **c.** *Danaus plexippus* y las Asclepias; **d.** *Heliconius charitonius* y las Passifloras; **e.** *Pardopsis punctatissima* y las Violetas.

Tomado de Ehrlich & Raven, 1967.

Orden	Especie	Compuesto secuestrado	Planta hospedera
Orthoptera	Poekilocerus bufonis (Pyrgomorphidae)	Cardenólidos	Asclepiadaceae
	Zonocerus variegatus (Pyrgomorphidae)	Alcaloides pirrolizidínicos	<i>Crotalaria</i> spp. (Euphorbiaceae)
Hemiptera	Aphis nerii (Aphididae)	Cardenólidos	Asclepiadaceae
	Oncopeltus fasciatus (Lygidae)	Cardenólidos	Asclepiadaceae
	Neacoryphus bicrucis (Lygidae)	Alcaloides pirrolizidínicos	<i>Senecio</i> sp.
Neuroptera	Chrysopa carnea (Chrysopidae)	Cardenólidos	Secuestrados de la presa Aphis nerii
Coleoptera	Tetraopes oregonensis (Cerambycidae)	Cardenólidos	Asclepiadaceae
	Dibolia borealis (Chrysomelidae)	Glicoiridoides	Chelone glabra (Scrophulariaceae)
	Chrysolina brunsvicensis (Chrysomelidae)	Hipericina	Hypericum hirsutum (Guttiferae)
	Diabrotica bulfeata (Chrysomelidae)	Cucurbitacinas	Cucurbitaceae
Hymenoptera	Chrysolina brunsvicensis (Chrysomelidae)	Salicialdehído	Salicaceae
	Hyposoter exiguae (Ichneumonidae)	A-tomatina	Secuestrada de su hospedador <i>Heliothis</i>
	Neodiprion sertifer (Diprionidae)	Mono y sesquiterpenos	<i>Pinus</i> spp. (Pianaceae)
Lepidoptera	Danaus plexippus (Nymphalidae)	Cardenólidos	Asclepiadaceae
	Euphydryas phaeton (Nymphalidae)	Glicoiridoides	Scrophulariaceae
	Battus philenor (Papilionidae)	Acidos aristolóquicos	Aristolochiaceae
	Pieris brassicae (Pieridae)	Aceites de mostaza	Cruciferae
	Eumaeus atala (Lycaenidae)	Cicacina	Cycadaceae
	Tyria jacobaeae (Arctiidae)	Alcaloides pirrolizidínicos	Senecio jacobaea (Compositae)
	Eloria noyesi (Lymantriidae)	Cocaína	Erythroxylaceae

(Modificado de Bowers, 1990).

Tabla 1.1. Ejemplos de especies de insectos que secuestran aleloquímicos a partir de especies vegetales

sido señalado para especies con hábitos de alimentación generalistas tales como el arctiido *Pyrrhactia isabella* que secuestra glicósidos iridoides de varios taxa que los contienen (Bowers y Stamp, 1997).

Aunque el mecanismo de acumulación de compuestos tóxicos por ingestión puede ser en muchos casos el responsable de la protección antidepredadora para larvas y adultos en lepidópteros, no necesariamente garantiza *per se* que la asociación de una especie con una planta reconocida por sus defensas químicas convierta a su huésped en impalatable, ni que esta condición de impalatabilidad no pueda variar de acuerdo a características individuales y poblacionales de los componentes que participan del binomio planta-insecto (Brower, 1984). Esta variación puede estar relacionada, por ejemplo, al tipo y cantidad de compuestos presentes en la planta, a la capacidad intrínseca de acumulación por parte de los insectos y al estadio de desarrollo considerado, conformando por último el grado de protección química frente a potenciales depredadores (Dyer y Bowers, 1996). Una consecuencia importante que se deduce de lo anterior es que aunque los metabolitos secundarios secuestrados pueden ser efectivos protectores contra la depredación, el que esta estrategia defensiva sea efectiva comienza a definirse a partir de la selección de la planta por parte de las hembras en oviposición lo cual se reflejará no solamente sobre la calidad del sustrato de alimentación larval, sino también en el éxito al enfrentar sus enemigos naturales. Como las larvas recién eclosionadas son generalmente incapaces de movilizarse grandes distancias en la búsqueda de alimento, esto las hace particularmente dependientes de la “habilidad” que sus madres posean para encontrar la planta hospedera adecuada.

Seguido a la escogencia la planta hospedera idónea para oviponer, la efectividad en el secuestro de los compuestos defensivos puede tener varios componentes relacionados con el comportamiento de los insectos que pueden afectarla. Por ejemplo, se ha observado que una misma especie de insecto varía en su grado de protección cuando se alimenta de especies de plantas diferentes que contengan los mismos compuestos secuestrables (Camara, 1997a) y entre individuos conespecíficos que se nutren de la misma especie de planta (Gardner y Stermitz, 1988).

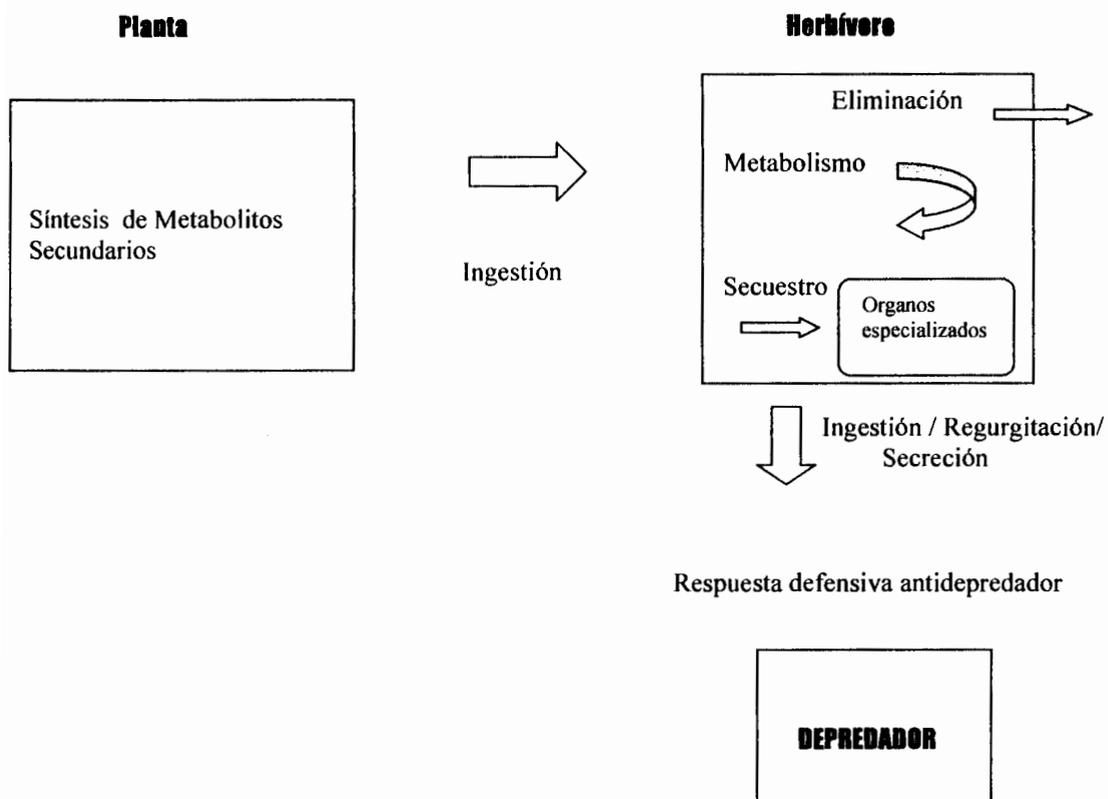


Fig. 1. 2. Destinos posibles de los metabolitos secundarios en la interacción Planta-Insecto

Inspirado en: Duffey, 1980 y Bowers, 1990.

Adicionalmente, puede haber variación de una etapa de desarrollo a otra (Wiesen et al. 1994) e inclusive compuestos secuestrados durante el desarrollo larval pueden perderse en la etapa adulta (Brown & Francini, 1990). También han sido observadas diferencias entre los sexos en la cantidad y tipo de aleloquímicos secuestrados (Stermitz et al. 1986).

El análisis de los componentes de variación que afectan la efectividad del secuestro como mecanismo de defensa en insectos no está completo si no se considera a los enemigos naturales susceptibles de ser afectados por éste. Como bien ha sido señalado por Price et al. (1980) y en tiempo más reciente por Camara (1997b), las interacciones entre plantas hospederas, sus herbívoros y los depredadores son variables aún a escalas geográficas reducidas. La abundancia de estos últimos, la habilidad para localizar las larvas y su capacidad para sortear la batería defensiva de las presas son algunos de los elementos importantes de tomar en cuenta en este enfoque holístico que definirían la efectividad del secuestro de compuestos por insectos para propósitos defensivos.

1.3. La Cianogénesis: Un ejemplo de interacción química entre Plantas e Insectos

1.3.1. La Cianogénesis en Plantas:

El fenómeno de la cianogénesis describe el proceso de liberación de HCN que se desencadena a partir del rompimiento de tejidos vegetales que contienen glicósidos cianogénicos. Estos compuestos son hidrolizados con la consecuente generación de glucosa, un aldehído o cetona y el cianuro de hidrógeno (HCN), poderoso inhibidor del sistema respiratorio en invertebrados y mamíferos (Conn, 1979) (Fig.1. 3).

Los glicósidos cianogénicos son producidos por un espectro muy amplio de diferentes plantas (Tabla 1.2), incluyendo especies cultivadas que forman parte

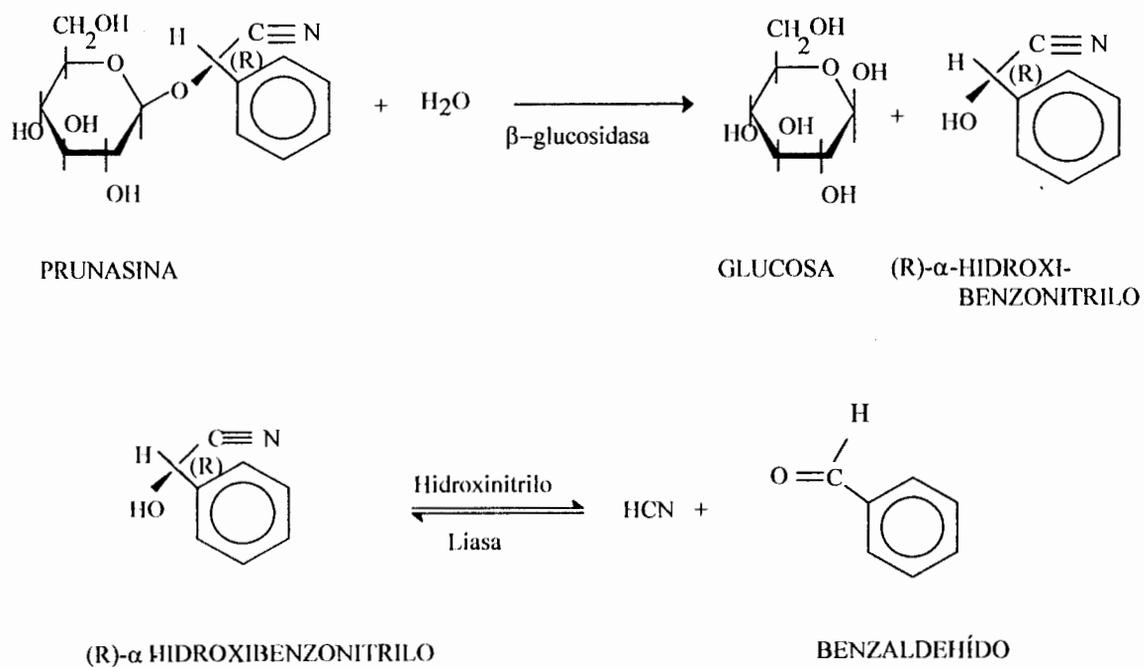


Fig. 1.3. Degradación enzimática de los cianoglicósidos
(Conn, 1979).

Compuesto	Especie	Familia
Acacipetalina	<i>Acacia constricta</i>	Leguminosae
Amydalina	<i>Prunus amygdalus</i>	Rosaceae
Cariospermina	<i>Cardiospermum hirsutum</i>	Sapindaceae
Deidaclina	<i>Deidamia clematoides</i>	Passifloraceae
Dhurrina	<i>Sorghum almum</i>	Gramineae
Dihydroacacipetalina	<i>Acacia sieberiana</i>	Leguminosae
Gynocardina	<i>Gynocardia odorata</i>	Flacourtiaceae
Holocalina	<i>Sambucus nigra</i>	Caprifoliaceae
<i>p</i> -Hydroxymandelonitrilo	<i>Nandina domestica</i> <i>Thalictrum polycarpum</i>	Berberidaceae Ranunculaceae
Isotriglochicinina	<i>Alocasia macrorrhiza</i>	Araceae
Linamarina	<i>Lotus corniculatus</i> <i>Hevea brasiliensis</i> <i>Trifolium repens</i> <i>Phaseolus lunatus</i> <i>Dimorphotheca spectabilis</i> <i>Cnidocolus texanus</i> <i>Linum usitatissimum</i>	Leguminosae Compositae Euphorbiaceae Linaceae
Lotaustralina	<i>Trifolium repens</i> <i>Lotus australianis</i> <i>Manihot carthaginensis</i> <i>Linum perenne</i>	Leguminosae Euphorbiaceae Linaceae
Lucumina	<i>Lucuma mammosa</i>	Sapotaceae
Prunasina	<i>Sambucus nigra</i> <i>Eremophila maculata</i> <i>Eucalyptus cladocalyx</i> <i>Pteridium aquilinum</i> <i>Prunus persica</i> <i>Jamesia americana</i> <i>Linaria minor</i>	Caprifoliaceae Myoporaceae Myrtaceae Polypodiaceae Rosaceae Saxifragaceae Scrophulariaceae
Sambunigrina	<i>Sambucus nigra</i>	Caprifoliaceae
Taxiphylina	<i>Taxus baccata</i>	Taxaceae
Tetraphylina	<i>Tetraphalea tetrandra</i>	Passifloraceae
Triglochicinina	<i>Alocasia macrorrhiza</i>	Araceae
Triglochicinnina metil ester	<i>Thalictrum aquilegifolium</i>	Ranunculaceae
Vicianina	<i>Vicia macrocarpa</i>	Leguminosae
Zierina	<i>Zieria laevigata</i>	Rutaceae

Tomado y modificado de Conn, E. (1979).

Tabla 1.2. Distribución de Cianoglicósidos en las familias de Plantas.

importante de la dieta humana, tales como la yuca, el trigo, la cebada, y la avena, entre otros (Jones, 1998). Las plantas con propiedades cianogénicas contienen, además de los glicósidos cianogénicos, enzimas degradativas que luego del rompimiento celular entran en contacto con tales compuestos provocando la rápida liberación del HCN. Este sistema funciona como una “ bomba de cianuro” donde los componentes enzima-sustrato están situados en espacios celulares diferentes, haciéndolos inertes individualmente para así evitar la autotoxicidad de la planta (Rhodes, 2000) (Fig.1.5).

Estos compuestos son biosintetizados a partir de aminoácidos como la tirosina, fenilalanina, valina, isoleucina o leucina y aproximadamente 60 tipos diferentes de ellos han sido identificados a partir de plantas vasculares (Brinkler y Seigler, 1992).

El principal mecanismo para la desintoxicación de los cianoglicósidos se considera que es la conversión del anión cianuro al anión tiocianato, proceso catalizado por la enzima rodanasa. Esta enzima ha sido detectada en tejidos animales, incluyendo mamíferos e insectos. Otro mecanismo alterno de desintoxicación ha sido observado en el milípedo *Harpaphe haydeniana* en el cual ocurre la conversión del HCN a β -cianoalanina y presumiblemente en un paso posterior a asparagina (Conn, 1979) (Fig. 1.4).

1.3.1.1. La función defensiva de los Cianoglicósidos en las plantas

Durante años se ha debatido acerca del papel defensivo que juegan los compuestos cianogénicos contra la acción de la herbivoría. Los trabajos realizados por Jones y colaboradores relacionados con la comprobación experimental de la efectividad tóxica de los cianoglicósidos derivados del trébol blanco *Trifolium repens* y *Lotus corniculatus* se han constituido en ejemplos clásicos de la química ecológica (Jones y Rothschild, 1962; Jones, 1962; por ejemplo).

Más recientemente, la función defensiva de la cianogénesis ha sido documentada en otros trabajos donde utilizan, principalmente, insectos y moluscos. En estos se observó su inhibición de la alimentación sobre plantas cianogénicas (Cooper y Swain, 1976; Schreiner et al. 1984; Nahrstedt, 1985; Jones, 1998). Se asume que esta

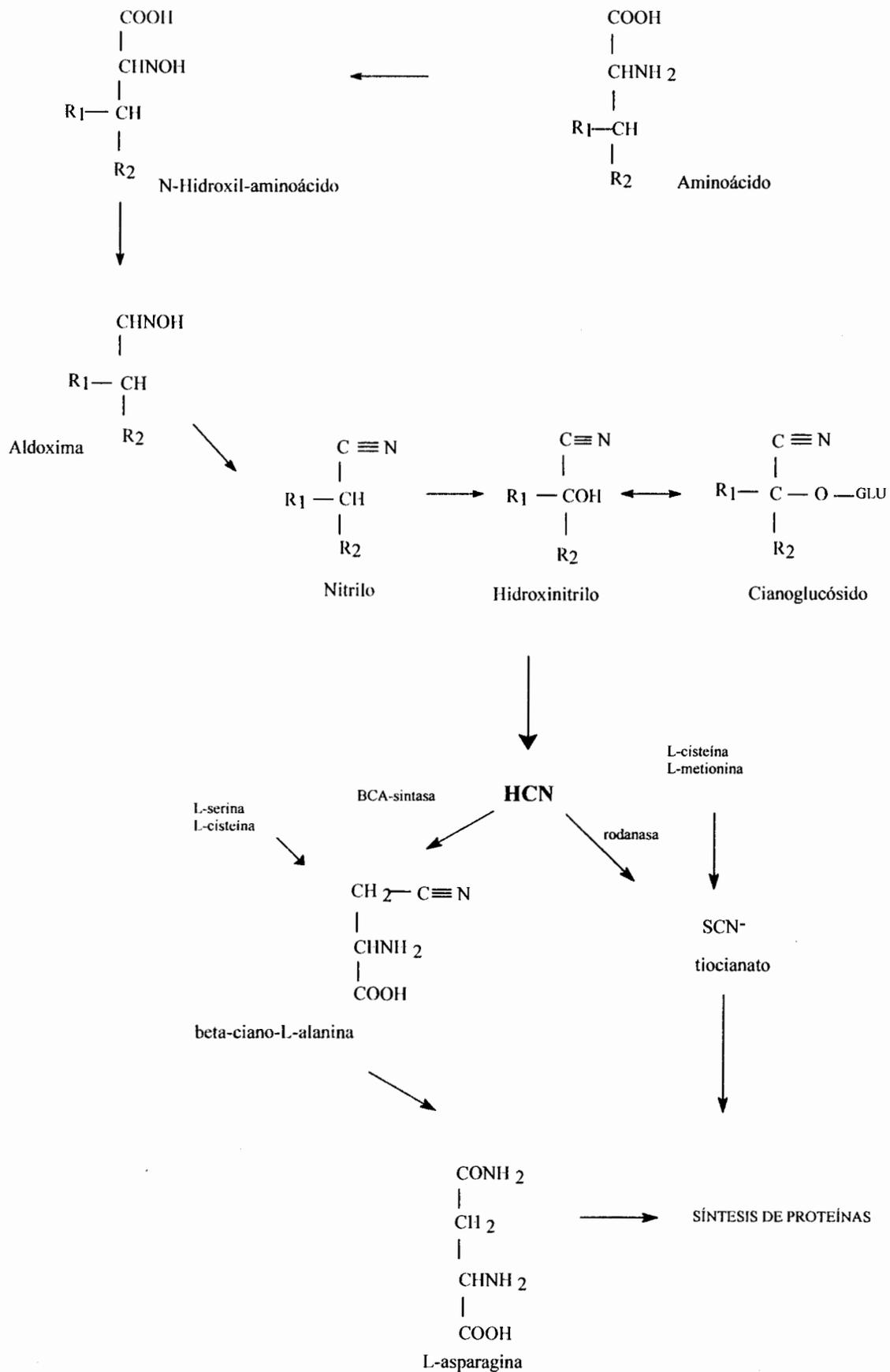


Fig.1.4. Metabolismo de los cianoglucósidos en los lepidópteros.
(Wiitthohn y Naumann, 1987)

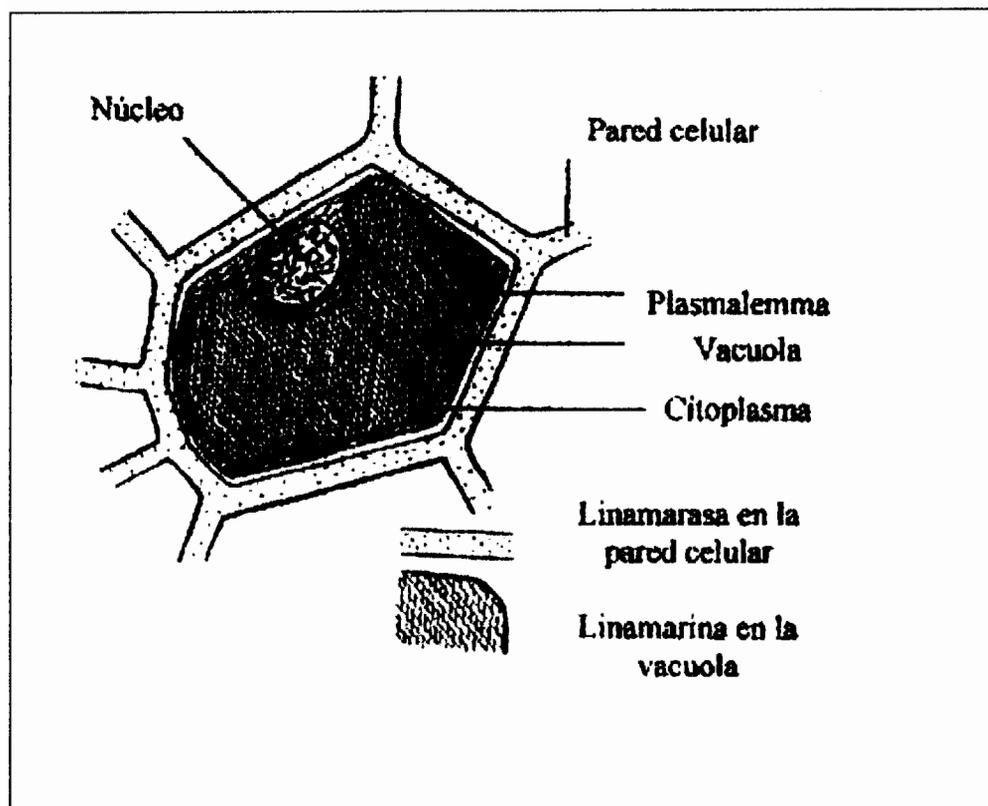


Fig. 1.5. Localización del cianoglicósido linamarina y de su enzima degradativa en la célula vegetal
(Kakes, 1993)

protección tiene su origen en los efectos tóxicos del cianuro, aunque también una posible actividad fagodepresora de los cianogénicos en sí mismos no parece ser descartable (Woodhead y Bernays, 1977). Estos autores enfatizaron la importancia del grado de liberación de HCN en la efectividad de la protección conferida por este tóxico. Se encontró que la cantidad de HCN dependía de la edad y variedad de los ejemplares de *Sorghum bicolor*, observándose que las hojas más jóvenes eran más a menudo rechazadas por el orthóptero *Locusta migratoria* que las de mayor edad. Esta dependencia del contenido de HCN en función de la edad de las hojas también ha sido observada en individuos de *Passiflora capsularis* por Alonso y Oliveros (2000).

Tales efectos de antiherbivoría no han sido observados siempre. Scriber (1978) no obtuvo diferencias importantes en la tasa de crecimiento, balance energético y utilización del nitrógeno en las larvas de *Spodoptera eridania* alimentadas en variedades cianogénicas y acianogénicas de *Lotus corniculatus*, concluyendo que la cianogénesis en esta especie de trébol no resultó un disuasivo efectivo para frenar la herbivoría de esta polilla generalista.

Por otra parte, Hruska (1988), en una revisión crítica de los estudios experimentales de la función protectora de estos compuestos, consideró que muchos de los trabajos realizados sobre el tema deberían reexaminarse dado que estos fallan en un adecuado análisis estadístico que aporte solidez a los resultados. El autor enfatizó la necesidad de tomar en cuenta la especificidad alimentaria del herbívoro ya que muchos de ellos tienen la capacidad para secuestrar o desintoxicar los compuestos cianogénicos por lo que estos insectos especialistas no responderán de la misma manera como aquellos con hábitos alimentarios menos restringidos.

1.3.2. La Cianogénesis en Insectos:

La presencia de cianoglicósidos en insectos es conocida y ha sido señalada para los órdenes heteróptera, coleóptera y lepidóptera (Nahrstedt, 1985). Se ha observado que varias especies de lepidópteros se alimentan preferentemente de plantas con reconocida actividad cianogénica y resulta factible pensar que su protección antidepredadora pueda derivarse de éstas (Bowers, 1988). Sin embargo, en algunos

géneros de lepidópteros como *Zygaena* y *Acraea*, siendo cianogénicas, la fuente de esta propiedad no proviene de las plantas hospederas de sus larvas, sino que estas especies biosintetizan sus cianoglicósidos independientemente de su dieta larval (Witthohn y Naumann, 1987), fenómeno conocido como síntesis *de novo* (Tabla 1.3).

Brown y Francini (1990) consideran a la cianogénesis en insectos como un mecanismo de defensa común, no específico y de efectividad moderada. Señalan que la tendencia más clara en las mariposas aposemáticas ha sido la de manifestar en el tiempo evolutivo una progresión hacia el desarrollo de mecanismos de síntesis *de novo* de las sustancias defensivas más que el almacenamiento de cantidades más pequeñas obtenidas de la alimentación larval.

El rol defensivo de los compuestos cianogénicos en plantas en insectos sigue siendo un tema polémico. Aunque los argumentos bioquímicos referidos a la acción tóxica del HCN son evidentes, las respuestas fisiológicas y ecológicas de herbívoros y depredadores necesitan ser mejor estudiadas.

1.4. La interfase Passifloraceae / Lepidoptera como modelos cianogénicos de interacción:

1.4.1. Asociación Passiflora/ Heliconiinae:

La familia Passifloraceae consta de 12 géneros, cuatro de los cuales, incluyendo a *Passiflora*, son exclusivos del nuevo mundo. Son plantas herbáceas, usualmente trepadoras de tallo blando o leñoso, con zarcillos opuestos a las hojas. Éstas son alternas, frecuentemente con glándulas secretoras en los pecíolos o distribuidas en el envés. Las hojas pueden ser simples o divididas en lóbulos. Las flores pueden ser pequeñas o grandes, de color azul lavanda, rosado, rojo, blanco o amarillo verdoso. Los frutos son generalmente carnosos interiormente, con una piel blanda o dura (Killip, 1938) (Fig.1.6).

Muchas de las especies de *Passiflora* tienen importancia económica debido a la calidad de sus frutos y su adaptabilidad para ser cultivadas como plantas ornamentales o

Familia	Especie	Etapas de Desarrollo	Planta hospedera de las larvas
Papilionidae	<i>Iphiclides podalirius</i>	Imago	Rosaceae
	<i>Zerynthia polyxena</i>	Imago	Crassulaceae
Pieridae	<i>Aporia crataegi</i>	Imago	Rosaceae
	<i>Pieris brassicae</i>	Imago	Brassicaceae
	<i>Colias phicomone</i>	Imago	Fabaceae
	<i>Gonepteryx rhamni</i>	Imago	Rhamnaceae
Nymphalidae	<i>Limenitis reducta</i>	Imago	Caprifoliaceae
	<i>Vanessa atalanta</i>	Imago	Urticaceae
	<i>Mesoacidalia aglaia</i>	Imago	Violaceae
	<i>Fabriciana niobe</i>	Imago	Violaceae
	<i>Issoria lathonia</i>	Imago	Violaceae
	<i>Danaus chrysippus</i>	Imago	Asclepiadaceae
	<i>Mechanitis polymnia</i>	Imago	Solanaceae
	<i>Acraea horta</i>	Imago	Passifloraceae
	<i>Acraea natalica</i>	Imago	Passifloraceae
	<i>Pardopsis punctatissima</i>	Imago	Poaceae
	<i>Heliconius doris</i>	Imago	Passifloraceae
<i>Heliconius charitonia</i>	Imago	Passifloraceae	
<i>Erebia meolans</i>	Imago	Passifloraceae	
Lycaenidae	<i>Normannia esculi</i>	Imago	Fagaceae
	<i>Cupido minimus</i>	Imago	Fabaceae
Hesperiidae	<i>Pyrgus sp.</i>	Imago	Rosaceae
	<i>Thymelicus lineola</i>	Imago	Poaceae
Lymantriidae	<i>Lymantria monacha</i>	Imago	Polífaga
Arctiidae	<i>Parasemia plantaginis</i>	Imago	Polífaga
Notodontidae	<i>Stauropus fagi</i>	Imago	Fagaceae
Zyganidae	<i>Rhagades pruni</i>	Imago	Ericaceae
	<i>Campylotes histrionicus</i>	Imago	Ericaceae
	<i>Zygaena orana</i>	Imago	Fabaceae
	<i>Zygaena trifolii</i>	Imago	Fabaceae
Megalopygidae	<i>Psycharium pellucens</i>	Larva	Pianaceae
Cymatophoridae	<i>Thyatira batis</i>	Imago	Rosaceae
Lasiocampidae	<i>Malacosoma neustria</i>	Imago	Polífaga
Noctuidae	<i>Noctua pronuba</i>	Imago	Polífaga
Geometridae	<i>Bapta temerata</i>	Imago	Rosaceae
	<i>Boarmia sp.</i>	Imago	Ericaceae
Yponomeutidae	<i>Gymnogramma rufiventris</i>	Imago	Anacardiaceae

Extraído de: Witthohn & Naumann (1987)

Tabla 1.3. Ejemplos de especies de Lepidópteros cianogénicos

medicinales. Los frutos de varias especies de *Passiflora* son aprovechados como alimento en el trópico, aunque muchos de ellos cuando están inmaduros son altamente tóxicos. Las hojas, tallos y semillas inmaduras son las partes de la planta con mayor contenido de compuestos cianogénicos (Seigler et al. 1982).

La química de las Passifloraceae se considera compleja por la variedad de los glicósidos cianogénicos, alcaloides, taninos y flavonoides que están presentes en esta familia (Bowers, 1988). En la década de los años 80 creció el interés por estudiar sus compuestos cianogénicos. En particular resulta importante señalar los trabajos de Seigler y colaboradores orientados hacia el aislamiento y caracterización de compuestos cianogénicos en el género *Passiflora* (Seigler et al., 1982; Spencer y Seigler, 1985; Spencer et al. 1986). La mayoría de las especies de *Passiflora* contienen cianógenos derivados del ciclopentano (Spencer y Seigler, 1985) como la passicapsina aislada de *Passiflora capsularis* (Fischer et al. 1982) pero también otros glicósidos derivados de los aminoácidos valina e isoleucina como la linamarina y lotaustralina, respectivamente, han sido aislados de este género (Spencer et al. 1986) (Fig.1.7 y 1.8).

Las mariposas de la subfamilia neotropical Heliconiinae han sido tradicionalmente asociadas a las passifloráceas. Son consideradas como impalatables a depredadores vertebrados (Brower, 1984), con patrones aposemáticos de coloración que advierten sobre esta condición. Históricamente, este grupo de mariposas ha sido utilizado como modelos para explicar los anillos de mimetismo Batesiano y Mulleriano (Turner, 1984) (Fig.1.9).

Las larvas de los Heliconiinae utilizan casi exclusivamente hojas de la familia Passifloraceae como alimento, por lo que han sido denominadas como las mariposas de las pasionarias (Turner, 1973; citado por Benson et al. 1975).

La presencia de cianoglicósidos linamarina y lotaustralina parece ser la base de la impalatabilidad de los heliconiinae. Todavía no existe acuerdo sobre el origen de estos compuestos en esta subfamilia. Nahrstedt y Davies (1983), detectaron la presencia de estos dos cianogénicos en varias especies de heliconines neotropicales, inclinándose a pensar que la linamarina y lotaustralina eran producidos por síntesis

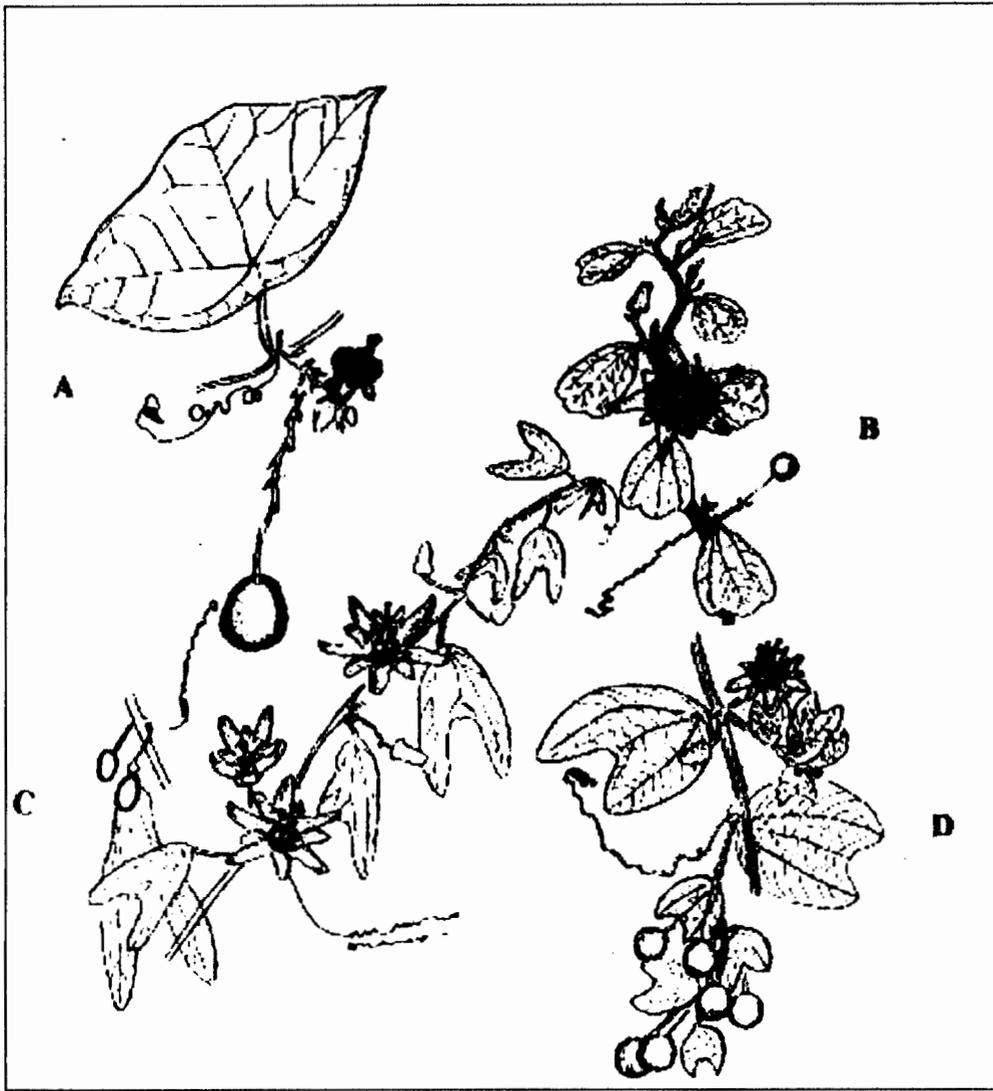
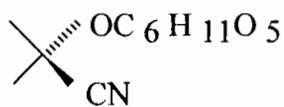
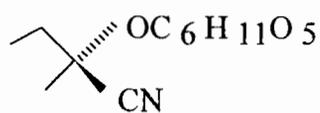


Fig. 1.6. Algunas especies de Passifloraceae.

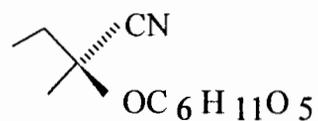
A. *Passiflora coriacea*. **B.** *Passiflora Kalbreyeri*. **C y D.** *Passiflora cuneata*.
Tomado de: Steyermark y Huber, 1978.



Linamarina

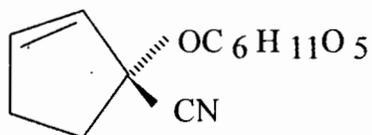


Lotaustralina

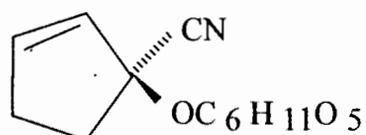


Epilotaustralina

Fig.1.7. Estructuras de varios cianoglicósidos comunes



Deidaclina



Tetrafilina A

Fig. 1.8. Estructuras de dos cianoglicósidos de *Passiflora capsularis*

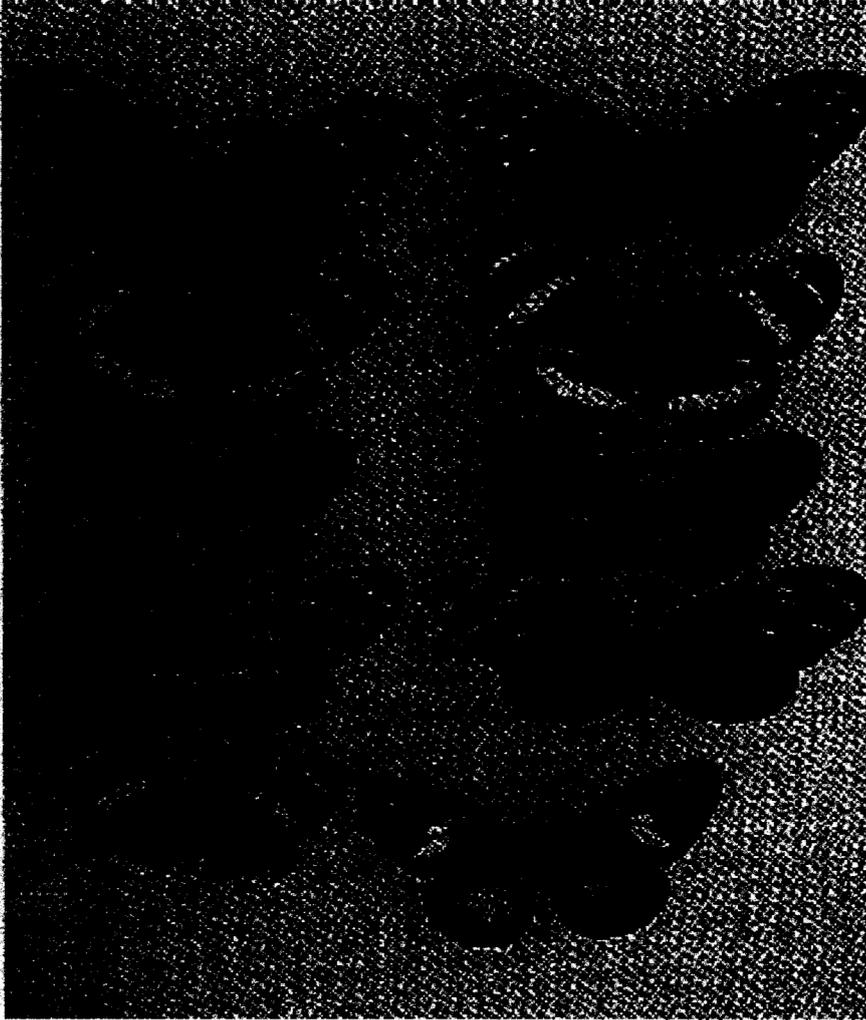


Fig.1.9. Algunas especies de Heliconiinae.

Columna Izquierda, de arriba hacia abajo: *Heliconius hecalesia*, *H. hewitsoni*, *H. erato*, *H. charitonia*, *H. sara*.

Columna Derecha, de arriba hacia abajo: *H. hecale*, *H. pachinus*, *H. melpomene*, *H. ismenius*, *H. doris*.

Tomado de Vane-Wright y Ackery, 1984.

“ de novo”, dado que en aquellos años todavía no se había aislado estos compuestos de especies de *Passiflora*. De esta manera la predicción de Brower y Brower (1964) acerca de que las mariposas Heliconiinae podrían secuestrar compuestos cianogénicos de sus hospederas para su propia defensa aún tiene vigencia y espera por resultados más contundentes.

La posibilidad de la síntesis de compuestos cianogénicos *de novo* no parece ser descartable. Witthohn y Naumann (1987) citando a Wray et al. (1983) señalaron que larvas de *Zygaena* sp., *Heliconius* sp. y *Acraea* sp. biosintetizan sus cianoglicósidos independientemente de la ingestión larval de plantas con propiedades cianogénicas. Las rutas de biosíntesis de estos compuestos coinciden con las seguidas por las plantas para la producción de la linamarina y lotaustralina.

1.4.2. Asociación Passifloraceae / Dioptinae.

Los Dioptinae pertenecen a la familia Notodontidae y agrupa aproximadamente 400 especies neotropicales (Byrk, 1930; citado por Miller & Otero, 1994). Este grupo de polillas resalta dentro de la familia Notodontidae por su coloración brillante y sus hábitos diurnos. (Fig.1.10).

Las especies del género *Josia* son los dioptinos más comúnmente colectados, con una distribución que incluye desde el sur de México hasta el norte de la Argentina. Las larvas se alimentan sobre hojas de *Passiflora* y constituyen junto con los Heliconiinos los taxa más estrechamente asociados con esta familia de plantas (Miller y Otero, 1994) (Fig. 1.11).

Miller (1992), ha establecido algunos paralelismos entre los Heliconiinae y Dioptinae basándose en el patrón de uso de las plantas hospederas. En ambos casos se cree que evolucionaron independientemente de especies palatables primitivas que se alimentaban sobre Violaceae hacia especies impalatables especializadas sobre *Passiflora*.

La asociación *Passiflora* / Dioptinae, en contraste con la interacción *Passiflora* / Heliconiinae ha sido poco estudiada. En particular, los registros sobre plantas hospederas

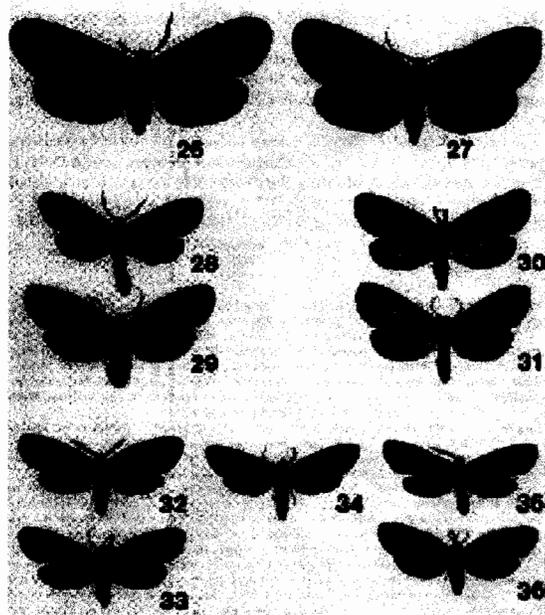


Fig. 1.10. Adultos de Josiini. 26. Macho de *Thirmida discinota*; 27. Hembra de *Thirmida discinota*; 28. Macho de *Josia radians*; 29. Hembra de *Josia radians*; 30. Macho de *Josia gopala*; 31. Hembra de *Josia gopala*; 32. Macho de *Josia turgida*; 33. Hembra de *Josia turgida*; 34. Macho de *Josia aurifusa*; 35. Macho de *Josia aurifusa*; 36. Hembra de *Josia aurifusa*. Tomado de Miller & Otero, 1994.

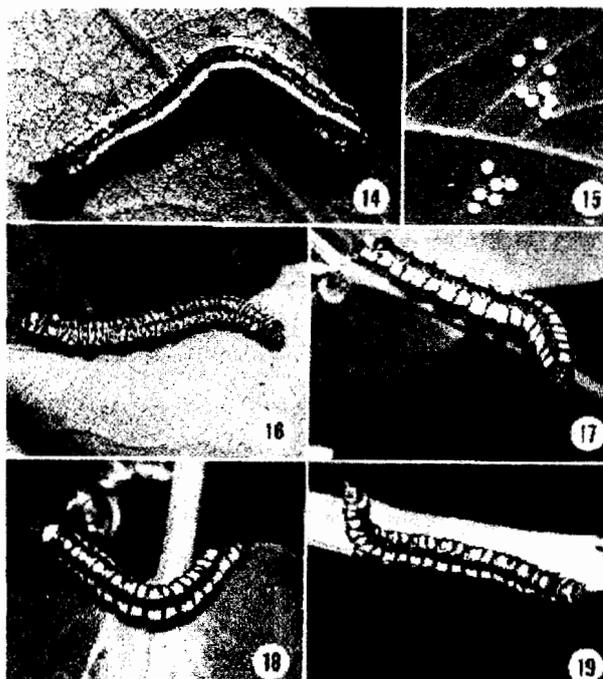


Fig. 1.11. Formas larvales de Josiini.

14. Larva de *Thirmida discinota* sobre *Passiflora bauhinifolia*
15. Huevos de *Thirmida discinota* sobre *Passiflora bauhinifolia*
16. Larva de *Josia radians* sobre *Passiflora capsularis*
17. Larva de *Josia gopala* sobre *Passiflora cuneata*
18. Larva de *Josia aurifusa* sobre *Passiflora capsularis*
19. Larva de *Josia turgida* sobre *Passiflora capsularis*

Tomado de Miller y Otero, 1994.

para el género *Josia* son escasos. Miller y Otero (1994), en su descripción de 5 especies de Josiini de Venezuela, señalaron que éstas ocupan un amplio espectro geográfico de distribución. Incluye desde selvas bajas hasta las selvas montano-altas de los Andes . En estos ecosistemas parecen preferir hábitats perturbados y bosques secundarios donde es común encontrar especies de pasifloráceas.

Las asociaciones *Passiflora* / Dioptinae junto con la asociación *Passiflora*/ Heliconiinae parecen representar modelos idóneos para el estudio de las interacciones en las que las barreras químicas han determinado la evolución de linajes altamente especializados sobre determinados tipos de plantas hospederas.

En relación con el papel que pudieran jugar los glicósidos cianogénicos en la especificidad de la interacción *Passiflora*/Dioptinae es poco lo que se conoce. El antecedente más reciente es el trabajo de Orellana (2000), en el cual se obtuvieron resultados que mostraron que la impalatabilidad de larvas de *Jossia radians* frente a la araña *Nephila clavipes* estaba relacionada con la utilización de plantas del orden Violales que incluye a la familia Passifloraceae y que esta condición de impalatabilidad es conservada por los adultos frente al mismo depredador. No obstante, la base química de la misma no pudo ser esclarecida, ya que tanto larvas en ayuno como ejemplares adultos resultaron negativos en pruebas colorimétricas para detectar compuestos cianogénicos.

El destino de estos compuestos luego de ser ingeridos por las larvas tanto de Heliconiinae como de Dioptinae todavía no está claro.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

- Sabiendo que *Passiflora capsularis* es una planta con reconocida actividad cianogénica, las larvas del herbívoro especialista *Josia radians* podrían utilizar sus compuestos cianogénicos y otros alelopáticos para protección frente a potenciales depredadores, debiendo estos compuestos ser localizables en los tejidos de las mismas (Fig.2.1).
- Conociendo que *Passiflora capsularis* posee propiedades cianogénicas, no deberían detectarse compuestos de esta naturaleza en larvas generalistas palatables como *Spodoptera frugiperda*, sugiriendo la posibilidad de que esos compuestos sean metabolizados o eliminados a través de las excretas (Fig.2.2).
- De la comparación del flujo de movilización de los cianoglicósidos en sistemas especializados como los Heliconiinae / Passifloraceae y Dioprinae / Passifloraceae debería observarse características más unificadoras entre éstos que con un sistema generalista como *Spodoptera frugiperda* / Passifloraceae.

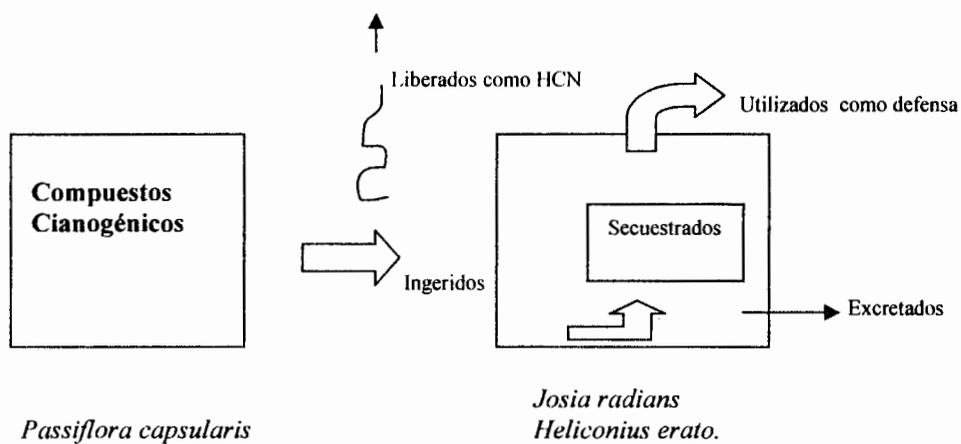


Fig. 2.1. Rutas hipotéticas de los cianoglicósidos en los insectos especialistas del estudio

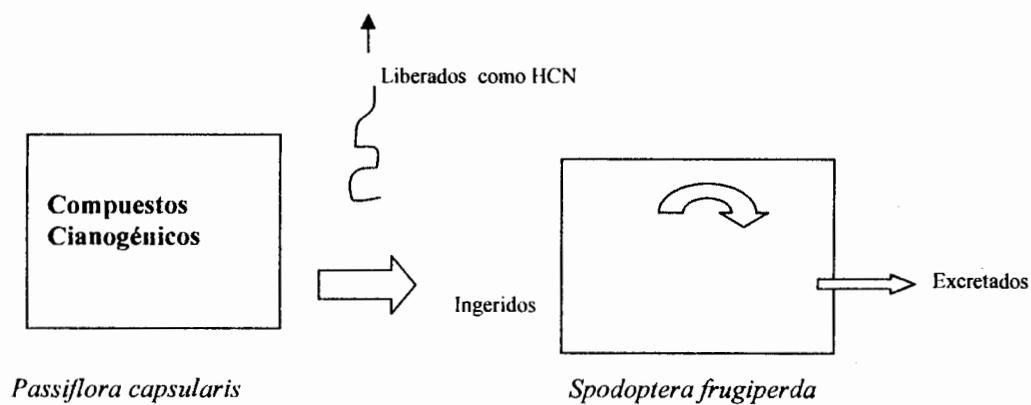


Fig. 2.2. Rutas hipotéticas de los cianoglicósidos en el insecto generalista en estudio

3. OBJETIVOS:

-Cuantificar el flujo de glicósidos cianogénicos mediante su transformación enzimática a HCN desde su localización original en las hojas de *P. capsularis*, hasta sus rutas de destino dentro de las larvas de *Josia radians* y *Heliconius erato* como modelos de herbívoros especialistas.

-Cuantificar el flujo del mismo grupo de compuestos desde las hojas de *P. capsularis*, hasta sus rutas de destino cuando son ingeridas por *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) como ejemplo de insecto generalista.

-Comparar los diagramas de flujo de los glicósidos cianogénicos derivados de los dos modelos anteriores.

-Determinar, en el caso comprobado de secuestro de los cianoglicósidos, si éstos constituyen una estrategia de defensa frente a la acción de una especie depredadora generalista como *Odontomachus chelifer* (Hymenoptera: Formicidae).

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Breve descripción de las especies:

Passiflora capsularis:

Esta planta trepadora pertenece a la familia Passifloraceae del orden de las vilolales. Killip (1938) la describe con tallo de tres a cinco ángulos que puede ser estriado, glabrado o pubescente. Hojas bilobuladas, en ocasiones asimétricos, de forma lanceolada o un tanto obtusos. La longitud del nervio central puede oscilar de dos a siete cm de ancho, mientras que los nervios laterales puede alcanzar los diez cm de longitud. Flores con una anchura de dos a seis cm, de color blanco o amarillo pálido, con una corona de filamentos dispuestos en una o dos series y sépalos lanceolados. Fruto elipsoidal o fusiforme de cinco a seis cm de largo y de uno a dos cm de diámetro. En su distribución geográfica esta especie se extiende desde Guatemala hasta el Brasil central y Paraguay en altitudes por encima de los 1600 m. (Fig.4.1)

Josia radians:

Es una polilla de hábitos diurnos perteneciente a la subfamilia Dioptinae (Notodontidae:Lepidoptera) (Fig. 4.2). Sus huevos son de color blanco perlado, puestos separadamente en el envés de las hojas de sus plantas hospederas. Las larvas presentan en el dorso del tórax y abdomen un complejo patrón de líneas amarillas y blancas sobre un fondo marrón rojizo, transcurriendo su desarrollo a través de cuatro instares. Los adultos poseen el dorso del tórax negro con una banda amarilla naranja a cada lado que se extiende a lo largo del abdomen. Alas anteriores y posteriores negras con una banda

amarilla que cubre dos terceras partes de éstas desde la base. Miller y Otero (1994) señalan su presencia desde el estado Aragua, pasando por el occidente de Venezuela,



Fig. 4.1. *Passiflora capsularis*

hasta la frontera con Colombia. En Venezuela estos autores colectaron a *J. radians* en lugares con elevaciones que oscilaron entre 1100 m (Parque Nacional Henri Pittier) hasta 2250 m (Las Playitas, Edo. Mérida). Esta especie puede habitar sitios muy variados que incluyen selvas nubladas y lugares con fuerte intervención humana como plantaciones y márgenes de carreteras. Estos mismos autores recolectaron esta especie sobre *P. capsularis*, *P. cuneata* y *P. rubra*.

Heliconius erato:

Mariposa perteneciente a la subfamilia heliconiinae (Nymphalidae: Lepidoptera)(Fig.4.3). Los huevos son amarillos con ápice puntiagudo, puestos en solitario sobre la punta de meristemas. Las larvas tienen una cápsula cefálica de color amarillo y espinas en la cabeza y resto del cuerpo. Cuerpo blanco con manchas negras y el desarrollo larval incluye cinco instares. Los adultos poseen una franja amarilla en las alas posteriores con extremos distales curvados hacia el margen costal. Las franjas rojas de las alas anteriores están cortadas agudamente en la zona donde éstas bordean con el fondo negro (DeVries, 1987).

Posee una amplia distribución geográfica, desde México hasta el Amazonas en altitudes desde el nivel del mar hasta superiores a los 1600 m. Frecuentemente ocupa bosques de vegetación secundaria y otros ambientes perturbados por el hombre. Sus larvas están estrechamente asociadas a especies del género *Passiflora*.

Spodoptera frugiperda

Es una polilla de la subfamilia Amphipyrinae (Noctuidea: Lepidoptera) (Fig.4.4). Los huevos tienen forma de domo y son puestos en grupos de 100 a 200 unidades, con una producción por hembra de aproximadamente 1500-2000 huevos. Las larvas crecen durante seis instares siendo los más avanzados de color marrón claro con líneas laterales blancas. Manchas oscuras y espinas se distribuyen dorsalmente a lo largo del cuerpo. En la zona frontal de la cápsula cefálica está dibujada una “ Y ” invertida. Los adultos tienen una amplitud alar de 32 a 40 mm. Son de color grisáceo y los machos poseen manchas blancas triangulares en la punta y cerca del centro de las alas

posteriores. Es una especie de las regiones tropicales del hemisferio occidental, desde los Estados Unidos hasta Argentina. Hace uso de un amplio rango de hospederos, registrándose más de 80 especies de plantas colonizables, aunque se considera que tiene mayor preferencia por las gramíneas. Es una plaga agrícola de importancia en muchos países, donde ataca el follaje de especies cultivadas como el maíz y plantas para el forrajeo del ganado, con graves pérdidas en muy poco tiempo.

Odontomachus chelifer :

Pertenece a la subfamilia Ponerinae (Formicidae: Hymenoptera) (Fig.4.5), de hábitos cazadores solitarios. Cuerpo marrón oscuro con una longitud variable entre 1.5 cm a 2.0 cm. Su característica morfológica más conspicua es la presencia de un par de mandíbulas fuertes y desarrolladas especializadas para la captura de pequeños insectos y otros artrópodos (Shaltuck y Barnett, 2000). El movimiento de las mandíbulas se conoce como golpe de mandíbula y circunscribe un arco de 180° desde su posición cerrada hasta que se abren completamente. Todo el movimiento se realiza en 0.3 milisegundos y se considera que es el más rápido exhibido por especie animal alguna (Gronenberg, 1996). Cada mandíbula tiene 1.8 mm de largo, 0.45 mm de ancho y 0.25 mm de grosor, con tres dientes en la punta que causan heridas en la presa. Forma colonias de pocos individuos y generalmente se le encuentra en bosque de vegetación secundaria aunque también es común hallarla en jardines y áreas cultivadas. Es una especie neotropical con una distribución que abarca desde México hasta Paraguay en un rango altitudinal de 0-1900m.

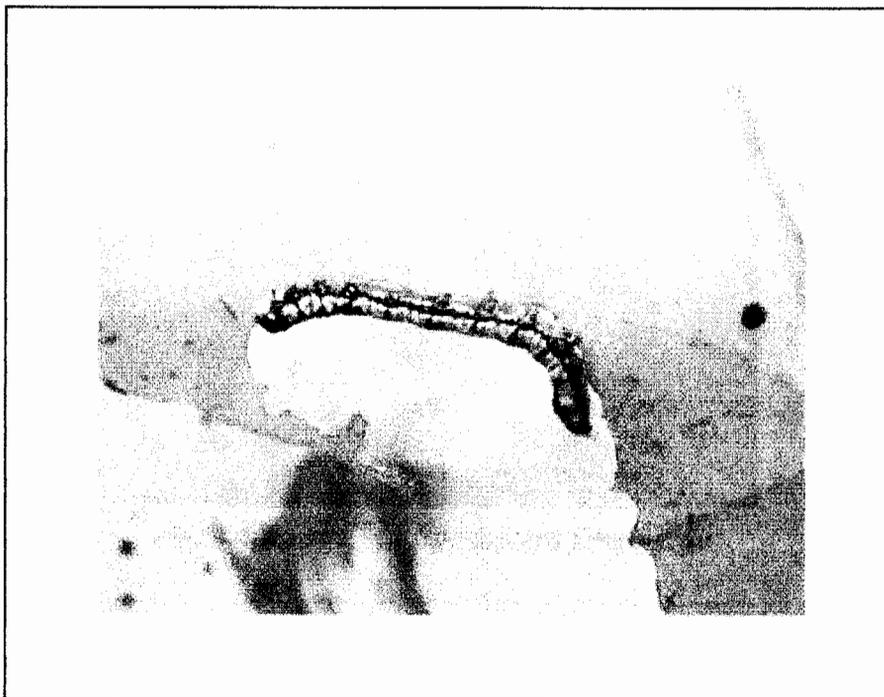


Fig. 4.2. Larva de *Josia radians*

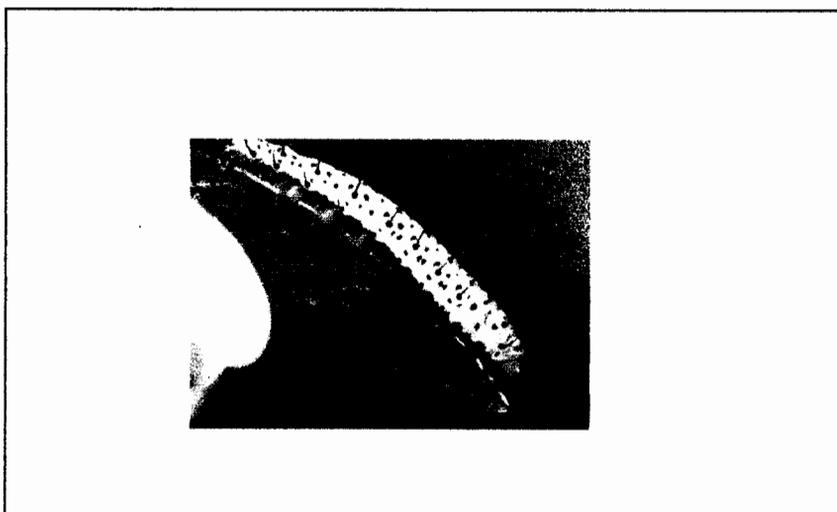


Fig. 4.3. Larva de *Heliconius erato*



Fig. 4.4. Larva de *Spodoptera frugiperda*

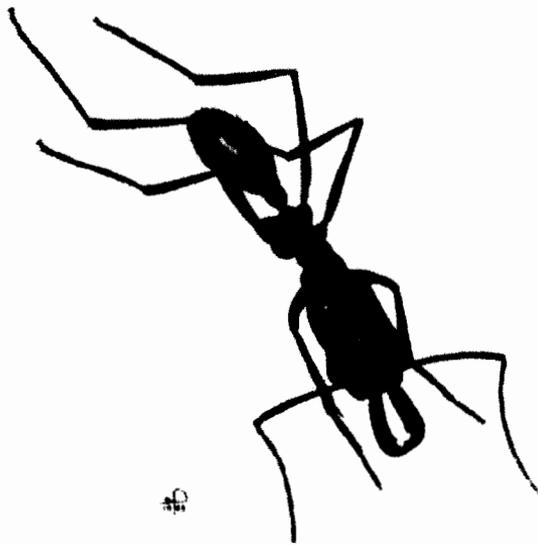


Fig. 4.5. Obrera de *Odontomachus chelifer*

4.2. Colecta y Cría de los Insectos:

Las larvas de *Josia radians* utilizados en los experimentos provinieron de una colonia que logró ser establecida a partir de huevos recolectados en un área boscosa de vegetación secundaria en las adyacencias del sector Las Tapias en la ciudad de Mérida. La rutina de mantenimiento de esta cría consistió en colocar larvas recién eclosionadas sobre hojas frescas de *P. capsularis* cuyos pecíolos se sumergían en pequeños envases que contenían agua. Cada frasco se colocó sobre un plato plástico con un envase de plástico transparente (1 l de capacidad) , según metodología de Otero (comunicación personal). Periódicamente se suministraba a las larvas hojas recién cortadas, permitiendo su desarrollo hasta su transformación a pupas. En esta fase, los ejemplares eran trasladados a envases cubiertos con rejilla plástica con una capacidad de 10 l . Cuando la emergencia de los adultos ocurría, eran mantenidos en este mismo espacio y se les suministraba un algodón embebido en una solución de miel como alimento. Posteriormente se colocaban hojas de *P. capsularis* que servían de sustrato de oviposición. Cuando se obtenían las posturas, las hojas con la carga de huevos eran retiradas de la jaula y colocadas en envases descritos anteriormente para el desarrollo de las larvas. Este ciclo se repitió por varias generaciones durante casi un año. Cada 2-3 meses se colectaban larvas en el campo y eran introducidas dentro de la colonia para evitar la disminución de su vitalidad por posibles efectos de endogamia.

Los huevos de *H.erato* se recolectaron en la misma área descrita para *J. radians*. Todas las larvas que se utilizaron en los experimentos provinieron de posturas colectadas en esta zona. La metodología para el desarrollo larval fué la misma que se utilizó con el dióptino.



Fig. 4.6. Bosque Las Tapias, Mérida. Edo. Mérida
Area de colecta de los especímenes

Las larvas de *Spodoptera frugiperda* se obtuvieron a partir de huevos provenientes de una colonia establecida en el Instituto de Zoología Tropical de la Universidad Central de Venezuela. Las larvas se alimentaron con una dieta artificial (ver apéndice) y colocadas individualmente dentro de envases plásticos con capacidad para 50 ml. Cada dos días los envases fueron revisados para reponer el alimento fresco y eliminar las heces. El desarrollo de las larvas se siguió hasta obtener ejemplares de III instar, seleccionando aquellos en los que el tiempo de muda hubiera coincidido.

Los ejemplares de *Odontomachus chelifer* fueron capturados en la zona boscosa de Las Tapias, el mismo lugar de donde se extrajeron las especies de lepidópteros especialistas ya mencionadas. Los ejemplares eran capturados en actividad de forrajeo e inmediatamente trasladados al laboratorio para colocarlos individualmente en envases plásticos (1 l de capacidad) cubiertos con una rejilla del mismo material. Estos recipientes contenían una pequeña porción de aserrín. Las hormigas eran mantenidas con una solución de miel de abejas que era renovada regularmente. Este alimento se suspendía 24 horas antes del día previsto para la realización de los bioensayos de depredación.

4.3. Descripción del método para la cuantificación de la cianogénesis en el material vegetal (Alonso y Oliveros, 2000) :

El procedimiento diseñado por estos autores consiste en colocar el material vegetal fresco a evaluar en un matraz de 250 ml al que se le agrega tolueno o la especie de herbívoro en estudio para inducir la liberación del HCN. Este envase se conecta a un sistema de flujo de aire húmedo destinado para el transporte del HCN desprendido hasta una solución de 2,4 – dinitrofenilhidrazina que funge como una trampa para atrapar posibles derivados carbonílicos volátiles que puedan interferir en el análisis. Seguidamente la corriente de aire pasa a una solución alcalina de picrato de sodio donde

se forma, en presencia del HCN, el complejo picrato-cianuro de color rojizo oscuro (Fig. 4.7). Un tiempo de exposición de 24 horas es suficiente para que el material vegetal libere su contenido de HCN inducido por la adición del tolueno. Posteriormente, se determina a 500 nm la absorbancia de este complejo mediante el uso de un espectrofotómetro UV Hewlett-Packard conectado a una computadora Vectra HP de 133 MHz. El picrato de sodio y el ión cianuro producen un complejo cuyo espectro de UV presenta absorbancias por encima de 440 nm, lo cual permite utilizar aquellas entre 480 y 560 nm para la cuantificación del HCN. La $\lambda_{\text{máx}}$ del espectro de este complejo aparece alrededor de los 500 nm a concentraciones de cianuro por debajo de 7×10^{-3} mol / L. Pevio a las determinaciones con el material vegetal, se habrá elaborado una curva de calibración usando soluciones de cianuro de sodio con un rango de concentraciones desde 2×10^{-3} M hasta 2×10^{-5} M.

La ecuación : $\% \text{ de Cianoglicósidos} = C \times \text{PM} \times 1000 / R \times G$, calcula el porcentaje de cianoglicósidos / g de muestra analizada, donde :

C= Concentración de HCN (mol/ L) de la curva de calibración

PM = Peso molecular del HCN

R= Tasa de recuperación de HCN por el método

G = Cantidad de material vegetal analizado

4.4. Determinación de la cantidad inicial de HCN contenido en las hojas de *P. capsularis*, la cantidad de HCN liberado en el proceso de alimentación y la cantidad de HCN que ha ingerido la larva:

El procedimiento a seguir consistió en recolectar 5 hojas frescas de *P. capsularis*, seleccionadas de acuerdo a un tamaño y desarrollo similar, extraídas de un mismo individuo de la especie referida. Estas hojas fueron cortadas a lo largo del eje longitudinal y determinados el peso fresco y el área de superficie de cada mitad mediante barrido lumínico-electrónico en un escáner para obtener las imágenes que luego serán analizadas cuantitativamente por métodos computacionales (programa

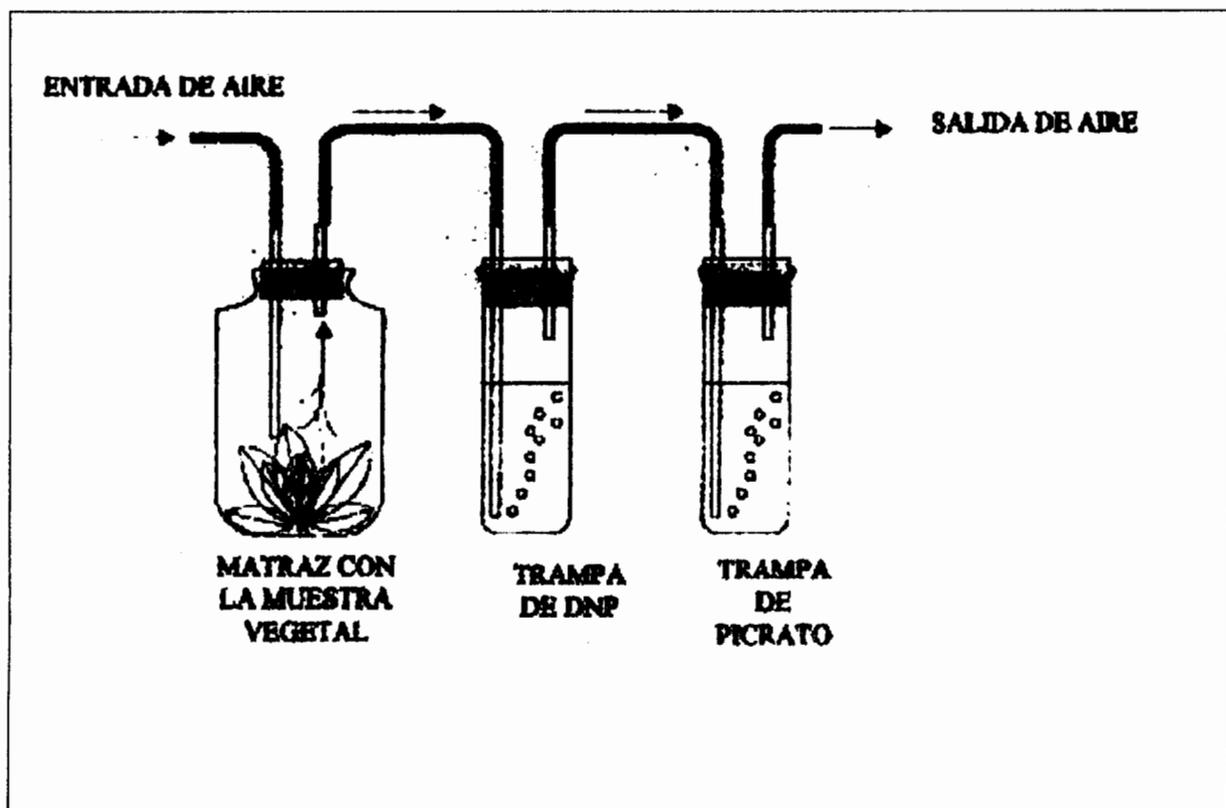


Fig. 4.7. Dibujo del sistema para la detección de HCN.

Tomado de Alonso & Oliveros, 2000.

MOCHA, Jandel Scientific; San Rafael, California). Una de éstas se colocó dentro de un matraz (100ml de capacidad) en el cual previamente se había introducido una larva de III instar de la especie con la que se deseaba trabajar. La otra mitad se colocó dentro de otro matraz similar al cual se añadió 1ml de tolueno (desfragmentador celular) que indujo la liberación del contenido de HCN en el tejido vegetal. Este contenido, asumiendo una simetría bilateral en la distribución de cianoglicósidos en la hoja (Alonso y Oliveros, 2000), representaba la cantidad inicial de HCN en la hoja intacta.

La liberación de HCN producto tanto del proceso de rompimiento hecho por la actividad masticatoria de la larva como por la desfragmentación inducida por el tolueno fué medida de acuerdo al método descrito anteriormente. El experimento se desarrolló con cinco réplicas durante 24 horas, al término de las cuales se determinó el peso fresco y área de superficie finales de la mitad de hoja que fue expuesta a la larva. La diferencia entre los pesos y áreas iniciales y finales rindió los valores de material vegetal consumido por las larvas. Consecuentemente, conociendo la cantidad inicial de HCN contenida inicialmente en la hoja y la cantidad de HCN liberado en el proceso de alimentación, fué posible calcular cuánto de este compuesto se incorporó a la larva en esta fase del seguimiento del flujo.

4.5. Determinación del HCN retenido en los tejidos de las larvas y el excretado en las heces:

Las larvas utilizadas en el experimento anterior se colocaron en ayuno durante 24 horas para asegurar que el contenido estomacal hubiera sido vaciado e inmediatamente fueron congeladas a -18° C.

Para detectar las propiedades cianogénicas de larvas y heces se utilizó la técnica de microdifusión que consistía en macerar en un mortero el tejido congelado en nitrógeno líquido agregando posteriormente 50 μ l de buffer fosfato 0.1M (pH= 6.8) y 50 μ l de la enzima β -glucosidasa (0.2% p/v). Esta mezcla se hacía manteniendo el mortero sobre un lecho de hielo para mantener inactiva la reacción. Posteriormente a la maceración, la muestra era transferida rápidamente a un envase hermético de vidrio con

tapa de rosca (250ml) en el cual previamente se había colocado un pequeño vaso de precipitado (5 ml) que contenía 1.2 ml de ácido pícrico que fungía de trampa para atrapar el HCN liberado en la reacción enzimática de los tejidos (Fig. 4.7). Estos envases fueron introducidos en un baño térmico a 37° C para una incubación de 15 horas. Al término de este tiempo, se determinó la concentración de HCN por el método espectrofotométrico descrito anteriormente.

Para la disección de las larvas se emplearon ejemplares del III instar a los cuales se les practicó una incisión ventral para retirar el tubo digestivo completo, la hemolinfa fué recolectada en una tira de papel de filtro e inmediatamente congelada para posteriores análisis. Cuando el estómago era extraído, la porción corporal restante se lavó con agua destilada para remover cualquier remanente de contenido estomacal o hemolinfa que hubiera podido quedar. Inmediatamente esta porción se congeló a -18° C para la posterior determinación de su capacidad cianogénica.

Las heces obtenidas durante la prueba de alimentación de las larvas con *P. capsularis* se recolectaron y se secaron en la estufa a 35° C por 6 horas. Posteriormente se les aplicó un procedimiento similar para la detección de las cantidades de cianoglicósidos eliminadas por esta vía.

Al término de esta fase en el seguimiento del flujo de HCN en la interacción hoja-larva, se pudo calcular, basado en las cantidades de este compuesto tomadas por las larvas a través de la ingestión y la cantidad del mismo eliminado, cuánto había quedado incorporado o metabolizado en el cuerpo de la larva.

4.6. Medición de la capacidad defensiva de las larvas en las especies de lepidópteros considerados en los experimentos:

Las observaciones de las interacciones presa-depredador fueron realizadas en el laboratorio por medio de bioensayos que enfrentaron larvas de Instar III de las especies *Josia radians*, *Heliconius erato* y *Spodoptera frugiperda* a la hormiga *Odontomachus chelifer*. Las larvas de cada especie por separado fueron introducidas en un dispositivo de observación que consistía de dos placas de vidrio separadas por una plantilla de aluminio que delimitaba la arena experimental en la cual se producía la interacción larva-

hormiga (Fig.4.8). Se colocó una larva y una hormiga en cada dispositivo, registrando en un período de 30 minutos si la presa era tocada, atacada o comida. También se registraba el número de golpes mandibulares recibido en cada encuentro.

4.7. Detección y cuantificación de la liberación de HCN en larvas perturbadas:

El propósito de los experimentos que se describirán a continuación era determinar por medio de la perturbación mecánica o la respuesta depredatoria de la hormiga, si las especies de lepidópteros con comprobada capacidad para secuestrar compuestos cianogénicos, reaccionaban liberando HCN como mecanismo de defensa. La perturbación mecánica consistía en introducir una larva de III instar dentro de un matraz con capacidad de 100 ml por cuyo tapón se insertó un pincel de pelos muy finos que permitía, por acción del experimentador, tocar la larva durante diez minutos. La fiola estaba conectada al flujo de aire según el procedimiento descrito para la cuantificación del HCN liberado.

También se desarrolló otro experimento en el que se introdujo una larva y una hormiga dentro de un tubo de ensayo conectado al sistema de flujo de aire con el propósito de detectar la posible liberación de HCN, bien fuera por la emisión activa de las larvas o por el rompimiento de tejidos corporales producto de la mordida que indujeran la hidrólisis de los cianoglicósidos. Esta experiencia se realizó con las especies *J. radians* y *H. erato*, manteniéndolas en un ayuno previo de 24 horas para descartar interferencias por la producción de heces durante el bioensayo

4.8. Evaluación de la responsabilidad de los Cianoglicósidos en la posible respuesta antidepredatoria de las larvas

Este objetivo trató de estudiarse mediante la utilización de una dieta artificial que permitiera el desarrollo de las larvas en ausencia de los cianoglicósidos contenidos en las hojas de *P. capsularis*. Para tal fin se preparó una fórmula nutricional cuyos ingredientes se especifican en el apéndice y se intentó que las larvas aceptaran tal alimento.



Fig. 4.8. Dispositivo para el bioensayo de la interacción hormiga-presa

4.9. Análisis estadístico de los resultados

En virtud del número reducido de réplicas en los experimentos se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar las medias entre especies y en el caso que se requería, entre valores de una misma especie. Cuando se necesitó comparar medias de dos muestras se empleó la prueba de Mann-Whitney. Los datos se procesaron con el programa estadístico STATISTIX 7.0 (Analytical software 2000).

5. RESULTADOS

5.1. Contenido de HCN en las hojas de *Passiflora capsularis*:

Las muestras foliares de *P. capsularis* utilizadas en los experimentos con tolueno como inductor para la liberación del HCN presentaron una concentración de este volátil que varió en el rango de 1.79-3.43 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de hoja fresca (Tabla 5.1). Estos valores corresponden a 0.18 y 0.34 % de HCN / muestra de hoja fresca. La cantidad de HCN liberado resultó ser dependiente del tamaño de la muestra tomando en cuenta el peso (mg) ($r^2= 0.54$) pero independiente cuando se considera el área (cm^2) ($r^2= 0.03$)

Las figuras 5.1 y 5.2 muestran los diagramas de dispersión de los valores de μg de HCN liberados cuando son calculados considerando al peso y al área de las muestras de hojas frescas de *P. capsularis*. En la relación peso vs. μg de HCN/mg de muestra se evidencia la tendencia, no muy marcada, a que los tejidos foliares de mayor peso presentan menores valores en el contenido de cianoglicósidos en comparación con la muestras de menor peso. Suponiendo que la edad de la hoja está en correspondencia con un mayor peso, la tendencia antes señalada estaría indicando que la cianogénesis en hojas jóvenes sería mayor que la que puede ser observada en hojas de mayor edad, como ha podido ser demostrado en otros trabajos para *P. capsularis* (Oliveros, comunicación personal) y otras plantas cianogénicas (Bernays et al. 1977, Woohead y Bernays, 1977).

Tabla 5.1. Determinación del contenido de HCN en hojas de *P. capsularis* utilizando tolueno como agente inductor.*

Peso (mg)	Area (cm ²)	µg HCN/mg de hoja fresca	µg HCN/cm ² de hoja fresca
189.0	25.30	2.77	20.71
194.7	29.30	3.43	22.76
211.2	30.06	3.16	22.19
217.5	27.61	2.67	21.04
222.9	28.01	2.56	20.34
244.7	30.55	3.30	26.42
245.6	31.68	2.90	22.41
246.5	30.05	2.67	21.90
247.0	29.60	2.56	21.35
248.0	28.90	2.42	20.73
274.1	31.75	2.95	24.42
285.7	27.80	2.07	21.26
291.5	31.70	2.04	18.74
298.0	29.10	1.89	19.38
308.0	31.10	1.79	17.70

* Datos agrupados de los experimentos con las hojas controles de las tres especies larvales en estudio (Tabla 2)

Fig. 5.1 Relación entre la capacidad cianogénica y el peso de la hoja

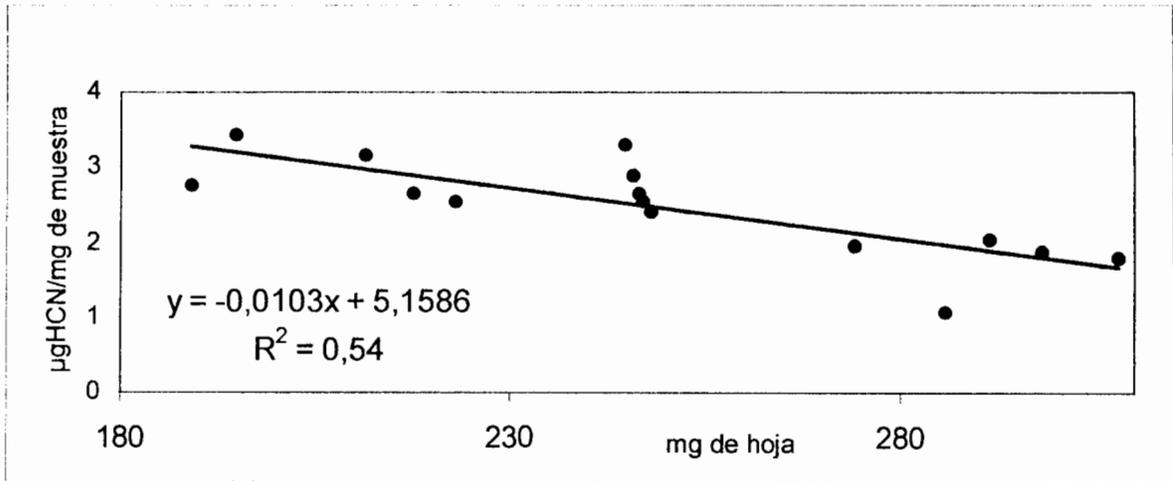
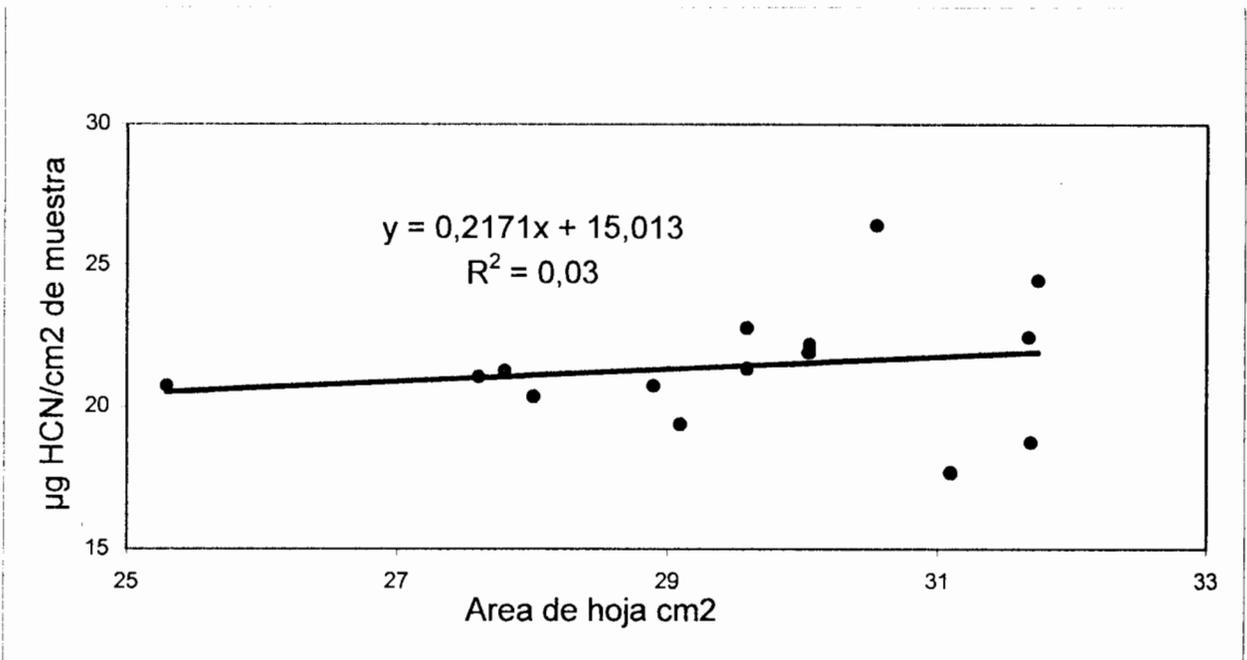


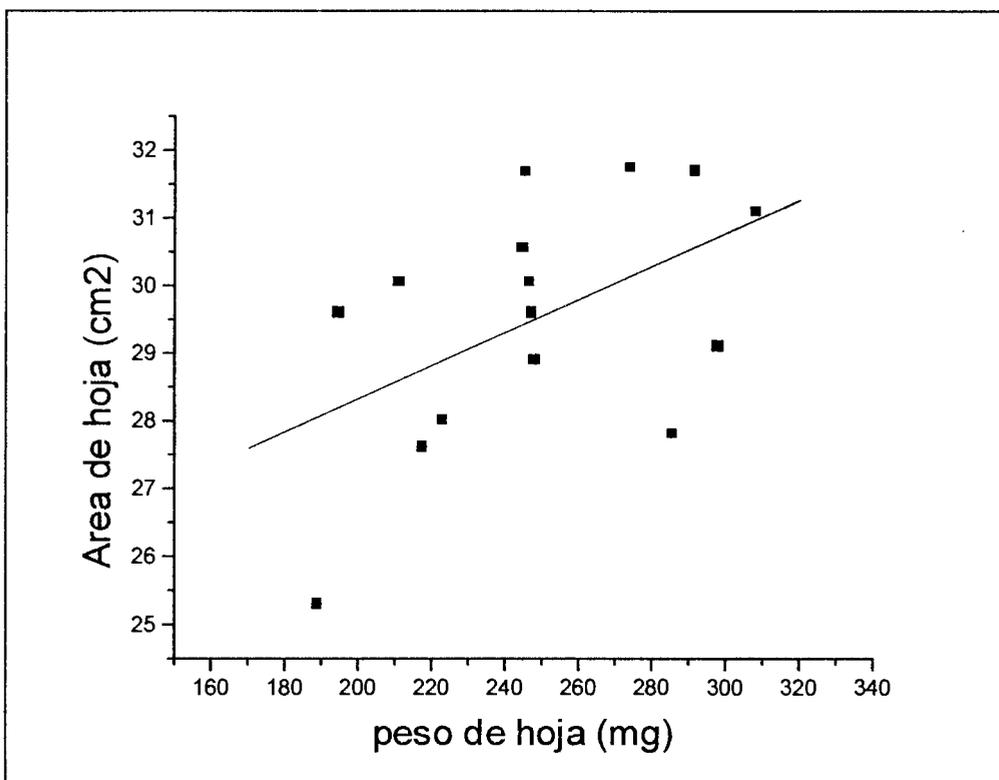
Fig. 5.2 Relación entre la capacidad cianogénica y el área de la muestra



En la figura 5.2 se observa la independencia de la producción de HCN / cm² de hoja con el área (cm²) de la muestra foliar analizada. Llama la atención que la tendencia antes señalada para el peso, debería también ser vista con esta variable si se supone que a mayores pesos corresponden mayores áreas y en consecuencia una menor capacidad cianogénica por tratarse hipotéticamente de hojas de mayor edad .

La figura 5.3 muestra que esta apreciación no resultó del todo cierta. La curva de regresión lineal de área vs. Peso estuvo pobremente definida ($r^2 = 0.25$), pareciendo que el aporte al aumento de peso provendría más bien del incremento en el grosor del parénquima que del crecimiento celular de la superficie.

Fig. 5.3 Relación entre el Área y Peso de las muestras foliares utilizadas en los experimentos para determinar la capacidad cianogénica de las hojas de *P. capsularis*.



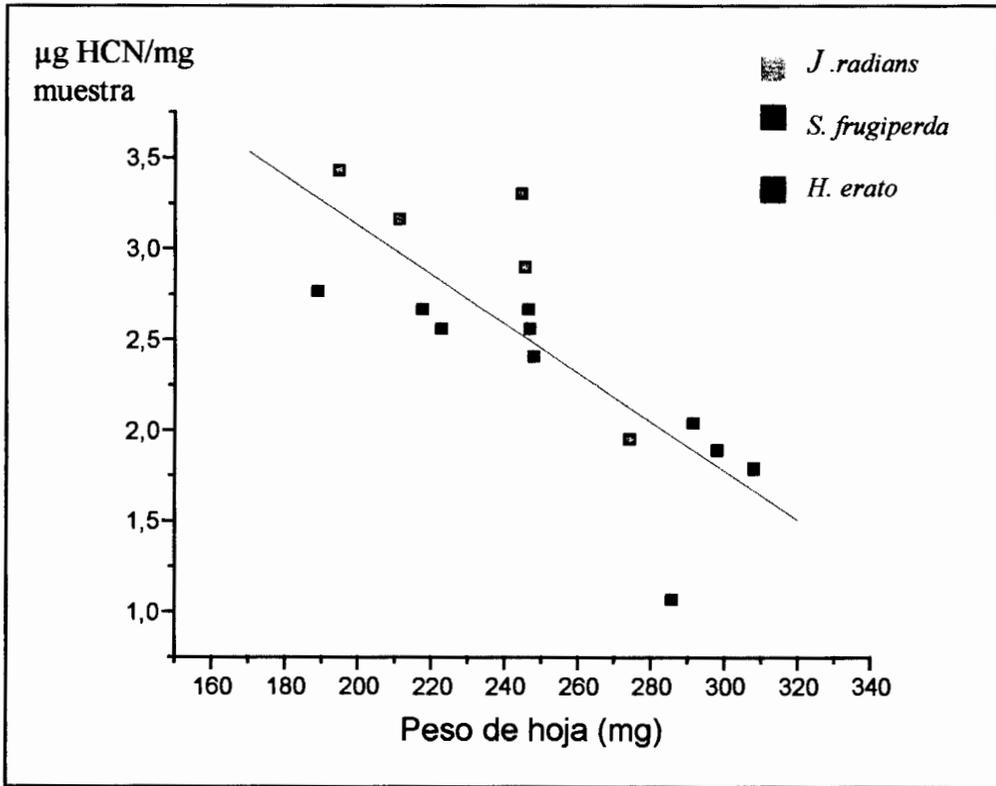
Se podría pensar que las hojas utilizadas en los experimentos no correspondieron a muestras uniformes en edad, razonamiento que puede ser rebatido cuando los valores de la tabla 5.1 son reagrupados para determinar el contenido cianogénico de las muestras que fueron suministradas a las diferentes especies larvales (Tabla 5.2). Se observa que las diferencias en el peso y el área de las muestras no difirieron significativamente entre los grupos experimentales, esto es, la uniformidad morfométrica estuvo garantizada, sin embargo los valores de μg de HCN expresados por unidad de peso o unidad de área resultaron diferentes entre los grupos. Pareciera que la cianogénesis en las hojas de *P.capsularis* es una propiedad muy variable, aún en muestras de una misma planta, además que el criterio de uniformidad en peso y área no es suficiente para asegurar respuestas cianogénicas similares entre las hojas (fig. 5.4)

Tabla 5.2. Contenido cianogénico de las hojas de *Passiflora capsularis* medido para los tres experimentos de alimentación *

Experimento	Peso hoja (mg)	Area hoja (cm ²)	μg HCN/mg hoja	$\mu\text{gHCN}/\text{cm}^2$ hoja
Para <i>J. radians</i>	234.06 \pm 31.31 a	30.67 \pm 1.05 a	3.15 \pm 0.23 b	23.84 \pm 1.94 a
Para <i>H. erato</i>	285.94 \pm 23.55 a	29.95 \pm 1.56 a	2.09 \pm 0.34 a	19.80 \pm 1.75 b
Para <i>S. frugiperda</i>	224.88 \pm 24.34 a	27.88 \pm 1.64 a	2.60 \pm 0.13 a	20.83 \pm 0.38 b

* Valores expresados como $X \pm \text{DE}$ de 5 réplicas. Las letras iguales siguiendo a estos valores indican que no hay diferencias significativas entre experimentos ($p > 0.05$) según Test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Fig. 5.4 Representación gráfica del contenido cianogénico en las hojas de *P. capsularis* que correspondieron a cada una de las especies como control en los experimentos de alimentación.



El análisis interpretativo desarrollado en los párrafos anteriores acerca de la variabilidad en las relaciones de los parámetros peso, área y capacidad cianogénica de las hojas de *P. capsulares* refuerzan la idea, originalmente planteada en la metodología, acerca de la conveniencia de usar la mitad simétrica en la muestras foliares como un control más apropiado para determinar la cantidad de cianoglicósidos ingeridos por las larvas, en descarte del uso de hojas diferentes, aunque proviniesen de una misma planta.

5.2. Cuantificación del consumo de *P.capsularis* por las larvas en estudio

Las larvas de *Heliconius erato* presentaron un valor de consumo foliar mayor que *Josia radians* y *Spodoptera frugiperda*, cuyos valores no se diferenciaron significativamente. La corrección del consumo de acuerdo al tamaño de la larva permitió confirmar la tendencia de un mayor consumo para las larvas especialistas en comparación a lo obtenido con la larva generalista *S. frugiperda* (tabla 5.3). Cuando se comparó el consumo de *P. capsularis* por larvas de esta especie con la cantidad ingerida de otra especie vegetal, se encontró que las hojas de la especie cianogénica resultaron ser menos palatables para estas larvas que las muestras foliares de la espinaca (*Spinacia oleracea*), especie sin antecedentes conocidos de la presencia de metabolitos secundarios disuasores de la alimentación (Tabla 5.5).

Tomando en cuenta los valores de concentración de cianoglicósidos obtenidos cuando las hojas liberan su potencial cianogénico con el tolueno, fué posible calcular, de acuerdo a las cantidades de tejido consumidas por las larvas, los microgramos de cianoglicósidos (HCN potencial) ingeridos de acuerdo a la siguiente relación: $\text{Cons HCN} = C \times K - L$; donde C = Concentración de HCN potencial en las hojas ($\mu\text{g HCN/mg}$ de hoja fresca), k = Consumo de hoja/larva (mg), L = cantidad de HCN liberado durante el consumo/larva ($\mu\text{g HCN/larva}$). Se obtuvo que *H.erato* y *S. frugiperda* incorporaron valores similares de estos compuestos (consumo corregido por peso larval) mientras que *J. radians* superó más de tres veces estas cantidades. Si se toma en cuenta el consumo por área foliar ingerida se tiene que también con este parámetro las tres especies ingirieron cantidades diferentes de glicósidos cianogénicos. El análisis de las relaciones entre el tamaño de la hoja, expresado bien sea como peso o área, con su contenido cianogénico, señalado al inicio de esta sección, explica las diferencias reseñadas anteriormente.

Tabla 5. 3. Cantidades consumidas en función del peso fresco de las hojas de *P. capsularis* por larvas de III instar durante 24 horas*

Especie	Consumo de hoja (mg/larva)	Peso (mg) larvas	Consumo (mg)/mg larva	µg HCN potenciales consumidos/ larva	µgHCN consumidos/ mg larva
<i>J. radians</i>	52.56± 11.18a	37.07 ± 3.08a	1.43 ± 0.34 a	186 ± 50.08a	5.04 ± 1.35a,1
<i>H. erato</i>	224.22± 47.61b	306.76 ± 36.26b	0.74 ± 0.19 b	469 ± 121.97b	1.53 ± 0.38b,2
<i>S. frugiperda</i>	74.70±20.13a	167.72 ± 15.84c	0.45 ± 0.14 c	201.56 ± 84.33a	1.20 ± 0.53b,3

* Valores expresados como $X \pm DE$ de 5 réplicas. Las letras iguales siguiendo a estos valores indican que no hay diferencias significativas entre experimentos ($p > 0.05$) según Test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Tabla 5. 4 . Cantidades consumidas en función del área de las hojas de *P. capsularis* por larvas de III instar durante 24 horas*

Especie	Consumo(cm ²)/larva	Consumo (cm ²)/mg larva	µg HCN potenciales consumidos/ larva	µg HCN potenciales consumidos/mg de larva
<i>J. radians</i>	8.30 ± 2.17 a	0.22 ± 0.05 a	180.78 ± 41.65 a	4.83 ± 0.91 a,1
<i>H. erato</i>	28.66 ± 2.68 b	0.10 ± 0.01 b	562.39 ± 53.39 b	1.83 ± 0.08 b,2
<i>S. frugiperda</i>	8.86 ± 1.56 a	0.05 ± 0.02 c	184.31 ± 30.26 c	1.11 ± 0.34 c,3

- Valores expresados como $X \pm DE$ de 5 réplicas. Las letras iguales siguiendo a estos valores indican que no hay diferencias significativas entre experimentos ($p > 0.05$) según Test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Números semejantes señalan que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$), según el test de Mann-Whitney, entre los valores de µg de HCN consumidos/mg de larva calculados de acuerdo al peso y al área en cada especie.

Tabla 5.5. Comparación del área foliar consumida (cm²) y peso consumido (mg) de dos especies vegetales por larvas de *Spodoptera frugiperda* (Instar III) durante 24 horas*

Especie Vegetal	Area consumida (cm ²)/ larva	Peso consumido (mg)/larva
<i>Passiflora capsularis</i>	8.86 ± 1.56 a	74.70 ± 20.13 a
<i>Spinacia oleracea</i>	14.60 ± 0.64 b	124.44 ± 8.28 b

* Valores expresados como $X \pm DE$ de 5 réplicas. Las letras iguales siguiendo a estos valores indican que no hay diferencias significativas entre experimentos ($p > 0.05$) según Test de Mann-Whitney.

5.3. Determinación de la cantidad de HCN liberado en la alimentación de las especies sobre *P. capsularis*. (durante 24 horas con larvas de III Instar).

La actividad de alimentación de las larvas estuvo acompañada por la liberación de HCN de los tejidos foliares. Ésta mostró ser diferente de acuerdo a la especie involucrada en el proceso. *J. radians* y *H. erato* provocaron una menor producción del volátil en comparación con *S. frugiperda*, que indujo un desprendimiento mayor (casi seis veces más) (Tabla 5.6).

Tabla 5.6. Cuantificación de HCN liberado en la alimentación de las especies estudiadas durante 24 horas (Larvas de III Instar) *

Especie	µg HCN liberado/mg planta consumido	% de HCN liberado respecto al total contenido en lo devorado
<i>J radians</i>	2.40 ± 1.12a	1.44 ± 1.07
<i>H. erato</i>	0.41 ± 0.46a	0.09 ± 0.09
<i>S. frugiperda</i>	13.28 ± 4.33b	7.78 ± 5.78

* Valores expresados como $X \pm DE$ de 5 réplicas. Las letras iguales siguiendo a estos valores indican que no hay diferencias significativas entre experimentos ($p > 0.05$) según Test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

5.4. Destino de los cianoglicósidos ingeridos por las larvas

Las primeras pruebas realizadas para detectar cianogénesis en las larvas fueron realizadas con ejemplares intactos de *J. radians*. En el proceso de maceración pudimos percatarnos que aún después de 24 horas de ayuno, las larvas todavía contenían una fracción del material vegetal en digestión. Esta circunstancia entorpecía averiguar si la posibilidad de secuestro de los cianoglicósidos era cierta ya que para que este proceso se considere como tal, los compuestos deberían atravesar la barrera de la pared del tubo digestivo del insecto (Duffey, 1984). El tiempo de ayuno de 24 horas utilizado en nuestro trabajo fue seleccionado como un período donde se suponía que el canal digestivo estuviera vacío, tomando como referencias procedimientos realizados por otros autores quienes emplean tiempos aún menores que el seleccionado para nuestro estudio (Wiesen et al., 1994). En vista de tal situación, se procedió a hacer la disección de las larvas y el posterior análisis espectrofotométrico de la liberación de HCN de diferentes partes corporales de las larvas. Esta separación mostró que los cianoglicósidos estaban presentes en, además del tubo digestivo, la hemolinfa y la pared corporal (incluyendo la cutícula, músculos y tejido graso).

La comparación entre la cantidad de HCN liberado por larvas intactas y las diferentes partes disectadas de *J. radians* (tabla 5.7) condujo a revelar una contribución importante del material vegetal en digestión (más del 50 %) al valor de HCN obtenido en la suma de las partes y que además cuando este aporte se sustraía, se observaban diferencias significativas con los valores de HCN obtenidos en las larvas no disectadas, lo que induciría a una sobreestimación de la capacidad de acumulación de los cianoglicósidos. También se pudo constatar que en esta especie, dichos compuestos eran movilizados desde el tubo digestivo hacia otras partes del cuerpo larval, tal como lo reveló la presencia de estos compuestos en el integumento (40%) y en menor cantidad, en la hemolinfa (7%).

Tabla 5.7. Cuantificación de los cianoglicósidos detectados en diferentes partes corporales de *J.radians* luego de 24 horas de ayuno (Larvas de III Instar)

Parte corporal	$\mu\text{g HCN/larva}$	% del Total
Larva no disectada	$8.64 \pm 2.61\text{a}$	
Pared corporal	$4.38 \pm 0.88\text{b}$	40.1 ± 3.56
Hemolinfa	$0.86 \pm 0.20\text{c}$	7.4 ± 3.16
Tubo digestivo	$5.80 \pm 2.12\text{b}$	52.6 ± 4.23
Suma de las partes	$11.08 \pm 3.03\text{a}$	100

* Valores expresados como $X \pm \text{DE}$ de 5 réplicas. Las letras iguales siguiendo a estos valores indican que no hay diferencias significativas entre experimentos ($p > 0.05$) según Test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Como consecuencia de estos resultados las otras especies del estudio fueron directamente analizadas discriminando el contenido de cianogénicos en el tubo digestivo del resto del cuerpo larval (Tabla 5.8). El patrón de repartición de estos compuestos resultó ser diferente de acuerdo a la especie estudiada. En *H. erato* la contribución del tubo digestivo a la cantidad total de cianoglicósidos detectados fué menor que en las otras especies, concentrándose la actividad cianogénica en la pared corporal. Las larvas de *S. frugiperda* mostraron mayor actividad cianogénica concentrada en los tubos digestivos, aparentemente por una menor capacidad digestiva del material vegetal consumido en relación con las especies anteriores. De las partes analizadas, La hemolinfa tuvo el menor aporte a la actividad cianogénica en todas las especies (3% en *H. erato* y *S. frugiperda*; 7% en *J. radians*).

Tabla 5. 8. Distribución de los cianoglicósidos en diferentes partes larvales luego de 24 horas de ayuno (Larvas de III Instar).

Especie	µg HCN en pared corporal/ larva	% del total	µgHCN en hemolinfa/ larva	% del Total	µg HCN en tubo digestivo/ larva	% del total	Suma de µg de HCN en las partes / larva
<i>J.radians</i>	4.38 ± 0.88a	40.10 ±3.56	0.86 ± 0.20b	7.36 ±3.16	5.80 ± 2.12c	52.54 ± 4.23	11.08 ± 3.03
<i>H. erato</i>	23.16 ± 9.41a	58.94 ±10.53	0.92 ± 0.08b	2.55 ± 0.74	14.43 ± 0.72c	38.51 ± 9.83	38.01 ± 9.53
<i>S.frugiperda</i>	5.03 ± 2.83a	20.90 ± 11.41	0.74 ± 0.74b	3.25 ± 0.88	19.90 ± 8.43c	75.85 ± 11.14	25.67 ± 7.43

* Valores expresados como $X \pm DE$ de 5 réplicas. Las letras diferentes siguiendo a los valores indican que hay diferencias significativas entre las partes corporales de larvas de una misma especie ($p < 0.05$) según Test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

5.5. Cantidad de cianoglicósidos excretados por las larvas

Las tres especies estudiadas eliminaron glicósidos cianogénicos a través de los heces. La tabla 5.9 muestra que las concentraciones de HCN / mg de muestra seca fueron diferentes dependiendo de la especie. *S. frugiperda* excretó la mayor cantidad cianoglicósidos (1.05 µg/ mg de heces), seguida de *H. erato* (0.51 µg/mg de heces) y por último *J. radians* (0.11 µg/mg de heces).

Tabla 5. 9 . Cuantificación de cianoglicósidos en las heces de las especies estudiadas, excretadas durante su alimentación con *P. capsularis* durante 24 horas.

Especie	Peso de heces (mg)/larva	Peso de heces (mg)/mg larva	Relación Excreción / consumo	µg de HCN/mg heces
<i>J. radians</i>	16.16 ± 3.99 a	0.44 ± 0.16a	0.44 ± 0.11 a	0.11 ± 0.01 a
<i>H. erato</i>	38.80 ± 6.04 b	0.13 ± 0.03b	0.23 ± 0.07 a	0.51 ± 0.17 b
<i>S. frugiperda</i>	37.9 ± 14.70 c	0.24 ± 0.12a	0.28 ± 0.07 a	1.05 ± 0.31 c

* Valores expresados como $X \pm DE$ de 5 réplicas. Las letras iguales siguiendo a estos valores indican que no hay diferencias significativas entre experimentos ($p > 0.05$) según Test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

5.6. Cuantificación de la capacidad defensiva de las larvas frente al ataque depredatorio de *Odontomachus chelifer*

La figura 5.6 muestra los resultados de la interacción de la hormiga *Odontomachus chelifer* y las larvas estudiadas. Esta especie se reveló como un excelente operador en el bioensayo por su estereotipado comportamiento. Experiencias preliminares permitieron observar que

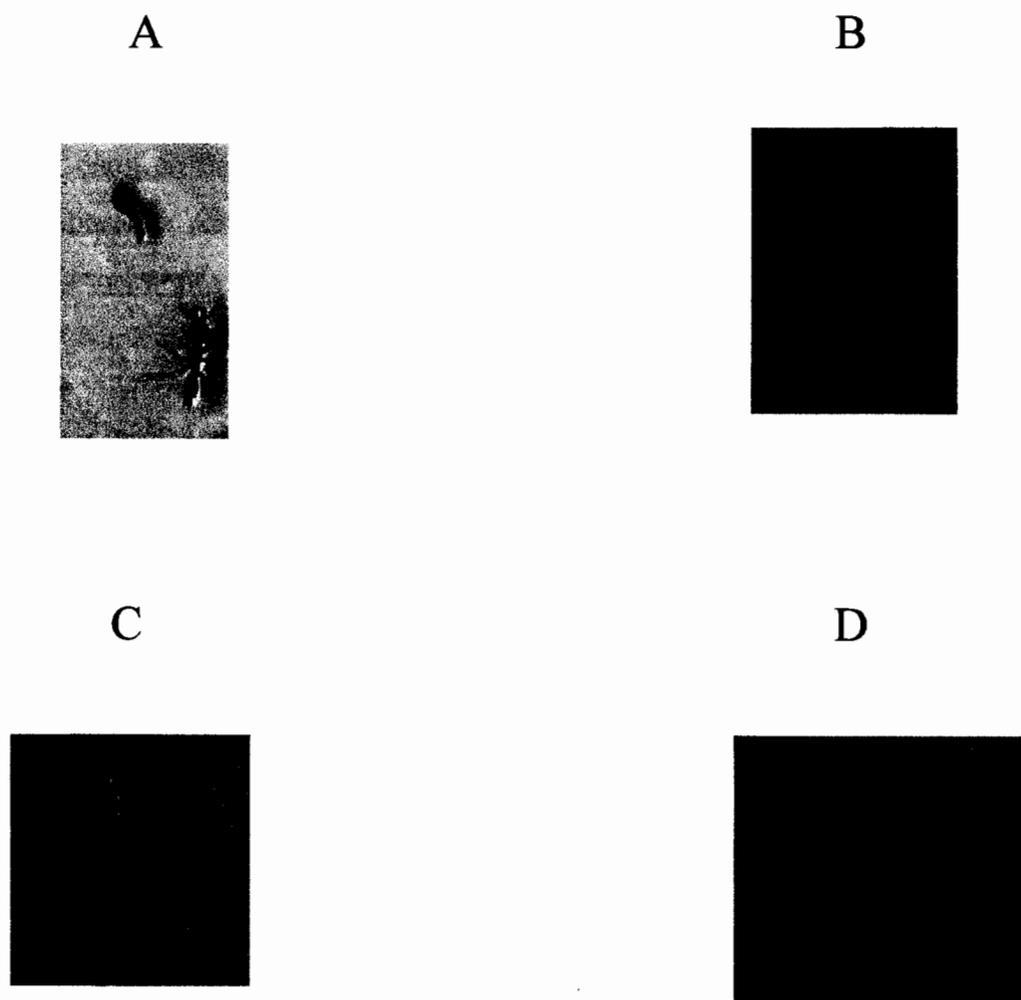
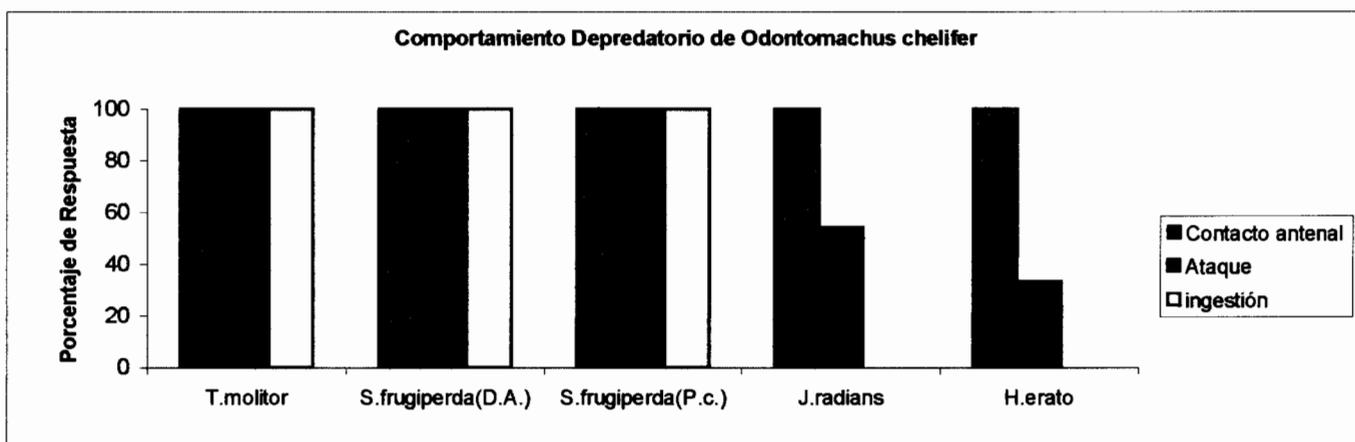


Fig. 5.5. Comportamiento depredatorio de *Odontomachus chelifer* frente a una larva de *T. molitor*. A. Aproximación, B. Contacto antenal, C. Golpe mandibular, D. Ingestión

este se desplegaba de acuerdo a cuatro fases perfectamente distinguibles: 1. Orientación hacia la presa, 2. Exploración antenal, 3. Ataque a través de golpes mandibulares y 4. Ingestión de la presa sorbiendo líquidos secretados por las heridas en el integumento (Fig. 5.5). En la gráfica están representadas las diferentes respuestas de la hormiga ante la presencia de la presa diferenciadas de acuerdo a la especie y la dieta alimentaria suministrada a la larva. Lamentablemente el objetivo de estudiar la capacidad defensiva de las larvas en función de la fuente de nutrición no pudo cumplirse con las especies *J. radians* y *H. erato* por su renuencia a alimentarse tanto de la planta acianogénica *Hybanthus* sp. como de la dieta artificial preparada para la experiencia. Los resultados incluyen las respuestas obtenidas para las larvas del coleóptero *Tenebrio molitor* (especie control), *Spodoptera frugiperda*, diferenciadas de acuerdo a si fueron alimentadas con la dieta artificial (D.A.) o con hojas de *P. capsularis* (P.C.). También se presentan los resultados de *J. radians* y *H. erato* alimentados con su hospedera natural *P. capsularis*, ya que, como se señaló anteriormente, resultó imposible que estas especies aceptaran la dieta artificial.

Figura 5.6. Respuestas de depredación de *Odontomachus chelifer* frente a las especies estudiadas*

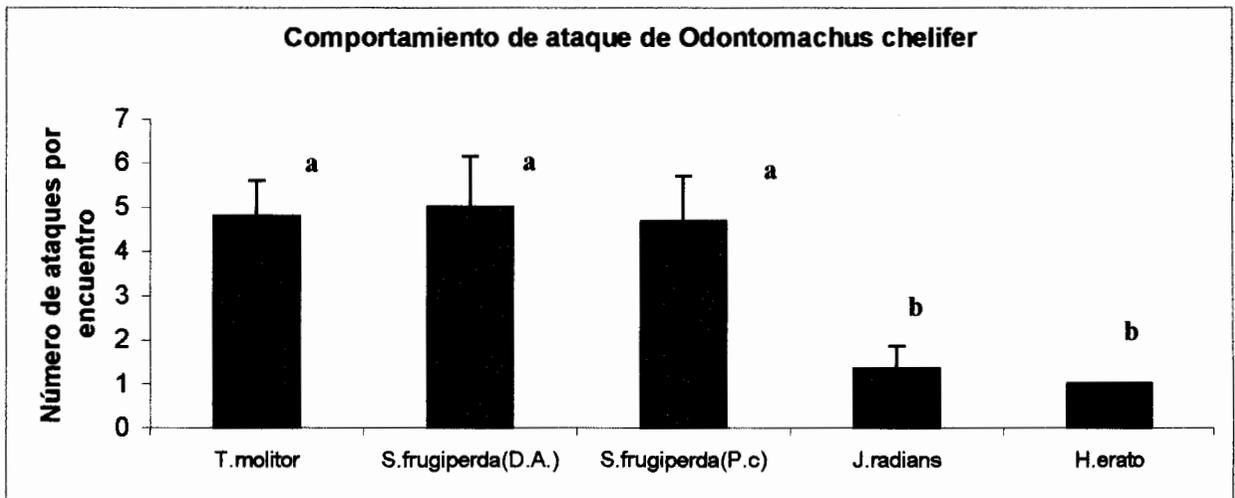


* Se representan porcentualmente los encuentros en los que la respuesta resultó positiva en las tres categorías consideradas. Se realizaron 12 bioensayos por especie larval.

Puede observarse que siempre hubo aproximación para establecer contacto antenal con todas las especies evaluadas. También se puede ver que las larvas de *S. frugiperda* fueron atacadas e ingeridas en igual proporción que las larvas de *T. molitor* (controles), independientemente de la dieta suministrada a las primeras. *J. radians*, aunque resultó tocada con las antenas en todas las oportunidades, la proporción de ataques fué menor en casi la mitad en comparación con *T. molitor* y *S. frugiperda*. En los casos en que se presentó el ataque, las larvas nunca fueron ingeridas. Con *H. erato* se obtuvo resultados similares. Las larvas fueron tocadas en 100% de los encuentros, pero la respuesta de ataque resultó menor que la observada en el control y al igual que en *J. radians*, las larvas atacadas no fueron ingeridas, logrando sobrevivir para completar su desarrollo hasta adultos.

Si se profundiza un poco más en la respuesta de ataque (fig. 5.7) exhibida por la hormiga frente a *J. radians* y *H. erato*, se encuentra que el número de golpes mandibulares por encuentro resultó menor (de 1 a 2 mordidas/encuentro) en estas especies que el observado en *T. molitor* y *S. frugiperda*, las cuales presentaron valores similares entre sí (entre 4 y 7 mordidas/ encuentro), sin que hubiera relación con el tipo de dieta ingerido por ésta.

Figura 5. 7. Respuesta de ataque de *Odontomachus chelifer*



Valores expresados como $X \pm DE$ de 12 réplicas. Las letras iguales siguiendo a estos valores indican que no hay diferencias significativas entre experimentos ($p > 0.05$) según Test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

5.7. Detección y cuantificación del HCN liberado en las larvas perturbadas artificialmente y las atacadas por *O. chelifer*

Las tabla 5.10 muestra que no se logró detectar la producción de HCN como reacción de las larvas frente a un estímulo agresor, bien fuera generado artificialmente o producto del ataque de la hormiga depredadora.

Tabla 5.10. Cuantificación del HCN producido por las larvas en los experimentos de perturbación artificial y durante su enfrentamiento con *Odontomachus chelifer*

Especie	μg HCN liberados/ larva con perturbación artificial	μg HCN liberados/ larva durante el ataque de <i>Odontomachus chelifer</i>
<i>J. radians</i>	No detectado	No detectado
<i>H. erato</i>	No detectado	No detectado

5.8. Balance global del flujo de cianoglicósidos en los sistemas *P. capsularis*-lepidóptero (Figuras 5.8, 5.9, 5.10)

J. radians trasladó al término de las 24 horas del experimento una fracción de cianoglicósidos equivalente al 26 % de todo el potencial cianogénico contenidos inicialmente en las hojas de *P. capsularis*. *H. erato* mostró mayor eficiencia al incorporar más del 70% de los cianoglicósidos originales en la planta hospedera. Ambas especies coincidieron en descomponer una pequeña fracción de éstos en forma de HCN liberado en el acto de alimentación. *S. frugiperda* movilizó una fracción semejante a *H. erato* desde la hojas pero el porcentaje de liberación de HCN resultó mayor.

Luego de 24 horas de digestión del material vegetal, se encontró que éste tenía una contribución importante en la medición de la actividad cianogénica tanto (como en *J. radians* y *H. erato*) o más que lo detectado en el integumento (como en *S. frugiperda*). La suma de las actividades cianogénicas detectadas en la pared corporal, hemolinfa y tubo digestivo representaron aproximadamente el 10% del potencial ingerido por las larvas especialistas, mientras que *S. frugiperda* (especie generalista) estuvo próximo al 15% de acuerdo a la cantidad de cianoglicósidos tomados del alimento. De todas las especies consideradas, *J. radians* se comportó con mayor eficiencia de conservación de estos compuestos pues la actividad de eliminación de los mismos a través de las heces resultó menor que en *H. erato* y *S. frugiperda*. Esta última especie en particular excretó casi el 20% de los cianoglicósidos ingeridos inicialmente. La diferencia entre las cantidades de estos compuestos ingeridos menos las cantidades movilizadas hacia la pared corporal, hemolinfa, tubo digestivo y heces debería representar cuánto de estos compuestos fueron degradados por procesos propios del metabolismo de cada especie. Al respecto se pudo observar que todas las especies metabolizaron más de la mitad de los cianoglicósidos ingeridos, particularmente las larvas especialistas, cuyos procesos degradativos parecen estar mejor adaptados para enfrentar a estos compuestos.

Figura 5. 8. Distribución porcentual de los cianoglicósidos en la interacción *P. capsularis*-*J.radians*-*O. chelifer*

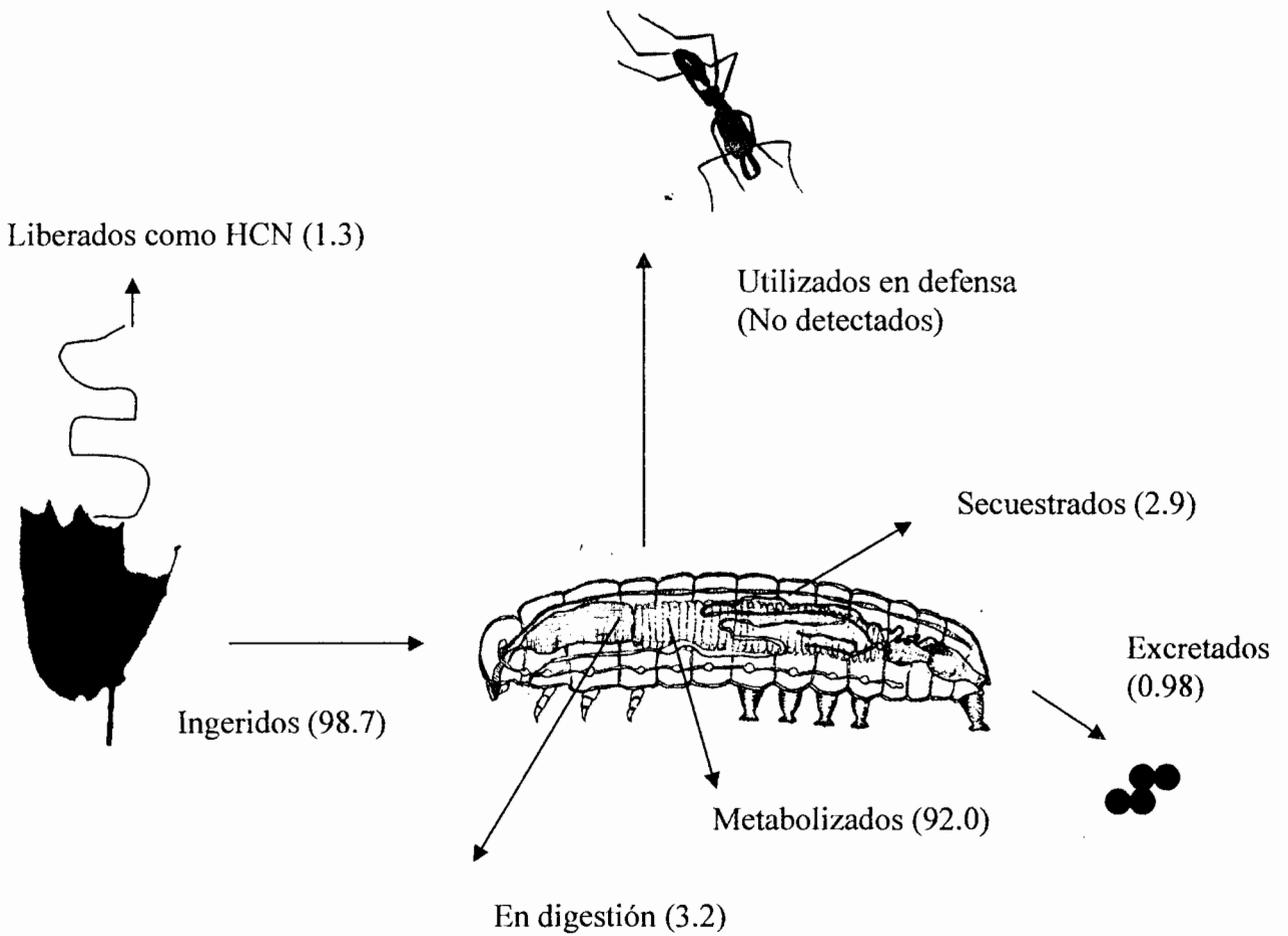


Figura 5. 9. Distribución porcentual de los cianoglicósidos en la interacción *P. capsularis*-*H. erato*-*O. chelifer*

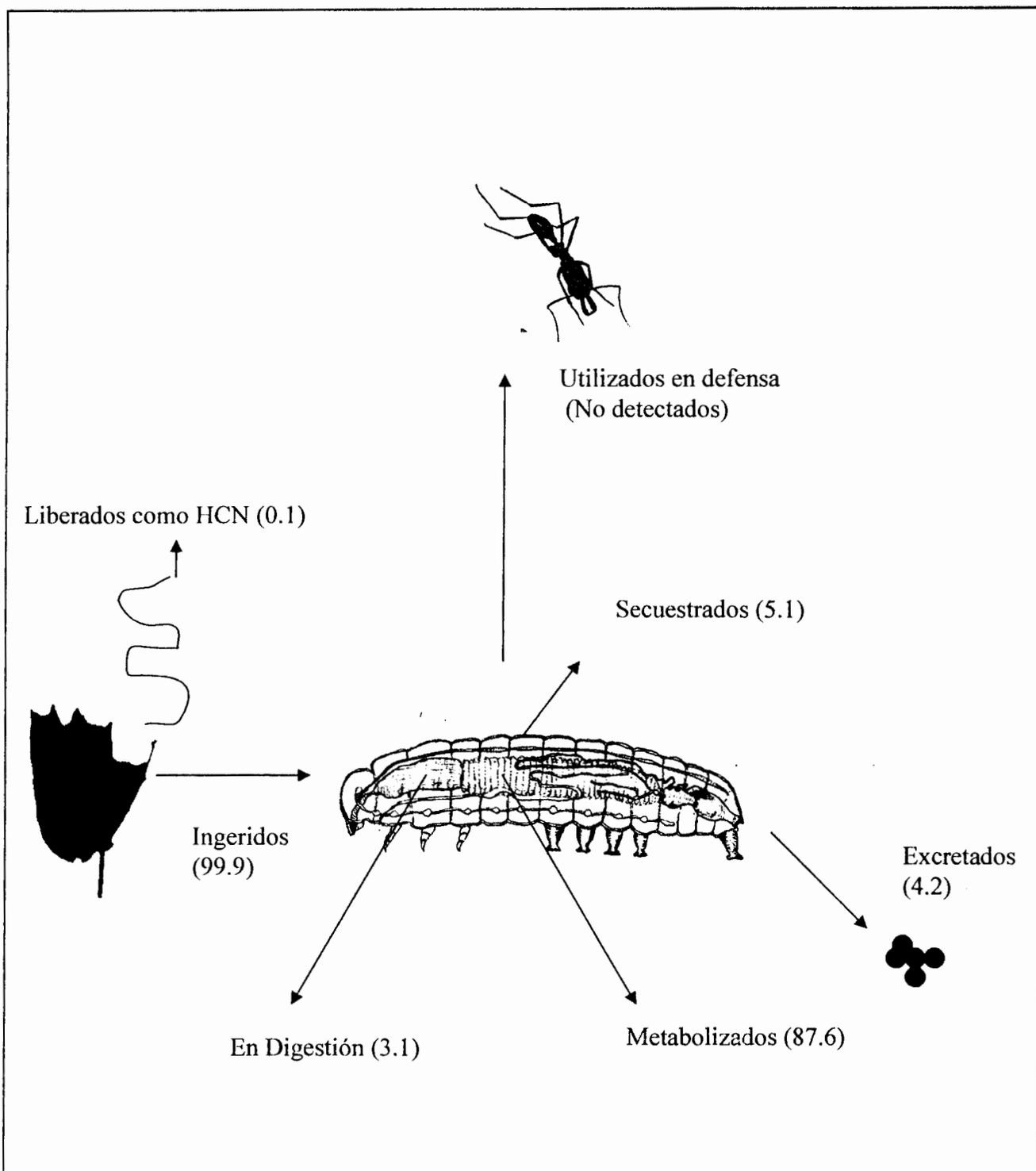
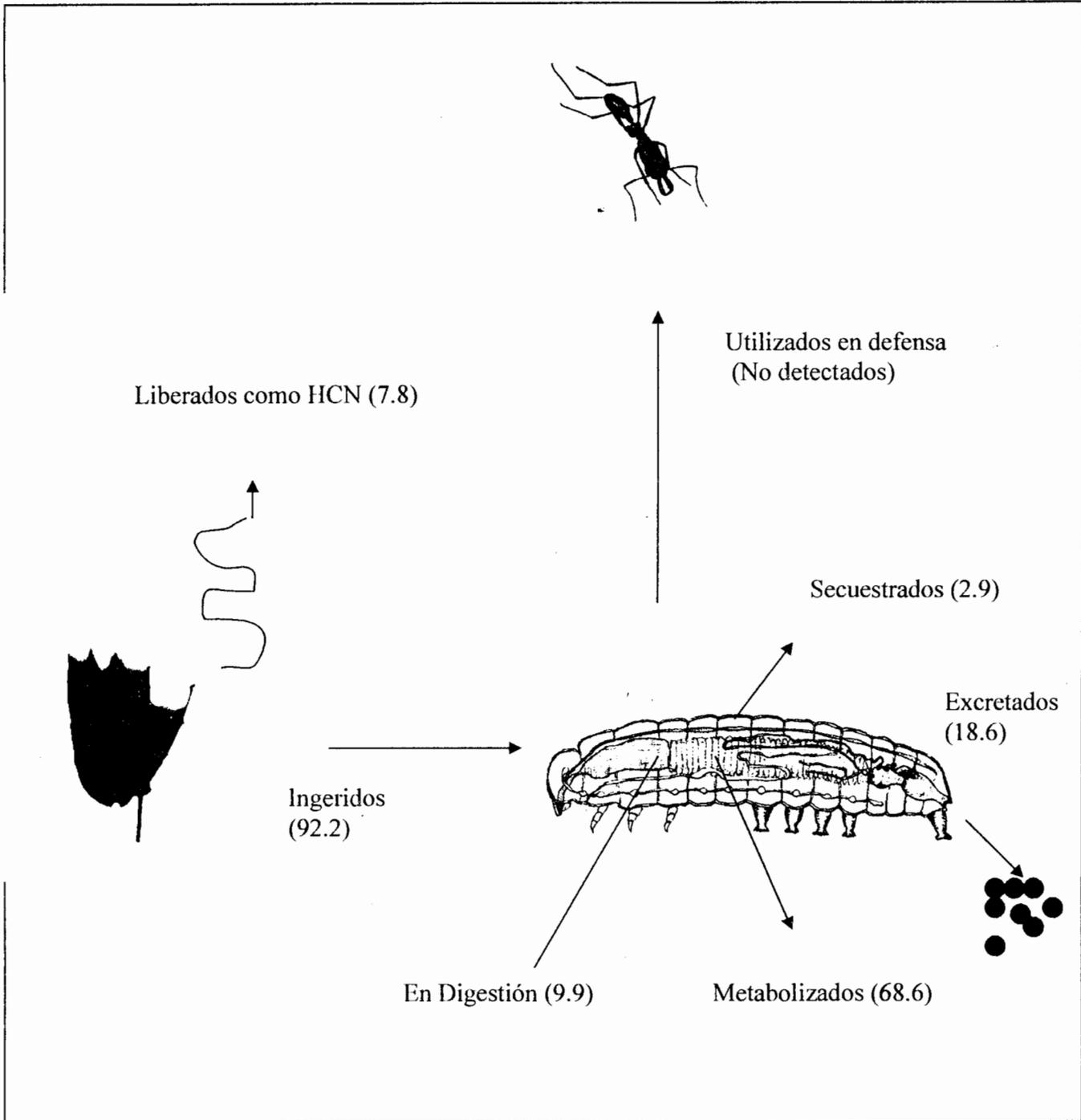


Figura 5.10. Distribución porcentual de los cianoglicósidos en la interacción *P. capsularis*-*S. frugiperda*-*O. chelifer*



6. DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo han apuntalado diferencias importantes en la forma cómo los metabolitos cianogénicos son movilizados a través de los sistemas interactivos especializados *P. capsularis*-*J. radians* y *P. capsularis* -*H. erato* en comparación con un sistema no especializado como *P. capsularis*-*S. frugiperda*. Dado que en esta trilogía de sistemas el punto común es la utilización de la especie vegetal como recurso alimentario, ella puede servir de punto de inicio en el planteamiento de las ideas generadas a partir de los resultados hallados.

Passiflora capsularis mostró ser una especie con un alto potencial cianogénico manifestado por valores que oscilaron entre 0.18 y 0.34 % de HCN por peso de hoja fresca. Se conoce que la passicapsina es su cianoglicósido más representativo (Fischer, 1982) y en estudios conducidos para extraer este compuesto se han conseguido un rendimiento de 0.13% del peso total de hojas frescas utilizadas en el proceso. De acuerdo a los valores medidos de liberación de HCN señalados anteriormente es razonable suponer que toda la passicapsina fué convertida a HCN por la acción desfragmentadora que ejerce el tolueno en las células de las muestras foliares y que permite poner en contacto las enzimas B-glucosídicas con este sustrato cianogénico.

La comparación de estos resultados con otros señalados por la literatura permite hacer algunas consideraciones interesantes. Por ejemplo, Alonso y Oliveros (2000) encontraron, a partir de una metodología similar a la empleada en este trabajo, cantidades de HCN liberadas por *P. capsularis* que oscilaron entre 0.1 y 0.34 $\mu\text{g} / \text{mg}$ de hoja fresca, valores que son diez veces menores a los encontrados en aquí. Las muestras de hojas provenían de plantas que habían sido colectadas en el campo y transferidas a macetas de cultivo. Estos resultados contrastan con los señalados por Oliveros (comunicación personal) quien utilizó hojas provenientes de plantas que crecían naturalmente en un bosque de vegetación secundaria similar de donde provinieron nuestras muestras. En éstas

las concentraciones de HCN variaron entre 1.48 y 3.26 $\mu\text{g} / \text{mg}$ de hoja fresca, valores que son bastante parecidos a los señalados por nosotros en este trabajo.

La producción variable de cianoglicósidos parece ser una condición sujeta a la procedencia geográfica y condiciones de cultivo de *P. capsularis*. Esta característica ha sido observada por algunos autores en otras plantas cianógenas. Butler (1965) encontró que el contenido de cianoglicósidos en *Trifolium repens* variaba entre 0.0032 y 0.352 μg de HCN/ mg de peso fresco de hojas jóvenes provenientes de colectas con diferente origen geográfico. Podría pensarse que siendo el nitrógeno un elemento indispensable en la conformación de los cianoglicósidos, tierras pobres en este elemento tenderían a reducir la capacidad cianogénica de las plantas. Sin embargo, resultados hallados por Briggs (1990) no parecen ayudar a sustentar esta idea pues sus experimentos no revelaron un efecto significativo de la disponibilidad de nitrógeno sobre la concentración de HCN en *Lotus corniculatus*. Otros autores han señalado la relación entre el grado de turgidez de las hojas y la capacidad para liberar HCN cuando sus tejidos son fragmentados. Las hojas de *Manihot esculenta* con potenciales hídricos bajos no producen cantidades detectables de este volátil, aún cuando el contenido de cianoglicósidos sea alto (Bernays et al., 1977).

Cuando se comparan la cantidad de HCN liberado por *P. capsularis* en nuestros experimentos con los señalados por otros autores para diferentes especies cianogénicas, se encuentra que la primera posee un potencial cianogénico sobresaliente que los insectos que pueden colonizarla seguramente deben enfrentar. La siguiente tabla muestra algunos de estos valores con propósitos comparativos:

Tabla 6.1. Cuadro comparativo de la capacidad cianogénica de algunas especies vegetales

Especie	μg de HCN/mg de hoja fresca	Fuente
<i>Acacia chiapensis</i>	0.363	Rehr et al., 1973
<i>Acacia farnesiana</i>	0.037	Rehr et al., 1973
<i>Trifolium repens</i>	0.352	Butler, 1965
<i>Dimorphoteca barberiae</i>	1.21	Butler, 1965
<i>Passiflora edulis</i>	0.116	Spencer y Seigler, 1983
<i>Passiflora ambigua</i>	0.033	Thomson y Brimer, 1997
<i>Cassava esculenta</i>	0.594	Spencer y Seigler, 1983

6.1. Comportamiento de las especies de lepidópteros cuando utilizan a *P. capsularis* como alimento

A partir de los resultados mostrados en este trabajo quedó evidente que *P. capsularis* cuando es sometida al ataque de herbivoría responde con la liberación de HCN, producto de la auto-hidrólisis de los cianoglicósidos contenidos en sus hojas. Según el modelo de Kates (1993), la actividad masticatoria de las larvas permitiría poner en contacto a los cianoglicósidos con las enzimas glucosidasas encargadas de su degradación, las cuales originalmente están localizadas en compartimientos de la pared celular. Aún cuando las tres especies de larvas se alimentaron de *P. capsularis* y provocaron la reacción cianogénica en ésta, existen dos parámetros evaluados en este proceso que merecen ser atendidos con más detalle. El primero de ellos se refiere a que la cantidad de tejido foliar consumido por peso larval no fue la misma en todas las especies. *J. radians* consumió dos veces más tejido foliar que *H. erato* y *S. frugiperda*, presentando esta última el menor valor de consumo de todas.

Es particularmente interesante el comportamiento seguido por esta última especie pues trae a la discusión el polémico tema acerca del papel activo de la cianogénesis para frenar la herbivoría de insectos. Si se comparan los valores de consumo de *P. capsularis* por parte de *S. frugiperda* con los obtenidos cuando se alimenta con hojas de *Spinacea oleracea* se encuentra que el consumo promedio sobre estas hojas fue de aproximadamente 15 cm² de área foliar frente al valor de casi 8 cm² ingeridos de *P. capsularis* por larvas de la misma edad y en un mismo lapso de tiempo. Estos valores representan una reducción en el consumo de aproximadamente 40%, indicando que en una situación de no selección, las larvas de *S. frugiperda* pueden llegar a aceptar a *P. capsularis* pero al costo de reducir el consumo, influenciado probablemente por la acción de mecanismos disuasores de la alimentación hallados en *P. capsularis* y que en las hojas referenciales de espinaca no estarían presentes.

Otro de los parámetros obtenidos que resultaron de interés tiene que ver con la cantidad de HCN liberado en el proceso de alimentación de las larvas. *J. radians* y *H.*

erato provocaron un menor desprendimiento de este volátil en comparación con *S. frugiperda* (casi seis veces más que las especies anteriores). Aunque la comparación estadística de los valores obtenidos para *J. radians* y *H. erato* no fueron significativamente diferentes, la tendencia observada en esta última fué la de minimizar aún más que *J. radians* la emisión de HCN en su actividad masticatoria de *P. capsularis*. Estas tendencias parecen reflejar una situación en la que un lepidóptero no especializado sobre esta planta como lo es *S. frugiperda*, cuando está en una situación de no selección utiliza esta planta para alimentarse reducidamente pues debe enfrentar a su química defensiva, para la cual no está suficientemente preparada para superarla como lo hacen *J. radians* y *H. erato* (insectos especializados). Como consecuencia de este razonamiento surge la siguiente pregunta: ¿ Es la liberación de HCN el agente causal para explicar la alteración del comportamiento alimentario en un insecto no especialista como *S. frugiperda*?. A propósito Bernays y Chapman (2000) plantearon que la palatabilidad de una planta a un insecto refleja un balance entre señales sensoriales que indican propiedades fagoestimulantes (azúcares, por ejemplo) del potencial alimento y otras que indican propiedades disuasivas o fagodepresoras (donde participan los metabolitos secundarios). La situación de impalatabilidad surge cuando las señales disuasivas de un determinado alimento sobresalen y actúan sobre el sistema sensorial del insecto inhibiendo su alimentación. En el caso de los cianoglicósidos, la mayoría de los experimentos y discusiones acerca de su papel defensivo han estado enfocados sobre la producción de HCN, el cual, como es suficientemente conocido, es altamente tóxico para los organismos. Poco se sabe acerca de las propiedades disuasivas de la alimentación en los cianoglicósidos en aquellos casos donde la liberación de HCN no esté involucrada y donde características intrínsecas de éstos pudieran ser tanto o más importantes.

Una condición determinante para que la actividad defensiva del HCN fuera eficiente sería que su liberación fuera rápida y concentrada. Los datos obtenidos aquí no ayudan a esclarecer la dinámica de producción de este compuesto volátil en el tiempo, pero es sintomática la observación acerca del patrón interrumpido de alimentación en *S. frugiperda* de nuestros experimentos. Pudo notarse que las larvas de esta especie tendían a alimentarse con frecuentes interrupciones, mostradas por la aparición de pequeñas áreas consumidas esparcidas por toda la superficie foliar, a diferencia de las larvas especialistas que segúan

un patrón más regular y continuo, caracterizado por el consumo de la hoja desde sus márgenes con desplazamiento progresivo hasta la nervadura central. Esta estrategia de alimentación interrumpida ha sido señalada para insectos que enfrentan una gran variedad de metabolitos secundarios en su comportamiento polífago y bien pudiera ser explicada por la liberación de HCN hasta niveles que el insecto no puede tolerar y provoca el cese temporal de la alimentación. Bernays et al. (1977) ilustraron esta situación con el saltamonte polífago *Zonocerus variegatus* alimentándose de la especie cianogénica *Manihot esculenta*. Estos autores observaron que cuando el insecto mordía la hoja era inmediatamente repelido, presumiblemente por la liberación de HCN, pero luego de un intervalo de tiempo corto la alimentación era reanudada. Casos de alimentación continua fueron observados únicamente en hojas en avanzado estado de marchitez, en el cual la producción de HCN era muy reducida. Woodhead y Bernays (1977), mostraron que las plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*) estaban mejor protegidas del ataque de insectos cuando eran muy jóvenes, enfatizando que esta protección era conferida por las mayores tasas iniciales de liberación de HCN cuando ninfas de *Locusta migratoria* mordían hojas jóvenes que cuando lo hacían sobre hojas maduras.

En nuestro caso, adicionalmente a la posible rapidez con que se genera la respuesta cianogénica contra *S. frugiperda* está la mayor cantidad de HCN liberada por la acción de esta especie y que mostraría una menor capacidad por parte de las larvas generalistas para enfrentar la hidrólisis de los cianoglicósidos de *P. capsularis* en el momento de alimentarse. Es interesante pensar en la posible actividad adicional de las propias enzimas beta-glucosídicas del insecto, detectadas en las secreciones salivares de las larvas de lepidópteros polípagos, y que probablemente contribuirían en los procesos de hidrólisis de los cianoglicósidos (Mattiacci et al., 1995).

En contraste se ha señalado que los lepidópteros que crecen sobre plantas cianogénicas poseen la “habilidad” de inhibir la hidrólisis por la formación de un complejo bloqueador entre enzimas propias de las larvas y el cianoglicósido de la planta, previniendo consecuentemente la liberación de HCN (Gilbert, 2000). Esta acción debería desarrollarse inicialmente en el acto de alimentación y explicaría el por qué en un insecto no especialista como *S. frugiperda* la cantidad de HCN liberado resultó mayor.

6.2. Destino de los cianoglicósidos ingeridos por las larvas en estudio

Los resultados mostraron que la hidrólisis de los compuestos cianogénicos contenidos en *P. capsularis* por la acción alimentaria de las larvas, manifestada por la liberación de HCN, fué un proceso que implicó una pequeña disminución del potencial cianogénico total de la planta. Más del 90% del mismo se incorporó a los procesos digestivos en las larvas de los lepidópteros estudiados. Los resultados también han mostrado diferencias importantes es la manera cómo éstos han movilizadado la carga de cianoglicósidos ingeridos, reflejando seguramente diferentes estrategias fisiológicas determinadas por la condición especializada o generalista de la especie larval en cuestión. Nuevamente *S. frugiperda* presentó características llamativas. Tras el período de alimentación de 24 horas sobre *P. capsularis* se encontró que en los ejemplares de esta especie la mayor actividad cianogénica se encontraba en el tubo digestivo, seguida por *J. radians* (50%) y *H. erato* (38%). Surge la pregunta acerca de si estos resultados indicarían diferentes capacidades para la metabolización de compuestos que como los cianoglicósidos poseen un alto potencial de toxicidad. Profundizando un poco más, sería pertinente preguntarse acerca de los mecanismos bioquímicos que hacen a las propias beta-glucosidasas existentes en el estómago de las larvas (Mattiacci et al., 1995) inactivas en la hidrólisis de la carga de cianoglicósidos ingerida y los procesos de inhibición de las beta-glucosidasas propias del material vegetal ingerido.

Dos posibles mecanismos bioquímicos han sido propuestos como vías de destoxificación del ácido cianhídrico en lepidópteros: La primera se refiere a la producción de tiocianato por intervención de la enzima rodanasa. La segunda se debe a la acción catalizadora de la BCA sintasa que conduce a la producción de β -ciano-L-alanina (BCA) (Witthohn y Naumann, 1987). Aunque ninguno de estos dos sistemas de destoxificación ha sido demostrado enlazado a cianoglicósidos como la passicapsina, éstos podrían ser capaces de destoxificar el HCN liberado por ésta, como ha sido sugerido por Witthohn y Naumann (1987) para los cianoglicósidos linamarina y lotaustralina.

La presencia de BCA ha sido demostrada en larvas de *Spodoptera exigua* (Brattsten et al., 1983) y en mariposas del género *Heliconius* (Witthohn y Naumann, 1984). Jones (1979) ha señalado que mecanismos de destoxicación deberían estar presentes en todas las especies de herbívoros pues en casi todas las especies de plantas angiospermas se encuentran cianoglicósidos, aunque sea en pequeñas cantidades.

Brattsten et al. (1983) encontraron que altas dosis de cianuro producían envenenamiento agudo de larvas del lepidóptero polífago *S. eridania* sin ningún contacto previo con este tóxico. Sin embargo, si las larvas ingerían previamente dosis bajas de éste podían adquirir resistencia, atribuyendo ésto a la inducción del mecanismo desintoxicante de la β - cianoalanina sintetasa. Estos mismos autores encontraron que larvas de sexto instar de la especie antes referida , a las que se les inyectó cianuro (como KCN diluído en agua), mostraron un LD₅₀ de 332 mg de HCN/ Kg, revelando la alta capacidad de tolerancia de esta especie generalista. Estos valores pueden servir de referencia para argumentar la existencia de mecanismos similares en los lepidópteros estudiados por nosotros. En particular, para *S. frugiperda* sería razonable la suposición acerca de la existencia de procesos donde estén involucradas los complejos enzimáticos antes señalados puesto que la dosis de HCN potencialmente producibles ingeridos por las larvas a partir de *P. capsularis* supera más de tres veces la dosis letal antes referida. Un segundo destino encontrado para los cianoglicósidos ingeridos fué revelado por su presencia en la hemolinfa. Las tres especies coincidieron en presentar los menores valores de actividad cianogénica en relación con las otras partes corporales analizadas. El que se haya detectado la presencia de esta actividad en la hemolinfa resulta un importante indicador de que los cianoglicósidos han superado la barrera bioquímica digestiva y de la existencia de mecanismos conservativos dirigidos a bloquear la hidrólisis de éstos. Estos mecanismos son poco conocidos en insectos, pero en plantas cianogénicas se ha encontrado que los glicósidos cianogénicos son transportados a través de largas distancias convirtiéndolos para esta movilización en diglucósidos (por acción de diglucositransferasas) que no son reconocidos por las beta-glucosidasas como sustrato de degradación (Jones et al., 2001). No pudimos encontrar evidencias en la literatura de la existencia de mecanismos parecidos en insectos, pero se conoce, por ejemplo, que en *Zygaena trifolii*, la hemolinfa mostró los mayores valores de actividad para la beta-glucosidasa en comparación con la hallada en el

estómago (Witthohn y Nauman, 1984). Este hecho justificaría que existieran mecanismos que reduzcan tal actividad para prevenir que se genere toxicidad en la larva. Nahrstedt (1996) señaló que la producción de HCN en la hemolinfa de *Zygaena trifolii* era impedida por inhibidores iónicos (como el Ca^{++} y Mg^{++}) de la linamarasa pero no aportó luces acerca de cómo esta enzima es reactivada para que el propio sistema cianogénico de la larva funcione. En nuestro trabajo llama la atención que la concentración de cianoglicósidos haya sido tan baja en la hemolinfa de *J. radians* y *H. erato* en comparación con los datos obtenidos para otras especies de lepidópteros que se alimentan también de plantas cianogénicas. Por ejemplo, Nahrstedt (1996) encuentra que la hemolinfa es la parte, después del integumento, donde mayormente están concentrados los cianoglicósidos linamarina y lotaustralina en la polilla *Zygaena trifolii*, aunque también es importante señalar que esta especie además de incorporar cianoglicósidos de su planta hospedera, sintetiza “de novo” el mismo tipo de compuestos y los emplea en secreciones defensivas, explicando tal vez la necesidad de concentrarlos en la hemolinfa como medio de transporte desde el cuerpo graso donde son producidos (Nahrstedt, 1996). Un patrón similar de concentración alta de metabolitos secundarios en la hemolinfa de lepidópteros con propiedades defensivas lo poseen las larvas de *Athalia rosae* (Hymenoptera: Tenthredinidae), las cuales adquieren glucosinolatos de *Sinapis alba* (Brassicaceae) y los concentra en la hemolinfa para luego ser secretados a través del integumento con propósitos defensivos (Muller et al., 2001). En nuestro trabajo, ninguno de los insectos especialistas estudiados mostró evidencias de la existencia de secreciones de igual naturaleza y con propósitos semejantes a los ejemplos referidos.

La pared corporal fué el tercer lugar estudiado para el seguimiento de los cianoglicósidos en el cuerpo larval de los lepidópteros analizados. Este incluye la cutícula, músculos y tejido adiposo. *J. radians* y *H. erato* coincidieron en presentar la mayor actividad cianogénica en estas partes. Dado que no se hizo una diferenciación más exhaustiva de los diferentes tipos de tejidos, la concentración observada en su conjunto puede representar, posiblemente, dos posibles estrategias de movilización de los cianoglicósidos. La primera estaría relacionada con la centralización de la actividad desintoxicante en el tejido adiposo de los insectos. La actividad del complejo citocromo P450 en el cuerpo graso ha sido reconocido como fundamental en procesos de

desintoxicación de lepidópteros y ortópteros. Adicionalmente, Witthohn y Naumann (1984) sugieren que la mayor actividad de la beta-cianoalanina sintetasa en el tejido adiposo de la polilla cianogénica *Zygaena trifolii* puede estar relacionada con la concentración de cianoglicósidos en estos tejidos.

Otra posibilidad importante que explicaría la notoria concentración de cianoglicósidos en tejidos diferentes al tubo digestivo y hemolinfa sería la movilización de estos compuestos hacia el tejido cuticular de las larvas de *J. radians* y *H. erato*. De la deposición de aleloquímicos en el integumento de larvas lepidópteras se conocen algunos casos. Pueden mencionarse a los alcaloides pirrolizidínicos en *Cretonotos transiens* (Boppré, 1990), cannabinoides en *Arctia caja* (Rothschild et al., 1977) y glicósidos cardíacos en *Sytoneida epilais* (Von Nickisch-Rosenegk et al., 1993; citado por Montllor et al., 1991). Las larvas de *Zygaena trifolii* acumulan cianoglicósidos en cavidades cuticulares en una concentración que puede alcanzar más del 50% de la concentración total corporal de estos compuestos. Cuando estas larvas son atacadas se secreta desde las cavidades un líquido incoloro con propiedades disuasoras para aves, reptiles y hormigas (Nahrstedt, 1996). Nada se conoce acerca de los mecanismos fisiológicos que movilizan estos compuestos hacia la cutícula. Para los alcaloides pirrolizidínicos y glicósidos cardíacos se ha señalado la existencia de transportadores que facilitan la transferencia de los mismos desde el estómago hacia las células epidérmicas (Montllor et al., 1991).

6.3. Excreción de los cianoglicósidos a través de las heces

Las diferencias observadas en los niveles de cianoglicósidos detectados en las heces de las especies analizadas sugieren la existencia de estrategias conservativas de éstos compuestos en *J. radians* y *H. erato*, no así en *S. frugiperda*, la cual eliminó casi el 20% de los cianoglicósidos ingeridos a través de esta vía.

Esta tendencia a eliminar tóxicos a través de las excretas ha sido observada en varias especies de insectos herbívoros, siendo un proceso fisiológico conocido como estrategia farmacokinética (Muller et al., 2001). El lepidóptero noctuideo *Manduca sexta*, por ejemplo, excreta a través de las heces la mayor parte de la nicotina ingerida (Brattsten,

1988). De acuerdo a los resultados de nuestro trabajo, *S. frugiperda* estaría haciendo uso de mecanismos parecidos con el añadido de la preservación de los cianoglicósidos inestables que fueron ingeridos. En el otro extremo de comportamiento están las especies *J. radians*, y *H. erato* las cuales parecen asimilar en mayor grado el material cianoglicósido ingerido, reflejando una mayor capacidad adaptativa para su consumo. Algunos autores han encontrado una correlación negativa importante entre la capacidad para secuestrar compuestos secundarios con la cantidad de éstos eliminados por las heces. Esto es, las especies con tendencias a la bioacumulación controlarían el balance de estos compuestos a través de la minimización de la salida de ellos por las heces (Bowers et al., 1993; Muller et al., 2001).

6.4. Capacidad defensiva de las larvas y su relación con los cianoglicósidos

La presencia comprobada de cianoglicósidos en partes diferentes al tubo digestivo en las tres especies de larvas analizadas abrió el camino conducente a pensar si esta propiedad de movilizar dichos compuestos hacia partes específicas corporales les confiere alguna capacidad protectora frente al ataque de un potencial depredador. Los resultados mostraron que el comportamiento altamente agresivo y depredatorio de la hormiga *Odontomachus chelifer* observado con las especies predictivamente protegidas químicamente se vio fuertemente inhibido cuando se les suministraba larvas de *J. radians* y *H. erato* como presas. Estas especies parecieran tener un sistema protector cuyo reconocimiento se hace a través de los receptores sensoriales de las antenas (en todos los encuentros hubo palpación antenal) y podría actuar en dos niveles. El primero ocurre cuando luego del acercamiento antenal, la hormiga se retrae para luego alejarse y no atacar. El segundo está referido al caso ocurrido en algunas larvas que fueron atacadas pero pareciera haber un reconocimiento de la presencia de un compuesto que inhibe a la hormiga de seguir mordiendo. Resulta interesante establecer algunas consideraciones al respecto. El tipo de comportamiento señalado anteriormente se conoce como evasión proximal a un químico defensivo por parte del depredador atacante (Brower, 1984). Este debe entrar en contacto con la presa para percibir la señal química antes de decidir el ataque o rechazo. Este tipo de evasión contrasta con aquella que se establece a distancia, cuando el depredador reconoce

la señal y el contacto físico no es necesario. Estas señales no son necesariamente de tipo químico (volátiles) sino que también el color puede ser un estímulo disuasor importante. Es razonable pensar que aquellos compuestos químicos que facilitan esta última respuesta serían más ventajosos tanto para el depredador como para la presa. El primero no malgastaría tiempo y energía en un recurso no palatable, mientras que la segunda evitaría ser dañada por el atacante. Sin embargo, la evasión proximal que contempla inclusive el ataque, tendría consecuencias importantes en aquellos depredadores donde la experiencia de contactos negativos anteriores puede ser una pieza clave en los procesos evolutivos de la impalatabilidad (Vet y Dicke, 1992).

Nuestros resultados no permiten hacer inferencias acerca de la capacidad de *Odontomachus chelifer* para exhibir respuestas condicionadas, pero esta idea resulta atractiva de tomar en cuenta, ya que mostró un comportamiento depredatorio bastante estereotipado, y adicionalmente como pudo ser observado , *J. radians* y *H. erato* sobrevivieron al ataque . Estas condiciones son sumamente importantes para que el carácter defensivo de un químico tenga valor adaptativo (Brower, 1984). Esto estaría en consonancia con la posición de algunos autores (por ejemplo, Wiklund y Jarvi, 1982) que han señalado que la capacidad que posea un depredador para “juzgar” rápidamente la calidad de la presa capturada y que resulta en la posterior liberación sin mayor daño de ésta es una forma determinante para que los genes de impalatabilidad puedan incrementar su frecuencia en una determinada población de mariposas.

Existen varios trabajos donde se reconoce la impalatabilidad de los heliconinos. La mayoría utilizaron aves como depredadores y las presas evaluadas han sido heliconinos adultos. Por ejemplo, Brown y Francini (1990) resaltaron la importancia defensiva de los cianoglicósidos adquiridos por las larvas de sus plantas hospederas (Passifloraceas), aunque no señalaron frente a cuál depredador se evaluó esta capacidad. Brower et al. (1964), citados por Brower (1984), encontraron que siete especies de heliconinos entre ellas *H. erato* fueron rechazados por pájaros tanágridos en Trinidad. Muhtsasib y Evans (1987) hallaron una fuerte correlación entre la presencia de linamarina en *Zygaena filipendulae* con la inhibición de su depredación por aves.

Para *J. radians* la ausencia de evidencias experimentales de protección por defensas químicas son casi absolutas. Orellana (2000) realizó pruebas con la araña *Nephila clavipes* como operador en bioensayos de laboratorio encontrando que de quince larvas de cuarto instar utilizadas, catorce de ellas fueron rechazadas por las arañas y sólo una fué aceptada. Este autor no encontró evidencias claras de cianogénesis en larvas de esta especie, y sugiere una mayor importancia para los alcaloides detectados en sus experimentos en sus experimentos preliminares.

Establecer la responsabilidad de que un determinado compuesto secundario participe de las estrategias defensivas en los organismos que los acumulan o producen “de novo” no es tarea fácil ni puede hacerse a priori. La teoría permitiría predecir que especies de insectos herbívoros estrechamente asociados con plantas que producen metabolitos secundarios con propósitos defensivos tenderían a desarrollar la capacidad para secuestrar esas moléculas nocivas de sus plantas hospederas para utilizarlas luego en su propia defensa (Brower et al., 1967). De acuerdo a esto resulta razonable pensar que la evidente capacidad defensiva demostrada en las larvas de *J. radians* y *H. erato* de nuestro trabajo se deriva de la utilización por parte de esta especie de la planta *P. capsularis*. Adicionalmente, dado que esta especie vegetal mostró poseer un alto potencial cianogénico, sería fácil suponer que estas propiedades defensivas de los insectos se deben al secuestro de estos compuestos. Sin embargo, las evidencias conseguidas en nuestro trabajo no pueden ser catalogadas como concluyentes en favor de esta idea. Preferimos tomar una posición más prudente puesto que uno de los aspectos claves que tenía que ver con la demostración de que la planta hospedera era la fuente de impalatabilidad necesariamente implicaba seleccionar una cepa de *J. radians* o *H. erato* que aceptaran alimentarse bien de una planta con antecedentes conocidos de ausencia de compuestos tóxicos o a través de la formulación de una dieta artificial con ingredientes de igual condición. Lamentablemente, los esfuerzos dirigidos a conseguir estos objetivos resultaron infructuosos. Larvas de diferentes instares de las dos especies señaladas rechazaron alimentarse tanto de *Hybanthus sp.* como de la dieta artificial. Sin duda, hace falta mayor conocimiento acerca de las sustancias fagoestimulantes responsables de la aceptación de *P.*

capsularis como fuente de alimentación. *J. radians* es una especie que puede aceptar otras especies de passifloras, como por ejemplo, *P. cuneata* y *P. biflora* (López, comunicación personal) por lo que resulta interesante evaluar en un futuro si características como la tasa de supervivencia o la capacidad defensiva puede variar de acuerdo a la especie de *Passiflora* considerada. Valdría la pena también estudiar el posible rol de los cianoglicósidos y el HCN en el reconocimiento por parte de este insecto de las passifloras como recurso de alimentación adecuado.

Las experiencias hechas con la manipulación de la fuente de alimento tuvieron más éxito con *S. frugiperda*. Los resultados obtenidos mostraron que la asociación con *P. capsularis* por parte de este noctuideo no le aportó capacidad defensiva frente a *Odontomachus chelifer*. Aunque se logró demostrar que las larvas tenían la propiedad de acumular cianoglicósidos en tejidos diferentes al tubo digestivo, la similitud de los valores de depredación con las observadas en las larvas control no revelan que éstos actuaran como inhibidores del comportamiento depredatorio de las hormigas. De una forma característica, las larvas de *S. frugiperda* reaccionaban al ataque produciendo un regurgitado con un efecto nulo sobre las hormigas, que en varias ocasiones fueron vistas consumiéndolo. Este líquido entérico debería contener una importante carga de cianoglicósidos no metabolizados, como se desprende de los resultados discutidos en la sección donde se describió la movilización de estos compuestos dentro de la larva. Esto daría apoyo para pensar, al menos en *S. frugiperda*, en el reducido papel defensivo de estos compuestos en el binomio larva-*Odontomachus chelifer*.

Otra posibilidad que se planteó inicialmente era que las larvas especializadas en *P. capsularis* mostraran mecanismos de liberación del volátil HCN como respuesta defensiva al ataque depredador, tal como ha sido observado en otros insectos asociados a plantas cianogénicas (Nahrstedt, 1996; Blum et al., 1981; Brower, 1984). Ni los experimentos de perturbación mecánica ni aquellos donde las larvas de *J. radians* y *H. erato* fueron atacadas por las hormigas revelaron la liberación (al menos detectable por la técnica utilizada) de HCN. La presencia de órganos especializados para tal fin parece descartable así como también la presencia de secreciones cuticulares observadas en otras especies de larvas cianogénicas.(Nahrstedt, 1996). La no detección de la liberación de HCN en el acto

del golpe mandibular de la hormiga también parece descartar la posibilidad que este volátil pudiera jugar un papel activo en la defensa de *J. radians* y *H. erato*, aún a pesar de que su potencial cianogénico fué demostrado con la maceración de sus tejidos en ausencia de beta-glucosidasa exógena.

Queda aún sin contestar la pregunta acerca del origen de las propiedades defensivas observadas en las larvas especialistas de *P. capsularis*. Recientemente, Pérez (2002) comparó la química de esta planta con la de las larvas y adultos de *J. radians*, encontrando una notable similitud entre compuestos hallados en la planta hospedera y los encontrados en el insecto. Particularmente son interesantes aquella encontrada en compuestos de naturaleza alcaloidal cuyas propiedades defensivas fueron evaluadas contra la hormiga *Solenopsis geminata*, observándose que estos compuestos poseían un fuerte efecto fagodepresor. Queda abierta entonces la posibilidad de que las evidentes capacidades defensivas de *J. radians* y *H. erato* sean derivadas de otros compuestos diferentes a los cianoglicósidos. Esta posibilidad ya ha sido sugerida por Brown y Trigo (1994) para los heliconiinae en los cuales se ha demostrado la acumulación de cantidades importantes de alcaloides beta-carbonilos cuyos efectos sobre depredadores no han sido suficientemente estudiados.

Las consideraciones planteadas en estos párrafos forman parte de un abanico de posibilidades. Creemos que uno de los corolarios más importantes derivados de este trabajo es que la evidencia de la presencia de un aleloquímico en una especie de mariposa no prueba que éstas están defendidas precisamente por estos compuestos. Se necesitan estudios futuros donde deben combinarse la identificación de los químicos con bioensayos que tengan significado ecológico y que las pruebas experimentales en el campo deben confirmar las deducciones obtenidas en el laboratorio. La fenología de la planta, las variaciones intraespecíficas de éstas y sus herbívoros, además de los efectos sinérgicos entre los aleloquímicos y la dinámica poblacional de los depredadores, son algunos de los factores que determinan el éxito de una barrera química para modular la relación natural de un sistema tritrófico (Camara, 1997a).

7. CONCLUSIONES

- ❖ *Passiflora capsularis* es una planta con una alta capacidad de cianogénesis puesta de manifiesto cuando se produce la fragmentación celular bien sea por la acción de un químico inductor (Tolueno) o por la actividad masticatoria de las larvas de los lepidópteros que la utilizaron como recurso de alimentación.
- ❖ El comportamiento alimentario de las larvas de los lepidópteros en estudio varió de acuerdo a la especie. Las larvas de *J. radians* y *H. erato* (especialistas) presentaron mayores tasas de consumo foliar en comparación con las larvas generalistas de *S. frugiperda*. De acuerdo al comportamiento interrumpido de alimentación observado en *S. frugiperda*, es razonable suponer que estos resultados sean producto de la respuesta cianogénica de la planta.
- ❖ La liberación de HCN que acompañó el proceso de alimentación de las larvas resultó mayor en el insecto generalista *S. frugiperda* que en las larvas especialistas *J. radians* y *H. erato*. Estas últimas parecen estar mejor adaptadas para sortear la hidrólisis, durante el acto de alimentación, de los cianoglicósidos contenidos en los tejidos de *P. capsularis*.
- ❖ La cantidad de cianoglicósidos descompuestos a HCN representó apenas una pequeña fracción del total de estos compuestos que ingresaron al tubo digestivo de las larvas estudiadas.

- ❖ La carga de cianoglicósidos ingeridos por las tres especies siguió rutas semejantes. Las diferencias aparecieron en las cantidades de cianoglicósidos detectados en cada uno de los compartimientos analizados. Las larvas generalistas presentaron una menor tasa digestiva del material foliar consumido de *P. capsularis*. Desde este compartimiento los cianoglicósidos fueron movilizados hacia la hemolinfa y pared corporal en las tres especies. Todas éstas coincidieron en metabolizar más de las dos terceras partes de la carga inicial de estos compuestos. Las heces resultaron una vía importante para la especie generalista de eliminación de los cianoglicósidos.

- ❖ Las larvas especialistas mostraron una capacidad defensiva eficaz frente a la acción de la hormiga generalista *Odontomachus chelifer* y no así la especie generalista. Esta propiedad no parece estar relacionada con la presencia de los cianoglicósidos en sus tejidos.

- ❖ Las evidencias halladas en este trabajo orientan la apreciación de que las larvas especialistas manejan la carga de cianoglicósidos adquirida de su hospedera natural *P. capsularis* sobre la base de estrategias conservativas de estos compuestos utilizables como fuente metabólica importante, por encima del rol defensivo hipotético que se planteó inicialmente en este trabajo. Queda abierta la posibilidad de indagar por otros compuestos que pudieran ser claves en explicar su demostrada capacidad defensiva .

8. REFERENCIAS

- Alonso, M.E. & Oliveros, A. 2000.** A method for the Practical Quantification and Kinetic Evaluation of Cyanogenesis in Plant Material. Application to *Pteridium aquilinum* and *Passiflora capsularis*. *Phytochemical Analysis*. 11: 309-316.
- Aplin, R.T. ; Benn M.H. ; Rothschild, M. 1968.** Poisonous Alkaloids in the Body Tissues of the Cinnabar Moth (*Callimorpha jacobaceae*). *Nature* 219: 747.
- Barbosa, P. 1988.** Natural Enemies and Herbivore-Plant Interactions: Influence of Plant Allelochemicals and Host Specificity. *En Novel Aspects of Insect –Plant Interactions*. Barbosa & Letourneau, Editors. John Wiley & Sons, Inc., New York. pp. 201-229.
- Benson, W., K. Brown, Jr. , L. Gilbert. 1975.** Coevolution of Plants and Herbivores: Passion Flower Butterflies. *Evolution* 29: 659-680.
- Bernays, A; Chapman, E; Leather, E; McCaffery, A; Modder,W. 1977.** The relationship of *Zonocerus variegatus* (L.) (Acridoidea: Pyrgomorphidae) with Cassava (*Manihot esculenta*). *Bulletin of Entomological Research* 67: 391-404.
- Bernays, E; Chapman,R. 2000.** Plant secondary compounds and grasshoppers: Beyond plant defenses . *Journal of Chemical Ecology* 26(8): 1773-1794.
- Blum, M; Jones, T; House, G; Tschinkel, W. 1981.** Defensive secretions of tiger beetles: cyanogenetic basis. *Comparative Biochemistry Physiology* 69(B): 903-904.
- Boppré,M. 1990.** Lepidoptera and pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Chemical Ecology* 16: 165-186.
- Bowers, M. D. 1980.** Unpalatability as a Defense Strategy of *Euphydryas phaeton* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Evolution* 35 : 367-375.
- Bowers, M. D. 1988.** Plant Allelochemistry and Mimicry. *En Novel Aspects of Insect –Plant Interactions*. Barbosa & Letourneau, Editors. John Wiley & Sons, Inc., New York. pp.273-311.
- Bowers, M.D. 1990.** Recycling Plant Natural Products for Insect Defense. *En Insect Defenses : Adaptative Mechanisms and Strategies of Prey and Predators*. Jerram Brown, Editor. State University of New York Press. New York. pp.353-386.
- Bowers, W., F. Ortego, X. You, P. Evans. 1993.** Insect Repellents from the Chinese Prickly Ash *Zanthoxylum bungeanum*. *Journal of Natural Products* 56(6): 935-938.

- Bowers, M.D. & Stamp, N.E. 1997.** Fate of Host-Plant Iridoid Glycosides in Lepidopteran Larvae of Nymphalidae and Arctiidae. *Journal of Chemical Ecology* 23(12): 2955-2963.
- Brattsten, L.B., Wilkinson, C.F. ; Eisner T. 1977.** Herbivore-Plant Interactions: Mixed function oxidases and Secondary Plant Substances. *Science* 196: 1349-1352.
- Brattsten, L.B. 1988.** Potential role of plant allelochemicals in the development of insecticide resistance. *En: Novel Aspects of Insect –Plant Interactions.* Barbosa & Letourneau, Editors. John Wiley & Sons, Inc. New York. pp. 313-348.
- Brattsten, L; Samuelian, J; Long, K; Kincaid, L; Evans, C. 1983.** Cyanide as a feeding stimulant for the southern armyworm *Spodoptera eridania*. *Ecological Entomology* 8: 125-132.
- Briggs, M. 1990.** Chemical defense production in *Lotus corniculatus*. I. The effects of nitrogen source on growth, reproduction and defense. *Oecologia* 83: 27-31.
- Brinker, A.M. & Seigler, D.S. 1992.** Determination of Cyanide and Cyanogenic Glycosides from Plants. *En Plant Toxin Analysis.* Linskins & Jackson, Editors. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. pp. 360-380
- Brower, L.P. & Brower, J.V.Z.. 1964.** Birds, Butterflies and Plant Poisons: A study in Ecological Chemistry. *Zoologica* 49: 137-159.
- Brower, L.P; Brower, J. V; Corvino, J. 1967.** Plant poisons in a terrestrial food chain. *Proceedings of The Natural Academy of Sciences USA* 57: 893-898
- Brower, L.P. 1969.** Ecological Chemistry. *Scientific American* 220: 22-29.
- Brower, L.P ; Seiber, J.N; Nelson C. J; Lynch, S.P; Tuskes, P.M. 1982.** Plant Determined Variation in the Cardenolide Content, Thin-Layer Chromatography Profiles and Emetic Potency of Monarch Butterflies *Danaus plexippus* Reared on the Milkweed *Asclepias eriocarpa* in California. *Journal of Chemical Ecology* (3): 579-633.
- Brower, L.P. 1984.** Chemical Defences in Butterflies. *En: The Biology of Butterflies.* Vane-Wright & Ackery Editors. Princeton University Press. New Jersey. pp.109-134.
- Brown, K. & Francini R. 1990.** Evolutionary Strategies of Chemical Defense in Aposematic Butterflies: Cyanogenesis in Asteraceae-feeding American Acraeinae. *Chemoecology* 1: 52-56.
- Brown, K; Trigo, J. 1995.** Multilevel complexity in the use of plant allelochemicals by aposematic insects. *Chemoecology* 5/ 6,3/ 4: 119-126.

Butler, G. 1965. The distribution of the cyanoglucosides Linamarin and Lotaustralin in higher plants. *Phytochemistry* 4: 127-131.

Camara, M.D. 1997a. Predator Responses to Sequestered Plant Toxins in Buckeye Caterpillars: Are Tritrophic Interactions Locally Variable? *Journal of Chemical Ecology* 23(9): 2093-2106.

_____ **1997b.** A Recent Host Range Expansion in *Junonia coenia* Hubner (Nymphalidae): Oviposition Preference, Survival, Growth and Chemical Defense. *Evolution* 51:873-884.

Chew, F; Rodman, J. 1979. Plant resources for chemical defenses. En: Herbivores: Their interaction with Secondary plant metabolites. Rosenthal & Jansen, editors. Academic Press. New York. pp. 387-412.

Conn, E. 1979. Cyanide and cyanogenic glycosides. En: Herbivores: Their interaction with Secondary plant metabolites. Rosenthal & Jansen, editors. Academic Press. pp. 387-412

Cooper-Driver, G; Swain, T. 1976. Cyanogenic polymorphism in bracken in relation to herbivore predation. *Nature* 260, 604.

DeVries, P. 1987. The Butterflies of Costa Rica and their natural history. Princenton University Press, New Jersey.

Duffey, S. 1980. Sequestration of Plant Natural Products by Insects. *Annual Review of Entomology* 25: 447-477.

Dyer, L. & Bowers, M.D.. 1996. The Importance of Sequestered Iridoid Glycosides as a defense against and Ant Predator. *Journal of Chemical Ecology* 22(8) : 1527-1539.

Ehrlich, P.R. & Raven, P.H. 1964. Butterflies and Plants: A Study in Coevolution. *Evolution* 18: 586-608.

Ehrlich, P.R. & Raven, P.H. 1967. Butterflies and Plants. *Scientific American* 217 : 104-112.

Fischer, F.C. 1982. Cyanogenesis in Passifloraceae.II. Cyanogenic Compounds from *Passiflora capsularis*, *P. Warmingii* and *P. perfoliata*.. *Planta Medica* 45: 42-45.

Gardner, D.W. & Stermitz, F.R. 1988. Hostplant Utilization and Iridoid Glycoside Sequestration by *Euphydryas anicia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Journal of Chemical Ecology* 14(12) :2147-2168.

- Gilbert, L. 2000.** *Heliconius* como un género representativo de la biodiversidad tropical. URL: <http://www//uts.cc.utexas.edu/~gilbert/research/wingpattern/jump.html>
- Gronenberg, W. 1996.** The trap-jaw mechanism in the Dacetinae ant *Daceton armigerum* and *Strumigenys* sp. *The Journal of Experimental Biology* 199: 2021-2033.
- Hruska, A.J. 1988.** Cyanogenic Glucosides as Defense Compounds. *Journal of Chemical Ecology* 14 (12): 2213-2217.
- Jaffe, K. 1993.** El Mundo de Las Hormigas. Editorial Equinoccio. Ediciones de la Universidad Simón Bolívar. Caracas. 184 pp.
- Jermey, T. 1984.** Evolution of Insect / Hostplant relationship. *The American Naturalist* 124: 609-630.
- Johnson, K.S. 1999.** Comparative Detoxification of plant (*Magnolia virginiana*) Allelochemicals by Generalist and Specialist Saturniid Silkmoths. *Journal of Chemical Ecology* 25(2): 253-269.
- Jones D.A. 1962.** Selective eating of the Acyanogenic form of the Plant *Lotus corniculatus* by various animals. *Nature* 193: 1109-1110.
- Jones, D. 1979.** Chemical defense: Primary o secondary function. *The American Naturalist* 113: 445-451.
- Jones, D. 1998.** Why are so many food Plants Cyanogenic ? *Phytochemistry* 47(2):155-162.
- Jones, P; Tattersall,D; Moller,B. 2001.** Cyanogenic diglucosides as transport forms of cyanogenic glucosides. <http://www.plbio.kvl.dk/plbio/cyanogen.htm>.
- Kakes, P. 1993.** Function and Variation of the Beta-glucosidasa Linamarasa in Natural Populations of *Trifolium repens*. *En Beta- glucosidasas: Biochemistry and Molecular Biology*. Asim Esen Editors, American Chemical Society. Washington D.C. pp. 145-152 .
- Killip, E. 1938.** The American Species of Passifloraceae. Botanical Series. Field Museum of Natural History 19:1-613.
- Mattiacci, L; Dicke, M; Posthumus, M. 1995.** β -glucosidase: An elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *Proceedings of The National Academy of Sciences of USA* 92: 2036-2040.
- Mead, E; Foderano, T; Gardner, D; Stermitz, F. 1993.** Iridoid glycoside sequestration by *Thessalia leanira* (Lepidoptera: Nymphalidae) feeding as *Castilleja integra* (Scrophulariaceae). *Journal of Chemical Ecology* 19(6): 1155-1165.

- Miller, J.S. 1992.** Host-Plant Associations among Prominent Moths. *BioScience* 42(1):50-57
- Miller, J. & Otero, L.D. 1994.** Immature stages of Venezuelan Dioprinae (Notodontidae) in *Josia* and *Thirmida*. *Journal of Lepidopterists' Society* 48(4): 338-372.
- Montllor, C; Bernays,E; Cornelius, M. 1991.** Responses of two hymenopteran predators to surface chemistry of their prey: Significance for an alkaloid sequestering caterpillars. *Journal of Chemical Ecology* 17(2): 391-399.
- Muhtasib, H; Evans, D. 1987.** Linamarin and Histamine in the defensive of adult *Zygaena filipendulae* . *Journal of Chemical Ecology* 13(1): 133-142.
- Muller, C; Agerbirk, N; Olsen, C; Boevé, J; Schaffner, U; Brakefield, P. 2001.** Sequestration of host plant glucosinolates in the defensive memolimph of the sawfly *Athalia rosae* . *Journal of Chemical Ecology* 27(12): 2505-2516.
- Nahrstedt, A. & R.H. Davis. 1983.** Ocurrence, Variation and Biosynthesis od the Cyanogenic Glucosides Linamarin and Lotoaustralin in Species of the Heliconiini (Insecta: Lepidoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology* 75B(1):65-73.
- Nahrstedt, A. 1985.** Cyanogenic compounds as protecting agents for organisms. *Plant Systematic Evolution* 150: 35-47.
- Nahrstedt, A. 1996.** Relationships between the defense systems of plants and insects. The cyanogenic system of the moth *Zygaena trifolii*. En: Phytochemical diversity and redundancy in ecological interactions. *Recent Advances in Phytochemistry* 30, 217-230
- Olafsdottir, E; Cornett , C; Jaroszewski, L. 1989.** Cyclopentanoid cyanohydrin glycosides with unusual sugar residues. *Acta Chemica Scandinavica* 43: 51-55.
- Orellana, A. 2000.** Palatabilidad, Mimetismo y Defensas Químicas en Polillas Dioprinae (Lepidoptera: Notodontidae). Tesis de Grado.Licenciatura. Fac. Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida. 66 pp.
- Osborn, F. & Jaffe , K. 1998.** Chemical Ecology of the Defense of Two Nymphalid Butterfly Larvae Against Ants. *Journal of Chemical Ecology* 24(7): 1173-1186.
- Pérez, M. 2002.** Secuestro de material xenobiótico por parte de *Josia radians* (Lepidoptera: Notodontidae: Dioprinae) de su planta hospedera *Passiflora capsularis* para su defensa. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. Mérida. 85 pp.
- Price, P; Bouton, C.E; Gross P; McPheron, B; Thompson, J.N; Weis, A. E. 1980.** Interactions Among Three Trophic Levels: Influence of Plants on Interactions between Insect Herbivores and Natural Enemies. *Annual Review of Ecological Systematics* 11:41-65.

- Rehr, S; Feeney, P; Janzen, D. 1973.** Chemical defense in Central American non-ant Acacia *Journal of Animal Ecology* 42(2): 405-416.
- Reichstein, T; Von Euw, J; Parsons, J.A. & Rothschild, M. 1968.** Heart Poinsons in the Monarch Butterfly. *Science* 161: 861-866.
- Rhoades, D; Cates, R. 1976.** Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry. En : Biochemical interactions between plants and insects. J.W. Wallace & Mansell editors. New York. pp. 168-213.
- Rhoades, D. 1979.** Evolution of plant chemical defenses against herbivores. En: Herbivores: Their interaction with Secondary plant metabolites. Rosenthal & Jansen, editors. Academic Press. NewYork. pp. 3-54.
- Rhodes, D.F. 2000.** Biosynthesis of Cianogenic Glucosides. URL: <http://www.plbio.kul.dk/plbio/cyanogen.htm>.
- Rosenthal, G. 2000.** The Chemical Defenses of Higher Plants. URL: <http://www.uky.edu/~garose/link100.htm>.
- Rothschild, M; Rowan, M; Fairbairn , J. 1977.** Storage of cannabinoides by *Arctia caja* and *Zonocerus elegans* fed on chemically distintic strains of *Cannabis sativa*. *Nature* 266: 650-651.
- Schaffner, U; Boevé, J; Gfeller, H; Schlunegger, U. 1994.** Sequestration of *Veratrum* alkaloids by specialist *Rhadinoceraea nodicornis* Konow (Hymenoptera Tenthredinidae) and its ecoethological implications. *Journal of Chemical Ecology* 20(12): 3233-3294.
- Schreiner, I; Nafus, D; Pimentel, D. 1984.** Effects of Cyanogenesis in Bracken fern *Pteridium aquilinum* on associated Insects. *Ecoogical. Entomology* 9: 69-79.
- Stermitz,F.R; Gardner, F. J; Odendaal, D.R; Ehrlich, P.R. 1986.** *Euphydryas anicia* Utilization of Iridoid Glucosides from *Castilleja*, and *Besseyia* (Scrophulariaceae) hostplants. *Journal of Chemical Ecology* 12:1459-1468.
- Scriber, J.M. 1978.** Cyanogenic Glycosides in *Lotus corniculatus*. Their Effect upon Growth, Energy Budget and Nitrogen Utilization of *Spodoptera frugiperda*. *Oecologia* 34: 143-155.
- Seigler,D.S; Spencer , K.C; Statler , W.S; Conn E. & Dunn, J.E. 1982.** Tetraphyllin B and Epitetraphyllin B Sulphates: Novel Cyanogenic Glucosides from *Passiflora caerulea* and *P. alato-caerulea*. *Phytochemistry* 21(9):2277-2285.

- Shaltuck, S; N. Barnett. 2002.** Australian ants on line. <http://www.ento.csiro.au/science/ants.htm>.
- Singh, G; Thornhill, R. 1980.** The metabolism of dieldrin by microsomal preparations of different tissues of cockroaches and locusts. *Comparative Biochemistry and Physiology* 67C: 79-82.
- Snyder, M; Champagne, D; Cohen, M; Howard, J. 1998.** Effects of plant diet on detoxification enzyme activities of two grasshoppers, *Melanoplus differentialis* and *Taenipoda eques*. *Journal of Chemical Ecology* 24 (12): 2151-2163.
- Spencer, K. & Seigler, D. 1985.** Passibiflorin, Epipassibiflorina and Passitrifasciatin: Cyclopentanoid cyanogenic Glycosides from *Passiflora*. *Phytochemistry* 24(5): 981-986.
- Spencer, K., Seigler, D.S; & Nahrstedt, A. 1986.** Linamarin, Lotaustralin and Neolimstatin from *Passiflora* species. *Phytochemistry*. 25(3):645-647.
- Spencer, K; Seigler, D. 1983.** Cyanoglycosides of *Passiflora edulis*. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 31: 796-801.
- Steyermark, J.A., O. Huber. 1978.** Flora del Avila. Sociedad de Ciencias Naturales, Editores, Caracas. Imprenta Gráficas Toledo, España. 971 pp.
- Thomsen, K; Brimer, L. 1997.** Cyanogenic constituents in woody plants in natural lowland rain forest in Costa Rica. *Botanical Journal of the Linnean Society* 124: 273-294.
- Turner, J.A. 1984.** Mimicry: The Palatability Spectrum and its Consequences. *En The Biology of Butterflies* Vane-Wright & Ackery Editors. Princeton University Press. New Jersey pp. 141-161.
- Vet, L; Dicke, M; 1992.** Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Review of Entomology* 37: 133-142.
- Von Nickisch-Roseneck, E; Wink, M. 1993.** Sequestration of pyrrolizidine alkaloids in several arctiid moths (Lepidoptera: Arctiidae). *Journal of Chemical Ecology* 19 (9): 1889-1903.
- Whitman D.W. 1988.** Allelochemical Interactions Among Plants, Herbivores and their Predators. *En Novel Aspects of Insect-Plant Interactions*. Barbosa & Letourneau Editors. John Wiley & Sons, Inc. New York. pp.11-64.
- Whittaker, R.H. & Feeney, P.P. 1971.** Allelochemicals: Chemical Interactions between Species *Science* 171(3973): 757-770.
- Wiesen, B; Krug, E; Fiedler, V; Wray, P; Proksch, P. 1994.** Sequestration of plant derived

flavonoids by lycaenid butterfly *Polyommatus icarus*. *Journal of Chemical Ecology* 20(10): 2523-2538.

Wiklund, C; Jarvi, T. 1982. Survival of distasteful insects after being attacked by naïve birds: A reappraisal of the theory of aposematic coloration evolving through individual selection. *Evolution* 36(5): 998-1002.

Witthohn, K. & Naumann, C. 1987. Cyanogenesis: A General Phenomenon in the Lepidoptera?. *Journal of Chemical Ecology* 13(8): 1789-1809.

Woodhead, D. & Bernays, E.A. 1977. Changes in Release Rates of Cyanide in relation to Palatability of *Sorghum* to Insects. *Nature* 270: 235-236.

9. APÉNDICE

Tabla 9.1. Dieta artificial utilizada para el experimento de alimentación de *J.radians* y *H. erato* con una fuente distinta a *P. capsularis* (inspirada en Morton, 1979).

Ingredientes	Cantidad
Harina de soya	3.5 g
Germen de trigo	3.0 g
Sacarosa	1.8 g
Liofilizado de <i>Passiflora capsularis</i> como fagoestimulante*	10 g
Ácido ascórbico	0.2 g
Benzoato de Sodio	0.08 g
Formalina (10%)	0.2 ml
Agua destilada	50 ml

*Previo a la liofilización se maceró el material foliar fresco en una pequeña porción de agua destilada con el propósito de hidrolizar los cianoglicósidos contenidos en la misma.

Tabla 9.2. Dieta artificial para la cría de las larvas de *Spodoptera frugiperda* en el laboratorio (Modificada de Maldonado, comunicación personal)

Ingredientes	Cantidad
Caraotas blancas	400 g
Caseinato de Calcio	30 g
Levadura de cerveza granulada	30 g
Agar	30 g
Acido sórbico	3 g
Acido ascórbico	7 g
Complejo multivitamínico	1 cápsula
Benzoato de sodio	5 g
Formalina (10%)	5 ml
Agua destilada	1250 ml

9.3. Respuesta depredatoria de otros insectos sobre larvas de *Josia radians*: el caso de *Zelus sp.* (Hemiptera: Reduviidae) .

En una de las numerosas visitas a al sitio de recolección del material biológico de prueba pudimos toparnos con una puesta de huevos de origen desconocido colocados en una hoja de *P. capsularis*. Fueron llevados al laboratorio y se les permitió el desarrollo obteniéndose 12 ninfas de un hemíptero del género *Zelus* las cuales fueron alimentadas con larvas de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) durante toda su metamorfosis. Del número inicial de ninfas lograron sobrevivir siete ejemplares de V instar, que fueron utilizados para un bioensayo donde se enfrentaron a larvas de II instar de *Josia radians*. La siguiente tabla muestra los resultados de estos encuentros, en los que se utilizó 1 ejemplar presa y 1 atacante por prueba durante 30 minutos de exposición.

Prueba	Contacto antenal	Ataque	Ingestión
1	+	+	-
2	+	+	-
3	+	+	-
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	-	-	-

Puede notarse que el contacto antenal y la respuesta de ataque ocurrió en casi todos los encuentros. Esta última se manifestaba por la inserción del estilete del depredador dentro del cuerpo de la larva , registrándose el resultado negativo de ingestión cuando el hemíptero retiraba el aparato bucal y liberaba a la presa en un período de tiempo menor a los 30

segundos . El reducido número con que se contaba del depredador no permitió realizar una mayor cantidad de pruebas, pero la tendencia observada es a una mayor aceptación por parte de este hemíptero de las larvas de *J. radians* en comparación con el rechazo absoluto obtenido con la hormiga *Odontomachus chelifer*. Podría pensarse en diversas explicaciones a este comportamiento. Especulando un tanto, se podría pensar en algún grado de especialización que manifiesta *Zelus sp.* que le permite sortear la barrera química que posee *J. radians*. El hecho de que los huevos de este insecto hayan sido colectados sobre *P. capsularis* podría ser sintomático de tal propiedad. Otra posible idea sería que la susceptibilidad de *J. radians* puede variar de acuerdo al instar que se considere como presa y que estaría estrechamente asociado a su capacidad para acumular compuestos defensivos. Otra condición, esta vez inherente a la capacidad individual de desarrollar este fenómeno podría estar también involucrado. Orellana (2000) en su estudio sobre la impalatabilidad de los dióptinos, encontró que larvas de la especie *Josia draconis* en Panamá eran frecuentemente depredadas por un hemíptero de la familia Pentatomidae con características aposemáticas e insinúa la posibilidad de que esta especie haría uso de los químicos de las larvas depredadas para su propia protección.

9.4. Determinación de la capacidad cianogénica en adultos de *J. radians*

Para satisfacer la inquietud acerca de si la propiedad cianogénica observada en las larvas de esta polilla se manifestaba también cuando adultos, se procedió a la determinación del HCN liberado cuando se maceraba individuos frescos de esta especie. La siguiente tabla muestra que los dos sexos presentaron tal propiedad, sin que haya una diferencia significativa en la concentración de cianoglicósidos ($p > 0.1$) entre éstos. El origen de estos compuestos podría atribuirse hipotéticamente como producto de su acumulación en la etapa larval, tomando como base los resultados de Pérez (2002) quien encontró una estrecha similitud entre la química de *P. capsularis* y las formas larvales y adultas de *J. radians*.

Sexo	Peso (mg) individuo	$\mu\text{gHCN/individuo}$	$\mu\text{g HCN/mg individuo}$
Machos	49.54 ± 4.57 a	29.2 ± 5.86 a	0.59 ± 0.13 a
Hembras	67.0 ± 10.19 b	56.22 ± 31.64 b	0.78 ± 0.39 a

$X \pm DE$ de 5 réplicas. Los valores seguidos por letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los grupos ($p > 0.05$) de acuerdo a la prueba de Mann-Whitney.