

**DETERMINACIÓN POR HS-SPME/GC-MS DEL PERFIL VOLÁTIL EN HOJAS  
DE *Crotalaria nitens*, INDUCIDO POR EL DAÑO CAUSADO POR ORUGAS DE  
*Utetheisa ornatix***

**NATHALIE ÑAÑEZ ZULETA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2018**

**DETERMINACIÓN POR HS-SPME/GC-MS DEL PERFIL VOLÁTIL EN HOJAS  
DE *Crotalaria nitens*, INDUCIDO POR EL DAÑO CAUSADO POR ORUGAS DE  
*Utetheisa ornatix***

**NATHALIE ÑAÑEZ ZULETA**

**Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de  
Bióloga**

**DIRECTORA**

**ELENA E. STASHENKO**

**PhD. en Química**

**CODIRECTOR**

**FAUSTO PRADA CHAPARRO**

**PhD. en Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**BUCARAMANGA**

**2018**

## DEDICATORIA

A mi padre Arnulfo, por llenar nuestras vidas de música, libros y arte, y por la  
maravilla que es ser su hija.

A mi madre Olga, por ser amor y bondad, porque lo bueno del mundo lo puedo  
encontrar en ella.

A Johan, por ser un ejemplo en la ciencia y en la vida; a Santiago, por su  
inegable valor al afrontar retos imponiendo siempre su fortaleza.

A mi familia, a los que están, y a los que estuvieron pero que seguirán presentes  
en cada acorde de guitarra.

A Jhonatan Carreño, por alentarme siempre y construir conmigo este proyecto.

A Leidy Pico, porque si tuviésemos los mismos padres no seríamos tan parecidas  
y mi cariño por ti no sería como el de una hermana.

A quienes me han dado un espacio en sus vidas y me compartieron sus risas.

Mis agradecimientos y mi amor son para ustedes.

*Nathalie*

*A partir de aquí, "El Porvenir está abierto".*

## **AGRADECIMIENTOS**

A COLCIENCIAS, Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, Contrato RC-0572-2012; la Universidad Industrial de Santander–VIE, proyecto 1786, y al Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas (CROM-MASS), por la financiación del proyecto.

A la profesora Elena E. Stashenko y al profesor Jairo René Martínez, por su apoyo incondicional y la orientación para cumplir los objetivos propuestos en el desarrollo de la investigación.

Al equipo de trabajo del CENIVAM/CROM-MASS-CIBIMOL, por sus recomendaciones, compañerismo y valía.

A Fausto Prada Chaparro, por su disposición y compromiso para la realización de este proyecto investigativo.

A Cristian Oliveros y Gustavo Rodríguez, por sus valiosos aportes para la determinación de los índices de retención lineales de las sustancias patrón.

Al profesor Jorge Hernández Torres, por su amistad y por el invaluable conocimiento adquirido durante mi estancia en su laboratorio.

## CONTENIDO

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| INTRODUCCIÓN .....   | 15          |
| 1. OBJETIVOS.....  | 19          |
| 1.1 OBJETIVO GENERAL .....   | 19          |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 19          |
| 2. MARCO TEÓRICO .....   | 20          |
| 2.1 GÉNERO <i>CROTALARIA</i> .....   | 20          |
| 2.1.1 <i>Crotalaria nitens</i> .....   | 20          |
| 2.1.2 Relación trófica entre el género <i>Crotalaria</i> y la oruga <i>Utetheisa ornatix</i> .....   | 21          |
| 2.2 <i>Utetheisa ornatix</i> .....   | 22          |
| 2.3 COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES .....   | 24          |
| 2.4 VOLÁTILES DE PLANTAS INDUCIDOS POR HERBÍVOROS.....   | 25          |
| 2.5 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y ANÁLISIS POR<br>CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE<br>MASAS .....  | 26          |
| 2.6 ANTECEDENTES SOBRE LOS HIPV .....  | 27          |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 30          |
| 3.1 EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES LIBERADOS POR<br>LAS HOJAS DE <i>C. nitens</i> MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICROEXTRACCIÓN<br>EN FASE SÓLIDA. ....   | 30          |
| 3.1.1 Material vegetal.....  | 30          |
| 3.1.2 Cuidados de <i>U. ornatix</i> .....  | 31          |
| 3.1.3 Extracción de volátiles de plantas inducidos por herbivoría (HIPV). ....   | 32          |
| 3.2 DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA<br>DEL PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN HOJAS DE <i>C. nitens</i> ,<br>ANTES, DURANTE Y DESPUÉS DEL ATAQUE DE <i>U. ornatix</i> , UTILIZANDO |             |

|  |    |
|--|----|
| CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS .....  | 33 |
| 3.2.1 Cálculo de las abundancias .....   | 35 |
| 3.2.2 Mediciones de áreas foliares .....   | 36 |
| 3.2.3 Análisis estadístico .....   | 36 |
| 4. RESULTADOS.....   | 38 |
| 4.1 RECOLECCIÓN Y PROPAGACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL .....   | 38 |
| 4.2 IDENTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LOS HIPV EXTRAIDOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA ..... | 39 |
| 4.2.1 Compuestos detectados .....  | 39 |
| 4.2.2 Dinámica de liberación.....  | 43 |
| 5. DISCUSIÓN .....   | 48 |
| 6. CONCLUSIONES .....  | 55 |
| 7. RECOMENDACIONES.....  | 56 |
| BIBLIOGRAFÍA.....  | 58 |
| ANEXOS.....  | 69 |

## LISTA DE TABLAS

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| Tabla 1. Identificación de los compuestos orgánicos volátiles de <i>C. nitens</i> , aislados por HS-SPME y analizados por GC-MS, en columnas apolar (DB-5) y polar (DB-WAX). IRL: Índices de Retención Lineales; SH: Hidrocarburos sesquiterpénicos; GLV: Volátiles de hojas verdes; OS: Sesquiterpenos oxigenados; MH: Hidrocarburos monoterpénicos; OOC: Otros compuestos oxigenados; MO: Monoterpenos oxigenados.....  | 41          |
| Tabla 2. Porcentajes de abundancias (% ARP) presentadas como el promedio aritmético $\pm$ el error estándar de la media (SEM). Los asteriscos indican diferencias significativas según el test de Kruskal Wallis, entre las abundancias para cada tipo de compuestos, en diferentes rangos de tiempo, (*, $P < 0.05$ ; **, $P < 0.01$ ). MT: Monoterpenos; OOC: Otros compuestos oxigenados; ST: Sesquiterpenos; C. Al: Compuestos del tipo aldoximas; C. Ar: Compuestos del tipo aromáticos; GLV: Volátiles de hojas verdes..... | 44          |
| Tabla 3. Resultados de la correlación de Pearson, respecto a las sumatorias de las abundancias ( $A_i/A_{ISTD}$ ) para cada grupo de volátiles, y el área foliar consumida por las orugas. ....   | 46          |

## LISTA DE FIGURAS

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| Figura 1. <i>Crotalaria nitens</i> . Fotografía tomada por Fausto Prada en el jardín del CENIVAM-UIS.....   | 21          |
| Figura 2. Ciclo de vida de <i>U. ornatrix</i> . Fotografías tomadas por la autora en CENIVAM-UIS. ....  | 23          |
| Figura 4. Cultivo de <i>C. nitens</i> . Fotografía tomada por la autora en un laboratorio del CENIVAM-UIS.....  | 31          |
| Figura 5. Montaje para la extracción de volátiles mediante el uso de HS-SPME. Fotografía tomada por la autora en un laboratorio del CENIVAM-UIS.....  | 33          |
| Figura 6. GC-MS, DB-WAX. Fotografía tomada por Fausto Prada en el CROM-MASS, UIS.....   | 35          |
| Figura 7. Procedimiento de desorción de los HIPV en el puerto de inyección del CG. ....   | 35          |
| Figura 8. Mapa con la ubicación geográfica del punto de recolección (Google Earth, 2018). ....  | 38          |
| Figura 9. Perfil de emisión de volátiles inducidos por herbivoría en hojas de <i>C. nitens</i> , antes del ataque (0 h) de <i>U. ornatrix</i> . HS-SPME in vivo (PDMS/DVB), GC-MS, DB-WAX. ISTD: undecanoato de metilo. ....    | 39          |
| Figura 10. Perfil de emisión de volátiles inducidos por herbivoría en hojas de <i>C. nitens</i> , durante el ataque (2 h) de <i>U. ornatrix</i> . HS-SPME in vivo (PDMS/DVB), GC-MS, DB-WAX. ISTD: undecanoato de metilo. ....  | 40          |
| Figura 11. Perfil de emisión de volátiles inducidos por herbivoría en hojas de <i>C. nitens</i> , después del ataque (6 h) de <i>U. ornatrix</i> . HS-SPME in vivo (PDMS/DVB), GC-MS, DB-WAX. ISTD: undecanoato de metilo. .... | 40          |
| Figura 12. Dinámica de liberación de los HIPV emitidos por hojas de <i>C. nitens</i> , tras el ataque por orugas de <i>U. ornatrix</i> . Se indujeron cuatro grupos principales   |             |

de compuestos: GLV (*green leaf volátiles*), terpenos, aldoximas y compuestos aromáticos. Gráfica diseñada en gnuplot (versión 5.2.2). Las barras de error corresponden al error estándar de la media (SEM).  $n = 7$ . .....45

## LISTA DE ANEXOS

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| Anexo A. Dinámicas de liberación de GLV, terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos y homoterpenos) y, compuestos aromáticos y aldoximas. Los asteriscos indican diferencias significativas según el test de Kruskal Wallis, en las abundancias de los compuestos desde la hora cero hasta la 11 (*, $P < 0.05$ ; **, $P < 0.01$ )..... | 69          |
| Anexo B. Gráficas de bigotes realizadas con las abundancias de los seis grupos de COV, para las horas: primera quinta y séptima, respectivamente. Monoterpenos (MT), sesquiterpenos (ST), compuestos aromáticos (C. Ar.), otros compuestos oxigenados (OOC), compuestos del tipo aldoximas (C. Al.) y GLV. ....                     | 71          |

## RESUMEN

**TÍTULO:** DETERMINACIÓN POR HS-SPME/GC-MS DEL PERFIL VOLÁTIL EN HOJAS DE *Crotalaria nitens*, INDUCIDO POR EL DAÑO CAUSADO POR ORUGAS DE *Utetheisa ornatix*\*.

**AUTOR:** NATHALIE ÑAÑEZ ZULETA\*\*

**PALABRAS CLAVES:** *Crotalaria nitens*, *Utetheisa ornatix*, VOC, HIPV, HS-SPME, CG-MS.

### DESCRIPCIÓN:

Los volátiles de plantas inducidos por herbívoros (HIPV, por sus siglas en inglés), han sido reportados como mecanismos de defensa en algunas especies. En este trabajo se estudió la emisión de volátiles en hojas de *Crotalaria nitens*, antes, durante y después de la herbivoría con orugas de *Utetheisa ornatix*. La obtención de los metabolitos secundarios se realizó mediante la técnica de micro-extracción en fase sólida (HS-SPME) y su determinación se estableció por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Los compuestos que predominaron durante el daño fueron los “volátiles de hojas verdes” (GLV), los cuales constituirían una primera señal de alarma en el organismo vegetal. Una vez las orugas se removieron, aumentó la emisión de compuestos como los terpenos, *trans*- $\beta$ -Ocimeno y *trans*-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno; las aldoximas como la 2-metil-propil aldoxima y la 2-metil-butil aldoxima; y aromáticos como el indol. Estos compuestos pueden actuar como defensas indirectas, atrayendo depredadores o parasitoides del insecto atacante, cebadores de genes implicados en la síntesis de defensas directas, e incluso en la comunicación entre plantas, mediante la inducción de defensas en tejidos no afectados dentro de la misma planta, o en plantas vecinas. La emisión de la mayoría de los HIPV descendió después de siete a nueve horas del ataque. Estos resultados mostraron que la exposición al herbívoro, incrementó de manera notoria la producción de compuestos que han sido reportados como volátiles de defensa, para los cuales se requeriría de la activación de complejas rutas biosintéticas.

---

\* Proyecto de grado

\*\* Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Directora: Elena Stashenko, Química, Ph.D. Codirector: Fausto Prada.

## ABSTRACT

**TITLE:** DETERMINATION BY HS-SPME/GC-MS OF THE VOLATILE PROFILE IN LEAVES OF *Crotalaria nitens*, INDUCED BY DAMAGE CAUSED BY CATERPILLAR OF *Utetheisa ornatrix* \*.

**AUTHOR:** NATHALIE ÑAÑEZ ZULETA\*\*

**KEY WORDS:** *Crotalaria nitens*, *Utetheisa ornatrix*, VOC, HIPV, HS-SPME, GC-MS.

### DESCRIPTION:

The Herbivore-Induced Plant Volatiles (HIPV), have been reported as defense mechanisms in some species. In this work, the emission of volatiles from the leaves of *Crotalaria nitens*, before, during and after the herbivory by *Utetheisa ornatrix* caterpillars was studied. Secondary metabolites were sampled using the headspace-solid phase microextraction technique (HS-SPME), and determined and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

The predominant compounds during the damage were green leaf volatiles (GLV), which constituted the first alarm signal in the plant. After a time, when the caterpillars were removed, the emission of compounds such as terpenes, trans- $\beta$ -ocimene and trans-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene increased; aldoximes such as 2-methyl-propyl- aldoxime and 2-methyl-butyl-aldoxime and aromatics such as indole, increased as well. These compounds could act as indirect defenses, as well as, attracting predators or parasitoids of the attacking insect, prime the expression of direct defense and even in the communication between plants, through the induction of defenses in non-attacked tissues within the plant, or in neighboring plants. The emission of most compounds decreased 7-9 hours after the attack. The results showed that exposure to the herbivore increased the production of compounds that have been as reported indirect defenses, for which the activation of complex biosynthetic pathways would be required.

---

\* Bachelor thesis

\*\* Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Directora: Elena Stashenko, Química, Ph.D. Codirector: Fausto Prada.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas y los insectos han interactuado por más de 350 millones de años. A lo largo de este tiempo han logrado desplegar mecanismos para evadir los sistemas de protección de cada uno, dando lugar a una “carrera armamentista” que ha influido en el desarrollo de sistemas sofisticados de defensa.<sup>1 2 3</sup> En consecuencia, poseen diversos mecanismos químicos, morfológicos y moleculares para hacer frente a los ataques.<sup>4</sup> La respuesta química está conformada por metabolitos secundarios que intervienen de manera directa afectando las etapas de desarrollo o actuando como factores antinutricionales en los organismos agresores, o indirecta, atrayendo “enemigos” naturales de los herbívoros.<sup>5 6</sup> También, liberan “compuestos orgánicos volátiles” (VOC, por sus siglas en inglés), un grupo grande de metabolitos secundarios de bajo peso molecular y alta presión de vapor a temperatura ambiente, lo que les permite cruzar libremente las membranas celulares y ser liberados al entorno.<sup>7</sup>

Los VOC, pueden actuar directa o indirectamente como respuesta a infecciones por patógenos o heridas por herbivoría; estos últimos son conocidos como “volátiles de

---

<sup>1</sup> HOWE, Gregg A.; JANDER, Georg. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 2008. vol. 59, p. 41–66.

<sup>2</sup> VERHAGE, Adriaan; VAN WEES, Saskia CM; PIETERSE, Corné MJ. Plant Immunity: It's the Hormones Talking, But What Do They Say? *Plant Physiology*, 2010, vol. 154, no. 2, p. 536–540.

<sup>3</sup> HARE, J. Daniel. Ecological Role of Volatiles Produced by Plants in Response to Damage by Herbivorous Insects. *Annual Review of Entomology*, 2011, vol. 56, no. 1, p. 161–180.

<sup>4</sup> KESSLER, André; BALDWIN, Ian. Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature. *Science*, 2001, vol. 291, no 5511, p. 2141–2144.

<sup>5</sup> WAR, Abdul Rashid, *et al.* Herbivore- and Elicitor- induced resistance in groundnut to *Asian armyworm*, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Plant Signaling & Behavior*, 2011a, vol. 6, no. 11, p. 1769–1777.

<sup>6</sup> WAR, Abdul Rashid, *et al.* Jasmonic Acid-Mediated-Induced Resistance in Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Plant Growth Regulation*, 2011b, vol. 30, no. 4, p. 512–523.

<sup>7</sup> PICHERSKY, Eran; NOEL, Joseph P.; DUDAREVA, Natalia. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, 2006, vol. 311, no. 5762, 808–11.

plantas inducidos por herbívoros” (HIPV). Los HIPV pueden alterar las interacciones de la planta con su entorno, diferentes partes de la misma planta (señalización dentro de la planta), plantas contiguas (señalización vegetal), y enemigos naturales de los herbívoros que responden a los "llamados de ayuda" de las plantas, tales como parasitoides, hiperparasitoides, nemátodos, ácaros, escarabajos y aves, entre otros.<sup>8 9 10 11</sup> Estas sustancias emitidas forman mezclas que pueden llegar a comprender cientos de compuestos.<sup>12</sup>

Las plantas del género *Crotalaria* (Fabaceae), al que pertenecen más de 700 especies predominantemente tropicales y subtropicales, son de gran interés porque han adaptado un sistema fuerte de defensas químicas directas, específicamente, de alcaloides pirrolizidínicos, que les proveen protección contra una variedad de herbívoros, siendo estos compuestos tóxicos en aves, mamíferos y en insectos herbívoros no especializados.<sup>13</sup> Las orugas de *U. ornatrix*, han logrado por coevolución, adaptarse a su consumo y usar los alcaloides en su propio beneficio durante las diferentes etapas de su ciclo de vida. Sin embargo, es poco lo que se ha investigado sobre las defensas volátiles de la planta y es de sumo interés

---

<sup>8</sup> MÄNTYLÄ, Elina; KLEMOLA, Tero; HAUKIOJA, Erkki. Attraction of willow warblers to sawfly-damaged mountain birches: Novel function of inducible plant defences? *Ecology Letters*, 2004, vol. 7, no. 10, p. 915–918

<sup>9</sup> RASMANN, Sergio, *et al.* Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, 2005, vol. 434, no. 7034, p. 732–737.

<sup>10</sup> BALDWIN, Ian T., *et al.* Volatile Signaling in Plant-Plant Interactions: “Talking Trees” in the Genomics Era. *Science*, 2006, Vol. 311, no. 5762, p. 812–815.

<sup>11</sup> HEIL, Martin. Herbivore-induced plant volatiles: Targets, perception and unanswered questions. *Journal of Physiology*, 2014, vol. 204, no. 2, p. 297–306.

<sup>12</sup> HANLEY, Mick E., *et al.* Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 2007, vol. 8, no. 4, p. 157–178.

<sup>13</sup> SUBRAMANIAM, Shweta y PANDEY, Arun K. Taxonomy and phylogeny of the genus *Crotalaria* (Fabaceae): An overview. *Acta Biologica Indica*, 2013, vol. 2, no. 1, p. 253–264.

comprender este sistema de interacciones tróficas con base en la ecología química.<sup>14 15</sup>

En este trabajo, se determinó el perfil de compuestos orgánicos volátiles emitidos por hojas de *Crotalaria nitens*, empleando las técnicas de micro-extracción en fase sólida (HS-SPME) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), con el fin de establecer y evaluar los cambios en la composición química volátil, antes, durante y después de la herbivoría por orugas de *U. ornatrix*, e interpretar qué tipo de moléculas volátiles utiliza la planta como mecanismo de defensa. De este modo, se profundiza en el conocimiento de la interrelación entre las plantas y los insectos, que es crucial en el desarrollo de estrategias de control de plagas.

La presente investigación se realizó en el Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, como parte de un proyecto de la Unión Temporal Bio-Red-CO-CENIVAM. La fase de prospección está avalada por el “Contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados para investigación científica con fines de prospección biológica, N° 101, entre el Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Unión Temporal Bio-Red-CO-CENIVAM. Este trabajo hace parte del proyecto “Bioprospección y desarrollo de ingredientes naturales para las industrias cosmética, farmacéutica y de productos de aseo con base en la biodiversidad colombiana”, financiado por COLCIENCIAS, ejecutado por la Unión Temporal Bio-Red-CO-CENIVAM, Universidad Industrial de Santander, a través del Centro de Investigación de Biomoléculas CIBIMOL; Contrato RC-0572-2012; cuenta también con la cofinanciación de la Universidad Industrial de Santander–VIE, Proyecto 1786.

---

<sup>14</sup> FLETCHER, Mary T., *et al.* *Crotalaria medicaginea* associated with horse deaths in northern Australia: New pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, vol. 59, no. 21, p. 11888–11892.

<sup>15</sup> SOURAKOV, Andrei. You are what you eat: native versus exotic *Crotalaria* species (Fabaceae) as host plants of the Ornate Bella Moth, *Utetheisa ornatrix* (Lepidoptera: Erebidae: Arctiinae). *Journal of Natural History*, 2015, vol. 2933, p. 1–19.

También, hace parte del trabajo de investigación para la formación de un estudiante de Doctorado en Química.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios en la composición química del perfil de compuestos volátiles de hojas de *C. nitens* expuestas al ataque por *U. ornatix*, mediante la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) y análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer los compuestos volátiles liberados por las hojas de *C. nitens* mediante la técnica de microextracción en fase sólida.
- Determinar los cambios en la composición química del perfil de compuestos volátiles en hojas de *C. nitens*, antes, durante y después del ataque de *U. ornatix*, utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 GÉNERO *CROTALARIA*

El género *Crotalaria* (Fabales: Fabaceae), incluye más de 700 especies predominantemente tropicales y subtropicales, principalmente del hemisferio sur, siendo la mayoría provenientes de África. La *Crotalaria* es una planta leguminosa anual que posee tallos fibrosos y erectos. Tiene una raíz pivotal larga y un sistema radical bien ramificado. Las raíces forman nódulos en una relación simbiótica con bacterias beneficiosas que fijan nitrógeno atmosférico. Las flores son grandes y amarillas, y atraen diferentes polinizadores.<sup>16</sup> La planta es resistente a la sequía y se adapta a lugares cálidos. Las crotalarias han sido empleadas por el hombre debido a sus propiedades útiles, como la capacidad para evitar la erosión, fijar nitrógeno, servir como fuente de fibra, forraje para los animales y como abono verde.<sup>17</sup>

**2.1.1 *Crotalaria nitens*.** De *Crotalaria nitens* se registra escasa información; la lista roja de las especies amenazadas de la IUCN la reporta como una especie originaria de la Amazonia, que se distribuye desde el sur de México hasta el sur de Bolivia, en un límite de elevación superior de 2600 m. *Crotalaria nitens* es catalogada en Estados Unidos como una especie nociva e invasora.<sup>18</sup>

---

<sup>16</sup> BRUNNER, Bryan, *et al.* *Crotalaria* [en línea]. Lajas (Puerto Rico): *Proyecto de Agricultura Orgánica*, 2010. [Consultado 10 de enero de 2018]. Disponible en Internet: <http://proorganico.info/crotalaria.pdf>.

<sup>17</sup> LEVERETT, Lindsay D. y WOODS, Michael. The Genus *Crotalaria* (Fabaceae) in Alabama. *Castanea*, 2012, vol. 77 N° (4), p. 364–374.

<sup>18</sup> GROOM, A. *Crotalaria nitens* [en línea]. *La Lista Roja de especies amenazadas de la UICN 2012*: e.T19892785A20049200. [Consultado 20 de diciembre de 2018]. Disponible en Internet: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2012.RLTS.T19892785A20049200.en>

En relación a su morfología, *C. nitens* (**Figura 1**) es una hierba que crece de 0.5 a 2 m de altura. Presenta hojas unifoliadas con textura aterciopelada, fuertemente discoloras, exhibiendo más claro el envés. Con inflorescencia terminal, multiflora, de cáliz verde y corola amarilla. Las vainas maduras son negras y poseen semillas negras.<sup>19</sup>

**Figura 1. Crotalaria nitens.**



Fuente: Fotografía tomada por Fausto Prada en el jardín del CENIVAM-UIS.

### **2.1.2 Relación trófica entre el género *Crotalaria* y la oruga *Utetheisa ornatrix*.**

Un rasgo importante es que muchas especies de *Crotalaria* cuentan con fuertes defensas químicas no volátiles como lo son los alcaloides pirrolizidínicos (PA), los

---

<sup>19</sup> CORREA, Jaime Enrique. Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. Colombia: Secretaria Ejecutiva del Convenio Andrés Bello. Ed. 3. 2010. p. 188-201. ISBN: 9589206018.

cuales pueden ser tóxicos incluso para los mamíferos y las aves. Por esta razón, rara vez son consumidas por insectos, a excepción de la oruga de *Utetheisa ornatrix* (Lepidoptera: Erebidae), la cual ha logrado romper la barrera de defensa química y capturar los alcaloides para luego utilizarlos como defensa y precursores de feromonas. Otro aspecto a considerar, es que no solo se encuentra gran variación morfológica entre las especies de *Crotalaria*, sino también en su composición química, lo que le podría conferir efectos diferentes sobre los insectos. También, se ha observado variación en el peso y el número de individuos de *U. ornatrix* dependiendo de la especie de *Crotalaria* que elijan como alimento.<sup>20 21 22</sup>

## **2.2 *Utetheisa ornatrix***

La polilla de *U. ornatrix* (Lepidoptera: Erebidae), se considera una de las más hermosas por su colorido, tienen alas anaranjadas, y bandas blancas con puntos negros. A diferencia de la mayoría de polillas posee hábitos diurnos. Al alcanzar la madurez sexual deposita sus huevos en racimos debajo de las hojas de las crotalarias, para que una vez eclosionen, las orugas jóvenes se alimenten de ellas. Al breve tiempo las orugas ascienden hacia las vainas inmaduras para alimentarse de las semillas por los altos contenidos de alcaloides pirrolizidínicos que estas presentan.<sup>23</sup> Las orugas acumulan estos metabolitos y se tornan venenosas. En estado adulto los utilizan como precursores de feromonas sexuales.<sup>24</sup>

---

<sup>20</sup> FLETCHER. Op. Cit. P. 11

<sup>21</sup> MAIA, Lisanka A., et al. Natural and experimental poisoning of goats with the pyrrolizidine alkaloid-producing plant *Crotalaria retusa* L. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2013, vol. 25, no. 5, p. 592–595.

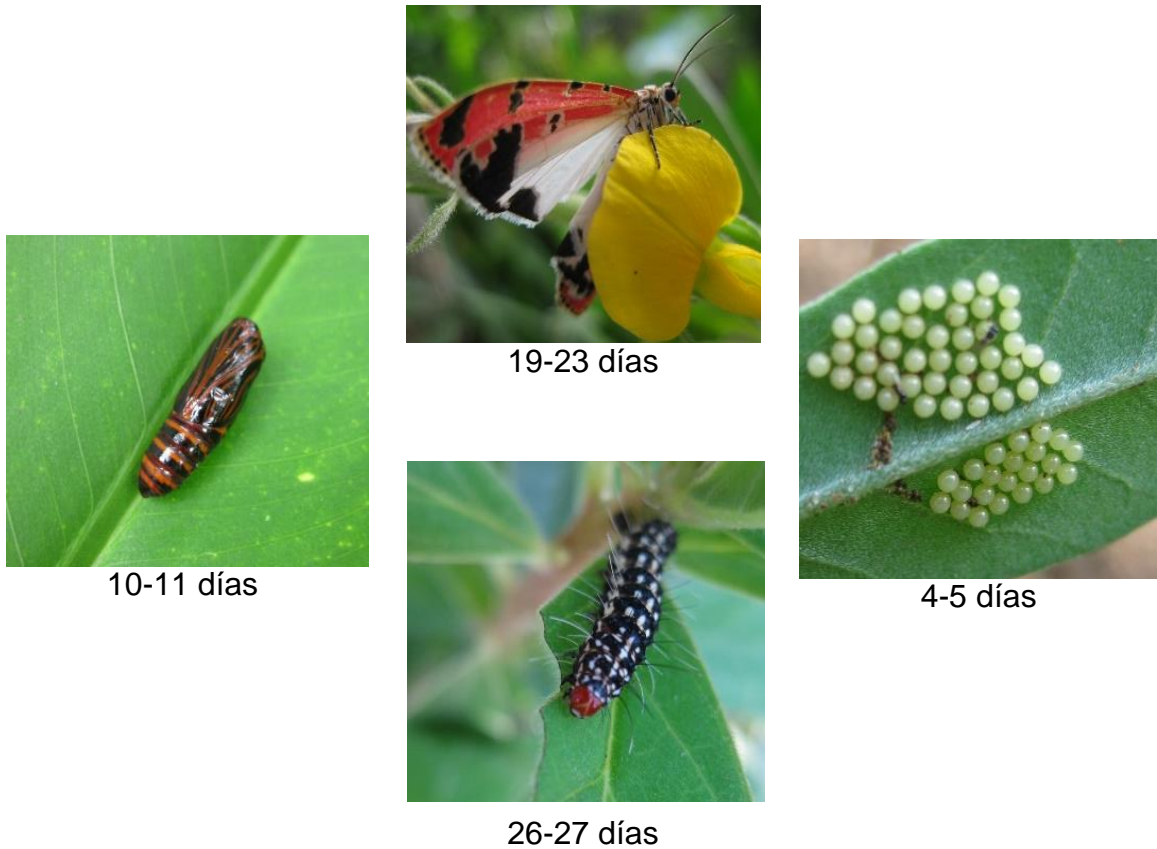
<sup>22</sup> SURAKOV. Op. Cit. P. 11.

<sup>23</sup> FERRO, Viviane Gianluppi; GUIMARÃES, Paulo Roberto; TRIGO, José Roberto. Why do larvae of *Utetheisa ornatrix* penetrate and feed in pods of *Crotalaria* species? Larval performance vs. chemical and physical constraints. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2006, vol. 121, no. 1, p. 23–29.

<sup>24</sup> HALL, Donald W. Ornate Bella Moth, Rattlebox Moths *Utetheisa ornatrix* (Linnaeus) (Insecta: Lepidoptera: Erebidae: Arctiinae) [en línea]. Florida (EE.UU): Department of Entomology and Nematology, UF/IFAS Extension, 2005. (Recuperado en 6 de diciembre 2017). Disponible en: [http://entnemdept.ufl.edu/creatures/beneficial/leps/bella\\_moth.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/beneficial/leps/bella_moth.htm).

El ciclo de vida de *U. ornatix* (**Figura 2**), dura 42 días aproximadamente: 19 a 23 días en la etapa de polilla, de cuatro a cinco días en la etapa de huevos, cerca de 26 a 27 días como orugas y finalmente, la etapa de crisálidas se completa de diez a 11 días.<sup>25</sup>

**Figura 2. Ciclo de vida de *U. ornatix*.**



---

<sup>25</sup> SIGNORETTI, André Gustavo Corrêa, et al. Biology and thermal requirements of *Utetheisa ornatix* (L.) (Lepidoptera: Arctiidae) reared on artificial diet. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2008, vol. 51, no 4, p. 447-453.

## 2.3 COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES

Los “compuestos orgánicos volátiles” (VOC, por sus siglas en inglés), se dividen en diferentes grupos, dependiendo de su origen biosintético; incluyen terpenoides, fenilpropanoides/benzoides, derivados de ácidos grasos y derivados de aminoácidos, además, algunos compuestos específicos que no están representados en estas clases principales.<sup>26</sup>

El grupo más diverso de VOC está constituido por los terpenoides, y se clasifican según el número de carbonos en hemiterpenos (C<sub>5</sub>), monoterpenos (C<sub>10</sub>) y sesquiterpenos (C<sub>15</sub>). Tales compuestos volátiles derivan de dos precursores de cinco carbonos, el pirofosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero, el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), los cuales son productos intermedios en dos rutas biosintéticas: la del ácido mevalónico (MVA), y la ruta del metileritrol fosfato (vía MEP/DOXP).<sup>27 28</sup>

La segunda clase más grande de compuestos orgánicos volátiles en las plantas comprende los fenilpropanoides y benzoides, que se originan a partir del aminoácido L-fenilalanina. Otro grupo importante de VOC son los que derivan de ácidos grasos insaturados de 18 carbonos como el ácido linolénico y linoleico, mediante la acción de las lipooxigenasas (LOX). Algunos compuestos derivados de la actividad de LOX son los volátiles de hojas verdes, que incluyen aldehídos, ésteres, acetatos y alcoholes como el *trans*-2-hexenal, *cis*-3-hexenol y el jasmonato de metilo (MeJA, por sus siglas en inglés). Finalmente, se encuentran volátiles que abundan en fragancias florales y frutales, que derivan de aminoácidos tales como la alanina, la

---

<sup>26</sup> DUDAREVA, Natalia, *et al.* Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 2013, vol. 198, no. 1, p. 16–32.

<sup>27</sup> *Ibíd.* P. 13.

<sup>28</sup> MCGARVEY, Douglas J.; CROTEAU, Rodney. Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*, 1995, vol. 7, no. 7, p. 1015–1026.

valina, la leucina, la isoleucina y la metionina, o intermedios de su biosíntesis, y contienen nitrógeno y azufre.<sup>29 30</sup>

## 2.4 VOLÁTILES DE PLANTAS INDUCIDOS POR HERBÍVOROS

A los compuestos orgánicos volátiles emitidos como respuesta a la herbivoría se les denomina volátiles vegetales inducidos por herbívoros (HIPV). Los HIPV funcionan como infoquímicos, debido a que están constituidos por diversas sustancias que logran transmitir información detallada de la planta, incluyendo el estado actual, el grado de daño, el estado ecológico y la identidad del herbívoro.<sup>31 32 33</sup> Resulta interesante que las plantas modifiquen la emisión constitutiva de sus volátiles en respuesta al daño ocasionado por herbívoros, dando lugar a una mayor emisión y cambios en la proporción en la mezcla de compuestos volátiles en comparación con plantas no dañadas o dañadas mecánicamente.<sup>34</sup>

La liberación de los volátiles luego del daño, no es constante. Algunos compuestos como los “volátiles de hojas verdes” (GLV) son los primeros en aparecer, mientras que otros como los terpenos y el indol, van apareciendo con el tiempo.<sup>35</sup> Esto apoyaría la hipótesis de que existe un mecanismo de defensa inducida que implicaría la activación de una serie de reacciones bioquímicas que incluirían la

---

<sup>29</sup> PARÉ, Paul W.; TUMLINSON, James H. Update on plant-insect interactions plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology*, 1999, vol. 121, p. 325–331.

<sup>30</sup> KNUDSEN, Jette T., *et al.* Diversity and distribution of floral scent. *The botanical review*, 2006, vol. 72, no. 1, p. 1-120.

<sup>31</sup> TAKABAYASHI, Junji; DICKE, Marcel; POSTHUMUS, Maarten A. Variation in composition of predator-attracting allelochemicals emitted by herbivore-infested plants: Relative influence of plant and herbivore. *Chemoecology*, 1991, vol. 2 no. 1, p. 1–6.

<sup>32</sup> DE MORAES, Consuelo M., *et al.* Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature*, 1998, vol. 393, no. 6, p. 570–573.

<sup>33</sup> YONEYA. *Op. Cit.* P. 13.

<sup>34</sup> TURLINGS, Ted CJ, *et al.* The induction of volatile emissions in maize by three herbivore species with different feeding habits: Possible consequences for their natural enemies. *Biological Control*, 1998, vol. 11, no. 11, p. 122–129.

<sup>35</sup> ERB, Matthias, *et al.* Indole is an essential herbivore-induced volatile priming signal in maize. *Nature Communications*, 2015, vol. 6, p 6273.

expresión de genes, el ensamblaje de proteínas y la acción de enzimas para dar como resultado, la síntesis de estos compuestos.<sup>36</sup> El hecho de que exista una defensa inducida le proporciona más beneficios a la planta que una defensa constitutiva, ya que no requeriría de un mayor gasto energético, en el caso de que la producción de estos metabolitos secundarios sea costosa. Así mismo, la producción de volátiles de defensa en la planta por mucho tiempo resultaría tóxica para la misma.<sup>37</sup>

## **2.5 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

La microextracción en fase sólida (SPME) es un método de extracción, que se puede utilizar tanto en laboratorio como en campo. La técnica representa una valiosa alternativa para hacer el muestreo de volátiles por ser rápida y eficiente. Se basa en el uso de una fibra de sílice fundida, revestida con una capa de un sorbente que puede ser polar, apolar o bipolar, y se ubica dentro de un dispositivo de tipo jeringa; este montaje no sólo le sirve de sostén a la fibra, también le permite al usuario guardarla una vez ha terminado el tiempo de exposición.<sup>38</sup> El muestreo de los analitos se realiza por inmersión directa de la fibra en la muestra líquida o en su fase gaseosa, mientras que la desorción ocurre en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrometro de masas.<sup>39</sup> Dicha técnica está indicada para la separación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles. Cuando la muestra se inyecta en el cromatógrafo, se volatiliza por calor y se transporta con un gas

---

<sup>36</sup> PARE. Op. Cit. P. 14.

<sup>37</sup> KARBAN, Richard y KUC, Joseph. Induced resistance against pathogens and herbivores: an overview. *Induced plant defenses against pathogens and herbivores*, 1999, p. 1-15.

<sup>38</sup> VUCKOVIC, Dajana, *et al.* In vitro evaluation of new biocompatible coatings for solid-phase microextraction: implications for drug analysis and in vivo sampling applications. *Analytica chimica acta*, 2009, vol. 638, no. 2, p. 175-185.

<sup>39</sup> LISEC, Jan, *et al.* Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature protocols*, 2006, vol. 1, no. 1, p. 387.

inerte (fase móvil) a través de una columna capilar de sílice fundida revestida internamente con una película delgada de polímero (fase estacionaria).<sup>40</sup> El tiempo que tarda un compuesto específico en pasar a través de la columna a un detector se denomina "tiempo de retención", que puede utilizarse para la identificación, cuando se compara con una sustancia de referencia.

Una vez finalizada la separación, las moléculas atraviesan un sistema de detección que utiliza iones en campos eléctricos y magnéticos, para clasificarlas según su relación masa-carga, obteniendo finalmente un espectro de masas. La identificación presuntiva se realiza por comparación con los espectros de masas almacenados en bases de datos (NIST, Wiley y Adams).<sup>41</sup>

## 2.6 ANTECEDENTES SOBRE LOS HIPV

Los estudios sobre los HIPV iniciaron en la década de los 80's, cuando David Rhoades<sup>42</sup> notó un aumento en la resistencia de sauces frente a un tipo de plaga a la que no habían estado expuestos de forma directa, y a su vez, cultivos cercanos de poblaciones conespecíficas, se encontraban infestados. Lo que lo llevó a suponer que señales aéreas alertaban a los arboles de sauce de un ataque inminente, y éstos reaccionaban a las advertencias. En los años siguientes, investigaciones como las que realizaron Baldwin y Schultz, en el álamo negro,<sup>43</sup> confirmaron la teoría propuesta por Rhoades. Por otra parte, Dicke y Sabelis,<sup>44</sup>

---

<sup>40</sup> STASHENKO, Elena; MARTÍNEZ, Jairo René. Gas Chromatography-Mass Spectrometry. In: Guo DX, ed. *Advances in Gas Chromatography*, 2014, p. 1-38.

<sup>41</sup> KATARIA, Sahil. Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Applications. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 2011, vol. 2, no. 6, p. 1544–1560.

<sup>42</sup> RHOADES, David F. Responses of alder and willow to attack by tent caterpillars and webworms: evidence for pheromonal sensitivity of willows. Washington: American Chemical Society, 1983. Ed. *Plant Resistance to insects*, p. 55-68. ISBN: 9780841207561.

<sup>43</sup> BALDWIN, Ian T.; SCHULTZ, Jack C. Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants. *Science*, 1983, vol. 221, no 4607, p. 277-279.

<sup>44</sup> DICKE, Marcel; SABELIS, Maurice W. How plants obtain predatory mites as bodyguards. *Netherlands journal of zoology*, 1987, vol. 38, no 2, p. 148-165.

plantearon la hipótesis de que los HIPV podían ser detectados también por insectos carnívoros que se alimentan de los herbívoros, como los ácaros ciegos, para ubicar a sus presas en plantas de frijol de Lima. Otro estudio paralelo, encontró que insectos parasitoides utilizaban los HIPV para localizar a las orugas huéspedes.<sup>45</sup> Dichos análisis, sentaron las bases de conceptos como: “comunicación entre plantas” y “defensa indirecta”, mediante la atracción de “enemigos naturales de los herbívoros”, que dieron paso a nuevas líneas de investigación.

En cuanto a la actividad científica sobre volátiles en Colombia, generalmente, las investigaciones se relacionan con la caracterización química de aceites esenciales o compuestos volátiles emitidos por flores o frutos, estudios realizados principalmente por el grupo de investigación dirigido por la profesora Elena E. Stashenko, de la Universidad Industrial de Santander.<sup>46</sup>

La investigación que más se aproxima al tema en cuestión, es una investigación realizada por Salazar y colaboradores,<sup>47</sup> de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad Militar Nueva Granada (Bogotá, Colombia), en asociación con la Universidad de California, Berkeley y la Universidad de Missouri, St. Louis. Los investigadores evaluaron arbustos de *Piper* (Piperaceae) atacados por herbívoros, en un bosque húmedo de Costa Rica. Concluyeron que la diversidad de perfiles volátiles brindada por las diferentes poblaciones de plantas en el sector, disminuyó el daño causado por los fitófagos.

El planeta sufre fuertes desequilibrios ecológicos y ambientales, siendo una de las causas, el uso desmesurado de insecticidas tóxicos, cuyos efectos secundarios

---

<sup>45</sup> TURLINGS, Ted CJ; TURLINSON, James H.; LEWIS, W. Joe. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science*, 1990, vol. 250, no 4985, p. 1251-1253.

<sup>46</sup> Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Período de observación: 1990-2017. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“*plant volatiles*”). Fecha de búsqueda: 30 de noviembre de 2017.

<sup>47</sup> SALAZAR, Diego; JARAMILLO, Alejandra; MARQUIS, Robert J. The impact of plant chemical diversity on plant–herbivore interactions at the community level. *Oecologia*, 2016, vol. 181, no. 4, p. 1199-1208.

comprenden la contaminación de los suelos y las fuentes hídricas. Por ello, actualmente, químicos, ecólogos, entomólogos, biólogos moleculares y biólogos en general, estudian los mecanismos y las repercusiones que tiene la emisión de HIPV durante las interacciones tritróficas entre plantas, insectos herbívoros y sus enemigos naturales. De esta forma, crece un área de estudio conocida como “ecología química”, que pretende generar alternativas al uso de plaguicidas sintéticos, a través de modificaciones en los perfiles volátiles emitidos por las plantas, que pueden conducir a cambios positivos para las mismas.<sup>48 49</sup> Por lo tanto, reportar los perfiles de volátiles en diferentes plantas, constituye la fase inicial de trabajos extensos que reúnen diferentes resultados, con el fin de generar alternativas con bajo impacto ambiental para la protección de los cultivos.

Las plantas de *Crotalaria* poseen defensas químicas directas, sin embargo, sus defensas volátiles aún no han sido estudiadas, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar mediante HS-SPME y GC-MS, el perfil de los compuestos volátiles liberados por plantas de *C. nitens*, tras recibir daños causados por *U. ornatrix* y, de esta manera, contribuir a la comprensión de la interacción “planta-insecto”.

---

<sup>48</sup> HANLEY. Op. Cit. p. 11.

<sup>49</sup> YONEYA, Kinuyo; KUGIMIYA, Soichi; TAKABAYASHI, Junji. Can herbivore-induced plant volatiles inform predatory insect about the most suitable stage of its prey? *Physiological Entomology*, 2009, vol. 34, no. 4, p. 379–386.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES LIBERADOS POR LAS HOJAS DE *C. nitens* MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

**3.1.1 Material vegetal.** El cultivo del material vegetal se realizó dentro de las instalaciones del Complejo Agroindustrial Piloto, CENIVAM. Se inició con la recolección de plantas del género *Crotalaria*, con sus respectivas hojas, flores y semillas. Se elaboraron los *exsicatae* y se enviaron al Herbario Nacional de Colombia de la Universidad Nacional, donde se llevó a cabo la identificación botánica de *C. nitens*. Las semillas se plantaron en materos de aproximadamente 1 L y se ubicaron en un espacio dentro del laboratorio para prevenir el contacto con herbívoros o volátiles de otras plantas. El cultivo contó con 12 h de fotoperiodo, proporcionado por diez lámparas fluorescentes compactas de 32 W y 6400 K (**Figura 3**), y permanecieron a  $25\pm 2$  °C con fertilización semanal utilizando fertilizante hidrosoluble N-P-K-Mg (11-27-12-2), 1g/L (50 mL por planta).

**Figura 3. Cultivo de *C. nitens*.**



**3.1.2 Cuidados de *U. ornatix*.** Las orugas de *U. ornatix* se tomaron del lugar donde se recolectaron las plantas. Previamente se estableció un cultivo de *C. nitens* en el jardín del CENIVAM - UIS, con el fin de permitir la proliferación de las orugas de manera silvestre. En el momento en el que se dispuso de una población estable, se seleccionaron individuos y se ubicaron en recipientes de plástico aislados del exterior por una malla de tela tul. Una vez las orugas alcanzaron el estado de crisálida, se reubicaron en cajas de cartón con ventanas selladas con tela tul. A las orugas se les alimentó diariamente con una ración de hojas de *C. nitens*, y a las polillas, con una solución de miel en agua al 5%.<sup>50</sup> Cuando las polillas adquirieron la madurez sexual, se recolectaron los huevos para iniciar de nuevo el ciclo con los descendientes.

---

<sup>50</sup> BAUTISTA, Ma Anita M., *et al.* RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect biochemistry and molecular biology*, 2009, vol. 39, no. 1, p. 38-46.

**3.1.3 Extracción de volátiles de plantas inducidos por herbivoría (HIPV).** Las fracciones volátiles producto de la interacción entre la planta y el insecto, se obtuvieron por micro-extracción en fase sólida en el espacio de cabeza (HS-SPME). Con base en la metodología reportada por Stashenko y colaboradores,<sup>51</sup> se estableció el conjunto de condiciones adecuadas para coleccionar y observar el comportamiento de los volátiles emitidos por las hojas de *C. nitens* en el tiempo.

La extracción de los HIPV se realizó en un recipiente de acrílico de 10 cm<sup>3</sup>, con un orificio diseñado para insertar el soporte de la fibra de SPME y una apertura para facilitar la ubicación del material analizado. Para sostener el recipiente, se anexó un soporte universal. Dentro del cubo de acrílico se aisló una parte de la planta que encerró la zona terminal de una rama, que incluía tallo y hojas (**Figura 4**). El proceso de extracción de los volátiles se realizó mediante la exposición de la fibra de microextracción en fase sólida (revestida con PDMS/DVB, 65 µm), donde los HIPV fueron extraídos y concentrados durante 45 min dentro del recipiente de acrílico. Posteriormente, los compuestos se desorbieron durante 10 min, en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas, completándose así, fracciones de tiempo de una hora de muestreo. Se usó undecanoato de metilo como estándar interno. El undecanoato de metilo (30 mg) se colocó en un frasco de 2 mL. La fibra de SPME se expuso durante 5 segundos a 21 °C en el espacio de cabeza del frasco, e inmediatamente después en el recipiente de acrílico para realizar la extracción de los HIPV liberados por las hojas.

En total se analizaron siete plantas de *C. nitens* de dos meses de edad, y sus perfiles se evaluaron individualmente, bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo. Al inicio de cada día se realizaron los blancos de la fibra, del recipiente vacío y de la planta antes del ataque. Las plantas se sometieron al ataque de cinco

---

<sup>51</sup> STASHENKO, Elena E., *et al.* GC–MS study of compounds isolated from *Coffea arabica* flowers by different extraction techniques. *Journal of separation science*, 2013, vol. 36, no. 17, p. 2901-2914.

orugas en instar tres, durante dos horas. Luego, se removieron las orugas y se continuó el muestreo de los volátiles liberados después del ataque.

**Figura 4. Montaje para la extracción de volátiles mediante el uso de HS-SPME.**



### **3.2 DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN HOJAS DE *C. nitens*, ANTES, DURANTE Y DESPUÉS DEL ATAQUE DE *U. ornatrix*, UTILIZANDO CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

La identificación de los compuestos se basó en los criterios cromatográficos (tiempos de retención e índices de retención lineales (LRI)) y espectroscópicos (interpretación del espectro de masas, comparación con bases de datos y

sustancias-patrón).<sup>52</sup> Se usó una mezcla de *n*-alcanos C<sub>6</sub>-C<sub>25</sub> para la determinación de los LRI, que siguió la ecuación propuesta por van Den Dool y Kratz.<sup>53</sup>

Los datos espectroscópicos y cromatográficos, se obtuvieron con un cromatógrafo de gases GC 7890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.) (**Figura 5**). Equipado con un detector selectivo de masa 5975C (ionización por impacto de electrones, 70 eV; Agilent Technologies), inyector *split/splitless* operado en modo *splitless*, y un sistema de datos MS-ChemStation G1701-DA, que incluye las bibliotecas espectrales WILEY, NIST y Adams. Se usaron columnas capilares de sílice fundida DB-5MS [(J & W Scientific) de 60 m × 0,25 mm d.i., recubiertos con 5% de fenil-PDMS (0,25 μm de espesor de f.e.)] y DB-WAX [(J & W Scientific) de 60 m × 0,25 mm d.i., recubiertos con PEG (0,25 μm de espesor de f.e.)]. La temperatura del horno en el GC se programó desde 50 °C (5 min) hasta 150 °C (2 min) a 5 °C/min, luego a 230 °C (10 min) a 5 °C/min. Cuando se usó la columna DB-5MS, se añadió un calentamiento final a 275 °C (15 min) a 10 °C/min. Las temperaturas del puerto de inyección, la cámara de ionización y la línea de transferencia se ajustaron a 250, 230 y 285 °C, respectivamente. Para la columna polar DB-WAX, la temperatura de la línea de transferencia se ajustó a 230 °C. Se usó helio (99,995%, Linde, Bucaramanga) como gas de arrastre, con una presión de cabeza de columna de 155 kPa y una velocidad lineal de 27 cm/s (1 ml/min, a flujo constante). Para el análisis SPME, la fibra se desadsorbió en el puerto de inyección durante 10 minutos (**Figura 6**). Los espectros de masas y los cromatogramas iónicos reconstruidos (totales), se obtuvieron por barrido automático en el intervalo de masa *m/z* 30-400 a 4 barridos/s. Las sustancias de referencia (mezcla de *n*-alcanos C<sub>6</sub>-C<sub>25</sub> y sustancias-patrón), se corrieron en ambos cromatógrafos bajo los mismos parámetros operacionales utilizados para los HIPV.

---

<sup>52</sup> STASHENKO, Elena E.; MARTÍNEZ, Jairo René. Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*, 2010, vol. 2, no. 1, p. 29-47.

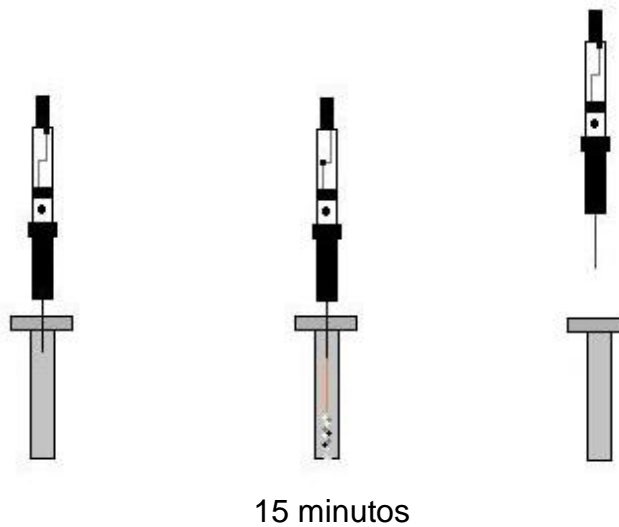
<sup>53</sup> VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. Dec. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1963, vol. 11, p. 463-471.

**Figura 5. GC-MS, DB-WAX.**



Fuente Fotografía tomada por Fausto Prada en el CROM-MASS, UIS.

**Figura 6. Procedimiento de desorción de los HIPV en el puerto de inyección del CG.**



**3.2.1 Cálculo de las abundancias.** Las áreas cromatográficas para los HIPV detectados, se usaron para hallar las abundancias relativas al área del pico (% ARP), como se muestra en la ecuación.

$$(\% \text{ ARP}) = \left( \frac{A_i}{A_{\text{total}}} \right) (100)$$

$A_i$ = Área cromatográfica del compuesto de interés.

$A_{\text{total}}$ = Sumatoria de las áreas cromatográficas de todos los HIPV detectados.

También, se halló la abundancia para cada compuesto, relativa al área del estándar interno (undecanoato de metilo), para ello se empleó la siguiente ecuación.

$$\text{Abundancia relativa al ISTD} = \frac{A_i}{A_{\text{ISTD}}}$$

$A_i$ = Área cromatográfica del compuesto de interés.

$A_{\text{ISTD}}$ = Área cromatográfica del undecanoato de metilo.

**3.2.2 Mediciones de áreas foliares.** La cantidad de área foliar devorada por las orugas durante las dos horas de herbivoría se calculó con el programa Image-Pro PLUS (versión 6.0.0.260).

**3.2.3 Análisis estadístico.** El experimento de inducción de HIPV se llevó a cabo utilizando un diseño completamente al azar ( $n = 7$ ), sin réplicas. Se tuvieron en cuenta tres momentos (antes, durante y después de la herbivoría). La normalidad de las distribuciones de datos de los grupos de volátiles se probó usando la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.<sup>54</sup> Dado que no se presentaron distribuciones normales, se realizó un análisis de varianza entre rangos (Kruskal-Wallis), para determinar los cambios principales de las abundancias de los HIPV en el tiempo. También, se calculó el coeficiente de Pearson para establecer la correlación entre las abundancias ( $A_i/A_{\text{ISTD}}$ ) de los volátiles y la superficie de área foliar consumida

---

<sup>54</sup> SHAPIRO, Samuel Sanford; WILK, Martin B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 1965, vol. 52, no. 3/4, p. 591-611.

por las orugas. Los análisis se realizaron con el programa Wolfram Research Mathematica (versión 10.4.1).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 RECOLECCIÓN Y PROPAGACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La recolección del material vegetal se realizó en zona rural del municipio de Floridablanca, Santander, con coordenadas 7°05'34.7"N 73°04'35.8"W (**Figura 7**). El número de colecta asignado luego de la identificación de *Crotalaria nitens* Kunth, fue COL 586226.

**Figura 7. Mapa con la ubicación geográfica del punto de recolección (Google Earth, 2018).**



El cultivo de las plantas se logró realizar bajo los parámetros estipulados en la metodología. Se obtuvieron plantas sanas y fue necesaria la siembra continua de semillas para renovar la población.

## 4.2 IDENTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LOS HIPV EXTRAIDOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

**4.2.1 Compuestos detectados.** El análisis por GC-MS de las diversas fracciones volátiles aisladas por HS-SPME, permitió la identificación presuntiva de 21 compuestos emitidos por *C. nitens* (Tabla 1). Las Figuras 8, 9 y 10, corresponden a los cromatogramas típicos de los HIPV detectados antes (hora cero), durante (segunda hora) y después (cuarta hora), del daño causado por orugas de *U. ornatix*. El número dado a cada pico, corresponde al número asignado a cada compuesto presentado en la Tabla 1.

**Figura 8. Perfil de emisión de volátiles inducidos por herbivoría en hojas de *C. nitens*, antes del ataque (0 h) de *U. ornatix*. HS-SPME in vivo (PDMS/DVB), GC-MS, DB-WAX. ISTD: undecanoato de metilo. Véase identificación de picos en Tabla 1.**

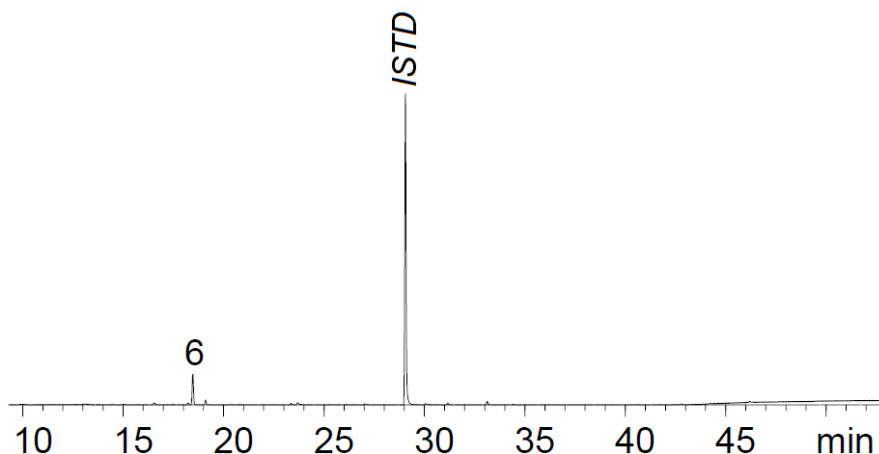


Figura 9. Perfil de emisión de volátiles inducidos por herbivoría en hojas de *C. nitens*, durante el ataque (2 h) de *U. ornatix*. HS-SPME in vivo (PDMS/DVB), GC-MS, DB-WAX. ISTD: undecanoato de metilo. Véase identificación de picos en Tabla 1.

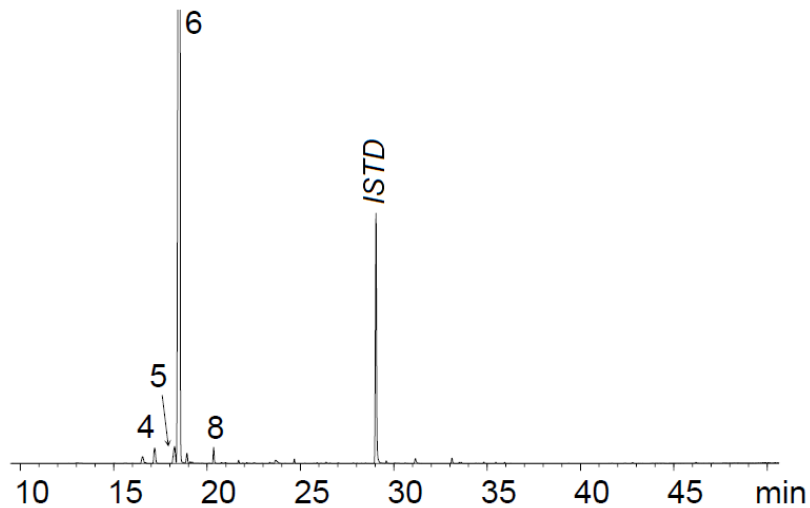
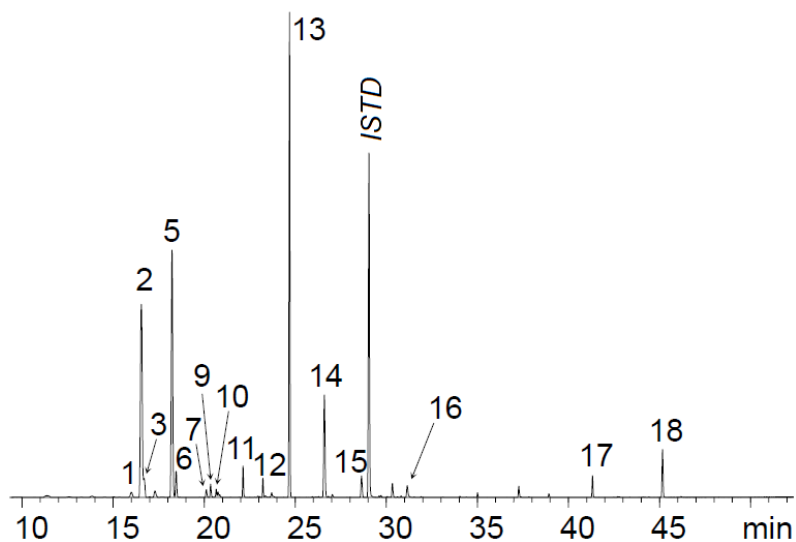


Figura 10. Perfil de emisión de volátiles inducidos por herbivoría en hojas de *C. nitens*, después del ataque (4 h) de *U. ornatix*. HS-SPME in vivo (PDMS/DVB), GC-MS, DB-WAX. ISTD: undecanoato de metilo. Véase identificación de picos en Tabla 1



**Tabla 1. Identificación de los compuestos orgánicos volátiles de *C. nitens*, aislados por HS-SPME y analizados por GC-MS, en columnas apolar (DB-5) y polar (DB-WAX). IRL: Índices de Retención Lineales; SH: Hidrocarburos sesquiterpénicos; GLV: Volátiles de hojas verdes; OS: Sesquiterpenos oxigenados; MH: Hidrocarburos monoterpénicos; OOC: Otros compuestos oxigenados; MO: Monoterpenos oxigenados.**

| Pico N°<br>en Fig. 9,<br>10 y 11 | Compuesto                                  | Tipo        | DB-5               |                    | DB-WAX             |                    | Criterios de<br>identificación |
|----------------------------------|--|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------------------|
|                                  |  |             | IRL <sup>EXP</sup> | IRL <sup>LIT</sup> | IRL <sup>EXP</sup> | IRL <sup>LIT</sup> |                                |
| 1                                | <i>cis</i> -β-Ocimeno                      | MH          | 1036               | 1038 <sup>55</sup> | 1231               | 1234 <sup>57</sup> | a y b                          |
| 2                                | <i>trans</i> -β-Ocimeno                    | MH          | 1048               | 1048 <sup>57</sup> | 1248               | 1250 <sup>57</sup> | a y b                          |
| 3                                | 3-Octanona                                 | OOC         | 986                | 985 <sup>57</sup>  | 1253               | 1255 <sup>57</sup> | a y b                          |
| 4                                | Acetato de hexilo                          | GLV         | 1012               | 1010 <sup>57</sup> | 1273               | 1274 <sup>56</sup> | a y b                          |
| 5                                | <i>trans</i> -4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno | Homoterpeno | 1115               | 1114 <sup>56</sup> | 1306               | 1302 <sup>57</sup> | a y b                          |
| 6                                | Acetato de <i>cis</i> -3-hexenilo          | GLV         | 1006               | 1004 <sup>57</sup> | 1316               | 1316 <sup>57</sup> | a y b                          |
| 7                                | <i>allo</i> -Ocimeno                       | MH          | 1129               | 1130 <sup>57</sup> | 1371               | 1366 <sup>57</sup> | a y b                          |
| 8                                | <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol                   | GLV         | 862                | 857 <sup>57</sup>  | 1375               | 1380 <sup>57</sup> | a y b                          |
| 9                                | 2-Metil-propil aldoxima                    | Aldoxima    | 750                | -                  | 1375               | -                  | a                              |
| 10                               | 3-Octanol                                  | OOC         | 998                | 993 <sup>57</sup>  | 1386               | 1392 <sup>57</sup> | a y b                          |
| 11                               | 1-Octen-3-ol                               | OOC         | 981                | 980 <sup>57</sup>  | 1439               | 1444 <sup>57</sup> | a, b y c                       |

<sup>55</sup> BABUSHOK, V. I.; LINSTROM, P. J.; ZENKEVICH, I. G. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 2011, vol. 40, no. 4, p. 043101.

<sup>56</sup> AMENT, Kai, *et al.* Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. *Plant Physiology*, 2004, vol. 135, no. 4, p. 2025-2037.

<sup>57</sup> BUTTERY, Ron G., *et al.* Volatile components of green walnut husks. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2000, vol. 48, no. 7, p. 2858-2861.

| Pico N°<br>en Fig. 9,<br>10 y 11 | Compuesto                   | Tipo      | DB-5               |                    | DB-WAX             |                    | Criterios de<br>identificación |
|----------------------------------|-----------------------------|-----------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------------------|
|                                  |                             |           | IRL <sup>EXP</sup> | IRL <sup>LIT</sup> | IRL <sup>EXP</sup> | IRL <sup>LIT</sup> |                                |
| 12                               | 2-Metil-butil aldoxima      | Aldoxima  | 856                | -                  | 1479               | -                  | a                              |
| 13                               | Linalool                    | OM        | 1102               | 1099 <sup>57</sup> | 1534               | 1543 <sup>57</sup> | a, b y c                       |
| 14                               | <i>trans</i> -β-Cariofileno | SH        | 1432               | 1420 <sup>57</sup> | 1607               | 1598 <sup>57</sup> | a, b y c                       |
| 15                               | <i>cis</i> -β-Farneseno     | SH        |                    | 1456 <sup>57</sup> |                    | 1664 <sup>57</sup> | a y b                          |
| 16                               | α-Humuleno                  | SH        | 1468               | 1453 <sup>57</sup> | 1679               | 1667 <sup>57</sup> | a, b y c                       |
| 17                               | Germacreno D                | SH        | 1492               | 1481 <sup>57</sup> | 1720               | 1708 <sup>56</sup> | a y b                          |
| 18                               | <i>trans</i> -α-Farneseno   | SH        | 1455               | 1504 <sup>57</sup> | 1746               | 1743 <sup>57</sup> | a y b                          |
| 19                               | Salicilato de metilo        | Aromático | 1198               | 1193 <sup>57</sup> | 1772               | 1768 <sup>57</sup> | a y b                          |
| 20                               | <i>trans</i> -Nerolidol     | OS        | 1564               | 1561 <sup>57</sup> | 2036               | 2036 <sup>57</sup> | a, b y c                       |
| 21                               | Indol                       | Aromático | 1300               | 1298 <sup>57</sup> | 2430               | 2441 <sup>57</sup> | a y b                          |

a - Identificación tentativa realizada con base en el espectro de masas (MS, EI, 70 eV, coincidencia del pico > 90%).

b - Identificación tentativa basada en la comparación entre los LRI obtenidos y los reportados en la literatura, para las columnas DB-WAX (polar) y DB-5MS (no polar)

c - Identificación confirmada con MS y LRI de sustancias-patrón.

Los 21 volátiles se clasificaron de acuerdo con su fórmula química en: volátiles de hojas verdes (GLV), monoterpenos (hidrocarburos monoterpénicos y monoterpenos oxigenados), sesquiterpenos (hidrocarburos sesquiterpénicos y sesquiterpenos oxigenados), compuestos oxigenados, compuestos aromáticos y aldoximas. Los HIPV se registraron según el orden de aparición en la **Tabla 1**, en la que también aparecen los índices de retención lineales para columnas apolar y polar, según los resultados experimentales, y las comparaciones con datos bibliográficos y las sustancias-patrón disponibles (1-octen-3-ol, linalool, *trans*- $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno y *trans*-nerolidol).

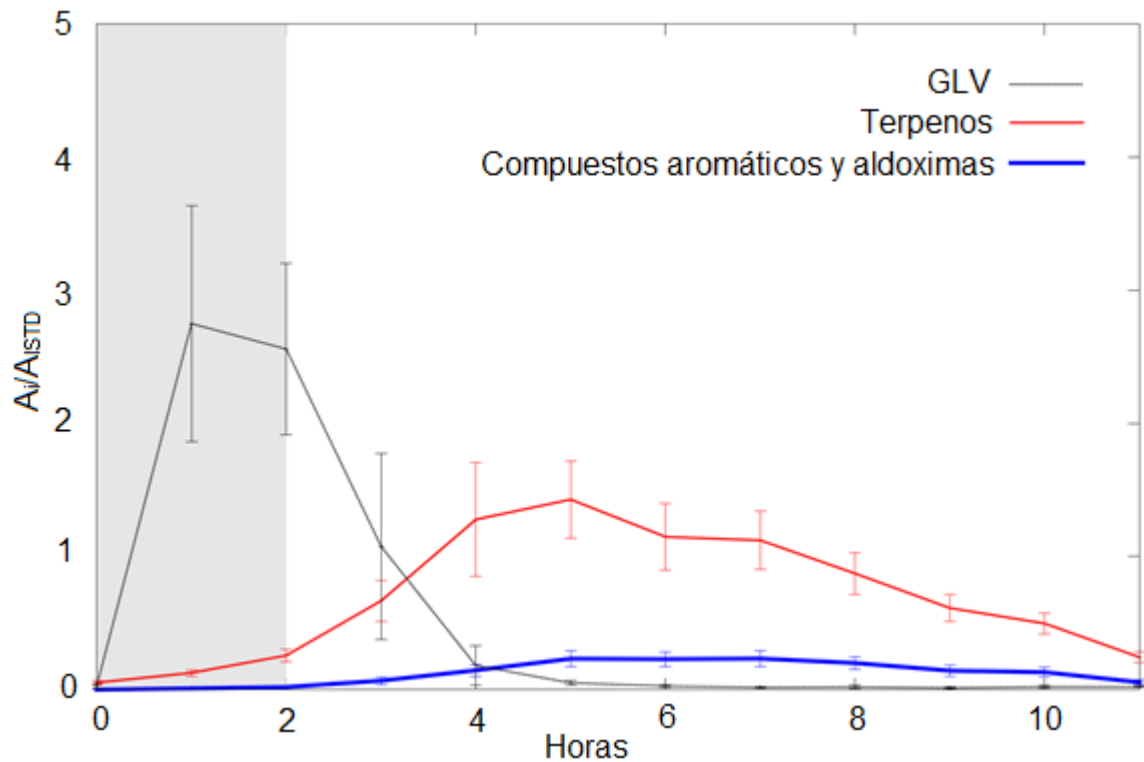
Las abundancias respecto al área relativa del pico (% ARP) se calcularon para los monoterpenos, los sesquiterpenos, los compuestos aromáticos, los otros compuestos oxigenados, los compuestos del tipo aldoximas y los volátiles de hojas verdes. Los resultados se presentan en la **Tabla 2**.

**4.2.2 Dinámica de liberación.** La dinámica de liberación en el tiempo, se determinó con la medición de los HIPV en grupos: GLV, terpenos o terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos y homoterpenos) y, compuestos aromáticos y aldoximas (**Figura 11**). Los valores de abundancia ( $A_i/A_{ISTD}$ ) corresponden a los promedios más o menos los errores estándar de las medias (SEM), para las diez horas de mediciones.

**Tabla 2. Porcentajes de abundancias (% ARP) presentadas como el promedio aritmético  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Los asteriscos indican diferencias significativas según el test de Kruskal Wallis, entre las abundancias para cada tipo de compuestos, en diferentes rangos de tiempo, (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ). MT: Monoterpenos; OOC: Otros compuestos oxigenados; ST: Sesquiterpenos; C. Al: Compuestos del tipo aldoximas; C. Ar: Compuestos del tipo aromáticos; GLV: Volátiles de hojas verdes.**

| <b>Tiempo (h)</b> | <b>MT</b>           | <b>ST</b>     | <b>C. Ar.</b>   | <b>OOC</b>          | <b>C. Al.</b> | <b>GLV</b>          |
|-------------------|---------------------|---------------|-----------------|---------------------|---------------|---------------------|
| <b>0</b>          | 58 $\pm$ 13,3       | 6,0 $\pm$ 3,3 | -               | 8,0 $\pm$ 3,7       | -             | 25 $\pm$ 13,4<br>** |
| <b>1</b>          | 5,0 $\pm$ 1,3<br>** | 0,6 $\pm$ 0,4 | 0,09 $\pm$ 0,05 | 0,4 $\pm$ 0,3<br>** | 0,3 $\pm$ 0,2 | 94 $\pm$ 1,2        |
| <b>2</b>          | 8 $\pm$ 2,1<br>*    | 1,0 $\pm$ 0,3 | 0,5 $\pm$ 0,3   | 3,0 $\pm$ 0,8       | 0,4 $\pm$ 0,2 | 87 $\pm$ 0,8<br>*   |
| <b>3</b>          | 38 $\pm$ 6,5        | 16 $\pm$ 4,9  | 2,0 $\pm$ 0,8   | 7,0 $\pm$ 1,8       | 4 $\pm$ 1,9   | 33 $\pm$ 12,1       |
| <b>4</b>          | 48 $\pm$ 6,2        | 25 $\pm$ 6,1  | 3,0 $\pm$ 0,9   | 5,0 $\pm$ 0,8       | 8 $\pm$ 2,8   | 10 $\pm$ 7,9        |
| <b>5</b>          | 50 $\pm$ 6,8<br>*   | 30 $\pm$ 6,2  | 3 $\pm$ 1,2     | 3,0 $\pm$ 0,7       | 11 $\pm$ 3,7  | 3,0 $\pm$ 1,3       |
| <b>6</b>          | 47 $\pm$ 8,0        | 32 $\pm$ 6,4  | 3,0 $\pm$ 0,9   | 2,0 $\pm$ 0,5       | 14 $\pm$ 4,4  | 2,0 $\pm$ 0,5       |
| <b>7</b>          | 45 $\pm$ 6,8        | 34 $\pm$ 6    | 2,4 $\pm$ 0,8   | 3,0 $\pm$ 0,5       | 14 $\pm$ 3,8  | 1,5 $\pm$ 0,7       |
| <b>8</b>          | 43 $\pm$ 5,7        | 34 $\pm$ 5,5  | 2,0 $\pm$ 0,7   | 3,0 $\pm$ 0,6       | 15 $\pm$ 3,9  | 2,0 $\pm$ 1,6       |
| <b>9</b>          | 36 $\pm$ 2,6        | 39 $\pm$ 4,4  | 1,6 $\pm$ 0,5   | 6,0 $\pm$ 1,9       | 14 $\pm$ 3,4  | 2,0 $\pm$ 0,9       |
| <b>10</b>         | 31 $\pm$ 1,9        | 40 $\pm$ 0,8  | 0,9 $\pm$ 0,3   | 3,0 $\pm$ 0,5       | 11 $\pm$ 2,6  | 15 $\pm$ 6,9        |
| <b>11</b>         | 15 $\pm$ 5,8        | 22 $\pm$ 2,7  | 1,3 $\pm$ 0,7   | 2 $\pm$ 1,1         | 8 $\pm$ 3,9   | 2 $\pm$ 1,1         |

**Figura 11.** Dinámica de liberación de los HIPV emitidos por hojas de *C. nitens*, tras el ataque por orugas de *U. ornatix*. Se indujeron cuatro grupos principales de compuestos: GLV (*green leaf volátiles*), terpenos, aldoximas y compuestos aromáticos. Gráfica diseñada en gnuplot (versión 5.2.2). Las barras de error corresponden al error estándar de la media (SEM).  $n = 7$ .



En la **Figura 11**, se observan las fluctuaciones de las abundancias para los tres grupos de compuestos desde la hora cero hasta la diez. Los GLV predominaron durante las dos horas del ataque (área sombreada). Una vez se retiraron las orugas, los GLV disminuyeron. En contraste, los terpenos y, las aldoximas y compuestos aromáticos, aumentaron a partir de ese momento. De los terpenos se observó el punto máximo en la quinta hora y, las aldoximas y compuestos aromáticos, exhiben una tendencia constante desde la quinta hora hasta la octava, cuando inició su disminución. Las figuras del **Anexo A**, muestran la dinámica de cada grupo por separado en diferentes escalas, más los indicadores de las diferencias significativas entre los rangos de horas para las diferentes mediciones.

Las gráficas del **Anexo B**, muestran la cantidad de área relativa al estándar interno que aportaron los monoterpenos, los sesquiterpenos, los compuestos aromáticos, los compuestos oxigenados, los compuestos del tipo aldoximas y los GLVs, al área total en la dinámica presentada en la **Figura 11**. Las gráficas se realizaron para la primera, la quinta y la séptima hora; momentos en los que se evidenciaron los picos máximos de abundancia para los tres grupos de compuestos.

Los compuestos mayoritarios durante la herbivoría fueron los GLV, los cuales aportaron en la primera hora,  $94 \pm 1,2$  (% ARP) de la abundancia total. En la quinta hora el aporte de los GLV mermó hasta  $3 \pm 1.3$  (% ARP), y el grupo con mayor abundancia fue el de los monoterpenos con  $50 \pm 6.8$  (% ARP), seguido por los sesquiterpenos con  $30 \pm 6.24$  (% ARP). El mayor valor aportado por las aldoximas fue  $15 \pm 3.9$  (% ARP) en la octava hora. Para el caso de los compuestos aromáticos, los valores más altos de abundancia fueron constantes en la cuarta, quinta y sexta hora ( $3 \pm 0.9$ ,  $3 \pm 1.2$  y  $3 \pm 0.9$ , respectivamente) (ver **Tabla 2**)

El análisis de Pearson no reveló una correlación lineal entre la cantidad de área foliar consumida y la abundancia de los grupos compuestos por GLV, terpenos y, aldoximas y aromáticos (**Tabla 3**)

**Tabla 3. Resultados de la correlación de Pearson, respecto a las sumatorias de las abundancias ( $A_i/A_{ISTD}$ ) para cada grupo de volátiles, y el área foliar consumida por las orugas.**

| Día | Área (cm <sup>2</sup> ) foliar total | Área (cm <sup>2</sup> ) Consumida | GLV  | Terpenos | Aldoximas y compuestos aromáticos | Abundancia relativa total |
|-----|--------------------------------------|-----------------------------------|------|----------|-----------------------------------|---------------------------|
| 1   | 19,4                                 | 3,6                               | 13,9 | 16,1     | 2,0                               | 32,3                      |
| 2   | 9,4                                  | 1,7                               | 11,9 | 6,5      | 0,2                               | 19,0                      |
| 3   | 43,1                                 | 5,5                               | 3,6  | 5,2      | 0,2                               | 9,0                       |
| 4   | 78,9                                 | 3,1                               | 3,6  | 10,5     | 2,6                               | 16,7                      |
| 5   | 57,6                                 | 3,9                               | 2,6  | 8,8      | 1,6                               | 13,0                      |

| <b>Día</b>                    | <b>Área (cm<sup>2</sup>) foliar total</b> | <b>Área (cm<sup>2</sup>) Consumida</b> | <b>GLV</b> | <b>Terpenos</b> | <b>Aldoximas y compuestos aromáticos</b> | <b>Abundancia relativa total</b> |
|-------------------------------|---|--|------------|-----------------|--|----------------------------------|
| 6                             | 29,9                                      | 3,1                                    | 10,3       | 6,3             | 2,2                                      | 18,8                             |
| 7                             | 34,7                                      | 2,5                                    | 1,5        | 4,6             | 1,5                                      | 7,6                              |
| <b>Correlación de Pearson</b> |   |  | -0,3       | 0,1             | -0,2                                     | -0,2                             |

## 5. DISCUSIÓN

El momento de la emisión de los HIPV es una característica fisiológica importante de las plantas, ya que el ritmo de su liberación puede indicar la función de cada compuesto.<sup>58</sup> También, la constitución de la mezcla volátil depende en gran medida del tipo de alimentación del insecto atacante.<sup>59</sup> Por lo tanto, conocer el perfil volátil de diferentes plantas, representa un punto de partida para el desarrollo de alternativas al uso de plaguicidas tóxicos, mediante la implementación de estrategias multidisciplinarias, con el objetivo final de manipular el comportamiento de los insectos herbívoros y sus enemigos naturales.<sup>60 61</sup> Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre los perfiles de liberación de volátiles se han llevado a cabo utilizando plantas modelo y/o comerciales (como el maíz y el tabaco), en lugar de plantas silvestres. Estas últimas, podrían poseer una combinación diferente de moléculas de defensa química, en especial, las que tienen menos predadores y dispersión rápida.<sup>62</sup>

Estudios previos realizados en crotalarias, han revelado que contienen alcaloides pirrolizidínicos (PA), como mecanismos de defensa directa ante insectos fitófagos generalistas.<sup>63</sup> Por el contrario, *U. ornatix*, que es un insecto especializado, no se ve afectado por dichos metabolitos secundarios y en cambio, los aprovecha para

---

<sup>58</sup> SUFANG, Zhang, *et al.* Rhythms of volatiles release from healthy and insect-damaged *Phaseolus vulgaris*. *Plant signaling & behavior*, 2013, vol. 8, no. 10, p. e25759.

<sup>59</sup> LEITNER, Margit; BOLAND, Wilhelm; MITHÖFER, Axel. Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 2005, vol. 167, no. 2, p. 597-606.

<sup>60</sup> HANLEY. Op. Cit. P. 11.

<sup>61</sup> YONEYA. Op. Cit. P. 13.

<sup>62</sup> SUFANG. Op. Cit. P. 37.

<sup>63</sup> TRIGO, José Roberto. Effects of pyrrolizidine alkaloids through different trophic levels. *Phytochemistry Reviews*, 2011, vol. 10, no 1, p. 83-98.

mejorar su aptitud biológica.<sup>64</sup> Acerca de *C. nitens*, un estudio en proceso de culminación (Trabajo de Grado de pregrado en Química, presentado por Julián Camilo Lozano Quintero, integrante del CENIVAM), mostró que la planta posee diferentes tipos de PA como la crispatina, la monocrotalina y la integerrimina. No obstante, las defensas volátiles no han sido evaluadas, por lo que fue de nuestro interés conocer la emisión de HIPV en hojas de *C. nitens*, antes, durante y después del ataque de *U. ornatix*, y efectuar una búsqueda bibliográfica sobre las funciones de defensa directa y/o indirecta en las que estarían participando.

Los resultados del presente trabajo de investigación, confirmaron que la herbivoría por parte de *U. ornatix* indujo HIPV en hojas de *C. nitens*. Los primeros que aparecieron y que predominaron durante las dos horas del ataque fueron los GLV, compuestos típicos del aroma de la planta luego de la lesión mecánica o causada por insectos.<sup>65</sup> En total se detectaron tres tipos de GLV, el *cis*-3-hexen-1-ol, el acetato de *cis*-3-hexenilo y el acetato de hexilo. Compuestos que también han sido reportados como constituyentes importantes de los perfiles volátiles en plántulas intactas de maíz, inducidos por volátiles de otras plantas plagadas. También, se han encontrado en plantas de ají y tomate, liberados por hojas con herbivoría.<sup>66 67</sup>

Investigaciones realizadas en plantas de fríjol de Lima, expuestas a volátiles de plantas infestadas por *Tetranychus urticae*, han intentado esclarecer las rutas metabólicas para la formación del acetato de *cis*-3-hexenilo, y han encontrado tres posibles mecanismos implicados: adsorción, conversión y re-liberación. Los

---

<sup>64</sup> COGNI, Rodrigo; TRIGO, Jose R.; FUTUYMA, Douglas J. A free lunch? No cost for acquiring defensive plant pyrrolizidine alkaloids in a specialist arctiid moth (*Utetheisa ornatix*). *Molecular ecology*, 2012, vol. 21, no 24, p. 6152-6162.

<sup>65</sup> HATANAKA, Akikazu. The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry*, 1993, vol. 34, no. 5, p. 1201-1218.

<sup>66</sup> DICKE, Marcel, *et al.* Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: prospects for application in pest control. *Journal of Chemical Ecology*, 1990, vol. 16, no. 11, p. 3091-3118.

<sup>67</sup> BRUIN, Jan; SABELIS, Maurice W.; DICKE, Marcel. Do plants tap SOS signals from their infested neighbours?. *Trends in ecology & evolution*, 1995, vol. 10, no. 4, p. 167-170.

volátiles indujeron la síntesis de *nov*o del acetato de *cis*-3-hexenilo en las plantas intactas. Además, es probable que capten el compuesto de otras plantas atacadas y luego lo vuelvan a liberar, pero no sin que antes este GLV, genere cambios metabólicos en las plantas receptoras. Otros volátiles como el *cis*-3-hexen-1-ol, podrían ser absorbidos o re-absorbidos para posteriormente ser utilizados como precursores del acetato de *cis*-3-hexenilo.<sup>68</sup>

Según estudios realizados en el maíz y el álamo negro, el acetato de *cis*-3-hexenilo podría tener acción cebadora en genes implicados en la defensa de las plantas, mediante la regulación génica, para la producción de defensas como los volátiles del tipo terpenoides, lo que les serviría a las plantas para preparar una respuesta rápida posterior a la herida causada por los insectos. Los investigadores compararon las tasas de emisión de terpenos luego de la herbivoría en plantas previamente sensibilizadas con acetato de *cis*-3-hexenilo y plantas sin ningún tratamiento. El resultado fue el incremento en la liberación de terpenos en las plantas expuestas al GLV.<sup>69 70 71 72</sup>

De otra parte, investigaciones anteriores han demostrado que el *cis*-3-hexen-1-ol, es el volátil vegetal más importante para la atracción y/o repelencia de los herbívoros, y la atracción de sus enemigos naturales en interacciones tritróficas. Así como también, el efecto cebador en plantas vecinas intactas. Por lo que podría ser un compuesto clave para el desarrollo de estrategias de control de plagas.<sup>73</sup>

---

<sup>68</sup> CHOH, Yasuyuki, *et al.* Exposure of lima bean leaves to volatiles from herbivore-induced conspecific plants results in emission of carnivore attractants: active or passive process?. *Journal of chemical ecology*, 2004, vol. 30, no 7, p. 1305-1317.

<sup>69</sup> DE MORAES. Op. Cit. P. 15.

<sup>70</sup> ENGELBERTH, Juergen, *et al.* Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, vol. 101, no. 6, p. 1781-1785.

<sup>71</sup> TON, Jurriaan, *et al.* Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *The Plant Journal*, 2007, vol. 49, no. 1, p. 16-26.

<sup>72</sup> FROST, Christopher J., *et al.* Priming defense genes and metabolites in hybrid poplar by the green leaf volatile *cis*-3-hexenyl acetate. *New Phytologist*, 2008, vol. 180, no. 3, p. 722-734.

<sup>73</sup> WEI, Jianing; KANG, Le. Roles of (Z)-3-hexenol in plant-insect interactions. *Plant signaling & behavior*, 2011, vol. 6, no. 3, p. 369-371.

A partir de los estudios revisados, se infiere que una función importante de los GLV, es alertar a la planta sobre el ataque recibido y activar mecanismos de defensa. Cuando cesa el ataque, los GLV disminuyen y se inicia la liberación de otro tipo de HIPV, lo que se refleja también en el perfil volátil de *C. nitens*.<sup>74</sup> En el presente estudio, finalizadas las dos horas de herbivoría por *U. ornatix*, se observó el incremento en la liberación de otro grupo importante de compuestos: los terpenoides. Integrado por los monoterpenos, sesquiterpenos y homoterpenos.

Entre los monoterpenos se destacan los ocimenes. En estudios realizados por Arimura y colaboradores,<sup>75</sup> se aisló y caracterizó la enzima terpeno sintasa (LjE $\beta$ OS), presente en la leguminosa *Lotus japonicus*. La enzima LjE $\beta$ OS recombinante, participó en la síntesis del *trans*- $\beta$ -ocimeno (98%) y su isómero, el *cis*- $\beta$ -ocimeno (2%), luego de la herbivoría por arañas rojas (*Tetranychus urticae*). Por lo que sugirieron que la enzima y los productos finales estarían implicados en procesos de defensa inducida por herbívoros y, que la emisión de *trans*- $\beta$ -ocimeno se vio aumentada en comparación con plantas que habían sido heridas de forma mecánica. Dicho compuesto y el homoterpeno *trans*-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, actúan como atrayentes de predadores de las arañas que infestan los frijoles de Lima. Del mismo modo, el *trans*- $\beta$ -ocimeno podría estar involucrado en la comunicación entre plantas para la activación de la síntesis de compuestos de defensa.<sup>76 77</sup>

Otro monoterpeno detectado en el perfil de *C. nitens* fue el *allo*-ocimeno, el cual ha mostrado acción como inductor de genes implicados en la defensa de las plantas y

---

<sup>74</sup> ERB. Op. Cit. P. 15.

<sup>75</sup> ARIMURA, Gen-ichiro, *et al.* Herbivore-induced defense response in a model legume. Two-spotted spider mites induce emission of (E)- $\beta$ -ocimene and transcript accumulation of (E)- $\beta$ -ocimene synthase in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 2004, vol. 135, no. 4, p. 1976-1983.

<sup>76</sup> ARIMURA, Gen-ichiro, *et al.* Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature*, 2000, vol. 406, no. 6795, p. 512.

<sup>77</sup> ARIMURA, Gen-ichiro, *et al.* Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants. *The Plant Journal*, 2002, vol. 29, no. 1, p. 87-98.

su papel antifúngico, que le confiere resistencia a *Arabidopsis thaliana* contra *Botrytis cinerea*, mediante la formación de agregados de lignina y camalexina en las paredes celulares.<sup>78</sup>

El monoterpeno linalool, mostró efecto protector de las plantas de *Nicotiana attenuata*, mediante la disminución de las tasas de oviposición de lepidópteros, y en conjunto con el *cis*-3-hexen-1-ol y el *cis*- $\alpha$ -bergamoteno, aumentaron las tasas de depredación de los huevos, reduciendo en más del 90% el número de herbívoros.<sup>79</sup>

El homoterpeno que destaca por su actividad protectora es el *trans*-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, del cual se cree que se sintetizaría de *novo* por la acción inductora de las secreciones bucales de insectos, y sería liberado para la atracción de los enemigos naturales de los herbívoros.<sup>80 81 82</sup> Este terpeno también está presente en los aromas florales de muchas plantas.<sup>83</sup> Investigadores como Donath y Boland<sup>84</sup>, lograron demostrar que algunas plantas como el árbol de lima, lo pueden sintetizar a partir del sesquiterpeno nerodiol, compuesto que también hace parte del perfil de HIPV hallado en *C. nitens*. Otro sesquiterpeno con actividad de interés es el *trans*- $\alpha$ -Farneseno, que actúa como la feromona más potente para la repelencia de los áfidos y la atracción de entoparasitoides.<sup>85 86 87</sup>

---

<sup>78</sup> KISHIMOTO, Kyutaro, *et al.* Analysis of defensive responses activated by volatile allo-ocimene treatment in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 2006, vol. 67, no 14, p. 1520-1529.

<sup>79</sup> KESSLER. Op. Cit. P. 10.

<sup>80</sup> DICKE. Op. Cit. P. 38.

<sup>81</sup> DICKE, M., *et al.* Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions. Involvement of host plant in its production. *Journal of chemical ecology*, 1990, vol. 16, no. 2, p. 381-396.

<sup>82</sup> TURLINGS. Op. Cit. P. 20.

<sup>83</sup> KAISER, Roman. New volatile constituents of the flower concrete of *Michelia champaca* L. *Journal of Essential Oil Research*, 1991, vol. 3, no. 3, p. 129-146.

<sup>84</sup> DONATH, Jens; BOLAND, Wilhelm. Biosynthesis of acyclic homoterpenes in higher plants parallels steroid hormone metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 1994, vol. 143, no. 4-5, p. 473-478.

<sup>85</sup> BOWERS, William S., *et al.* Aphid alarm pheromone: isolation, identification, synthesis. *Science*, 1972, vol. 177, no 4054, p. 1121-1122.

<sup>86</sup> PICKETT, J. A.; GRIFFITHS, D. C. Composition of aphid alarm pheromones. *Journal of Chemical Ecology*, 1980, vol. 6, no. 2, p. 349-360.

<sup>87</sup> FRANCIS, Frédéric, *et al.* Is the (E)- $\beta$ -farnesene only volatile terpenoid in aphids?. *Journal of Applied Entomology*, 2005, vol. 129, no. 1, p. 6-11.

Sobre sesquiterpenos como el *trans*- $\beta$ -Cariofileno y el  $\alpha$ -humuleno, se ha observado que la mayoría de las líneas de maíz estadounidense han perdido la capacidad de sintetizarlos, mientras que en general, las líneas no americanas los liberan en cantidades considerables en respuesta a las heridas por nemátodos. Análisis hechos en plantas con la síntesis restaurada de los compuestos, encontraron que estos HIPV les confirieron a las raíces mayor protección, al atraer a entomopatógenos que infectaron y eliminaron la plaga. Con esto reafirmaron la idea de que la manipulación del perfil de HIPV, puede mejorar la aptitud de las plantas frente a diferentes plagas.<sup>88</sup>

En general, las mezclas volátiles inducidas por herbívoros a menudo están dominadas por terpenos y GLV, mientras que otros volátiles encontrados como las aldoximas, 2-metil-propil aldoxima y 2-metil-butil aldoxima, están en menor cantidad y su presencia en los perfiles volátiles no es frecuente. Sin embargo, su papel es crucial, las aldoximas sirven como precursoras de varias clases de compuestos de defensa directa que actúan como sustancias tóxicas en diferentes organismos.<sup>89 90</sup> Además, se sabe que dichos HIPV son liberados por el álamo negro y funcionan como atrayentes de avispas *Glyptapantheles liparidis*, que parasitan las orugas.<sup>91</sup>

Se determinaron dos tipos de compuestos aromáticos: el salicilato de metilo y el indol. Sobre el salicilato de metilo, Lin y colaboradores,<sup>92</sup> encontraron que atrajo hongos entomopatógenos y a su vez ejerció un efecto positivo en la patogenicidad.

---

<sup>88</sup> DEGENHARDT, Jörg, *et al.* Restoring a maize root signal that attracts insect-killing nematodes to control a major pest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, vol. 106, no. 32, p. 13213-13218.

<sup>89</sup> TAKABAYASHI. Op. Cit. P. 15.

<sup>90</sup> VAN DEN BOOM, Cindy EM, *et al.* Qualitative and quantitative variation among volatile profiles induced by *Tetranychus urticae* feeding on plants from various families. *Journal of chemical ecology*, 2004, vol. 30, no. 1, p. 69-89.

<sup>91</sup> HAMBERGER, Björn; BAK, Søren. Plant P450s as versatile drivers for evolution of species-specific chemical diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2013, vol. 368, no. 1612, p. 20120426.

<sup>92</sup> LIN, Yongwen, *et al.* The Herbivore-Induced Plant Volatiles Methyl Salicylate and Menthol Positively affect Growth and Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi. *Scientific reports*, 2017, vol. 7, p. 40494.

Asimismo, puede afectar el comportamiento de los herbívoros y ser un importante atrayente de sus enemigos naturales.<sup>93</sup> Por otra parte, es un componente significativo de las cascadas de transducción de señales, que activa la respuesta de defensa de la planta.<sup>94</sup> Otro compuesto a resaltar como volátil de defensa es el indol, que en plantas de maíz, sólo se libera tras la herbivoría y que estaría implicado en la activación de genes para la producción de homoterpenos y monoterpenos que preparan los tejidos sistémicos y las plantas vecinas para los ataques.<sup>95</sup>

Los resultados obtenidos en el proceso de experimentación, permitieron establecer que la mayoría de los HIPV detectados durante y después del ataque por orugas de *U. ornatrix*, han sido reportados como componentes comunes en la mezcla de volátiles de defensa en otras plantas. Se reportaron 21 HIPV presentes en el perfil de *C. nitens*, de los cuales las aldoximas fueron los compuestos de mayor presencia con respecto a otras especies estudiadas.

---

<sup>93</sup> MALLINGER, Rachel E.; HOGG, David B.; GRATTON, Claudio. Methyl salicylate attracts natural enemies and reduces populations of soybean aphids (Hemiptera: Aphididae) in soybean agroecosystems. *Journal of economic entomology*, 2011, vol. 104, no. 1, p. 115-124.

<sup>94</sup> GARRIDO, Inmaculada; ESPINOSA, Francisco; ÁLVAREZ-TINAUT, M. Carmen. Oxidative defence reactions in sunflower roots induced by methyl-jasmonate and methyl-salicylate and their relation with calcium signalling. *Protoplasma*, 2009, vol. 237, no. 1-4, p. 27.

<sup>95</sup> ERB. Op. Cit. P. 15.

## 6. CONCLUSIONES

La aplicación de las técnicas de micro-extracción en fase sólida (HS-SPME) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), permitió la identificación presuntiva de 21 HIPV de hojas de *Crotalaria nitens*, emitidos tras la herbivoría causada por orugas de *Utetheisa ornatrix*; de los tipos: GLV, hidrocarburos monoterpénicos (MH), monoterpénos oxigenados (OM), hidrocarburos sesquiterpénicos (SH), sesquiterpenos oxigenados (OS), otros compuestos oxigenados (OOC), compuestos aromáticos y aldoximas.

Inmediatamente después del ataque de las orugas, las hojas emitieron principalmente GLV, tales como, el acetato de cis-3-hexenilo y el cis-3-hexen-1-ol. Una vez se retiraron los insectos, decreció la emisión de GLV, pero incrementó la emisión de volátiles del tipo terpenoides. Cinco horas después del ataque de los insectos, las aldoximas, 2-metil-propil aldoxima y 2-metil-butil aldoxima, alcanzaron el punto máximo. Para el caso de los compuestos aromáticos como el indol y el salicilato de metilo, el punto máximo se dio tres horas después de la herbivoría. La emisión de la mayoría de HIPV, decreció a partir de la séptima hora luego del ataque.

En cuanto al grupo de los terpenos o terpenoides, los monoterpénos como el *trans*- $\beta$ -ocimeno y el linalool, fueron los que se emitieron principalmente. Seguidos por los sesquiterpenos como el *trans*- $\beta$ -cariofileno y el  $\alpha$ -humuleno.

Tras realizar la búsqueda bibliográfica, se presume que, la mayoría de los HIPV detectados estarían implicados en la activación de mecanismos de defensa en *C. nitens*, por la herida de *U. ornatrix*.

## 7. RECOMENDACIONES

- Evaluar la acción ecológica y química de las aldoximas en crotalarias, porque podrían estar implicadas en la producción de los alcaloides pirrolizidínicos y en la atracción de avispas parasitoides de las orugas de *U. oratrix*.<sup>96 97 98</sup> Situación que fue observada recurrentemente en orugas del jardín del CENIVAM-UIS.
- Realizar la Identificación confirmada con los espectros de masas y los índices de retención lineales de las sustancias-patrón, para el resto de los compuestos identificados de manera tentativa.
- Un reto actual para los investigadores es encontrar los mecanismos para maximizar los efectos positivos de los HIPV, a través de la síntesis química de estas sustancias o mediante clonación molecular, producirlos a gran escala y emplearlos con objetivos muy específicos. También, por mejoramiento genético, elegir los genes que estén implicados en la síntesis de volátiles con el fin de producir plantas transgénicas.
- Enfocar futuras investigaciones en la selección de las plantas con mejores defensas directas e indirectas para ser sembradas entre cultivos, lo que permitiría mantener controlada la población de herbívoros y otros organismos que atacan las siembras. Ejemplo de ello es el sistema “*Push-Pull*”, que emplea los principios básicos de los policultivos, ya que la domesticación ha cambiado la capacidad de los cultivos para expresar estos rasgos. Este sistema busca intercalar el cultivo de interés (el cual se desea proteger), con una especie de planta con compuestos

---

<sup>96</sup> TAKABAYASHI. Op. Cit. P. 15.

<sup>97</sup> VAN DEN BOOM. Op. Cit. P. 42.

<sup>98</sup> HAMBERGER. Op. Cit. P. 42.

orgánicos volátiles capaces de repeler la plaga principal. Adicionalmente, se agrega otra especie atractiva para los insectos por fuera de la plantación. Estas plantas a su vez tendrían un efecto negativo en la reproducción de los herbívoros.<sup>99</sup>

---

<sup>99</sup> STENBERG, Johan A., *et al.* Optimizing crops for biocontrol of pests and disease. *Trends in plant science*, 2015, vol. 20, no. 11, p. 698-712.

## BIBLIOGRAFÍA

AMENT, Kai, et al. Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. *Plant Physiology*, 2004, vol. 135, no. 4, p. 2025-2037.

ARIMURA, Gen-ichiro, et al. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature*, 2000, vol. 406, no. 6795, p. 512.

ARIMURA, Gen-ichiro, et al. Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants. *The Plant Journal*, 2002, vol. 29, no. 1, p. 87-98.

ARIMURA, Gen-ichiro, et al. Herbivore-induced defense response in a model legume. Two-spotted spider mites induce emission of (E)- $\beta$ -ocimene and transcript accumulation of (E)- $\beta$ -ocimene synthase in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 2004, vol. 135, no. 4, p. 1976-1983.

BABUSHOK, V. I.; LINSTROM, P. J.; ZENKEVICH, I. G. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 2011, vol. 40, no. 4, p. 043101.

BALDWIN, Ian T.; SCHULTZ, Jack C. Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants. *Science*, 1983, vol. 221, no 4607, p. 277-279.

BALDWIN, Ian T., et al. Volatile Signaling in Plant-Plant Interactions: "Talking Trees" in the Genomics Era. *Science*, 2006, Vol. 311, no. 5762, p. 812–815.

BAUTISTA, Ma Anita M., *et al.* RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect biochemistry and molecular biology*, 2009, vol. 39, no. 1, p. 38-46.

BOWERS, William S., *et al.* Aphid alarm pheromone: isolation, identification, synthesis. *Science*, 1972, vol. 177, no 4054, p. 1121-1122.

BRUIN, Jan; SABELIS, Maurice W.; DICKE, Marcel. Do plants tap SOS signals from their infested neighbours?. *Trends in ecology & evolution*, 1995, vol. 10, no. 4, p. 167-170.

BRUNNER, Bryan, *et al.* *Crotalaria* [en línea]. Lajas (Puerto Rico): *Proyecto de Agricultura Orgánica*, 2010. [Consultado 10 de enero de 2018]. Disponible en Internet: <http://proorganico.info/crotalaria.pdf>.

BUTTERY, Ron G., *et al.* Volatile components of green walnut husks. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2000, vol. 48, no. 7, p. 2858-2861.

CHOH, Yasuyuki, *et al.* Exposure of lima bean leaves to volatiles from herbivore-induced conspecific plants results in emission of carnivore attractants: active or passive process?. *Journal of chemical ecology*, 2004, vol. 30, no 7, p. 1305-1317.

COGNI, Rodrigo; TRIGO, Jose R.; FUTUYMA, Douglas J. A free lunch? No cost for acquiring defensive plant pyrrolizidine alkaloids in a specialist arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). *Molecular ecology*, 2012, vol. 21, no 24, p. 6152-6162.

CORREA, Jaime Enrique. Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. Colombia: Secretaria Ejecutiva Del Convenio Andrés Bello. 2010. Ed. 3, p. 188-201. ISBN: 9589206018.

DE MORAES, Consuelo M., *et al.* Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature*, 1998, vol. 393, no. 6, p. 570–573.

DEGENHARDT, Jörg, *et al.* Restoring a maize root signal that attracts insect-killing nematodes to control a major pest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, vol. 106, no. 32, p. 13213-13218.

DICKE, Marcel; SABELIS, Maurice W. How plants obtain predatory mites as bodyguards. *Netherlands journal of zoology*, 1987, vol. 38, no 2, p. 148-165.

DICKE, Marcel, *et al.* Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predatorprey interactions Involvement of host plant in its production. *Journal of chemical ecology*, 1990, vol. 16, no. 2, p. 381-396.

DICKE, Marcel, *et al.* Plant strategies of manipulating predatorprey interactions through allelochemicals: prospects for application in pest control. *Journal of Chemical Ecology*, 1990, vol. 16, no. 11, p. 3091-3118.

DONATH, Jens; BOLAND, Wilhelm. Biosynthesis of acyclic homoterpenes in higher plants parallels steroid hormone metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 1994, vol. 143, no. 4-5, p. 473-478.

DUDAREVA, Natalia, *et al.* Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 2013, vol. 198, no. 1, p. 16–32.

ENGELBERTH, Juergen, *et al.* Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, vol. 101, no. 6, p. 1781-1785.

ERB, Matthias, *et al.* Indole is an essential herbivore-induced volatile priming signal in maize. *Nature Communications*, 2015, vol. 6, p 6273.

FERRO, Viviane Gianluppi; GUIMARÃES, Paulo Roberto; TRIGO, José Roberto. Why do larvae of *Utetheisa ornatrix* penetrate and feed in pods of *Crotalaria* species? Larval performance vs. chemical and physical constraints. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2006, vol. 121, no. 1, p. 23–29.

FLETCHER, Mary T., *et al.* *Crotalaria medicaginea* associated with horse deaths in northern Australia: New pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, vol. 59, no. 21, p. 11888–11892.

FRANCIS, Frédéric, *et al.* Is the (E)- $\beta$ -farnesene only volatile terpenoid in aphids?. *Journal of Applied Entomology*, 2005, vol. 129, no. 1, p. 6-11.

FROST, Christopher J., *et al.* Priming defense genes and metabolites in hybrid poplar by the green leaf volatile cis-3-hexenyl acetate. *New Phytologist*, 2008, vol. 180, no. 3, p. 722-734.

GARRIDO, Inmaculada; ESPINOSA, Francisco; ÁLVAREZ-TINAUT, M. Carmen. Oxidative defence reactions in sunflower roots induced by methyl-jasmonate and methyl-salicylate and their relation with calcium signalling. *Protoplasma*, 2009, vol. 237, no. 1-4, p. 27.

GROOM, A. *Crotalaria nitens* [en línea]. *La Lista Roja de especies amenazadas de la UICN 2012*: e.T19892785A20049200. [Consultado 20 de diciembre de 2018]. Disponible en Internet: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2012.RLTS.T19892785A20049200.en>

HALL, Donald W. Ornate Bella Moth, Rattlebox Moths *Utetheisa ornatrix* (Linnaeus) (Insecta: Lepidoptera: Erebidae: Arctiinae) [en línea]. Florida (EE.UU): Department of Entomology and Nematology, UF/IFAS Extension, 2005. (Recuperado en 6 de diciembre 2017). Disponible en: [http://entnemdept.ufl.edu/creatures/beneficial/leps/bella\\_moth.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/beneficial/leps/bella_moth.htm).

HAMBERGER, Björn; BAK, Søren. Plant P450s as versatile drivers for evolution of species-specific chemical diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2013, vol. 368, no. 1612, p. 20120426.

HANLEY, Mick E., *et al.* Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 2007, vol. 8, no. 4, p. 157–178.

HARE, J. Daniel. Ecological Role of Volatiles Produced by Plants in Response to Damage by Herbivorous Insects. *Annual Review of Entomology*, 2011, vol. 56, no. 1, p. 161–180.

HATANAKA, Akikazu. The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry*, 1993, vol. 34, no. 5, p. 1201-1218.

HEIL, Martin. Herbivore-induced plant volatiles: Targets, perception and unanswered questions. *Journal of Physiology*, 2014, vol. 204, no. 2, p. 297–306.

HOWE, Gregg A.; JANDER, Georg. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, vol. 59, p. 41–66.

KAISER, Roman. New volatile constituents of the flower concrete of *Michelia champaca* L. *Journal of Essential Oil Research*, 1991, vol. 3, no. 3, p. 129-146.

KARBAN, Richard y KUC, Joseph. Induced resistance against pathogens and herbivores: an overview. *Induced plant defenses against pathogens and herbivores*, 1999, p. 1-15.

KATARIA, Sahil. Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Applications. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 2011, vol. 2, no. 6, p. 1544–1560.

KESSLER, André; BALDWIN, Ian. Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature. *Science*, 2001, vol. 291, no 5511, p. 2141–2144.

KISHIMOTO, Kyutaro, *et al.* Analysis of defensive responses activated by volatile allo-ocimene treatment in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 2006, vol. 67, no 14, p. 1520-1529.

KNUDSEN, Jette T., *et al.* Diversity and distribution of floral scent. *The botanical review*, 2006, vol. 72, no. 1, p. 1-120.

LEITNER, Margit; BOLAND, Wilhelm; MITHÖFER, Axel. Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 2005, vol. 167, no. 2, p. 597-606.

LEVERETT, Lindsay D. y WOODS, Michael. The Genus *Crotalaria* (Fabaceae) in Alabama. *Castanea*, 2012. Vol. 77 N° (4), p. 364–374.

LIN, Yongwen, *et al.* The Herbivore-Induced Plant Volatiles Methyl Salicylate and Menthol Positively affect Growth and Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi. *Scientific reports*, 2017, vol. 7, p. 40494.

LISEC, Jan, *et al.* Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature protocols*, 2006, vol. 1, no. 1, p. 387.

MAIA, Lisanka A., *et al.* Natural and experimental poisoning of goats with the pyrrolizidine alkaloid–producing plant *Crotalaria retusa* L. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2013, vol. 25, no. 5, p. 592–595.

MALLINGER, Rachel E.; HOGG, David B.; GRATTON, Claudio. Methyl salicylate attracts natural enemies and reduces populations of soybean aphids (Hemiptera: Aphididae) in soybean agroecosystems. *Journal of economic entomology*, 2011, vol. 104, no. 1, p. 115-124.

MÄNTYLÄ, Elina; KLEMOLA, Tero; HAUKIOJA, Erkki. Attraction of willow warblers to sawfly-damaged mountain birches: Novel function of inducible plant defences? *Ecology Letters*, 2004, vol. 7, no. 10, p. 915–918

MCGARVEY, Douglas J.; CROTEAU, Rodney. Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*, 1995, vol. 7, no. 7, p. 1015–1026.

PARÉ, Paul W.; TUMLINSON, James H. Update on plant-insect interactions plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology*, 1999, vol. 121, p. 325–331.

PICHERSKY, Eran; NOEL, Joseph P.; DUDAREVA, Natalia. Biosynthesis of plant volatiles: nature’s diversity and ingenuity. *Science*, 2006, vol. 311, no. 5762, 808–11.

PICKETT, J. A.; GRIFFITHS, D. C. Composition of aphid alarm pheromones. *Journal of Chemical Ecology*, 1980, vol. 6, no. 2, p. 349-360.

RASMANN, Sergio, *et al.* Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, 2005, vol. 434, no. 7034, p. 732–737.

RHOADES, David F. Responses of alder and willow to attack by tent caterpillars and webworms: evidence for pheromonal sensitivity of willows. Washington: American Chemical Society, 1983. Ed. *Plant Resistance to insects*, p. 55-68. ISBN: 9780841207561.

SALAZAR, Diego; JARAMILLO, Alejandra; MARQUIS, Robert J. The impact of plant chemical diversity on plant–herbivore interactions at the community level. *Oecologia*, 2016, vol. 181, no. 4, p. 1199-1208.

SHAPIRO, Samuel Sanford; WILK, Martin B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 1965, vol. 52, no. 3/4, p. 591-611.

SIGNORETTI, André Gustavo Corrêa, *et al.* Biology and thermal requirements of *Utetheisa ornatix* (L.)(Lepidoptera: Arctiidae) reared on artificial diet. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2008, vol. 51, no 4, p. 447-453.

SOURAKOV, Andrei. You are what you eat: native versus exotic *Crotalaria* species (Fabaceae) as host plants of the Ornate Bella Moth, *Utetheisa* (Lepidoptera: Erebidae: Arctiinae). *Journal of Natural History*, 2015, vol. 2933, p. 1–19.

STASHENKO, Elena E., *et al.* GC–MS study of compounds isolated from *Coffea arabica* flowers by different extraction techniques. *Journal of separation science*, 2013, vol. 36, no. 17, p. 2901-2914.

STASHENKO, Elena E.; MARTÍNEZ, Jairo René. Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*, 2010, vol. 2, no. 1, p. 29-47.

STASHENKO, Elena; MARTÍNEZ, Jairo René. Gas Chromatography-Mass Spectrometry. In: Guo DX, ed. *Advances in Gas Chromatography*, 2014, p. 1-38.

STENBERG, Johan A., *et al.* Optimizing crops for biocontrol of pests and disease. *Trends in plant science*, 2015, vol. 20, no. 11, p. 698-712.

SUBRAMANIAM, Shweta y PANDEY, Arun K. Taxonomy and phylogeny of the genus *Crotalaria* (Fabaceae): An overview. *Acta Biologica Indica*, 2013, vol. 2, no. 1, p. 253–264.

SUFANG, Zhang, *et al.* Rhythms of volatiles release from healthy and insect-damaged *Phaseolus vulgaris*. *Plant signaling & behavior*, 2013, vol. 8, no. 10, p. e25759.

TAKABAYASHI, Junji; DICKE, Marcel; POSTHUMUS, Maarten A. Variation in composition of predator-attracting allelochemicals emitted by herbivore-infested plants: Relative influence of plant and herbivore. *Chemoecology*, 1991, vol. 2 no. 1, p. 1–6.

TON, Jurriaan, *et al.* Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *The Plant Journal*, 2007, vol. 49, no. 1, p. 16-26.

TRIGO, José Roberto. Effects of pyrrolizidine alkaloids through different trophic levels. *Phytochemistry Reviews*, 2011, vol. 10, no. 1, p. 83-98.

TURLINGS, Ted CJ, *et al.* The induction of volatile emissions in maize by three herbivore species with different feeding habits: Possible consequences for their natural enemies. *Biological Control*, 1998, vol. 11, no. 11, p. 122–129.

TURLINGS, Ted CJ; TUMLINSON, James H.; LEWIS, W. Joe. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science*, 1990, vol. 250, no. 4985, p. 1251-1253.

VAN DEN BOOM, Cindy EM, *et al.* Qualitative and quantitative variation among volatile profiles induced by *Tetranychus urticae* feeding on plants from various families. *Journal of chemical ecology*, 2004, vol. 30, no. 1, p. 69-89.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. Dec. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1963, vol. 11, p. 463-471.

VERHAGE, Adriaan; VAN WEES, Saskia CM; PIETERSE, Corné MJ. Plant Immunity: It's the Hormones Talking, But What Do They Say? *Plant Physiology*, 2010, vol. 154, no. 2, p. 536–540.

VUCKOVIC, Dajana, *et al.* In vitro evaluation of new biocompatible coatings for solid-phase microextraction: implications for drug analysis and in vivo sampling applications. *Analytica chimica acta*, 2009, vol. 638, no. 2, p. 175-185.

WAR, Abdul Rashid, *et al.* Herbivore- and Elicitor- induced resistance in groundnut to *Asian armyworm*, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Plant Signaling & Behavior*, 2011a, vol. 6, no. 11, p. 1769–1777.

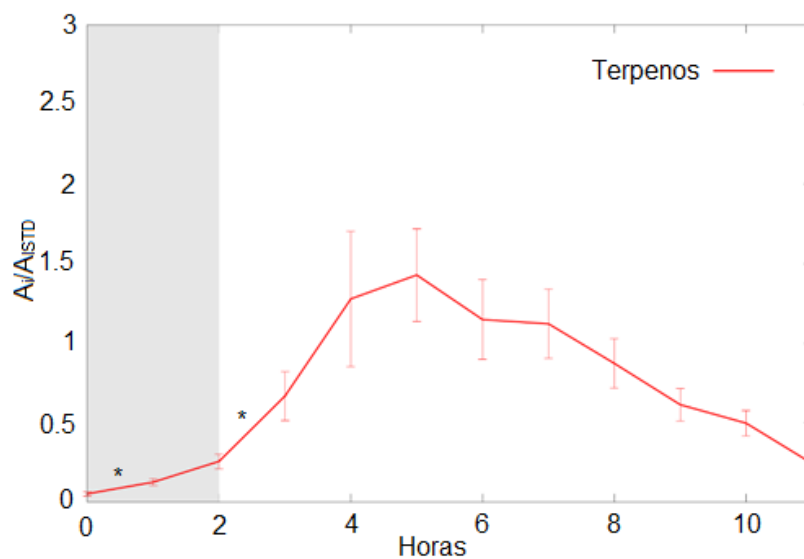
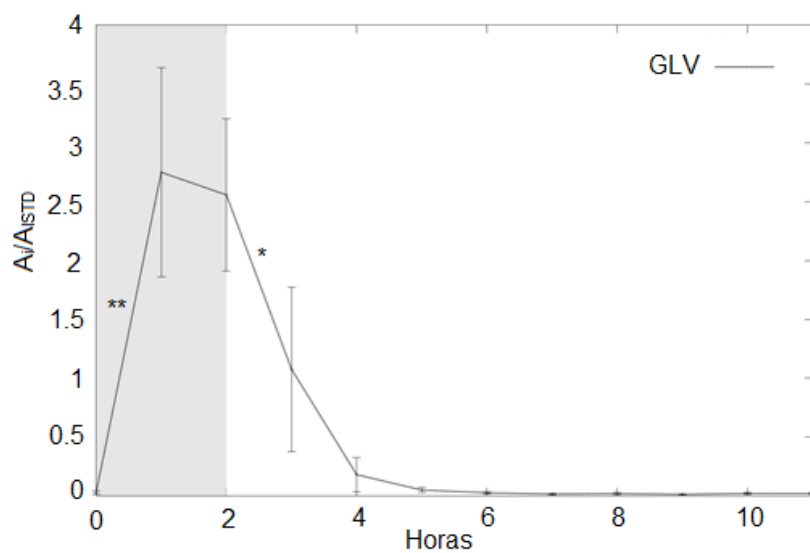
WAR, Abdul Rashid, *et al.* Jasmonic Acid-Mediated-Induced Resistance in Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Plant Growth Regulation*, 2011b, vol. 30, no. 4, p. 512–523.

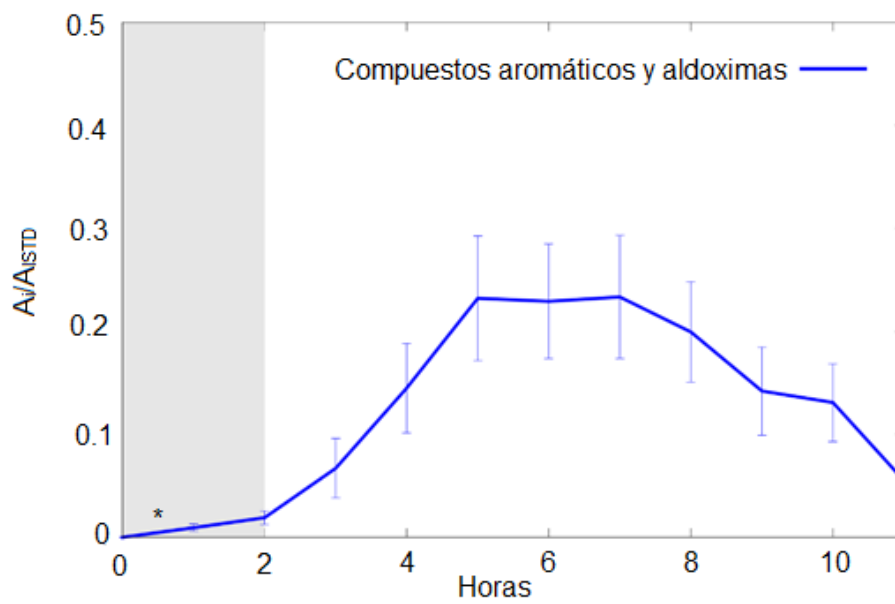
WEI, Jianing; KANG, Le. Roles of (Z)-3-hexenol in plant-insect interactions. *Plant signaling & behavior*, 2011, vol. 6, no. 3, p. 369-371.

YONEYA, Kinuyo; KUGIMIYA, Soichi; TAKABAYASHI, Junji. Can herbivore-induced plant volatiles inform predatory insect about the most suitable stage of its prey? *Physiological Entomology*, 2009, vol. 34, no. 4, p. 379–386.

## ANEXOS

Anexo A. Dinámicas de liberación de GLV, terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos y homoterpenos) y, compuestos aromáticos y aldoximas. Los asteriscos indican diferencias significativas según el test de Kruskal Wallis, en las abundancias de los compuestos desde la hora cero hasta la 11 (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ).





Anexo B. Gráficas de bigotes realizadas con las abundancias de los seis grupos de COV, para las horas: primera quinta y séptima, respectivamente. Monoterpenos (MT), sesquiterpenos (ST), compuestos aromáticos (C. Ar.), otros compuestos oxigenados (OOC), compuestos del tipo aldoximas (C. Al.) y GLV.

