

VCH-FC
MA 6-B
6434

**COSTOS DE LAS RESPUESTAS INDUCIDAS EN PLANTAS POR
HERBIVORÍA DE INSECTOS: ÁCIDOS HIDROXÁMICOS EN EL TRIGO
SILVESTRE *Triticum uniaristatum* Y EL ÁFIDO *Rhopalosiphum padi***

**Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magister en Ciencias Biológicas con mención en Ecología**

Facultad de Ciencias

**por
Ernesto Mario Gianoli Molla**

Junio, 1996

Director de Tesis: Dr. Hermann M. Niemeyer

Director de Tesis: Dr. Juan J. Armesto



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER**

**Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de
Magister presentada por el candidato**

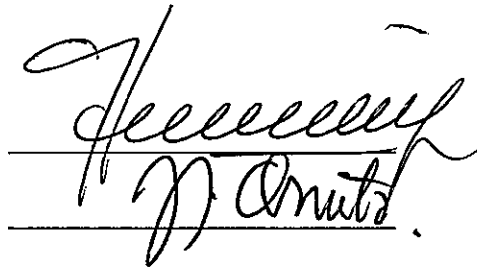
Ernesto Mario Gianoli Molla

**ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis
para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Ecología, en
el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 19 de junio de 1996.**

Directores de Tesis:

Dr. Hermann M. Niemeyer

Dr. Juan J. Armesto



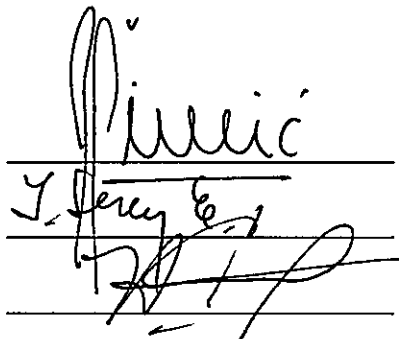
Handwritten signatures of Hermann M. Niemeyer and Juan J. Armesto, each on a horizontal line.

Comisión de Evaluación de Tesis:

Dr. Francisco Bozinovic

Dr. Italo Serey

Dr. Victor Argandoña



Handwritten signatures of Francisco Bozinovic, Italo Serey, and Victor Argandoña, each on a horizontal line.

A mi mamá, por todo.

AGRADECIMIENTOS

Es mi deber agradecer a la Red Latinoamericana de Botánica (RLB) por la beca de postgrado (93-M8) que permitió la realización de mis estudios de Maestría en esta facultad. Asimismo, agradezco al International Program in the Chemical Sciences (IPICS) por el financiamiento al Laboratorio de Química Ecológica que permitió la ejecución de mi tesis. Mi sostenimiento durante el último periodo de estudios es debido a fondos de la Cátedra Presidencial en Ciencias otorgada a Hermann Niemeyer.

Quiero agradecer además ...

...los valiosos comentarios y aportes de La Comisión de Evaluación de la Tesis que contribuyeron significativamente al estado final de ésta,

...a los académicos del programa de Ecología, en particular la confianza intuitiva de Javier (allá en el inicio de los tiempos) y el apoyo siempre generoso de mi amigo Pancho (al que le perdono lo de “basura del Rimac”),

...a Juan, destacando -además de los aspectos formativos- la grandeza de su colaboración.

Párrafo aparte para Hermann, quien con su apoyo incondicional y su estímulo constante logró, entre otras cosas, convertir a un estudiante graduado en un científico joven. Además, y eso no se olvida, siempre estuvo a mi lado en los momentos difíciles.

Los compañeros del laboratorio también aportaron lo suyo, a ellos también les agradezco. Lorena me ayudó a analizar las últimas muestras, por ello la menciono.

Aunque poco o nada tuvieron que ver con esta tesis, quiero mencionar igual a mis amigos de “aquellos tiempos duramente humanos” : Sergio, Lucho, Huguito.

Finalmente, a Manena, por ser y hacerme feliz.

PD : Agradezco también a Diego Maradona (él sabe por qué).

INDICE

	página
Lista de tablas	vii
Lista de figuras	viii
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
Respuestas Inducidas (RI). Antecedentes generales	5
El sistema áfidos-gramíneas-ácidos hidroxámicos	7
Costos de las RI. Antecedentes generales	9
Costos de las RI. El sistema áfidos-gramíneas-ácidos hidroxámicos	12
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
<i>Rhopalosiphum padi</i>	16
<i>Triticum uncaristatum</i>	16
RI en <i>T. uncaristatum</i> . Experimento básico	17
Persistencia de las RI	18
Evidencias de traslocación de Hx en las RI	18
Análisis cuantitativo de Hx en plantas	19

Estimación de costos de las RI en adecuación biológica de la planta	19
RESULTADOS	21
RI en <i>T. uniaristatum</i> . Experimento básico	21
Persistencia de las RI	22
Evidencias de traslocación de Hx en las RI	25
Costos de las RI en parámetros estimadores de adecuación biológica de la planta	28
Crecimiento (elongación) de las hojas	28
Producción de hojas	28
Tiempo hasta estadio de macolla	31
Biomasa final y mortalidad	31
DISCUSIÓN	33
RI en <i>T. uniaristatum</i> . Experimento básico	33
Persistencia de las RI	34
Evidencias de traslocación de Hx en las RI	36
Costos de las RI en parámetros estimadores de adecuación biológica de la planta	38
CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	45

LISTA DE TABLAS

		página
Tabla 1.	Concentración de DIBOA en la hoja primaria de plántulas de <i>T. uniaristatum</i> infestadas con áfidos <i>R. padi</i> y plántulas control 2, 4 y 8 días después de finalizada la infestación.	22
Tabla 2.	Concentración de DIBOA en la hoja secundaria de plántulas de <i>T. uniaristatum</i> infestadas con áfidos <i>R. padi</i> y plántulas control 2, 4 y 8 días después de finalizada la infestación.	23
Tabla 3.	Concentración de DIBOA en la hoja terciaria de plántulas de <i>T. uniaristatum</i> infestadas con áfidos <i>R. padi</i> y plántulas control 2, 4 y 8 días después de finalizada la infestación.	23
Tabla 4.	Concentración de DIBOA en los tallos de plántulas de <i>T. uniaristatum</i> infestadas con áfidos <i>R. padi</i> y plántulas control 2, 4 y 8 días de	24

LISTA DE FIGURAS

		página
Figura 1.	Diagrama de la cápsula-clip utilizada para los experimentos de infestación.	17
Figura 2.	Concentración de DIBOA en plántulas de <i>T. uniaristatum</i> infestadas con 20 áfidos <i>R. padi</i> y plántulas control.	21
Figura 3.	Regresión lineal entre $\ln (K-N / N)$ y $t =$ días después del inicio de la infestación, para plantas de <i>T. uniaristatum</i> infestadas con áfidos <i>R. padi</i> y plantas control.	30
Figura 4.	Distribución de frecuencia del tiempo requerido por plantas de <i>T. uniaristatum</i> control e infestadas con áfidos <i>R. padi</i> para alcanzar el estadio de macolla.	31
Figura 5.	Distribución de frecuencia de la mortalidad de plantas de <i>T. uniaristatum</i> control e infestadas con áfidos <i>R. padi</i> durante el experimento de evaluación de costos de RI.	32

RESUMEN

Las plantas pueden presentar cambios en su metabolismo secundario debido al daño infligido por insectos herbívoros. Tanto la magnitud como la dinámica de esas respuestas inducidas (RI) afectan el presupuesto de recursos de la planta y su nivel de resistencia a la herbivoría, estableciéndose una relación de costo/beneficio de esas respuestas. Se estudió las respuestas inducidas en el trigo silvestre *Triticum uniaristatum* por infestación del áfido *Rhopalosiphum padi*, analizando la acumulación de ácidos hidroxámicos (Hx) en el tejido vegetal infestado.

Dado que las RI pueden ser metabólicamente costosas para la planta, al asignar a defensa recursos que podrían ser utilizados en otras funciones como crecimiento o reproducción, se determinó la existencia de dichos costos en términos de parámetros relativos a la adecuación biológica de la planta. Previamente se estableció que el proceso fisiológico detrás de las RI de Hx no reflejaba un aumento en la síntesis local de Hx de la zona dañada (un proceso energéticamente costoso) sino una traslocación de Hx desde órganos no dañados (un proceso que no es significativamente costoso en términos metabólicos). Esta aproximación fisiológica inicial sirvió como elemento para predecir la inexistencia de costos de esas RI. Esto se confirmó al evaluar parámetros estimadores de la adecuación biológica de la planta relativos al crecimiento y desarrollo; no hubo diferencia en los parámetros evaluados

en plantas control y plantas "inducidas" (plantas que recibieron una breve infestación controlada de áfidos).

Adicionalmente se evaluó la dinámica espacial y temporal del fenómeno de RI, extendiéndose el análisis de Hx a todos los órganos de la planta y evaluando la persistencia en el tiempo de la inducción de Hx.. Estos resultados se discutieron en el marco de la teoría de Defensa Optima de plantas, conduciendo parcialmente a una verificación de las predicciones emergentes de dicha teoría general.

Esta tesis ilustra la posibilidad de proyectar patrones a nivel ecológico a partir de aproximaciones a nivel fisiológico de los procesos de asignación de recursos en plantas.

ABSTRACT

Damage to plant tissues by herbivorous insects may induce changes in the secondary metabolism of the plant. The amount and the dynamics of those induced responses (IR) affect the resource budget of the plant as well as its resistance against herbivory, establishing a cost/benefit relationship of those responses. The induced responses on the wild wheat *Triticum uniaristatum* upon infestation by the aphid *Rhopalosiphum padi* were studied. Hydroxamic acids (Hx) accumulation was analyzed in the plant tissue.

Since IR may impose a metabolic cost to the plant by allocating to defense resources otherwise available to growth or reproduction, the existence of such costs -expressed as fitness parameters- was determined. It was previously ascertained that the IR were not a consequence of enhanced local synthesis of Hx at the infested tissue but the result of the significantly less costly translocation of Hx from uninfested organs. This initial physiological approach led to the prediction of a lack of costs of such IR. This was later confirmed by evaluating plant fitness parameters related to growth and development. No significant difference was found between control and "induced" plants (subjected to a short-term controlled aphid infestation).

In addition, the temporal and spatial dynamics of such IR were assessed, extending the analysis of Hx to all the organs of the plant and evaluating the persistence through time of the

Hx induction. These results were discussed in the framework of the Optimal Defense theory, leading to a partial verification of the predictions arising from such general theory.

This thesis shows that patterns of resource allocation in plants at a physiological level may lead to predictions dealing with patterns at an ecological level .

INTRODUCCIÓN

Respuestas Inducidas (RI). Antecedentes generales

En una interacción de herbivoría, el daño a los tejidos de una planta puede inducir cambios en su metabolismo secundario ("respuestas inducidas", **RI**) y afectar negativamente a los herbívoros (Green & Ryan 1972, Carroll & Hoffman 1980, Edwards & Wratten 1983, Karban & Carey 1984, Edwards & Wratten 1985, Bryant *et al.* 1991, Rausher *et al.* 1993, Seldal *et al.* 1994). En hojas dañadas por insectos herbívoros se ha detectado decrecimientos en los niveles de nutrientes (Ciepiela 1989) así como aumentos en las concentraciones de metabolitos secundarios, tales como inhibidores de proteasas (Ryan 1978), compuestos fenólicos (Baldwin & Schultz 1983), terpenos (Tallamy & McCloud 1991), alcaloides (Baldwin 1988), furanocumarinas (Zangerl 1990), y ácidos hidroxámicos (Niemeyer *et al.* 1989a).

Como consecuencia de dichas RI, en algunos casos los insectos experimentan reducción en su tasa de crecimiento, disminución de su fecundidad y aumento de su mortalidad (Schultz & Baldwin 1982, Redak & Capinera 1994, Neuvonen *et al.* 1988, Hanhimäki 1989). También pueden verse afectados el comportamiento de los insectos, la palatabilidad de la planta y la distribución espacial de especies fitófagas en la planta (Wratten *et al.* 1984, Gibberd *et al.* 1988, Raupp & Sadof 1989). Asimismo, recientemente se ha resaltado la importancia de la dispersión del daño en la planta -probablemente como consecuencia de cambios locales inducidos- tanto en términos de una mayor exposición de los

herbívoros a enemigos naturales (Wratten *et al.* 1988) como en la determinación de la competitividad de la planta (Edwards *et al.* 1992, Marquís 1992a).

Las respuestas de las plantas al daño por herbívoros abarcan escalas espaciales que van desde hojas individuales hasta plantas enteras y escalas temporales que van desde minutos hasta tiempo evolutivo (Karban & Myers 1989). Una amplia extensión espacial de la respuesta al interior de la planta ha sido considerada como indicativa del carácter sistémico de ella (Makus *et al.* 1980, Haukioja & Hanhimäki 1985, Karban 1986) aunque no siempre se ha verificado (Tuomi *et al.* 1988). Las RI no necesariamente involucran síntesis *de novo*; el daño puede poner en contacto enzimas y sustratos preformados y producir las moléculas responsables del efecto sobre los herbívoros (Hartley & Lawton 1991). El tiempo que demora en producirse la respuesta inducida y su duración determinan si ésta afecta a los individuos que produjeron el daño (*e.g.* Tallamy 1985) o a futuros atacantes de la planta (*e.g.* Leather 1993).

El fenómeno de RI, como todo fenómeno biológico, no es de naturaleza fija o inmutable. Se ha descrito que las RI pueden ser moduladas por características de la planta tales como genotipo, ontogenia y estado fenológico (Coleman & Jones 1991) así como por el genotipo, historia de vida o conducta del herbívoro (Faeth 1991, Gianoli *et al.*, datos no publicados: ver Apéndice, 1); adicionalmente, se ha encontrado que las condiciones ambientales en las cuales ocurre la interacción planta-herbívoro pueden ser determinantes en el fenómeno mencionado (Karban 1987, Gianoli & Niemeyer 1996: ver Apéndice, 2).

El sistema áfidos-gramíneas-ácidos hidroxámicos

Los ácidos hidroxámicos (Hx) están presentes tanto en gramíneas cultivadas (trigo, maíz y centeno) como en gramíneas silvestres (Niemeyer 1988a), encontrándose en muchas especies del género *Triticum* (Niemeyer 1988b). Se han descrito correlaciones inversas entre los niveles de Hx -tanto en plantas (maíz y trigo) como en dietas artificiales- y la sobrevivencia, tasa de crecimiento y peso de adultos de distintas especies de áfidos de los cereales (Argandoña *et al.* 1980, 1981, 1983, Zúñiga *et al.* 1983, Corcuera *et al.* 1985, Bohidar *et al.* 1986, Leszczynski *et al.* 1989, Niemeyer *et al.* 1989b, Thackray *et al.* 1990). Los Hx están presentes en el mesófilo de la hoja, haces vasculares (específicamente floema) y raíces (Argandoña *et al.* 1981, 1987, Givovich *et al.* 1994). Los Hx se encuentran naturalmente en la planta en forma de glucósidos, los cuales son hidrolizados por la acción de enzimas presentes en los tejidos que han sufrido daño (Hofman & Hofmanová 1971) liberándose de esta manera las agluconas, de mayor actividad biológica que los glucósidos (Corcuera *et al.* 1985). Las agluconas aisladas de extractos de especies del género *Triticum* son el DIMBOA (2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona) y su análogo demetoxilado DIBOA (Niemeyer *et al.* 1992).

Los Hx no son los únicos metabolitos secundarios presentes en el género *Triticum* que han sido relacionados con la resistencia a áfidos de los cereales. Se ha evaluado la deterrencia (disminución de la alimentación) de áfidos causada por flavonoides presentes en trigo administrados en dietas artificiales (Dreyer & Jones 1981). En otro estudio, la resistencia de plantas de trigo a áfidos estuvo significativamente correlacionada con la concentración de fenoles totales mas no con la de alcaloides indólicos (Leszczynski *et al.* 1989). Se ha descrito

también el efecto de componentes de las ceras epicuticulares del trigo sobre la colonización por áfidos (Lowe *et al.* 1985)

En el área de gramíneas-Hx se han publicado seis estudios en el tema de RI. Gutiérrez *et al.* (1988), infestando con lepidópteros, encontraron en dos cultivares de maíz aumentos del 42% y 96% en la concentración de Hx respecto a plantas no infestadas. También en maíz, Morse *et al.* (1991a, 1991b) encontraron un aumento en Hx del 18% y una disminución en la tasa de crecimiento (23%) y sobrevivencia (600%) de los áfidos criados en las plantas dañadas. Sin embargo, estos últimos trabajos emplearon daño artificial, lo que limita el alcance de sus conclusiones con respecto a la herbivoría (Hartley & Lawton 1987). Los trabajos que emplearon áfidos como agentes de daño en trigo encontraron distintos niveles de aumento de Hx. Niemeyer *et al.* (1989a) detectaron incrementos (rango: 15-96%) en la concentración de Hx en dos de los cuatro cultivares de trigo examinados. Similarmente, Leszczynski & Dixon (1990) encontraron aumentos (rango: 30-70%) en dos de cuatro cultivares de trigo evaluados. Finalmente, Thackray *et al.* (1988) informaron diferencias significativas en Hx y mortalidad de áfidos sobre plantas inducidas previamente. Trabajos recientes han encontrado RI en otros dos cultivares de trigo y en el trigo silvestre *Triticum uniaristatum* (Gianoli & Niemeyer, datos no publicados: ver Apéndice, 3).

Respecto a trabajos de RI en compuestos distintos a Hx, Leszczynski (1985) evaluó los cambios en la actividad de enzimas (Fenilalanina y Tirosina -amonio liasas) y concentración de fenoles en dos cultivares de trigo (resistente y susceptible) tras infestación con áfidos. Con respecto a fenoles, no hubo un patrón claro que diferenciara al cultivar resistente del susceptible. El cultivar susceptible presentó una mayor actividad de las enzimas mencionadas

tanto antes como después de la infestación, en comparación con el cultivar resistente. En consecuencia, es improbable que tales enzimas -tanto como elemento constitutivo como inducido- sean relevantes para la resistencia a áfidos de los cultivares de trigo. Por otro lado, se ha evaluado el efecto de la infestación por áfidos sobre la actividad de las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y glutatión reductasa en trigo y cebada (Argandoña 1994). Los resultados en trigo y cebada fueron opuestos. Este hecho sugiere que dichos cambios enzimáticos no serían un mecanismo general de respuesta a la herbivoría en gramíneas. Más aún, no se ha establecido una relación clara entre la actividad de dichas enzimas y la resistencia de gramíneas a áfidos.

Las evidencias presentadas permiten concluir que los Hx -sin ser los únicos metabolitos secundarios en *Triticum* asociados a resistencia a áfidos ni los únicos que modifican su concentración tras daño- son los metabolitos secundarios mejor conocidos respecto a su función defensiva en dicho género. En consecuencia, pueden definirse operacionalmente como la variable respuesta en el atributo "metabolitos de defensa en *Triticum*" e incluirse en los procedimientos experimentales que posteriormente se detallan.

Costos de las RL. Antecedentes generales

En el marco de la teoría de Defensa Óptima¹ (Mc Key 1974, Rhoades 1979), gran parte de la discusión concerniente a la evolución de defensas químicas en las plantas ha estado centrada

¹ La teoría de Defensa Óptima tiene 3 postulados fundamentales: i) Las defensas tienen un costo, ii) No todas las partes de la planta son igualmente valiosas, en adecuación biológica, para la planta, y iii) No todas las partes de la planta poseen la misma probabilidad de ser atacadas por herbívoros. En consecuencia, los patrones de asignación de defensas deben reflejar, en tiempo ecológico, la frecuencia y severidad de la herbivoría sufrida por la planta en tiempo evolutivo.

en la noción de que las defensas implican costos (Feeny 1976, Mooney & Gulmon 1982, Rosenthal 1986, Simms & Fritz 1990, Herms & Mattson 1992, Simms 1992a). En el fundamento de esta noción está el axioma que indica que, dado un presupuesto finito de recursos, la materia y energía asignadas a una función particular no pueden ser simultáneamente asignadas a otra función. El costo directo de la defensa es entonces equivalente a la cantidad de recursos dedicados a la producción y mantenimiento de la defensa. Este costo se ha estimado generalmente en un contexto biosintético, cuantificándose en términos de algún recurso limitante (Chew & Rodman 1979, Gershenzon 1994); sin embargo, se considera que los costos así obtenidos están subestimados pues no consideran los costos asociados con las estructuras especializadas de almacenamiento, la autotoxicidad, el transporte de precursores, etc. (Zangerl & Bazzaz 1992). Esta escala de observación de costos (nivel fisiológico) debería estar correlacionada con una aproximación a nivel ecológico (Bazzaz *et al.* 1987) donde se evalúan los costos indirectos de las defensas en plantas.

El costo indirecto de la defensa se define como la menor disponibilidad de recursos para una determinada función -generalmente referida a parámetros estimadores de la adecuación biológica de la planta- debido a la inversión de dichos recursos en defensa (Zangerl & Bazzaz 1992). Es decir, los beneficios de una reducción en las tasas de herbivoría se contraponen a los costos incurridos al destinar a metabolitos defensivos recursos que podrían asignarse a crecimiento o reproducción (Simms 1992a) (supuesto: cantidad limitada de recursos). En consecuencia, las plantas deberían asignar recursos para defensa sólo cuando y donde dicha asignación resultara en un aumento de su adecuación biológica (Fagerström *et al.* 1987). En este sentido, y siempre dentro de la perspectiva de la teoría de Defensa Óptima

(Mc Key 1974, Rhoades 1979), las defensas químicas inducidas resultarían menos costosas que las de tipo constitutivo, al ser producidas sólo en caso de necesidad (Karban & Myers 1989). Una de las dificultades que presenta la medición de los costos indirectos es la identificación de la(s) función(es) de un determinado metabolito. La discusión acerca de la naturaleza y función de los metabolitos considerados defensivos lleva ya más de tres décadas (Fraenkel 1959, Seigler & Price 1976, Haukioja 1980, Bryant *et al.* 1985, Tuomi 1992, Ohnmeiss & Baldwin 1994).

Numerosos estudios han intentado estimar los costos indirectos de las defensas constitutivas (Tester 1977, Dirzo & Harper 1982, Berenbaum *et al.* 1986, Simms & Rausher 1987, 1989, Baldwin *et al.* 1990, Vrieling & Van Wijk 1992) pero pocos han podido detectar experimentalmente la existencia de dichos costos (ver Simms 1992b). Por otro lado, son pocos los trabajos de este tipo orientados a las defensas inducidas por herbivoría de insectos (Brown 1988, Baldwin *et al.* 1990, Karban 1993) y sólo uno de ellos encontró evidencias de estos costos al constatar una disminución en la producción de semillas de las plantas inducidas (Baldwin *et al.* 1990). Una probable explicación a los diferentes resultados obtenidos en dichos estudios surge a partir del análisis de trabajos posteriores del mismo Baldwin (Ohnmeiss & Baldwin 1994, Baldwin *et al.* 1994) y se presenta a continuación.

Cuando las RI se evalúan solamente en el tejido que ha sufrido daño (como generalmente es el caso), no existe la certeza si el incremento local de la concentración del metabolito respuesta es consecuencia de un aumento en la tasa de síntesis del metabolito secundario o es el resultado de una traslocación de metabolitos ya formados desde otros órganos o tejidos intactos de la planta. Sin duda que los requerimientos energéticos para uno u

otro caso son distintos y por ende deben afectar de modo distinto las variables respuesta elegidas para cuantificar los costos. La mera traslocación de compuestos secundarios -en el caso de transporte vía floema- no debería significar un gasto energético significativo para la planta (Taiz & Seiger 1991); además, no se estaría cumpliendo con la condición del uso excluyente de un recurso, explicitada líneas arriba para justificar la existencia de costos indirectos. Por otro lado, un aumento en la tasa de síntesis del metabolito acarrearía un gasto energético para la planta. En consecuencia, la existencia de RI puede estar dando cuenta de al menos dos procesos fisiológicos distintos (síntesis activa o traslocación) con distintas implicancias energéticas. El procedimiento experimental preciso para distinguir claramente entre los procesos propuestos es el uso de compuestos con isótopos radiactivos (*e.g.* Baldwin *et al.* 1994). Sin embargo, como se discutirá más adelante, es posible realizar un acercamiento experimental más "grueso" que aún permita distinguir entre traslocación y síntesis y conduzca a la elaboración de hipótesis concernientes a los costos indirectos de las RI observadas.

Costos de las RI. El sistema áfidos-gramíneas-ácidos hidroxámicos

Se han determinado costos -en parámetros estimadores de adecuación biológica- de la resistencia a la herbivoría (sin analizar metabolitos secundarios) en maíz y cebada. La resistencia a un lepidóptero en maíz estuvo correlacionada inversamente con la producción del cultivo (Klenke 1985 citado en Simms 1992a). En cebada, la tolerancia a áfidos mostró una correlación inversa con la biomasa a los 25 días de edad (Castro *et al.* 1988) aunque estudios previos encontraron evidencias opuestas (Windle & Franz 1979). Con respecto a Hx, se ha encontrado que la concentración de Hx constitutivos en plántulas de diversos cultivares de

trigo no tiene una relación estadísticamente significativa con el rendimiento del cultivo (Gianoli *et al.* 1996: ver Apéndice, 4).

En relación a RI, se encontró que -bajo distintas condiciones ambientales- las tasas de crecimiento de plántulas de trigo estaban significativa e inversamente correlacionadas con el nivel de inducción de Hx que presentaban (Gianoli & Niemeyer 1996: ver Apéndice, 5). Esto sugeriría la existencia de un costo de las RI en dicho sistema si este patrón se mantuviese post-infestación. Aunque la variable cuantificada no fue un parámetro típico de la adecuación biológica (relacionado con sobrevivencia o reproducción) , se ha afirmado que la tasa de crecimiento es una buena medida estimativa proximal de la adecuación biológica de la planta (Fagerström 1989) y de su capacidad competitiva (Tilman 1986). Por otro lado, Gutiérrez *et al.* (1988) no encontraron evidencias de traslocación de Hx desde las hojas infestadas hacia el tallo de las plántulas de maíz. En consecuencia, se podría especular que el proceso detrás de estas RI observadas implicaría gasto energético.

La metodología aplicada en los trabajos citados de RI en gramíneas (infestación localizada en una hoja, generalmente hoja primaria) permite un acercamiento "grueso" al problema de discriminar entre traslocación y síntesis. Ya que las RI se cuantifican solamente en la hoja infestada, la extensión del análisis de Hx a todos los otros órganos (hoja secundaria, tallo y raíz) podría permitir estimar si ocurrió una traslocación o no. Efectuada dicha discriminación entre procesos, sus consecuencias sobre los costos indirectos de las RI de Hx en el género *Triticum* pueden ser predichas y puestas a prueba.

En consecuencia, la hipótesis de trabajo es que si las RI observadas reflejan una síntesis aumentada de Hx antes que traslocación desde otros órganos, entonces las RI

deberían tener costos directos (metabólicos) e indirectos (expresados en parámetros estimadores de adecuación biológica).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo e Hipótesis General

Determinar la existencia de costos de las defensas (Hx) inducidas por infestación de áfidos en el trigo silvestre *Triticum uniaristatum*.

Hipótesis: Dichos costos existen si las RI observadas reflejan síntesis activa de Hx antes que traslocación desde otros órganos de la planta.

Objetivos Específicos

1. Confirmar la existencia de RI en *T. uniaristatum* por infestación del áfido *R. padi*.
2. Caracterizar la dinámica espacial y temporal del fenómeno de RI.
3. Estimar si la RI observada en *T. uniaristatum* es el resultado de una síntesis activa antes que de una traslocación desde otros órganos.
4. Determinar los costos indirectos de las RI en términos de parámetros de adecuación biológica de la planta en la etapa pre-reproductiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Rhopalosiphum padi

El áfido de los cereales *Rhopalosiphum padi* L. (Homoptera : Aphididae : Aphidinae) presenta una amplia distribución en gramíneas silvestres y cultivadas de regiones templadas, ocasionando daño a las plantas tanto por la succión de nutrientes de la savia como por la transmisión de virus fitopatógenos (Leather & Dixon 1982, Leather *et al.* 1989). Numerosos estudios han evaluado la interacción de este áfido con los Hx de gramíneas (Thackray *et al.* 1990, Givovich & Niemeyer 1991, Givovich & Niemeyer 1995, Givovich *et al.* 1994).

Triticum uniaristatum

El trigo silvestre *Triticum uniaristatum* L. (*Aegilops uniaristata* L.) (Gramineae : Triticeae : Triticinae) es una especie anual de hábito ruderal, típica de formaciones esclerófilas y hábitats perturbados (Kimber & Feldman 1987). Esta especie diploide pertenece a la misma tribu que las especies diploides de trigos ancestrales que dieron origen al trigo hexaploide (*Triticum aestivum* L.) que se cultiva actualmente (Feldman & Sears 1981). Se ha evaluado su resistencia a áfidos (Holubec *et al.* 1993) y a nemátodos (Dosba & Rivoal 1982) como posible fuente de resistencia a herbívoros en cereales. Esta especie contiene Hx (Niemeyer *et al.* 1992) y experimentos preliminares mostraron que presenta RI por herbivoría de áfidos (Gianoli & Niemeyer, no publicado: ver Apéndice, 3).

RI en *T. uniaristatum*. Experimento básico

Los experimentos se desarrollaron en cámaras de crecimiento Conviron-E7 a 15°C de temperatura y fotoperiodo 12/12. Las plántulas se sembraron en recipientes plásticos de 25 ml de capacidad, siendo el sustrato tierra de hojas (Anasac). El experimento básico consistió en la infestación de plántulas de *T. uniaristatum* en el estadio de crecimiento No. 12 de la escala de Zadoks *et al.* (1974) (hoja primaria totalmente desenrollada, hoja secundaria visible) con 20 áfidos ápteros *R. padi* de segundo y tercer estadio ninfal confinados en cápsulas-clip diseñadas para tal fin. Estas cápsulas se colocaron en la región distal de la hoja primaria de las plántulas (a 2 cm del ápice) (Fig. 1). Como control se utilizaron plántulas similares con cápsulas sin áfidos. Pasado el tiempo de infestación (48h), la hoja primaria completa se procesó de acuerdo a Niemeyer *et al.* (1989a) (ver detalles más adelante). Mediante el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se determinó la concentración de Hx para los distintos tratamientos. Las comparaciones se hicieron efectuando análisis de varianza (ANOVA) de una vía (n=8).

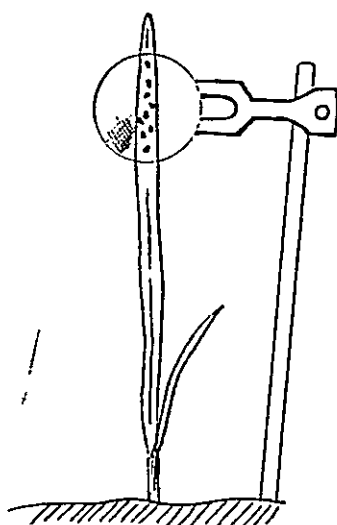


Figura 1. Diagrama de la cápsula-clip utilizada para los experimentos de infestación

Persistencia de las RI

Con el fin de estimar la ventana temporal en la cual se manifestarían los hipotéticos costos de RI, se determinó la persistencia temporal del fenómeno. Se repitió el experimento básico descrito previamente, variándose el tiempo post-infestación transcurrido antes del análisis de Hx. Los tratamientos fueron: 2, 4 y 8 días después de finalizada la infestación, utilizándose para cada uno de estos tratamientos un grupo de plantas control y otro de plantas infestadas (n=8). La persistencia de la inducción se evaluó mediante ANOVA's de una vía al final de cada periodo. Se analizó por separado las hojas primaria, secundaria y terciaria, y el tallo.

Evidencias de traslocación de Hx en las RI

Para estimar si el aumento de Hx tras la infestación en hoja primaria ocurría a expensas de un decremento de Hx en otro órgano no dañado, se repitió el experimento básico extendiéndose el análisis de Hx en ambos tratamientos a la hoja secundaria, tallo y raíz. Luego de obtener las cantidades brutas de Hx presentes en cada órgano, se hicieron análisis de la asignación proporcional de Hx a cada órgano. Esta asignación proporcional, expresada en razones (Hx-órgano) / (Hx-total en planta) fue -tras aplicarle la transformación arco seno- comparada entre tratamientos (control vs infestado) mediante ANOVA's de una vía. Previamente se determinó si las cantidades totales de Hx por planta eran significativamente diferentes entre tratamientos para evaluar la ocurrencia de un aumento en la tasa de síntesis y, caso contrario, para poder establecer una comparación legítima entre asignaciones proporcionales en cada tratamiento.

Tal como se indicara en la Introducción, el resultado del experimento de estimación de traslocación sirvió como base para determinar la existencia de costos indirectos de las RI.

Análisis cuantitativo de Hx en plantas

El tejido vegetal a analizar (20-50 mg) se pesó en una balanza analítica Shimadzu-L160 y luego se trozó y maceró en 1 ml de agua destilada en un mortero, usando arena de mar como medio abrasivo. El extracto acuoso se dejó a temperatura ambiente por 10 min y luego se llevó a pH 3 mediante la adición de 2 gotas de H_3PO_4 0.1 N (esto facilita la precipitación de las proteínas presentes). El extracto luego se centrifugó a 13,000 RPM por 15 min, se recogió el sobrenadante y se congeló hasta el momento de inyectarse. Para la HPLC, una alícuota de 50 μ l se inyectó en un cromatógrafo Shimadzu-LC9A con una columna Lichrospher-C18 RP-100. Se aplicó el siguiente programa de composición entre los solventes A (MeOH) y B (0.5 ml H_3PO_4 en 1 l H_2O): 0 a 7 min, 30% A; 7 a 9 min, 0% A; 9 a 15 min, 30% A. El flujo total de solventes fue constante (1.5 ml/min) La detección se llevó a cabo a 263 nm. El tiempo de retención del DIBOA (2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona), el Hx principal en *T. uncaristatum* (Niemeyer *et al.* 1992), fue de 3.2 ± 0.3 min.

Estimación de costos de las RI en adecuación biológica de la planta

En una primera etapa -realizada en el laboratorio- se efectuó el experimento básico de infestación en plántulas crecidas en recipientes plásticos de 2.5 l de capacidad (n=31) con tierra vegetal como sustrato. Una vez finalizada la infestación se trasladaron los recipientes (fecha: 1 de diciembre de 1995) a un invernadero de fibra de carbono laminada CARBOLUX de dimensiones 2 x 2.5 x 2.5 m (largo x ancho x alto). Los recipientes fueron ubicados alternadamente para cumplir con el principio de inter-dispersión (Hurlbert 1984). Al interior del invernadero las plantas recibieron una intensidad de luz en el rango de 30-50 Klux. La

temperatura fluctuó considerablemente, estableciéndose una T mínima en el rango de 12-20 °C y una T máxima en el rango de 29-36 °C.

Con el fin de determinar en ambos tratamientos (control vs infestado) parámetros estimadores de la adecuación biológica de la planta se consignó lo siguiente : i) fecha de aparición de hojas nuevas, ii) crecimiento (elongación) de las hojas antes de alcanzar el estadio fenológico de macolla, iii) tiempo hasta alcanzar el estadio de macolla y iv) mortalidad a lo largo de todo el experimento. Cuatro meses después de iniciado el experimento se cortaron las plantas para determinar su biomasa total seca. Inicialmente se propuso evaluar parámetros estimadores de adecuación biológica post-reproductivos (*e.g.* número y peso de semillas) pero esto no fue posible dado que las plántulas de *T. uniaristatum* no pudieron recibir el estímulo de vernalización requerido para floración (T.E. Miller, comunicación personal) debido a la temporada en la cual fueron sembradas (fines de la primavera).

Los procedimientos y análisis estadísticos aplicados para cada parámetro evaluado son detallados en el capítulo de Resultados.

RESULTADOS

RI en *T. uniaristatum*. Experimento básico

Tal como se observara en experimentos preliminares, la infestación con áfidos produjo un aumento de la concentración de Hx (mmol / kg peso fresco) en la hoja infestada (hoja primaria) con respecto a la misma hoja de plántulas control (Media \pm ES: 0.214 ± 0.019 y 0.125 ± 0.028 , respectivamente). Esta diferencia fue estadísticamente significativa: $F(1,14) = 6.99$, $P = 0.019$, ANOVA de una vía (Fig. 2).

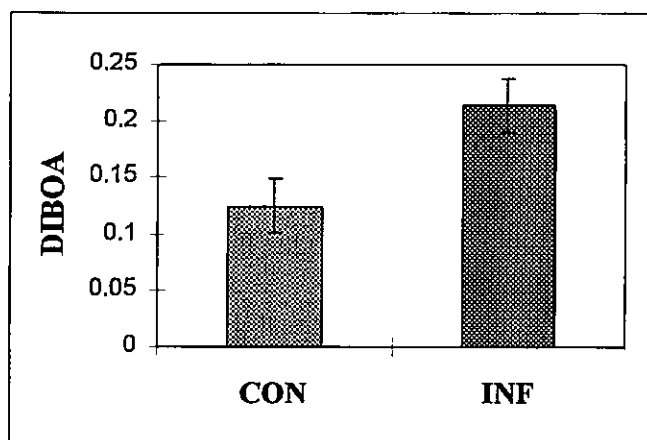


Figura 2. Concentración de DIBOA (mmol / kg peso fresco) en plántulas de *T. uniaristatum*.

INF = plántulas infestadas con 20 áfidos *R. padi*, CON = plántulas control. (n = 8)

Persistencia de las RI

En general, se observó el mismo patrón de acumulación de Hx descrito para trigo (Argandoña *et al.* 1981), *i.e.*, mayor concentración de Hx en la hoja más joven de la plántula y decrecimiento del nivel de Hx con la edad en cada hoja después de alcanzar un máximo en los primeros días.

Con respecto a la hoja primaria se encontró que, a pesar de mantenerse la tendencia de mayor concentración de Hx en el tratamiento infestado, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 1). Es decir que no se mantuvo el nivel de Hx inducido de la hoja que se observó inicialmente (Fig. 2).

Tabla 1. Concentración de DIBOA (mmol / kg peso fresco) (Media \pm Error Estándar) en la hoja primaria de plántulas de *T. uniaristatum* infestadas con áfidos *R. padi* (INF) y plántulas control (CON) (n = 8) 2, 4 y 8 días después de finalizada la infestación (ddfi).

	CON	INF	P
2ddfi	0.256 \pm 0.025	0.314 \pm 0.034	0.180
4ddfi	0.265 \pm 0.026	0.373 \pm 0.087	0.231
8ddfi	0.253 \pm 0.047	0.299 \pm 0.034	0.435

En la hoja secundaria no se encontró diferencias significativas en concentración de Hx entre tratamientos (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de DIBOA (mmol / kg peso fresco) (Media \pm Error Estándar) en la hoja secundaria de plántulas de *T. uniaristatum* infestadas con áfidos *R. padi* (INF) y plántulas control (CON) (n = 8) 2, 4 y 8 días después de finalizada la infestación (ddfi).

	CON	INF	P
2ddfi	1.689 \pm 0.351	2.174 \pm 0.479	0.312
4ddfi	1.220 \pm 0.286	0.705 \pm 0.182	0.067
8ddfi	0.351 \pm 0.059	0.549 \pm 0.114	0.153

Con respecto a la hoja terciaria, no se encontró diferencias significativas ni 2 ni 4 ddfi, en el caso del tratamiento 2ddfi hubo menor número de réplicas (n=3) dado que esa hoja no había aparecido en todas las plantas para esa fecha. Sin embargo, en el tratamiento 8ddfi se observó una diferencia significativa entre tratamientos, apareciendo inducida (en nivel de Hx) la hoja terciaria del tratamiento infestado (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración de DIBOA (mmol / kg peso fresco) (Media \pm Error Estándar) en la hoja terciaria de plántulas de *T. uniaristatum* infestadas con áfidos *R. padi* (INF) y plántulas control (CON) (n = 8) 2, 4 y 8 días después de finalizada la infestación (ddfi).

	CON	INF	P
2ddfi	2.491 \pm 1.361	3.361 \pm 0.844	0.588
4ddfi	2.541 \pm 0.547	1.688 \pm 0.407	0.324
8ddfi	1.843 \pm 0.184	2.930 \pm 0.270	0.008

Finalmente, en los tallos se encontró una inducción de Hx 2ddfi en el tratamiento infestado. Esta diferencia desapareció pasados 2 días más (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración de DIBOA (mmol / kg peso fresco) (Media \pm Error Estándar) en los tallos de plántulas de *T. uncaristatum* infestadas con áfidos *R. padi* (INF) y plántulas control (CON) (n = 8) 2, 4 y 8 días después de finalizada la infestación (ddfi).

	CON	INF	P
2ddfi	1.969 \pm 0.170	2.996 \pm 0.271	0.014
4ddfi	3.812 \pm 0.411	3.059 \pm 0.353	0.213
8ddfi	3.109 \pm 0.406	4.438 \pm 0.908	0.162

Evidencias de traslocación de Hx en las RI

Inicialmente se determinó que la cantidad total de Hx no fuera diferente entre tratamientos. Esto se hizo con el fin de: i) descartar la posibilidad de un aumento en la tasa de síntesis de Hx en las plantas infestadas y ii) legitimar la comparación de asignaciones proporcionales de Hx para cada órgano. No hubo diferencias significativas: $F(1,14) = 4.75$, $P = 0.845$ en la cantidad total de Hx (μmoles , Media \pm Error Estándar) entre las plántulas infestadas (0.215 ± 0.029) y las plántulas control (0.221 ± 0.011).

Al extender el análisis de Hx a todos los órganos de la planta se encontró que, adicionalmente a la diferencia significativa en la cantidad de Hx en hoja primaria (H1) entre plantas infestadas y control, el tallo (Ta) de plantas control mostraba una mayor cantidad de Hx que el tallo de plantas infestadas. Aunque esta diferencia no fue significativa sugirió una posible traslocación de Hx desde el tallo hacia la H1. No hubo diferencias significativas entre tratamientos para la hoja secundaria (H2) ni para la raíz (Ra) (Tabla 5).

Tabla 5. Cantidad de DIBOA ($\mu\text{moles} \times 10^2$) (Media \pm Error Estándar) en órganos de plántulas de *T. uniaristatum* infestadas con áfidos *R. padi* (INF) y plántulas control (CON) (n = 8). H1= hoja primaria, H2= hoja secundaria, Ta= tallo, Ra= raíz.

	CON	INF	P
H1	0.492 \pm 0.029	0.727 \pm 0.079	0.041
H2	10.197 \pm 1.382	11.132 \pm 0.782	0.601
Ta	9.816 \pm 1.017	7.370 \pm 0.689	0.112
Ra	1.775 \pm 0.238	1.744 \pm 0.271	0.931

Para evaluar adecuadamente la posible traslocación sugerida por estos resultados se analizó la asignación proporcional de Hx (cantidad en bruto) para H1 y cada uno de los otros órganos, al interior de cada tratamiento. En la tabla 6 se observa que la asignación proporcional relativa de Hx entre la H1 y los órganos no infestados sólo fue diferente entre tratamientos para el par Ta / H1, lo cual apoyó la idea sugerida de traslocación de Hx desde el tallo hacia la hoja infestada.

Tabla 6. Asignación proporcional relativa de Hx (μ moles, Media \pm Error Estándar) entre la hoja primaria y los órganos no infestados en plántulas infestadas (INF) por áfidos *R. padi* y plántulas control de *T. uniaristatum* (n=8). H1= hoja primaria, H2= hoja secundaria, Ta= tallo, Ra= raíz.

	CON	INF	P
Ta / H1	10.208 \pm 1.173	5.713 \pm 0.761	0.007
H2 / H1	16.320 \pm 2.242	13.915 \pm 3.505	0.574
Ra / H1	5.284 \pm 0.618	3.769 \pm 0.739	0.142

Esta evidencia apoyó aún más la sugerencia de traslocación desde el tallo hacia la hoja primaria tras la infestación. En consecuencia, y tal como se adelantara en la introducción, al ser el proceso de traslocación un proceso que no involucra costos metabólicos significativos para la planta, la predicción que emergió fue que no se observarían costos indirectos (expresados en parámetros estimadores de adecuación biológica de la planta) de estas RI en *T. uniaristatum* por infestación de *R. padi*.

Costos de las RI en parámetros estimadores de adecuación biológica de la planta

Crecimiento (elongación) de las hojas

Se midió el crecimiento en mm de las hojas primaria (H1) y secundaria (H2) 3 y 7 días después de finalizada la infestación. Tal como se aprecia en la tabla 7, no hubo diferencias significativas (ANOVA Kruskal-Wallis de una vía) entre las plántulas control y las infestadas en los parámetros evaluados, siendo las diferencias menos significativas en la evaluación a los 7 días lo cual hizo desestimar evaluaciones posteriores. En consecuencia, no se detectaron costos de las RI a este nivel.

Tabla 7. Crecimiento (mm, Media \pm Error Estándar) de las hojas primaria (H1) y secundaria (H2) 3 y 7 días después de finalizada la infestación (ddfi). Plántulas infestadas (INF) por áfidos *R. padi* y plántulas control de *T. uniaristatum* (n=30).

	3 ddfi		7 ddfi	
	H1	H2	H1	H2
CON	1.43 \pm 0.96	13.90 \pm 1.59	1.73 \pm 0.69	37.95 \pm 5.30
INF	0.04 \pm 0.04	16.72 \pm 1.75	0.76 \pm 0.22	42.35 \pm 4.23
P >	0.23	0.30	0.79	0.48

Producción de hojas

El número promedio de hojas producidas hasta 15 días después del fin de la infestación, por plantas que sobrevivieron hasta el estadio de macolla, no fue significativamente

diferente ($F(1,36) = 0.35$, $P = 0.5569$) entre plantas infestadas (INF) o control (CON):
 CON = 3.76 ± 0.20 , INF = 3.90 ± 0.14 (Media \pm Error Estándar).

Para obtener una estimación más precisa de la dinámica de la producción de hojas, se calculó la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r_m) de las hojas en cada tratamiento (considerando a las hojas en cada tratamiento como una población).

Deducción:

Ecuación Logística:
$$\frac{dN}{dt} = \frac{r_m N(K - N)}{K}$$

tras transformar e integrar:
$$\ln \frac{K - N}{N} = c - r_m t$$

Esta expresión tiene la forma de la ecuación de una recta ($y = mx + b$) y por lo tanto permite realizar una regresión lineal ($Y = \ln(K - N / N)$, $X = t$; Fig. 3) y obtener el valor de la pendiente = $-r_m$; donde K = número total promedio de hojas producidas en cada tratamiento, N = número promedio de hojas producidas en cada tratamiento (al tiempo t) y t = días después del inicio de la infestación.

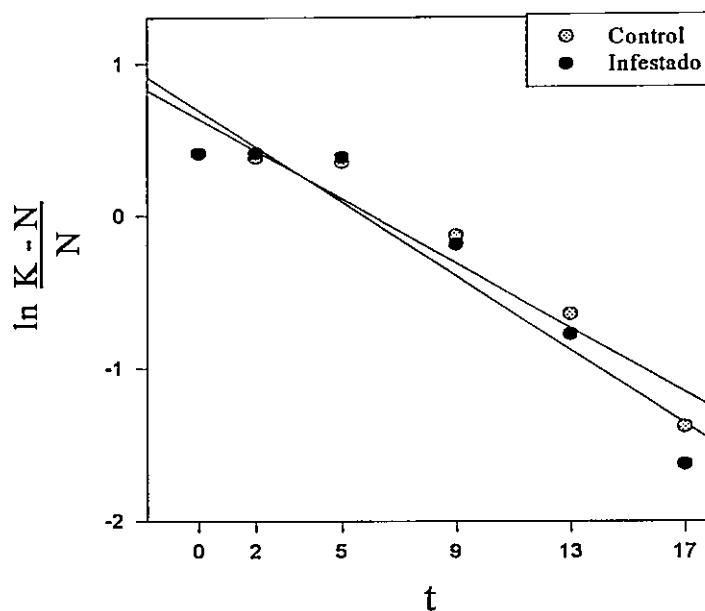


Figura 3. Regresión lineal entre $\ln (K-N / N)$ y $t =$ días después del inicio de la infestación para plantas de *T. uniaristatum* infestadas con áfidos *R. padi* y plantas control ($r^2 = 0.92$, $P < 0.01$ para ambos tratamientos)

Los valores de r_m así obtenidos fueron: r_m Plantas control = 0.1056, r_m Plantas infestadas = 0.1210. La comparación estadística de estos valores se hizo mediante una prueba F de homogeneidad de pendientes: $F (1,6) = 5.99$, $P > 0.95$. En consecuencia, tampoco se manifestaron costos de las RI a este nivel.

Tiempo hasta estadio de macolla

Para evaluar si las RI afectaron el tiempo requerido por las plantas para alcanzar el estadio de desarrollo de macolla se hizo una comparación de distribuciones de frecuencia (Fig. 4). Tras aplicar una prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras (dos colas) se concluyó que no hubo diferencias significativas entre las muestras al nivel $\alpha = 0.05$.

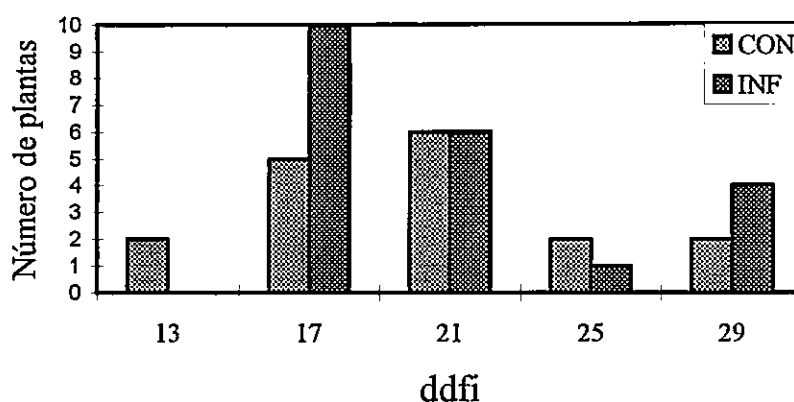


Figura 4. Distribución de frecuencia del tiempo requerido por plantas de *T. uniaristatum* control (CON) e infestadas (INF) con áfidos *R. padi* para alcanzar el estadio de macolla (ddfi = días después del fin de la infestación).

Biomasa final y mortalidad

Pasados cuatro meses de crecimiento en invernadero, y en vista de la imposibilidad de obtener semillas de las plantas (ver Materiales y Métodos), las plantas de ambos tratamientos se cortaron y se llevaron a una estufa Memmert a 70 °C por 48 h. A

continuación se determinó la biomasa aérea en una balanza Shimadzu EB2800. Las biomásas ($g \pm$ Error Estándar) así determinadas fueron 8.07 ± 0.45 y 7.71 ± 0.62 para plantas control e infestadas, respectivamente. No hubo diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA: $F(1,30) = 0.22$, $P = 0.643$.

La mortalidad de las plantas, desde el inicio del tratamiento de infestación hasta el final del experimento, fue muy similar para cada tratamiento: 50 % para las plantas control y 45 % para las plantas infestadas. Por otro lado, la distribución de frecuencia de mortalidad entre tratamientos fue similar (Fig. 5) Tras aplicar una prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras (dos colas) se concluyó que no hubo diferencias significativas entre las muestras al nivel $\alpha = 0.05$.

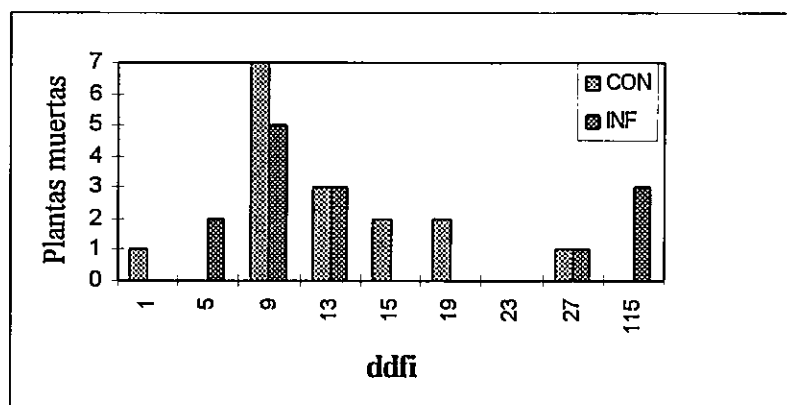


Figura 5. Distribución de frecuencia de la mortalidad de plantas de *T. uniaristatum* control (CON) e infestadas (INF) con el áfido *R. padi* durante el experimento de evaluación de costos de RI (ddfi = días después del fin de la infestación).

DISCUSIÓN

RI en *T. uniaristatum*. Experimento básico

El aumento en la concentración de Hx tras la infestación en la hoja primaria (71%) fue de magnitud relativamente grande en comparación con los antecedentes publicados en trigo por infestación de áfidos (Niemeyer 1989, Leszczynski & Dixon 1990) los que mostraron RI de Hx en el rango de 15 a 96%. Rangos similares de RI se han encontrado en otras gramíneas, tanto para Hx (Gutiérrez *et al.* 1988, Morse *et al.* 1991a, Morse *et al.* 1991b) como para otros compuestos (Leszczynski 1985, Cabrera *et al.* 1994, Muñoz *et al.* 1994).

Se ha señalado que la intensidad del daño inicial sufrido por la planta puede determinar la magnitud de las RI (Karban 1991). En este estudio, 20 áfidos por plántula fueron suficientes para generar las RI. Otros experimentos en *T. uniaristatum* mostraron que el nivel de RI no fue diferente utilizando densidades mayores de áfidos (Gianoli & Niemeyer, datos no publicados: ver Apéndice, 6). Por otro lado, se ha encontrado en *T. aestivum* que densidades de áfidos menores a las utilizadas en este experimento (20 áfidos / plántula) no son capaces de generar RI (Gianoli & Niemeyer, datos no publicados: ver Apéndice, 7). En consecuencia, al menos para dos especies del género *Triticum*, el fenómeno de RI sería aparentemente de naturaleza discreta, requiriendo un nivel de daño

mínimo (umbral de daño) para manifestarse pero permaneciendo invariante a magnitudes mayores de daño este nivel inducido.

Esto a primera vista parecería estar en contradicción con los postulados de la teoría de Defensa Óptima, pues se esperaría que estímulos mayores desencadenaran respuestas mayores para hacer frente a amenazas de herbivoría más contundentes. Sin embargo, y desde una perspectiva de explicación proximal, ello puede deberse a lo que en ecofisiología animal se conoce como “restricciones de diseño” (Calow 1987) *i.e.* no se observan RI mayores porque la maquinaria metabólica de la planta no sería capaz de acumular Hx (o transportarlo) por encima del nivel inducido. Se ha planteado con anterioridad que las plantas poseen restricciones a la expresión ilimitada de su plasticidad fenotípica (Schlichting 1986). En términos generales, el hallazgo de que existe un proceso de traslocación detrás de las RI de Hx es consistente con la idea de la “inducción limitada”, considerando la existencia de un “pool” limitado de Hx en la planta susceptible de ser traslocado, en oposición a la idea de síntesis aumentadas por estímulos de daño.

Persistencia de las RI

La inducción de Hx observada en la hoja primaria (H1) no se mantuvo en el tiempo, dejándose de notar a partir de 2 días después del fin de la infestación, aunque la tendencia de mayores niveles de Hx en el tratamiento infestado se mantuvo. No existen trabajos previos en los que se haya evaluado la persistencia de la inducción de Hx; sólo se ha verificado la persistencia de tales RI con infestación continua (Gutiérrez *et al.* 1988) y no tras un “pulso” de infestación como en este experimento. Experimentos realizados en

otros sistemas mostraron una gran variabilidad en las persistencias de RI: desde 21 horas hasta semanas o años, dependiendo del sistema y el tipo de daño (Tallamy & Mc. Cloud 1991, Hartley & Lawton 1991, Clausen *et al.* 1991).

Aunque se ha intentado definir patrones generales que caractericen a las RI (Edwards & Wratten 1983, Herms & Mattson 1992) la particularidad de cada sistema planta-herbívoro hace difícil una comparación de los resultados obtenidos. Se ha sugerido que es más relevante evaluar la duración o persistencia de la inducción en relación a las historias de vida de la planta y del herbívoro que las generó (Karban & Myers 1989). En el caso de *T. uniaristatum*, al ser una especie de crecimiento rápido se esperaría una corta duración de las RI debido a las elevadas tasas intrínsecas de recambio metabólico y a la posibilidad de suplir la pérdida de recursos o biomasa con nuevo tejido producido (*sensu* Coley *et al.* 1985). Con respecto a los áfidos, si estos representaran una presión de selección importante, se esperarían respuestas persistentes en el tiempo en vista de la poca movilidad de estos herbívoros. Sin embargo, esta visión de "respuestas específicas al tipo de herbívoro" ha sido puesta en tela de juicio, postulándose que las RI serían defensas de amplio espectro, efectivas contra la mayoría de los herbívoros y patógenos (Krischik *et al.* 1991). No existe consenso acerca de si la evolución de las RI está influenciada por presiones de selección "difusas" (a nivel de gremio) o específicas (Rausher *et al.* 1993).

El hecho de que la hoja terciaria (H3) apareciera inducida 8 ddfi se ajusta a predicciones compatibles con la teoría de Defensa Óptima (Coleman & Jones 1991). Así, la protección contra la herbivoría debería desplazarse a las hojas más valiosas para la

planta, *i.e.* las más jóvenes, conforme éstas se desarrollaran. Sin embargo, este patrón no se observó para la hoja secundaria (H2). Probablemente, la “señal de protección” tenga un *tempo* sólo compatible con hojas que en el momento de la infestación no estén aún iniciando su expansión. Curiosamente, sólo al estar completamente expandidas fue que las H3 aparecieron inducidas.

Finalmente, la inducción de Hx encontrada en el tallo 2 ddfi podría explicarse a la luz de los resultados del experimento de traslocación, donde se encontró evidencias que sugerían una traslocación de Hx desde el tallo hacia la H1 de plantas infestadas. Así, el aumento en Hx en el tallo de plantas infestadas 2 ddfi podría reflejar un reajuste en el nivel de Hx en el tallo tras la traslocación inicial hacia la H1. Sin embargo, esta sugerencia -y las otras propuestas en esta sección- quedan sólo a nivel de especulación debido a que en este experimento -a diferencia del experimento de traslocación- no se determinó la cantidad bruta total de Hx en la planta pues el análisis no se extendió a las raíces.

Evidencias de traslocación de Hx en las RI

Aunque existe literatura que describe la extensión espacial de las RI a tejidos no dañados (*e.g.* Broadway *et al.* 1986), no se han encontrado trabajos que evalúen en todos los órganos de una planta atacada el *status* de inducido de cada tejido. Las evidencias experimentales encontradas en este trabajo apoyaron la sugerencia de que detrás del fenómeno de RI en el sistema evaluado estaba un proceso de traslocación de Hx (probablemente vía floema, donde se han encontrado Hx (Givovich *et al.* 1994) desde el

tallo hacia la H1. No existen trabajos que describan traslocación de Hx inter-órganos en plántulas de gramíneas, por lo que no es posible dilucidar si este proceso estaría "gatillado" por la infestación o es un proceso que ocurre naturalmente pero cuya tasa se incrementaría tras la infestación por áfidos.

El patrón de traslocación encontrado es de algún modo opuesto al esperado, ya que en el transporte en el floema generalmente las hojas más maduras sirven como fuente de metabolitos a las zonas más jóvenes o de activo crecimiento (Richardson 1975), habiéndose observado este patrón incluso en experimentos de RI (Makus *et al.* 1980). Sin embargo, también se ha afirmado que este patrón puede ser alterado por daño a la planta (Taiz & Seiger 1991) y, más precisamente, se ha descrito a los áfidos como modificadores de las relaciones fuente / sumidero en los procesos de transporte en el floema (Dixon 1975).

En tal contexto, se esperaría que una infestación en la H2 (o, en general, la hoja más joven) generara un fenómeno de traslocación de mayor magnitud. De manera similar a la discutida en la sección precedente, este patrón se justificaría en el marco de la teoría de Defensa Óptima al extenderse la protección a los tejidos más valiosos en aporte futuro al éxito reproductivo de la planta. Los resultados encontrados parecieran no ajustarse a tal teoría en vista del hecho que la H2 del tratamiento infestado no apareció significativamente inducida, aunque mostró un mayor nivel de Hx que la H2 del tratamiento control. Sin embargo, esa teoría es aplicable a la H3 (ver discusión en la sección anterior).

Tal como se mencionara anteriormente, el experimento de traslocación fue diseñado con el fin de: i) estimar si efectivamente estaba ocurriendo tal fenómeno en las RI observadas, y, de obtenerse indicios que apoyaran su ocurrencia, ii) predecir que los costos metabólicos de tales RI serían insignificantes y, en consecuencia, no se manifestarían en costos indirectos. Esto último se apoyaba en el hecho que se considera que la carga hacia los haces vasculares y posterior transporte en el floema de compuestos de naturaleza similar a los Hx ocurre por difusión y por flujo de masas (generado por la carga activa de azúcares y aminoácidos), respectivamente (Taiz & Seiger 1991). A la vista de los resultados obtenidos, se sugiere que las plántulas de *T. uniaristatum* reaccionan al ataque de áfidos elevando la concentración de sus metabolitos de defensa (Hx) en la zona atacada mediante el transporte -sin costo energético significativo- de éstos desde un tejido no dañado. Dicho de otro modo, ocurriría una reasignación proporcional de defensas en plantas que han sufrido un ataque localizado por herbívoros (ver Tabla 6). Esta aproximación experimental al fenómeno de traslocación, si bien permitió distinguir si los procesos detrás del fenómeno involucraban síntesis, no es de ningún modo conclusiva. El uso de métodos que incluyan compuestos marcados con isótopos radioactivos (*e.g.* Baldwin *et al.* 1994) podrá discernir de manera definitiva si el proceso detrás del fenómeno de RI de Hx es efectivamente una traslocación.

Costos de las RI en parámetros estimadores de adecuación biológica de la planta

En la sección de Resultados se pudo apreciar que ningún parámetro estimador de adecuación biológica presentó diferencias significativas entre los tratamientos control e infestado. Si existieran costos de las RI en este sistema se habría esperado un mejor desempeño de las plantas control en alguno de los parámetros evaluados, referidos a crecimiento, desarrollo y sobrevivencia.

En una aproximación general, la inexistencia de costos de RI se podría explicar de varias maneras. A continuación se presentan algunas hipótesis posibles al respecto:

1. *Aunque existen costos de las RI de Hx, no fue posible detectarlos en esas condiciones experimentales. En particular, el nivel de inducción de Hx sólo comprometió una fracción muy pequeña, relativamente insignificante, del presupuesto de recursos basados en nitrógeno (c.f. Brown 1988) y por ello no se reflejó en los parámetros evaluados.*

Esta explicación es plausible pero difícil de evaluar en el sistema estudiado, debido a que no existen trabajos que hayan estimado el costo directo (biosintético) de la producción de una molécula de Hx como para estimar el impacto relativo de la inducción de Hx en el metabolismo de la planta. Sin embargo, si efectivamente el costo fuera muy pequeño, resultaría entonces fundamental evaluar el beneficio -en mayor protección contra la herbivoría- que ese nivel inducido le provee a la planta para buscar una explicación consistente con ese resultado.

2. *Los parámetros evaluados no fueron los más apropiados, estos no se ajustaron a la escala en que se manifestaron los costos de las RI, (e.g. Karban 1993).*

A primera vista, eso no parece probable para el presente estudio, ya que se evaluó el crecimiento (la elongación) de la H1 y la H2 pocos días después de la infestación, y siendo ésta una aproximación fina no se detectó efecto significativo de las RI de Hx. Más aún, dado que el fenómeno de RI se aborda finalmente desde una perspectiva ecológico-evolutiva, cualquier efecto (*i.e.* costo) que no se exprese en algún parámetro estimador de la adecuación biológica de la planta carece de importancia real para el problema

3. Los Hx tienen, además de su rol defensivo, otros roles relacionados con el crecimiento o el desarrollo de la planta. Esto genera un balance entre los costos y los beneficios de tales RI.

Se han descrito algunos roles fisiológicos de los Hx y sus compuestos derivados. Se han postulado una actividad tipo citoquinina (Pethó & Dinya 1992) y efectos tanto estimulantes (Ray *et al.* 1977) como inhibidores (Venis & Watson 1978, Venis 1979) de la actividad de auxinas o análogos de auxinas. En vista de la aparente inconsistencia de la evidencia, no es posible aún afirmar algo acerca del efecto de los Hx sobre el crecimiento de la planta. También se ha descrito un posible rol de los Hx exudados por la raíz como agentes fitosideróforos (facilitan la absorción de hierro al formar complejos con sus iones) (Pethó 1993). Sin embargo, al no existir un patrón consistente en la relación entre la exudación de Hx y su acumulación en tejidos de la planta (Pérez & Ormeño-Núñez 1991), no es posible suponer que ese fenómeno esté dando cuenta del patrón de acumulación de Hx observado. Se ha destacado recientemente la importancia de la identificación de las funciones "primarias" de un metabolito secundario en el contexto de

la determinación de los costos fisiológicos y ecológicos de las defensas en plantas (Simms 1992a).

4. *Las RI, aunque originalmente eran costosas, fueron por selección dejando de serlo.*

Esta proposición (Simms 1992b), formulada originalmente en el contexto de la evolución de defensas constitutivas, no ha sido aún evaluada en ningún sistema. En primer lugar, habría que estimar -para el sistema de RI de Hx- el grado de control genético de ese mecanismo de defensa para poder considerarlo susceptible de ser seleccionado (e.g. Zangerl & Berenbaum 1992). Por otro lado, la proposición de Simms ha sido cuestionada, dudándose que la presión de selección aludida pueda haber sido lo suficientemente consistente y sostenida como para reducir significativamente las correlaciones genéticas entre defensas y adecuación biológica de plantas (Zangerl & Bazzaz 1992). Esta dificultad aparece mayor aún en sistemas de respuestas inducidas por herbivoría, en vista de la improbable constancia, de generación a generación, de la magnitud, frecuencia y naturaleza de la herbivoría.

5. *Existiendo costos de las RI a nivel genotípico, éstos no se manifestaron a nivel fenotípico porque el ambiente del experimento no lo propició.*

Se ha especulado en similar sentido al suponer que los costos podrían expresarse si las plantas experimentales estuvieran sujetas a competencia entre ellas (Brown 1988) o a otras formas de estrés, emulando la condición natural en que la adecuación biológica se hace efectiva. Adicionalmente, se ha encontrado en *T. aestivum* que las condiciones ambientales (temperatura) afectan el nivel de expresión de las RI de Hx (Gianoli & Niemeyer 1996: ver Apéndice, 2). Por lo tanto, esta explicación del patrón observado

sería plausible, tomando en cuenta que en el experimento de invernadero las plantas se desarrollaron en recipientes individuales de volumen aparentemente no limitante y las condiciones ambientales de crecimiento en el invernadero (microclima de alta temperatura y alta humedad) fueron distintas a las prevalentes en el hábitat natural de *T. uniaristatum* (Los Balcanes, Turquía: clima mediterráneo, verano cálido y seco (Kimber & Feldman 1987)). Sin embargo, esto último podría también interpretarse como un tipo de estrés para la planta. Por lo tanto no resulta claro si las condiciones ambientales en las que se realizó el experimento estimularon o inhibieron la expresión de costos de RI de Hx.

Aunque se considera que la existencia de RI refleja una adaptación para minimizar los costos de las defensas (Edwards & Wratten 1983) y por tanto se supone que en todo sistema donde existan RI las defensas constitutivas involucran un costo, una evaluación preliminar de costos de Hx constitutivos en *T. aestivum* no encontró evidencias de la existencia de dichos costos (Gianoli *et al.*, 1996: ver Apéndice, 4). Esto conduce a una pregunta más fundamental y que podría ser contestada con alguna de las hipótesis previamente planteadas: ¿Representan los Hx (nivel constitutivo) un costo para la planta?

Volviendo al tema de los costos de las RI de Hx en *T. uniaristatum*, se aprecia que las hipótesis explicativas arriba planteadas se postulan enfrentando el fenómeno de RI observado desde aproximaciones tanto ecológicas como fisiológicas. En ambas aproximaciones, la explicación supone la ocurrencia de determinados eventos o procesos, los cuales no siempre son susceptibles de ser medidos o evaluados. En este trabajo, una aproximación fisiológica inicial (el experimento de traslocación) permitió generar una predicción de efectos que se observarían a nivel ecológico (experimento de determinación

de costos), lo cual fue efectivamente confirmado. En consecuencia, la inexistencia de costos de RI de Hx pudo ser explicada satisfactoriamente tras el discernimiento preliminar del mecanismo de traslocación asociado a esas RI y establecerse así que no estaba ocurriendo un uso excluyente de recursos sino que se estaba reasignando, mediante transporte (sin costo), recursos ya comprometidos a defensa.

La inexistencia de costos de las RI en el sistema estudiado en principio no validaba uno de los postulados fundamentales de la teoría de Defensa Óptima, referido precisamente a la existencia de costos de las defensas en plantas. Sin embargo, dicho postulado supone, para justificar la existencia de tales costos, un uso excluyente de recursos, lo cual -como se indicara en el párrafo anterior- fue descartado en este sistema. Por lo tanto, los resultados obtenidos son consistentes con la teoría de Defensa Óptima. Arribamos así a una situación en la que el hecho de que no se cumpla con un postulado de dicha teoría conduce al sostenimiento de ella, tras dilucidar los procesos subyacentes al fenómeno de RI observado. Esta aparente paradoja puede entenderse al considerar que la teoría de Defensa Óptima se gestó en un marco conceptual que, en principio, no comprendía las defensas inducidas por herbivoría. Este tipo de defensas, y los patrones asociados a ellas, vinieron a añadir un nuevo eje de optimización: la plasticidad en la asignación óptima de defensas a nivel espacial y temporal o, dicho de otro modo, el ajuste en tiempo ecológico a los ambientes bióticos cambiantes. En consecuencia, la existencia de defensas inducidas por herbivoría le confiere a la teoría de Defensa Óptima una nueva escala de validez, o una nueva escala en la cual pueda ser evaluada.

Dado que la herbivoría puede reducir significativamente la adecuación biológica de las plantas (Marquis 1992b) puede en consecuencia afectar la distribución y abundancia de las poblaciones de plantas (Harper 1977). Por lo tanto, el conocimiento de los mecanismos de resistencia de plantas a la herbivoría puede resultar fundamental para entender, por un lado, los patrones de distribución y abundancia de plantas y, por otro, los patrones de asignación de defensas en plantas a nivel individual. En esta tesis se ha ilustrado experimentalmente la posibilidad de predecir la existencia (o ausencia) de patrones observables a nivel ecológico a partir del conocimiento a nivel fisiológico de los procesos de asignación de recursos a defensa en plantas, tal como había sido propuesto anteriormente en un contexto teórico (Bazzaz *et al.* 1987).

CONCLUSIONES

1. El fenómeno de RI de Hx en el trigo silvestre *Triticum uniaristatum* por infestación del áfido *Rhopalosiphum padi* presenta una dinámica espacial y temporal que se ajusta parcialmente a las predicciones de la teoría de Defensa Óptima.
2. Estas RI, tras infestación controlada en la hoja primaria, son el resultado de un proceso de traslocación de Hx desde el tallo hacia la hoja infestada, el cual no involucraría un costo metabólico significativo para la planta.
3. Dicha traslocación de Hx se traduce en la inexistencia de costos indirectos, medidos en parámetros estimadores de adecuación biológica de la planta, de esas RI de Hx.
4. La inexistencia de costos indirectos de esas RI de Hx valida las predicciones de la teoría de Defensa Óptima porque el proceso fisiológico detrás de esas RI no involucra el uso excluyente de recursos.
5. Es posible predecir la existencia (o ausencia) de patrones observables a nivel ecológico a partir del conocimiento a nivel fisiológico de los procesos de asignación de recursos a defensa en plantas.

BIBLIOGRAFÍA

- Argandoña, V.H. (1994) Effect of aphid infestation on enzyme activities in barley and wheat. *Phytochemistry* 35:313-315.
- Argandoña, V.H., Corcuera, L.J., Niemeyer, H.M. & Campbell, B.C. (1983) Toxicity and feeding deterrence of hydroxamic acids from Gramineae in synthetic diets against the greenbug, *Schizaphis graminum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 34:134-138.
- Argandoña, V.H., Luza, J.G., Niemeyer, H.M. & Corcuera, L.J. (1980) Role of hydroxamic acids in the resistance of cereals to aphids. *Phytochemistry* 19:1665-1668.
- Argandoña, V.H., Niemeyer, H.M. & Corcuera, L.J. (1981) Effect of content and distribution of hydroxamic acids in wheat on infestation by *Schizaphis graminum*. *Phytochemistry* 20:673-676.
- Argandoña, V.H., Zúñiga, G.E., Corcuera, L.J. (1987) Distribution of gramine and hydroxamic acids in barley and wheat leaves. *Phytochemistry* 26:1917-1918.
- Baldwin, I.T. (1988) Damage-induced alkaloids in tobacco: pot bound plants are not inducible. *Journal of Chemical Ecology* 14:1113-1120.
- Baldwin, I.T., Karb, M.J. & Ohnmeiss, T.E. (1994) Allocation of ^{15}N from nitrate to nicotine: Production and turnover of a damage-induced mobile defense. *Ecology* 75:1703-1713.
- Baldwin, I.T. & Schultz, J.C. (1983) Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants. *Science* 221:277-279.
- Baldwin, I.T., Sims, C.L. & Kean, S.E. (1990) The reproductive consequences associated with inducible alkaloidal responses in wild tobacco. *Ecology* 71:252-262.
- Bazzaz, F.A., Chiarello, N.R., Coley, P.D. & Pitelka, L.F. (1987) Allocating resources to reproduction and defense. *Bioscience* 37:58-67.

- Berembaum, M.R., Zangerl, A.R. & Nitao, J.K. (1986) Constraints on chemical coevolution: wild parsnips and the parsnip webworm. *Evolution* 40:1215-1228.
- Bohidar, K., Wratten, S.D. & Niemeyer, H.M. (1986) Effect of hydroxamic acids on the resistance of wheat to the aphid Sitobion avenae. *Annals of Applied Biology* 109:193-198.
- Broadway, R.M., Duffey, S.S., Pearce, G. & Ryan, C.A. (1986) Plant proteinase inhibitors: a defense against herbivorous insects? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 41:33-38.
- Brown, D.G. (1988) The cost of plant defense: an experimental analysis with inducible proteinase inhibitors in tomato. *Oecologia* 76:467-470.
- Bryant, J.P., Chapin, F.S., Reichardt, P.B. & Clausen, T.P. (1985) Adaptation to resource availability as a determinant of chemical defense strategies in woody plants. *Recent Advances in Phytochemistry* 19:219-237.
- Bryant, J.P., Heitkonig, I., Kupopat, P. & Owen-Smith, N. (1991) Effects of severe defoliation on the long-term resistance to insect attack and on leaf chemistry in six woody species of the southern african savanna. *American Naturalist* 137:50-63.
- Cabrera, H.M., Argandoña, V.H. & Corcuera, L.J. (1994) Metabolic changes in barley seedlings at different aphid infestation levels. *Phytochemistry* 35:317-319.
- Calow, P. (1987) *Evolutionary Physiological Ecology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Carroll, C.R. & Hoffman, C.A. (1980) Chemical feeding deterrent mobilized in response to insect herbivory and counteradaptation by Epilachna tredecimnotata. *Science* 209:414-416.
- Castro, A.M., Rumi, C.P. & Arriaga, H.O. (1988) Influence of greenbug on root growth of resistant and susceptible barley genotypes. *Environmental and Experimental Botany* 28:61-72.
- Chew, F.S. & Rodman, J.E. (1979). Plant resources for chemical defense. En: *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. Rosenthal, G.A. & Janzan, D.H. (eds.), pp.271-307. Academic Press, New York.

- Ciepiela, A. (1989) Changes in phenylalanine and tyrosine content and metabolism in ears of susceptible and aphid resistant winter wheat cultivars upon infestation by Sitobion avenae. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 51:277-281.
- Clausen, T.P., Reichardt, P.B., Bryant, J.P. & Werner, R.A. (1991) Long-term and short-term induction in quaking aspen: related phenomena? En: *Phytochemical Induction by Herbivores*. Tallamy, D.W. & Raupp, M.J. (eds.), pp.71-84. John Wiley & Sons, New York.
- Coleman, J.S. & Jones, C.G. (1991) A phytocentric perspective of phytochemical induction by herbivores. En: *Phytochemical Induction by Herbivores*. Tallamy, D.W. & Raupp, M.J. (eds.), pp.3-46. John Wiley & Sons, New York.
- Coley, P.D., Bryant, J.P. & Chapin, F.S. (1985) Resource availability and plant anti-herbivore defense. *Science* 230:895-899.
- Corcuera, L.J., Queirolo, C.B. & Argandoña, V.H. (1985) Effects of 2-β-D-glucosyl-4-hydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one on cereal aphids on artificial diets. *Experientia* 41:514-516.
- Dirzo, R. & Harper, J.L. (1982) Experimental studies on slug-plant interactions. IV. The performance of cyanogenic and acyanogenic morphs of Trifolium repens in the field. *Journal of Ecology* 70:119-138.
- Dixon, A.F.G. (1975) Aphids and translocation. In: Zimmermann ML, Milburn JA (eds) *Transport in plants. I. Phloem transport*. Springer-Verlag, Berlin, pp 154-170
- Dosba, F. & Rivoal, R. (1982) Estimation des niveaux de résistance au développement d'Heterodera avenae chez les triticiées. *Bulletin OEPP* 12:451-456.
- Dreyer, D.L. & Jones, K.C. (1981) Feeding deterrence of flavonoids and related phenolics towards Schizaphis graminum and Myzus persicae: aphid feeding deterrents in wheat. *Phytochemistry* 20:2489-2493.
- Edwards, P.J. & Wratten, S.D. (1983) Wound-induced defences in plants and their consequence for patterns of insect grazing. *Oecologia* 59:88-93.
- Edwards, P.J. & Wratten, S.D. (1985) Induced plant defences against insect grazing: fact or artefact? *Oikos* 44:70-74.

- Edwards,P.J., Wratten,S.D. & Parker,E.A. (1992) The ecological significance of wound-induced changes in plants: insect grazing and plant competition. *Oecologia* 91:266-272.
- Faeth,S.H. (1991) Variable induced responses: direct and indirect effects on oak folivores. En: *Phytochemical Induction by Herbivores*. Tallamy,D.W. & Raupp,M.J. (eds.), pp.293-324. John Wiley & Sons, New York.
- Fagerström,T., Larsson,S. & Tenow,O. (1987) On optimal defence in plants. *Functional Ecology* 1:73-81.
- Fagerström,T. (1989) Anti-herbivory chemical defense in plants: A note on the concept of cost. *American Naturalist* 133:281-287.
- Feeny,P.P. (1976) Plant apparency and chemical defense. *Recent Advances in Phytochemistry* 10:1-40.
- Feldman,M. & Sears,E.R. (1981) The wild gene resources of wheat. *Scientific American* 244:98-109.
- Fraenkel, G.S. (1959) The raison d'etre of secondary plant substances. *Science* 129:1466-1470.
- Gershenzon,J. (1994) Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. *Journal of Chemical Ecology* 20:1281-1328.
- Gianoli,E. & Niemeyer,H.M. (1996) Environmental effects on the induction of wheat chemical defences by aphid infestation. *Oecologia*, en prensa.
- Gianoli,E., Papp,M. & Niemeyer,H.M. (1996) Costs and benefits of hydroxamic acids-related resistance in winter wheat against the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* L. *Annals of Applied Biology*, en prensa.
- Gibberd, R., Edwards, P.J. & Wratten, S.D. (1988) Wound-induced changes in the acceptability of tree foliage to Lepidoptera: within-leaf effects. *Oikos* 51:43-47.
- Givovich,A. & Niemeyer,H.M. (1991) Hydroxamic acids affecting barley yellow dwarf virus transmission by the aphid *Rhopalosiphum padi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 59:79-85.

- Givovich,A. & Niemeyer,H.M. (1995) Comparison of the effect of hydroxamic acids from wheat on five species of cereal aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 74:115-119.
- Givovich,A., Sandström,J., Niemeyer,H.M. & Pettersson,J. (1994) Presence of a hydroxamic acid glucoside in wheat phloem sap, and its consequences for the performance of Rhopalosiphum padi (L.) (Homoptera:Aphididae). *Journal of Chemical Ecology* 20:1923-1930.
- Green,T.R. & Ryan,C.A. (1972) Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* 175:776-777.
- Gutiérrez,C., Castañera,P. & Torres,V. (1988) Wound-induced changes in DIMBOA (2,4 dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4 benzoxazin-3-one) concentration in maize plants caused by Sesamia nonagrioides (Lepidoptera:Noctuidae). *Annals of Applied Biology* 113:447-454.
- Hanhimäki,S. (1989) Induced resistance in mountain birch: defence against leaf-chewing insect guild and herbivore competition. *Oecologia* 81:242-248.
- Harper,J.L. (1977) Population biology of plants. Academic Press, New York.
- Hartley,S.E. & Lawton,J.H. (1987) Effects of different types of damage on the chemistry of birch foliage, and the response of birch foliage, and the response of birch feeding insects. *Oecologia* 74:432-437.
- Hartley,S.E. & Lawton,J.H. (1991) The biochemical aspects and significance of the rapidly induced accumulation of phenolics in birch foliage. En: *Phytochemical Induction by Herbivores*. Tallamy,D.W. & Raupp,M.J. (eds.), pp.105-132. John Wiley & Sons, New York.
- Haukioja,E. (1980) On the role of plant defences in the fluctuation of herbivore populations. *Oikos* 35:202-213.
- Haukioja,E. & Hanhimäki,S. (1985) Rapid wound-induced resistance in white birch (Betula pubescens) foliage to the geometrid Epirrita autumnata: A comparison of trees and moths within and outside the outbreak range of the moth. *Oecologia* 65:223-228.

- Herms, D.A. & Mattson, W.J. (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quarterly Review of Biology* 67:283-335.
- Hofman, J. & Hofmanová, O. (1971) 1,4-Benzoxazine derivatives in plants: absence of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one from uninjured *Zea mays* plants. *Phytochemistry* 10:1441-1444.
- Holubec, V., Havlickova, H., Hanusova, R. & Kostkanova, E. (1993) Evaluation of *Aegilops* for aphid infestation, rust and powdery mildew resistance and seed quality. En: *Biodiversity and wheat improvement*. Damania, A.B. (ed.), pp.375-384. John Wiley & Sons, Chichester.
- Hurlbert, S.H. (1984) Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs* 54 :187-211.
- Karban, R. (1986) Induced resistance against spider mites in cotton: field verification. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 42:239-242.
- Karban, R. (1987) Environmental conditions affecting the strength of induced resistance against mites in cotton. *Oecologia* 73:414-419.
- Karban, R. (1991) Inducible resistance in agricultural systems. En: *Phytochemical Induction by Herbivores*. Tallamy, D.W. & Raupp, M.J. (eds.), pp.402-420.. John Wiley & Sons, New York.
- Karban, R. (1993) Costs and benefits of induced resistance and plant density for a native shrub, *Gossypium thurberi*. *Ecology* 74:9-19.
- Karban, R. & Carey, J.R. (1984) Induced resistance of cotton seedlings to mites. *Science* 225:53-54.
- Karban, R. & Myers, J.H. (1989) Induced plant responses to herbivory. *Annual Review of Ecology and Systematics* 20:331-348.
- Kimber, G. & Feldman, M. (1987) Wild Wheat: An Introduction. Special Report 353. College of Agriculture, University of Missouri-Columbia.
- Krischik, V.A., Goth, R.W. & Barbosa, P. (1991) Generalized plant defense: effects of multiple species. *Oecologia* 85:562-571.

- Leather, S.R. (1993) Early season defoliation of bird cherry influences autumn colonization by the bird cherry aphid, Rhopalosiphum padi. *Oikos* 66:43-47.
- Leather, S.R. & Dixon, A.F.G. (1982) Secondary host preferences and reproductive activity of the bird cherry-oat aphid, Rhopalosiphum padi. *Annals of Applied Biology* 101:219-228.
- Leather, S.R., Walters, K.F.E. & Dixon, A.F.G. (1989) Factors determining the pest status of the bird cherry oat aphid Rhopalosiphum padi in Europe; a study review. *Bulletin of Entomological Research* 79:345-360.
- Leszczynski, B. (1985) Changes in phenols content and metabolism in leaves of susceptible and resistant winter wheat cultivars infested by Rhopalosiphum padi (L.) (Hom., Aphididae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 100:343-348.
- Leszczynski, B. & Dixon, A.F.G. (1990) Resistance of cereals to aphids: Interaction between hydroxamic acids and the aphid *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae). *Annals of Applied Biology* 117:21-30.
- Leszczynski, B., Wright, L.C. & Bakowski, T. (1989) Effect of plant secondary substances on winter wheat resistance to the grain aphid. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 52:135-139.
- Lowe, H.J.B., Murphy, G.J.P. & Parker, M.L. (1985) Non-glaucousness, a probable aphid-resistance character of wheat. *Annals of Applied Biology* 106:555-560.
- Makus, D., Zuroske, G. & Ryan, C.A. (1980) The direction and rate of transport of the proteinase inhibiting factor out of wounded tomato leaves. *Plant Physiology* 65:150 (suppl.)
- Marquis, R.J. (1992a) A bite is a bite? Constraints on response to folivory in Piper arieianum (Piperaceae). *Ecology* 73:143-152.
- Marquis, R.J. (1992b) The selective impact of herbivores. En: *Plant Resistance to Herbivores and Pathogens. Ecology, Evolution and Genetics*. Fritz, R.S. & Simms, E.L. (eds.), pp. 301-325. University of Chicago Press: Chicago
- McKey, D. (1974) Adaptive patterns in alkaloid physiology. *American Naturalist* 108:305-320.

- Mooney,H.A. & Gulmon,S.L. (1982) Constraints on leaf structure and function in reference to herbivory. *Bioscience* 32:198-206.
- Morse,S., Wratten,S.D., Edwards,P.J. & Niemeyer,H.M. (1991a) Changes in the hydroxamic acid content of maize leaves with time and after artificial damage; implications for insect attack. *Annals of Applied Biology* 119:239-250.
- Morse,S., Wratten,S.D., Edwards,P.J. & Niemeyer,H.M. (1991b) The effect of maize leaf damage on the survival and growth rate of *Rhopalosiphum padi*. *Annals of Applied Biology* 119:251-256.
- Muñoz,O., Argandoña,V.H. & Corcuera,L.J. (1994) Efecto de la infestación por áfidos en el contenido de flavonoides en cebada. En: II Simposio internacional química de productos naturales y sus aplicaciones. Silva,M. & Bittner,M. (eds.), pp.353-354. Anibal Pinto, Concepción.
- Neuvonen,S., Hanhimäki,S., Suomela,J. & Haukioja,E. (1988) Early season damage to birch foliage affects the performance of a late season herbivore. *Journal of Applied Entomology* 105:182-189.
- Niemeyer,H.M. (1988a) Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the Gramineae. *Phytochemistry* 27:3349-3358.
- Niemeyer,H.M. (1988b) Hydroxamic acids content of *Triticum* species. *Euphytica* 37:289-293.
- Niemeyer,H.M., Copaja,S.V. & Barriá,B.N. (1992) The Triticeae as sources of hydroxamic acids, secondary metabolites in wheat conferring resistance against aphids. *Hereditas* 116:295-299.
- Niemeyer,H.M., Pesel,E., Copaja,S.V., Bravo,H.R., Franke,S. & Francke,W. (1989a) Changes in hydroxamic acid levels of wheat plants induced by aphid feeding. *Phytochemistry* 28:447-449.
- Niemeyer,H.M., Pesel,E., Franke,S. & Francke,W. (1989b) Ingestion of the benzoxazinone DIMBOA from wheat plants by aphids. *Phytochemistry* 28:2307-2310.
- Ohnmeiss,T.E. & Baldwin,I.T. (1994) The allometry of nitrogen allocation to growth and an inducible defense under nitrogen-limited growth. *Ecology* 75:995-1002.

- Pérez,F.J. & Ormeño-Núñez,J. (1991) Difference in hydroxamic acid content in roots and root exudates of wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereale* L.): possible role in allelopathy. *Journal of Chemical Ecology* 17:1037-1043.
- Petho,M. (1993) Possible role of cyclic hydroxamic acids in the iron uptake by grasses. *Acta Agronomica Hungarica* 42:203-214.
- Petho,M. & Dinya,Z. (1992) Occurrence and physiological role of benzoxazinone and their derivatives. I. Cytokinin activity of 6-methoxy-benzoxazolinone. *Acta Agronomica Hungarica* 41:39-48.
- Ray,P.M., Dohrman,U. & Hertel,R. (1977) Characterization of naphthaleneacetic acid binding to receptor sites on cellular membranes of maize coleoptile tissue. *Plant Physiology* 59:357-364.
- Raupp,M.J. & Sadof,C.S. (1989) Behavioral responses of a leaf beetle to injury-related changes in its salicaceous host. *Oecologia* 80:154-157.
- Rausher,M.D., Iwao,K., Simms,E.L., Ohsaki,N. & Hall,D. (1993) Induced resistance in *Ipomoea purpurea*. *Ecology* 74:20-29.
- Redak,R.A. & Capinera,J.L. (1994) Changes in western wheatgrass foliage quality following defoliation: consequences for a graminivorous grasshopper. *Oecologia* 100:80-88.
- Rhoades,D.F. (1979) Evolution of plant chemical defense against herbivores. En: *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites*. Rosenthal,G.A. & Janzen,D.H. (eds.), pp. 3-54. Academic Press: Orlando.
- Richardson,M. (1975) *Translocation in plants*. Camelot Press, Southampton.
- Rosenthal,G.A. (1986) The chemical defenses of higher plants. *Scientific American* 254:76-81.
- Ryan,C.A. (1978) Proteinase inhibitors in plant leaves: a biochemical model for pest-induced natural plant protection. *Trends in Biochemical Science* 5:148-150.
- Schlichting,C.D. (1986) The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annual Review of Ecology & Systematics* 17:667-693.
- Schultz,J.C. & Baldwin,I.T. (1982) Oak leaf quality declines in response to defoliation by gypsy moth larvae. *Science* 217:149-151.

- Seigler, D.S. & Price, P.W. (1976) Secondary compounds in plants: Primary functions. *American Naturalist* 110:101-105.
- Seldal, T., Dybwad, E., Knut-Jan, A. & Högsted, G. (1994) Wound-induced proteinase inhibitors in grey alder (*Alnus incana*): a defence mechanism against attacking insects. *Oikos* 71:239-245.
- Simms, E.L. (1992a) Costs of plant resistance to herbivory. En: *Plant Resistance to Herbivores and Pathogens. Ecology, Evolution and Genetics*. Fritz, R.S. & Simms, E.L. (eds.), pp. 392-425. University of Chicago Press: Chicago.
- Simms, E.L. (1992b) The evolution of plant resistance and correlated characters. En: *Proceedings of the 8th International Symposium on Insect-Plant Relationships*. Menken, S.B., Visser, J.H. & Harrewijn, P. (eds.), pp. 15-25. Kluwer Press: Dordrecht.
- Simms, E.L. & Fritz, R.F. (1990) The ecology and evolution of host-plant resistance to insects. *Trends in Ecology and Evolution* 5:356-360.
- Simms, E.L. & Rausher, M.D. (1987) Costs and benefits of plant defense to herbivory. *American Naturalist* 130:570-581.
- Simms, E.L. & Rausher, M.D. (1989) The evolution of resistance to herbivory in *Ipomoea purpurea*. II. Natural selection by insects and costs of resistance. *Evolution* 43:573-585.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (1991) *Plant physiology*. Benjamin Cummings: California.
- Tallamy, D.W. (1985) Squash beetle feeding behavior: an adaptation against induced cucurbit defenses. *Ecology* 66:1574-1579.
- Tallamy, D.W. & McCloud, E.S. (1991) Squash beetles, cucumber beetles and inducible cucurbit responses. En: *Phytochemical Induction by Herbivores*. Tallamy, D.W. & Raupp, M.J. (eds.), pp. 155-182. John Wiley & Sons, New York.
- Tester, C.F. (1977) Constituents of soybean cultivars differing in insect resistance. *Phytochemistry* 16:1899-1901.
- Thackray, D.J., Morse, S. & Leech, C. (1988) The role of hydroxamic acids in wheat and maize in conferring resistance to aphids. *Aspects of Applied Biology* 17:22-227.

- Thackray,D.J., Wratten,S.D., Edwards,P.J. & Niemeyer,H.M. (1990) Resistance to the aphids Sitobion avenae and Rhopalosiphum padi in Gramineae in relation to hydroxamic acid levels. *Annals of Applied Biology* 126:573-582.
- Tilman,D. (1986) Resources, competition and the dynamics of plant communities. En: *Plant Ecology*. Crawley,M.J. (ed.), pp.51-75. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Tuomi,J. (1992) Toward integration of plant defence theories. *Trends in Ecology and Evolution* 7:365-367.
- Tuomi,J., Niemelä,P., Rousi,M., Siren,S. & Vuorisalo,T. (1988) Induced accumulation of foliage phenols in mountain birch: branch response to defoliation? *American Naturalist* 132:602-608.
- Venis,M.A. (1979) Purification and properties of membrane-bound auxin receptors in corn. En: *Plant Growth Substances*. Skoog,F. (ed.), pp. 61-70. Springer-Verlag, New York.
- Venis,M.A. & Watson,P.J. (1978) Naturally occurring modifiers of auxin-receptor interaction in corn: identification as benzoxazolinones. *Planta* 142:103-107.
- Vrieling,K. & van Wijk,C.A. (1992) Estimating costs and benefits of the pyrrolizidine alkaloids of Senecio jacobaea under natural conditions. En: *Proceedings of the 8th International Symposium on Insect-Plant Relationships*. Menken,S.B., Visser,J.H. & Harrewijn,P. (eds.), pp.15-25. Dordrecht:Kluwer Press.
- Windle,P.N. & Franz,E.H. (1979) The effects of insect parasitism on plant competition: greenbugs and barley. *Ecology* 60:521-529.
- Wratten,S.D., Edwards,P.J. & Dunn,I. (1984) Wound-induced changes in the palatability of Betula pubescens and B. pendula. *Oecologia* 61:372-375.
- Wratten,S.D., Edwards,P.J. & Winder,L. (1988) Insect herbivory in relation to dynamic changes in host plant quality. *Biological Journal of the Linnean Society* 35:339-350.
- Zadoks,J.C., Chang,T.T. & Konzak, C.F. (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14:415-421.
- Zangerl,A.R. (1990) Furanocoumarin induction in wild parsnip: Evidence for an induced defense against herbivores. *Ecology* 71:1926-1932.

- Zangerl, A.R. & Bazzaz, F.A. (1992) Theory and pattern in plant defense allocation. En: Plant Resistance to Herbivores and Pathogens. Ecology, Evolution and Genetics. Fritz, R.S. & Simms, E.L. (eds.), pp. 363-391. University of Chicago Press, Chicago.
- Zangerl, A.R. & Berenbaum, M.R. (1992) Furanocoumarin induction in wild parsnip: genetics and populational variation. *Ecology* 71:1933-1940.
- Zúñiga, G.E., V.H. Argandoña, H.M. Niemeyer y L.J. Corcuera. 1983. Hydroxamic acid content in wild and cultivated Gramineae. *Phytochemistry* 22:2665-2669.

APÉNDICE

1. Efecto del genotipo de áfidos sobre las RI

Valores de r_m y niveles de Hx (mmol/kg peso fresco) en plantas infestadas por los clones Sa1 y Sar2 del áfido Sitobion avenae para dos cultivares de Triticum aestivum

	Valores de r_m *		Hx en plantas infestadas (Media \pm EE)	
	Antilhue	Kona	Antilhue	Kona
Sa1	0.256 \pm 0.013ab	0.265 \pm 0.021a	0.358 \pm 0.042b	0.571 \pm 0.035a
Sar2	0.210 \pm 0.032c	0.230 \pm 0.022bc	0.430 \pm 0.067ab	0.409 \pm 0.081b

*Medias seguidas de letras distintas al interior de cada grupo de 2 clones x 2 cultivares son significativamente diferentes (Student-Newman-Keuls test).

2. Efecto de factores ambientales sobre las RI

Indice de inducción (INDX) en plantas infestadas por el áfido Rhopalosiphum padi bajo diferentes regímenes de temperatura y fotoperiodo. $INDX = [Hx]_{inf.} / Media [Hx]_{cont.}$ para cada régimen. Media de 8 réplicas (Error Estándar)

Temperatura	Horas Luz		
	16	12	8
25	0.91(0.04)	1.01(0.06)	0.86(0.06)
20	0.86(0.04)	0.86(0.07)	1.13(0.10)
15	1.26(0.08)	1.12(0.14)	1.14(0.12)

Análisis de Varianza de 2 vías para indx

* Efecto de factores:

	P
Temperatura	0.001
Fotoperiodo	0.806

* Interacción de factores:

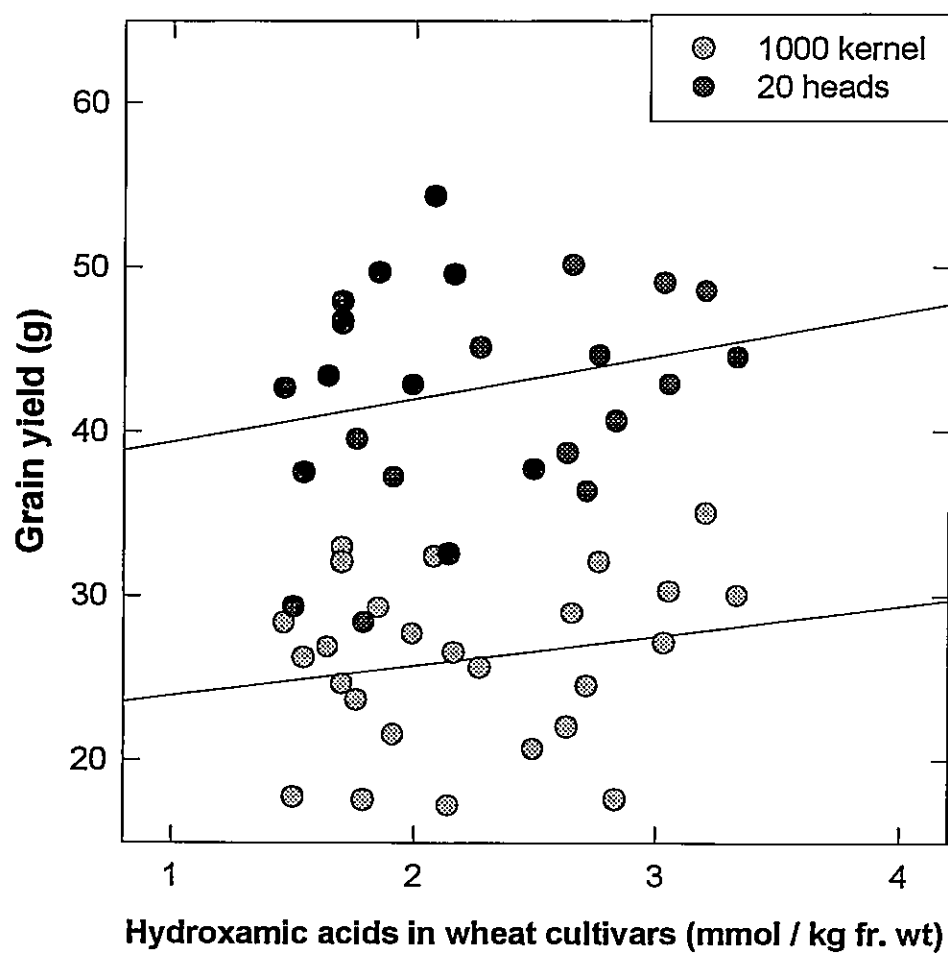
	P
Temperatura x Fotoperiodo	0.068

3. RI en cultivares de trigo Triticum aestivum y en el trigo silvestre T. uniaristatum

Niveles de Hx (mmol/kg peso fresco, Media \pm Error Estándar) en plantas control (CON) e infestadas (INF) por el áfido Rhopalosiphum padi

	Cisne	Millaleu	Lautaro	Paleta	T. uniaristatum
CON	0.73 \pm 0.13	0.71 \pm 0.03	2.11 \pm 0.17	1.72 \pm 0.19	0.13 \pm 0.01
INF	0.73 \pm 0.15	0.84 \pm 0.05	2.38 \pm 0.21	2.97 \pm 0.22	0.22 \pm 0.03
P	0.995	0.028	0.331	0.001	0.042

4. Relación entre la concentración de Hx y la productividad (peso de semillas) en cultivares de trigo T. aestivum (ausencia de costos de Hx constitutivos)

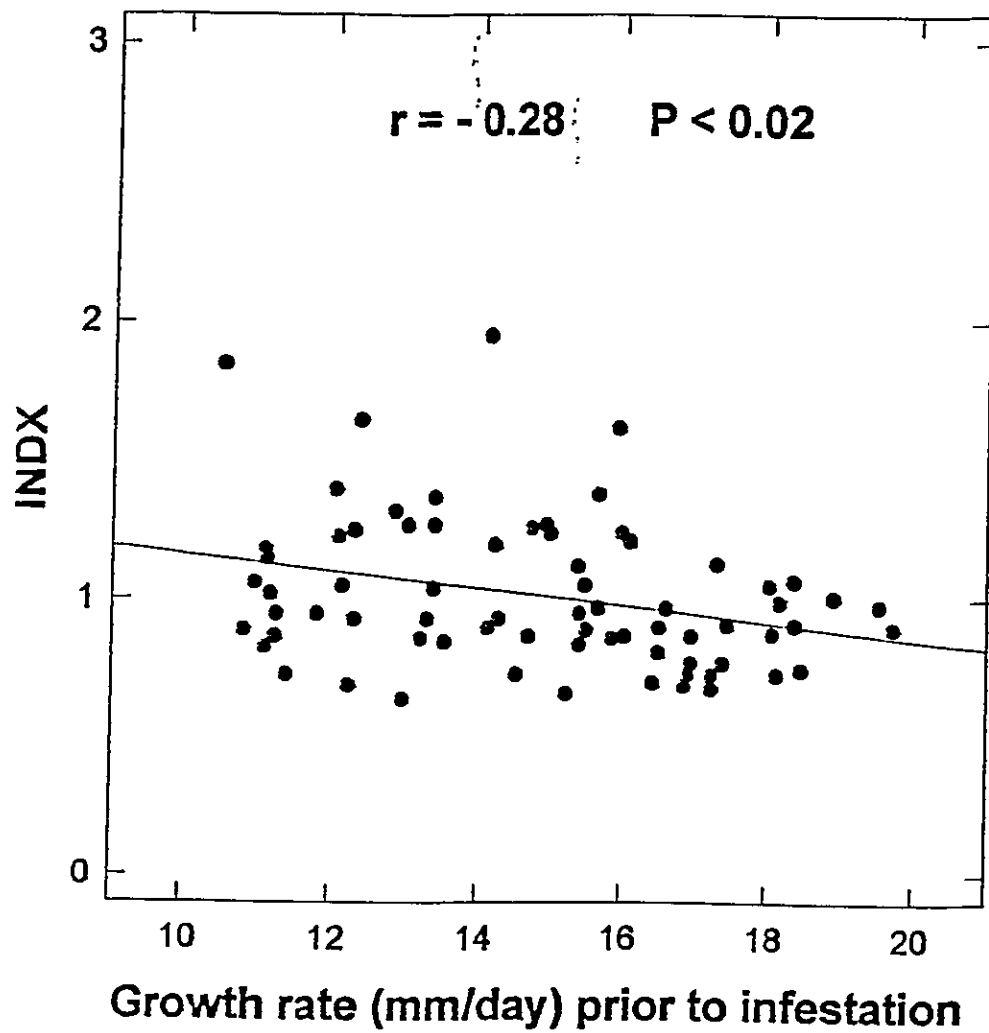


Regresión lineal (n = 26):

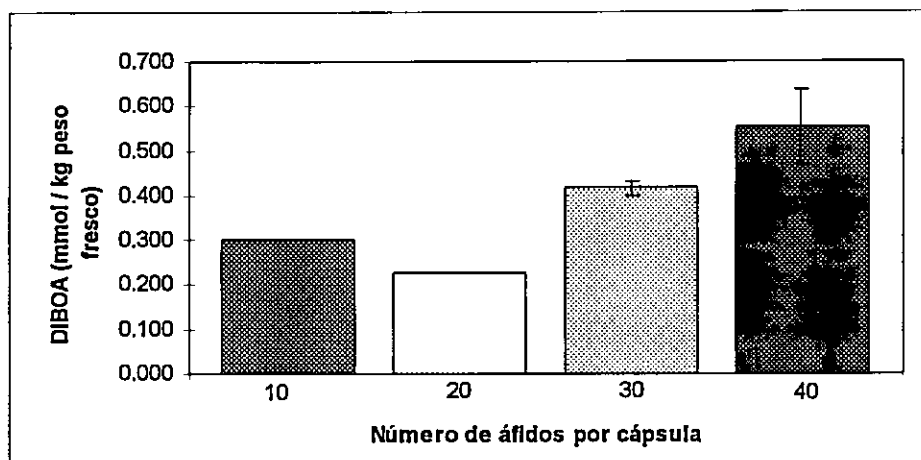
○ : $r=0.08$, $P > 0.6$

● : $r=0.20$, $P > 0.3$

5. La relación entre la tasa de crecimiento de plántulas de trigo antes de la infestación por áfidos y la magnitud de la RI ($INDX = [Hx]inf. / Media [Hx]control$)



6. Efecto de la densidad de áfidos sobre la RI en T. uniaristatum

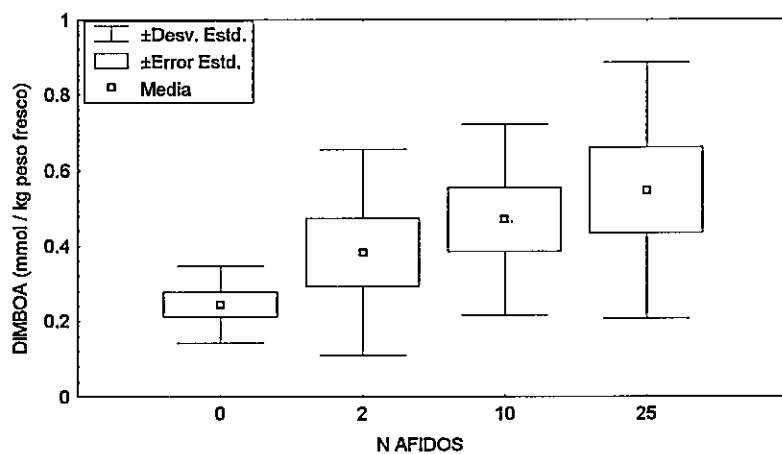


No hubo diferencias significativas entre ningún par de tratamientos (LSD test)

Valores de P para cada combinación :

	{1}	{2}	{3}	{4}
DIBOA	0.301	0.230	0.415	0.554
10af {1}		.752717	.609040	.263232
20af {2}	.752717		.410550	.155445
30af {3}	.609040	.410550		.537365
40af {4}	.263232	.155445	.537365	

7. Efecto de la densidad de áfidos sobre la RI en T. aestivum



LSD test. Valores de P para cada combinación :

	{1}	{2}	{3}	{4}
DIMBOA	0.244	0.383	0.470	0.546
0af . {1}		.260244	.071481	.017786
2af. {2}	.260244		.477882	.185624
10af {3}	.071481	.477882		.530209
25af {4}	.017786	.185624	.530209	