

UCH-FC
MAG-B
C 117

**RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y METABÓLICAS DE LA CEBADA
ANTE LA INFESTACION POR AFIDOS**

Tesis presentada ante la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la
Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de
Magister en Ciencias Biológicas con mención en Botánica

por

Lic. HERNAN MARINO CABRERA ARANA

05-0206379

Profesor Patrocinante: Dr. Luis J. Corcuera P.

Tutor Alternativo: Mag. Victor H. Argandoña

1994

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

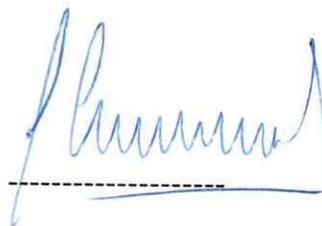
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de
Magister presentada por el candidato:

Lic. HERNAN MARINO CABRERA ARANA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como parte de los
requisitos para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención
en Botánica.

Director de Tesis:

Dr. Luis J. Corcuera



Comisión Informante de Tesis:

Dra. Liliana Cardemil (presidente)



Dra. Gladys Fernández



Dra. María Antonieta Valenzuela



Dr. Miguel Jordán



Agradecimientos

Al Dr. Luis J. Corcuera por su significativo apoyo en la realización de mis estudios en Chile. Sus críticas al trabajo de tesis y experiencia en investigación han sido valiosas e importantes en mi formación personal y académica.

A la Dra. Carolina Villagrán por darme a conocer con su amistad aspectos de Chile y de su flora que jamás olvidaré.

A los académicos del grupo de botánica que participan en el programa de postgrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Al candidato a Dr., Leon Bravo R., por su amistad, generosidad, y la excelencia que surgió en la participación que llevamos juntos en las actividades académicas del postgrado.

A todas las personas que de múltiples formas participaron en el desarrollo de mi tesis en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, particularmente al candidato a Dr., Mag. Gustavo Zúñiga, a los Srs. Danny Acevedo, Eduardo Acevedo y a las stas. Juana Reyes, María E. Lecaros y Ximena Muñoz.

Quiero expresar mi gratitud al apoyo otorgado en la realización de mis estudios en Chile por las siguientes instituciones y personas relacionadas a ellas:

FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE CHILE
Beca 1990

RED LATINOAMERICANA DE BOTANICA
Beca de Magister M4-91
Beca de Tesis SP-6-92

DEPARTAMENTO DE POSTGRADO Y POSTITULO, VICERRECTORIA
ACADEMICA Y ESTUDIANTIL, UNIVERSIDAD DE CHILE
Beca de Tesis PG-078-93

FONDECYT
Proyecto 1147-92

A la mujer que le dio la vida y el corazón a la Javiera Paz...

A la mariposa que me elevó con sus alas
me permitió con ello ver tras ellas
el mundo verde, azul, en infinito
al océano y las estrellas...

A las horas compartidas de alta mar

A los remos ofrecidos por tormentas

A su paz, su amor, su alma, su vida

A la mariposa de mis vientos del sur

A esas risas que nacieron con sus olas...

Vivo feliz. Amo a dos polizontes en mi viaje...

Indice

	página
AGRADECIMIENTOS	i
INDICE	iii
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCION	1
1.1 Bases bioquímicas de la resistencia en las plantas frente a los áfidos.	2
1.2 Factores de resistencia constitutivos en las plantas.	3
1.3 Factores de resistencia inducidos por estrés abiótico y biótico.	5
1.4 Respuestas fisiológicas y metabólicas en las plantas frente a estrés ambiental.	7
1.5 Objetivos.	11
2. MATERIALES Y METODOS	12
2.1 Cultivo de las plantas.	12
2.2 Infestaciones de la cebada con <i>Schizaphis graminum</i> R.	12
2.2.1 Tasa intrínseca de crecimiento poblacional de los áfidos (r_m).	12
2.2.2 Tasa promedio de crecimiento relativo (MRGR) y tasa de desarrollo de los áfidos (1/D).	14
2.2.3 Experimentos con dietas artificiales: Supervivencia de áfidos.	14
2.3 Contenido relativo de agua, peso fresco y peso seco de las plantas de cebada.	14
2.4 Potencial hídrico de las plantas de cebada.	15
2.5 Ácido abscísico (ABA).	15

2.6	Fotosíntesis y conductancia estomática al vapor de agua.	15
2.7	Clorofila total.	17
2.8	Azúcares solubles (sacarosa, fructosa y glucosa).	17
2.9	Aminoácidos libres y determinaciones de prolina.	18
2.10	Proteínas solubles.	18
2.11	Compuestos fenólicos.	19
2.12	Actividad PAL (fenil-alanina-amonio-líasa).	19
2.13	Actividad peroxidasa.	20
2.13.1	Test de glicosilación.	22
2.14	Electroforesis SDS de proteínas.	22
3.	RESULTADOS	24
3.1	Efecto de la infestación por <i>S. graminum</i> en el estado hídrico de la cebada.	24
3.1.1	Incremento del número de áfidos en ensayos de infestación artificial con <i>Schizaphis graminum</i> .	24
3.1.2	Contenido relativo de agua, peso fresco y peso seco.	24
3.1.3	Potencial hídrico de las plantas.	26
3.1.4	Contenido de ácido abscísico y resistencia estomática al vapor de agua.	28
3.2	Efecto de la infestación por <i>S. graminum</i> en los niveles de clorofila, proteínas solubles, aminoácidos libres y en fotosíntesis en plantas de cebada.	30
3.2.1	Clorofila total.	30
3.2.2	Proteínas solubles.	31
3.2.3	Aminoácidos libres (no proteícos).	34
3.2.4	Fotosíntesis.	34
3.2.5	Efecto de la infestación por <i>Schizaphis graminum</i> y <i>Rophalosiphum padi</i> sobre algunos parámetros fisiológicos y niveles de metabolitos en la cebada.	36

3.3	Efecto de la infestación por <i>S. graminum</i> en los niveles de los azúcares sacarosa, glucosa, fructosa y del aminoácido prolina en cebada.	36
3.3.1	Azúcares solubles totales (sacarosa, glucosa y fructosa).	38
3.3.2	Prolina.	40
3.4	Efecto de la infestación en cebada por <i>S. graminum</i> en los niveles de metabolitos descritos con rol defensivo.	42
3.4.1	Fenoles totales.	42
3.4.2	Acido ferúlico.	42
3.4.3	Sobrevivencia de los áfidos en dietas artificiales con ácido ferúlico.	43
3.5	Efecto de la infestación por <i>Schizaphis graminum</i> R. en la actividad de enzimas de cebada relacionadas a respuestas de defensa ante el estrés.	46
3.5.1	PAL (fenil alanina amonio liasa).	46
3.5.2	Peroxidasas.	47
3.6	Efecto de la infestación por <i>S. graminum</i> en los patrones electroforéticos SDS de proteínas de cebada.	53
3.7	Efecto de infestación por <i>S. graminum</i> , por daño mecánico artificial y por sequía en la fisiología, niveles de metabolitos y resistencia estomática en plantas de cebada.	55
3.7.1	Parámetros fisiológicos y niveles de metabolitos en cebada.	55
3.7.2	Resistencia de los estomas al vapor de agua.	58
3.7.3	Daño foliar en cebada provocado por áfidos y por daño mecánico artificial.	58
3.8	Efecto sobre los áfidos de los cambios provocados en la cebada por la infestación con <i>S. graminum</i> .	62
3.8.1	Tasa intrínseca de crecimiento poblacional de los áfidos (r_m).	62
3.8.2	Tasa intrínseca promedio de crecimiento (MRGR) y tasa de desarrollo (1/D).	65
3.9	Efecto sobre los áfidos de cambios provocados en la cebada por infestación con <i>S. graminum</i> , por daño mecánico artificial o por déficit de agua.	65
3.9.1	Tasa intrínseca promedio de crecimiento (MRGR) y tasa de desarrollo (1/D) de áfidos.	65
4.	DISCUSION	67

Lista de Tablas

Tabla 1. Efecto de diferentes niveles de infestación por <i>S. graminum</i> en el estado hídrico de la cebada.	25
Tabla 2. Efecto de la infestación por <i>S. graminum</i> y <i>R. padi</i> sobre algunos parámetros fisiológicos y niveles de algunos metabolitos en plantas de cebada.	37
Tabla 3. Efecto de la infestación por <i>S. graminum</i> , por daño mecánico y por sequía en parámetros fisiológicos y en los niveles de metabolitos en plantas de cebada.	56

Lista de figuras

Figura 1.	Condiciones de crecimiento de las plantas.	13
Figura 2.	Efecto de la infestación por <i>S. graminum</i> en el potencial hídrico y en los niveles de prolina en plantas de cebada.	27
Figura 3.	Ciclo diurno de niveles de ácido abscísico (ABA) y de la resistencia estomática al vapor de agua en plantas de cebada bajo infestación por <i>S. graminum</i> .	29
Figura 4.	Efecto de la infestación por <i>S. graminum</i> en los niveles de clorofila y en las tasas de fotosíntesis de plantas de cebada.	32
Figura 5.	Efecto de la infestación por <i>S. graminum</i> en los niveles de azúcares solubles totales y proteínas solubles en plantas de cebada.	33
Figura 6.	Contenido relativo de aminoácidos solubles en las hojas de cebada.	35
Figura 7.	Contenido de los azúcares sacarosa, fructosa y glucosa en plantas de cebada.	39
Figura 8.	Ciclo diario del contenido de sacarosa en hojas de cebada infestadas.	41
Figura 9.	Efecto de la infestación en los niveles de fenoles totales y ácido ferúlico.	44
Figura 10.	Experimentos en dietas artificiales: Supervivencia de los áfidos.	45
Figura 11.	Actividad fenil alanina amonio liasa (PAL).	46
Figura 12.	Actividad peroxidasa en Dot-Blots.	48
Figura 13.	Actividad peroxidasa en geles no denaturantes.	51
Figura 14.	Patrones de proteínas en geles SDS.	54
Figura 15.	Plantas de cebada sometidas a infestación o daño artificial.	57
Figura 16.	Patrones de resistencia estomática en plantas bajo sequía, daño artificial e infestación.	60
Figura 17.	Clorosis en hojas de plantas de cebada heridas artificialmente o infestadas.	61
Figura 18.	Tasa intrínseca de incremento de la población (r_m), tasa promedio de crecimiento relativo (MRGR) y tasa de desarrollo de áfidos (1/D).	63
Figura 19.	Tasa promedio de crecimiento relativo (MRGR) y tasa de desarrollo (1/D) de áfidos en plantas bajo sequía, daño artificial o previa infestación.	66

Resumen

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) es uno de los cereales importantes en el mundo, después del trigo, el maíz y el arroz. Los áfidos son probablemente la principal y más extendida plaga de insectos de la cebada. El pulgón verde (*Schizaphis graminum* R.) es la especie más destructiva de los cultivos en Norteamérica y una de las especies de áfidos que atacan los cultivos de cebada en Chile. En esta tesis se ha postulado que algunas de las respuestas metabólicas y fisiológicas en las plantas por la infestación reflejarían el daño causado por los áfidos y otras, podrían ser respuestas defensivas al estrés provocado por la infestación.

Plantas de cebada sometidas a infestaciones con el pulgón verde (*S. graminum* R.) mostraron importantes respuestas fisiológicas y metabólicas: a mayor número de áfidos en las plantas en infestaciones prolongadas (5 o más días de infestación), resultaron menores pesos frescos (hasta un 30 %) y contenidos relativos de agua, potenciales hídricos más negativos (- 0.9 MPa) e inferiores contenidos de clorofila, carbohidratos y proteínas solubles en las plantas. Las tasas de asimilación de CO₂ también fueron bajas respecto de plantas control, sin infestación. Similares cambios fueron determinados en plantas bajo sequía. Estos resultados sugieren que algunos de los cambios que ocurren en la cebada cv Aramir pueden ser consecuencia tanto del estrés hídrico provocado (potenciales hídricos más negativos e inferiores niveles de proteínas solubles) como del daño foliar causado (clorosis, tasas fotosintéticas y concentraciones de azúcares bajas, caída en los niveles de ácido abscísico) por la infestación del pulgón verde. En las plantas de cebada bajo infestación, fué encontrada una acumulación hasta de un 40 % de los azúcares solubles, glucosa y fructosa y de 10 veces del aminoácido prolina. Esto se relacionó con el papel que podrían tener estos solutos en el ajuste osmótico en la célula. Cuantificaciones de ABA demostraron un incremento de 1.5 veces del nivel del control y estudios de cambios de la conductancia estomática en estas plantas se explican como respuestas adaptativas frente al déficit hídrico provocado por los áfidos. Todas estas son respuestas principalmente encontradas y descritas en plantas sometidas a estrés por sequía, que podrían ayudar a evitar la pérdida de agua de los tejidos en las plantas de cebada bajo infestación.

Después de varios días de infestación con áfidos, se produce una caída en el estado hídrico de las plantas de cebada. El mecanismo de esta respuesta se desconoce. Sin embargo, en esta tesis se propone que la destrucción de los cloroplastos del mesófilo en las plantas infestadas, afectaría las tasas fotosintéticas y podría disminuir la capacidad de síntesis de ABA, lo que podrían ser factores que limitan la capacidad de las plantas de cebada para ajustarse osmóticamente (por acumulación de solutos compatibles) y responder fisiológicamente (por control estomático de la pérdida de agua) al estrés hídrico provocado por la infestación por áfidos.

Otros cambios bioquímicos estudiados que se producen en las plantas de cebada bajo infestación por áfidos, fueron el incremento de la actividad de PAL y la inducción de la expresión de peroxidasa. La respuesta temprana -a las 16 h- en la actividad de PAL en plantas bajo infestación, sugiere que los niveles de diferentes compuestos fenólicos podrían cambiar en los tejidos de la planta. Esto lo corrobora el aumento en el nivel de ácido ferúlico encontrado en las plantas después de la infestación. La adición del compuesto a dietas artificiales en concentraciones cercanas a los niveles hallados en las plantas infestadas, disminuyó significativamente la sobrevivencia de *S. graminum*. Los cambios encontrados en el metabolismo de los fenoles en las plantas de cebada, podría ser una clara respuesta defensiva contra los áfidos. La actividad específica de peroxidasa se incrementó en plantas bajo infestación por áfidos, entre 1.5 y 3 veces con respecto a los niveles determinados en los controles. El patrón isoenzimático de peroxidasa fue estudiado en geles nativos, no encontrándose diferencias en el patrón de isoenzimas en plantas infestadas respecto al control. Esto sugiere que la mayor actividad peroxidasa en la cebada bajo infestación, podría ser por incremento en la actividad y/o en la inducción de proteínas presentes en la planta, ya que estas también se hallaron en las plantas control. Estos grupos de isoenzimas podrían estar involucradas además en el metabolismo de fenoles como en la reparación de paredes celulares dañadas en las plantas de cebada infestadas y se puede concluir que el incremento en la actividad enzimática de la PAL y de peroxidasa fueron respuestas defensivas en la cebada al ataque por los áfidos.

Afidos alimentados en plantas de cebada previamente infestadas tienen bajas tasas promedio de ganancia de peso relativo (MRGR) y de desarrollo (1/D), solo 82 % y 68 %, respectivamente, comparándolas con las tasas de crecimiento y desarrollo de áfidos alimentados en plantas control sin una previa infestación. Estas bajas tasas de crecimiento y desarrollo se deben probablemente a la calidad del alimento de estas plantas. Los bajos niveles de azúcares solubles, proteínas solubles y de sacarosa hallados en plantas infestadas podrían ser una limitación nutricional para los áfidos que afectaría el desarrollo de las ninfas.

Estos resultados apoyan la hipótesis propuesta en esta investigación y sugieren que algunas de las respuestas metabólicas y fisiológicas en la cebada por la infestación con áfidos, podrían ser consecuencia directa de daño foliar (clorosis, tasas fotosintéticas bajas, caída en los niveles de ABA y la pérdida de la regulación estomática). A pesar de esto, otras respuestas adaptativas transitorias, similares a las que presentan plantas bajo sequía (acumulación de solutos y de ABA) son inducidas en la cebada por el estrés hídrico provocado por la infestación. Respuestas defensivas son inducidas en las hojas de la cebada, similares a las que presentan plantas bajo estrés biótico (activación de enzimas como PAL y peroxidasas) por la actividad alimentaria de *S. graminum* en los tejidos. Algunos de estos cambios metabólicos inducidos en la cebada (acumulación de ácido férulico, baja en azúcares y proteínas solubles) podrían ser tóxicos para los áfidos o al menos deletéreos para el desarrollo de estos insectos.

Abstract

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is the world's fourth most important cereal crop, after wheat, maize, and rice. Aphids are probably the most widespread insect pest of barley. The greenbug (*Schizaphis graminum* R.) is the most destructive insect pest of barley in North America and one of the main aphid species which attack barley in Chile. It is proposed in this thesis that some of the metabolic and physiological responses in plants by aphid infestation show the damage caused and others could be defence responses to the stress caused by the aphids. Some of these changes in barley plants could be deleterious for the aphids.

Barley plants subjected to several days of infestation by the greenbug (*S. graminum* R.) showed important physiological and metabolic changes: The higher the number of aphids on the plants, the lower the water potentials (-0.9 MPa), chlorophyll, soluble carbohydrate and protein contents. The rates of CO₂ assimilation were also lower. Similar changes were observed in plants subjected to drought stress. These results suggest that some of the changes that occurred in barley cv Aramir may be a consequence of water-stress (lower water potentials and protein contents) and foliar damage (chlorosis, lower photosynthesis, sugars content and abscisic acid levels) caused by greenbug infestation.

In infested barley plants, it was found an accumulation of soluble sugars glucose and fructose (c. 40 %). The increase (up to 10-fold) in the aminoacid proline is thought to play a role in the osmotic adjustment of the cell. Moreover, in these plants, the increased ABA levels (1.5-fold) and changes in stomatal conductance -responses mainly found in plants subjected to drought stress- may be understood as adaptative responses to water deficits produced by the aphids. All these responses in infested barley, could help to avoid water loss from the tissues. Yet, the mechanism by which the greenbug, after several days of infestation, causes a drop in the water status of barley plants is still unknown. In this thesis it is proposed that the disruption of the mesophyll chloroplast is what affects photosynthetic rates and it could also decrease the capacity for ABA synthesis. These factors could limit the capacity of barley plants to adjust osmotically (by accumulation of compatible solutes) and to physiologically respond (by stomatal control of water loss) to water stress provoked by aphid infestation.

Other changes in infested barley plants could be related to plant defensive mechanisms or reparative processes in the damage tissues. The early response of PAL activity in plants under infestation (16 h),

suggests that the content of several phenolic compounds in these tissues could change. In infested plants, ferulic acid levels increased. This compound decreased the survival of *S. graminum* in artificial diets at concentrations similar to those found in infested plants. This effect on the metabolism of phenolic compounds in barley could be a defensive response of barley against aphids. An increase in peroxidase activity (between 1.5 to 3-fold) was observed in the proteins of plants infested by the greenbug. These groups of isozymes could repair damaged cell walls in infested plants. The results determined in native gels with isozymatic patterns similar to those of protein extracts of control and to those of infested plants, suggest that the higher peroxidase activity found in infested barley could be due to an increment of activity or induction of proteins present in the infested plants, since they are also found in control plants. The increased in peroxidase could be a host response to aphids attack. Under infestation, the increased PAL and peroxidase activity could be related to these kind of responses on plants subjected to biotic stress by aphids. New aphids reared on previously infested barley plants had the lowest mean relative growth (MRGR) and developmental rates (1/D), solo 82 % and 68 %, respectively, compared with aphids reared in controls plants without previous infestation. Aphids feeding on previously infested barley plants had the lowest growth rates, most likely due to the poor food quality of these plants. The lower levels of soluble sugars, soluble proteins and sucrose found on infested plants could be important nutritional factors which affect the development of the nymphs.

These results support the hypothesis proposed in this thesis, and suggest that some of the metabolic and physiologic responses in barley to aphid infestation could be direct consequences of damage to foliar tissues (chlorosis and lower photosynthetic rates). In spite of this, adaptative responses similar to those shown by plants under water stress (solute and ABA accumulation) were induced in barley plants. Defensive responses similar to those found in plants subjected to biotic stress, such as the activation of peroxydases and PAL enzymes were induced in barley leaves possibly by the feeding stress of *S. graminum* in the tissues. Some of the metabolic changes, particularly the accumulation of ferulic acid, and the decrease in soluble sugars and proteins, could be toxic -or at least harmful- for development of aphids on infested barley plants.

1. Introducción

Dentro de las especies cultivables de mayor importancia económica se encuentran los cereales. Después del trigo, el maíz y el arroz, la cebada (*Hordeum vulgare* L.) es el cuarto cultivo cereal más importante, representando cerca del 12% del área total cosechada para todos los cereales en el mundo (Poehlman, 1985). La cebada es uno de los cereales que se cultivan en la zona central de Chile, siendo atacado por los áfidos *Schizaphis graminum* (Rondani), *Rhopalosiphum padi* (L.), *Rhopalosiphum maidis* (Fitch), *Sitobion avenae* (Fabricius), *Metopolopium dirhodum* (Walker) y en los últimos años por *Diuraphis noxia* (Morvilko), una especie recientemente introducida al país (Zúñiga, 1967; Campos, 1976; Zerené et al.; 1988). Los áfidos son posiblemente la principal plaga de insectos de la cebada, con *Schizaphis graminum* R. (el pulgón verde) como la más destructiva en los cultivos de Norteamérica (Starks y Webster, 1985).

Los áfidos producen efectos devastadores en la producción de los cereales debido al daño causado en los tejidos, a la remoción de nutrientes esenciales de la planta, a la transmisión de virus y a que su excreta azucarada representa un medio de cultivo para hongos fitopatógenos. Se han sugerido diversos mecanismos de resistencia en la cebada contra los áfidos, como son defensas morfológicas y compuestos químicos naturales (Corcuera, 1993). Respuestas defensivas al ataque por áfidos, como son la inducción de inhibidores de proteasas, de otras enzimas y de compuestos deletéreos para los insectos, son posibles mecanismos de resistencia en la cebada.

Bajo condiciones de estrés las plantas presentan respuestas fisiológicas y metabólicas. Algunos de estos cambios corresponden a mecanismos de adaptación en las plantas frente al estrés. Estas respuestas, algunas de ellas generalmente transitorias, permitirían a la planta soportar temporalmente condiciones ambientales adversas. El interés en estudiar la fisiología y el metabolismo de las plantas de especies cultivables frente a factores ambientales extremos, se ha incrementado en razón a que importantes pérdidas en las cosechas son resultado de diversos tipos de estrés y por la ocurrencia simultánea de estos. Las altas o bajas temperaturas, suelos salinos, sequía, patógenos e infestación por insectos podrían ser algunos de ellos (Heinrichs, 1988).

En esta tesis se pretende caracterizar y estudiar respuestas fisiológicas y metabólicas que ocurren en plantas de cebada por la infestación de áfidos y comprender que implicancias podrían tener estos cambios en la interacción entre la cebada y los áfidos.

1.1 Bases bioquímicas de la resistencia en las plantas a los áfidos

La resistencia en las plantas frente a los insectos está conformada por cualidades heredadas que da como resultado que plantas de un cultivar o de una especie resulten menos dañadas que plantas que carecen de estas cualidades (Smith, 1989). Esto hace que la resistencia en la planta sea relativa y que el grado de resistencia esté basado en la comparación con plantas más susceptibles. Horber (1980) ha definido tres categorías de efectos que plantas resistentes producen en los insectos, que pueden manifestarse como **antibiosis** (en que la biología del insecto es negativamente afectada), **antixenosis** (en la cual la planta actúa como un hospedante pobre y el insecto selecciona una planta hospedante alternativa), y la **tolerancia** (en que cualidades genéticas de la planta otorgan la capacidad para frenar o recuperarse del daño causado por los insectos).

Entre las características heredables están los metabolitos secundarios en plantas, los que deben cumplir algunos criterios para estar involucrados en la resistencia de la planta frente a los insectos: 1.- Efectos deletéreos del compuesto en los insectos alimentados con dietas artificiales, 2.- Que se encuentre en los tejidos donde se alimenta el insecto en concentraciones que puedan causar los efectos observados en dietas artificiales y 3.- Que exista una correlación entre la concentración del compuesto y la resistencia de la planta a los áfidos. Se ha sugerido que varios grupos heterogéneos de compuestos naturales en las plantas son "barreras" o factores defensivos permanentes en las plantas contra insectos o patógenos (Brooks y Watson, 1985; Haslan, 1986; Harbone, 1986). La importancia de la resistencia en el control biológico (Pimentel, 1991) y las bases químicas en las plantas en general frente a los áfidos ha sido revisada por Dreyer y Campbell (1987).

1.2 Factores de resistencia constitutivos en las plantas

Se han sugerido que diversos tipos de defensas morfológicas afectan la biología de los insectos. Los pelos superficiales y pelos glandulares (tricomos), las ceras epicuticulares y el engrosamiento de los tejidos en la planta determinarían el grado de resistencia de algunos cultivares a los áfidos. Smith (1989) ha descrito el papel que le corresponde a cada uno en alterar la naturaleza de la superficie foliar y cómo afectan el comportamiento de los insectos. Los compuestos secundarios como sesquiterpenos (β -Cariofileno y β -Farneseno) presentes en pelos glandulares (tricomos tipo A) de *Solanum tuberosum* y *Solanum berthaultii*, son repelentes para el áfido del duraznero *Myzus persicae* (Avé et al., 1987). La infestación de la cebada por *R. padi* se correlaciona inversamente con la cantidad de ceras en la superficie de las hojas (Tsumuki et al., 1989). Ceras foliares de otras plantas contienen aleloquímicos que afectan a *S. graminum* (Varanda et al., 1992) y otras especies de áfidos (Weibel y Starks, 1986). Los componentes de ceras epicuticulares de plantas que estarían involucrados en resistencia a áfidos son la 2-tridecanona (Williams et al., 1980), y algunos alcanos (Klingauf et al., 1978), alcoholes (Dillwith y Berberet, 1990) y dicetonas (Lowe et al., 1985). Incluso, se ha propuesto una interdependencia entre las pectinasas de la saliva de los áfidos con el grado de metilación y ramificación de la péctina intercelular en la planta. Esta interferencia por la péctina en la penetración del estilete del áfido, explicaría el grado de resistencia en sorgo (*Sorghum bicolor*) frente a *S. graminum* R. (Campbell y Dreyer, 1985; Dreyer y Campbell, 1987).

En cereales se han determinado diversos compuestos al interior de la planta con resistencia a patógenos. Por ejemplo, en algunas variedades de trigo, centeno y maíz se ha determinado la presencia de ácidos hidroxámicos (Corcuera et al., 1985; Niemeyer, 1988) acumulados en la planta como glucósidos, que sufren hidrólisis por endoglucosidasas cuando el tejido vegetal es dañado (Hofman y Hofmanova, 1969). Se ha encontrado que plantas con un alto contenido de ácidos hidroxámicos presentan una menor población de áfidos (Argandoña et al., 1980) tanto en condiciones de invernadero como de campo (Beck et al., 1983). El papel que juegan los ácidos hidroxámicos en la resistencia a los áfidos (por ser tóxicos e inhibir su alimentación) ha sido revisado por Niemeyer (1992) tomando en cuenta los aspectos ecológicos y moleculares de esta interacción.

En varias gramíneas y particularmente en cebada, se ha descrito la presencia de protoalcaloides, que poseen nitrógeno heterocíclico sólo en el anillo indólico. Gramina, el protoalcaloide más simple, ha sido ampliamente estudiado, debido a sus propiedades químicas y biológicas incluyendo toxicidad a mamíferos, insectos (entre ellos diferentes áfidos), plantas y bacterias. Esto sugiere un papel general de este compuesto en la protección de la cebada contra herbívoros, plagas y patógenos. En experimentos con dietas artificiales con gramina en las especies *S. graminum* y *R. padi*, este compuesto mostró deterrencia (desestimulo de la alimentación) y toxicidad en los insectos, provocando la muerte del 50% de los áfidos con una concentración (DL50) en la dieta dentro del rango de concentración a la cual es encontrado el compuesto en las hojas de cebada (Zúñiga y Corcuera, 1986). Al estudiar la conducta alimentaria de los áfidos, se encontró que la presencia de gramina en dietas artificiales y en la planta, alteraban los hábitos alimentarios de *S. graminum* y *R. padi*, observándose un incremento del período de salivación, un mayor número de pruebas y un menor tiempo de ingestión (Zúñiga et al., 1988). Además, se han hallado tanto en experimentos de laboratorio como en el campo (Zúñiga et al., 1985; Kanehisa et al., 1990; Rustamani et al., 1992) correlaciones entre el contenido de gramina en las hojas y la resistencia para los áfidos *S. graminum* y *R. padi*.

Otros compuestos constitutivos de las plantas de cebada con actividad biológica y posibles roles ecológicos son los flavonoides y fenoles. Se han determinado en solo cinco variedades de cebada hasta 27 flavonoides, con una distribución variable en estos diferentes cultivares (Fröst et al., 1977). Algunos de estos compuestos muestran en dietas artificiales un efecto deterrente o tóxico contra *S. graminum* (Todd et al., 1971; Kanehisa et al., 1987) y *Myzus persicae* (Dreyer y Jones, 1981). Inicialmente fueron propuestos de tener relación con la protección contra los áfidos por Guenzi y McCalla (1966) diversos ácidos fenólicos como el ácido ferúlico, cumárico, vanílico, siríngico y hidróxibenzoico en maíz, trigo y avena. A pesar de ello, el posible papel de protección que tendrían algunos fenoles y flavonoides en la cebada contra los áfidos permanece incierta, debido a que no se han realizado experimentos para establecer correlaciones entre el grado de resistencia y la concentración de estos compuestos en la planta.

1.3 Factores de resistencia inducidos por estrés abiótico y biótico

Al igual que otros grupos de insectos los áfidos en particular dependen de las plantas para su nutrición. Factores ambientales que afecten las cualidades nutricionales y organolépticas de la planta podrían afectar la interacción planta-áfido, debido a que la composición de la planta cambia (Corcuera, 1993). Entre los factores que afectan la composición química de la planta están diferentes tipos de estrés fisicoquímicos o abióticos (propiedades químicas del suelo, agua, temperatura, energía electromagnética, pesticidas y reguladores del crecimiento, polución ambiental y daño mecánico) y bióticos causados por diversos organismos como insectos, patógenos y malezas (Heinrichs, 1988). Entre los factores abióticos que afectan las concentraciones basales de algunos compuestos, está la fertilización de plantas de cebada con soluciones ricas en KNO_3 , lo que incrementa el contenido de gramina en las hojas más jóvenes. Las tasas de crecimiento poblacional de *S. graminum* son más bajas en estas plantas fertilizadas con KNO_3 que en ausencia o baja concentración de esta sal. Estos efectos podrían ser debidos a la mediana toxicidad o a la actividad deterrente por la acumulación de esta sal y al incremento en el contenido de gramina en las hojas (Salas et al., 1990). Así mismo, al someter plántulas de cebada a altas temperaturas, se encontró un mayor contenido de gramina en sus hojas (Hanson et al., 1981). Ha sido sugerido que plántulas de cebada crecidas en regímenes de altas temperaturas y fotoperíodos largos, serían más resistentes a los áfidos, a causa del incremento de gramina en las hojas jóvenes por ambos factores (Salas y Corcuera, 1991; Hanson et al., 1983). Hasta ahora no ha sido descrita la acumulación de gramina por la infestación de áfidos.

Uno de los pocos metabolitos secundarios estudiados, en que su acumulación y síntesis es promovida por el ataque de insectos son los ácidos hidroxámicos, que se encuentran constitutivamente en varias especies de cereales. Estos compuestos incrementan sus niveles en las plantas de trigo por insectos chupadores, como es la inducción en su acumulación por la alimentación de áfidos (Niemeyer et al., 1989) y en plantas de maíz después de daño artificial (Morse et al., 1991a). La acumulación de estos compuestos por daño mecánico se explica mejor en la inducción de su síntesis como una respuesta en la planta ante insectos fitófagos (masticadores), lo que ha sido descrito en maíz bajo el ataque de larvas de lepidópteros del género *Sesamia* (Gutiérrez et al., 1988). Otros cambios fitoquímicos que han sido descritos por ocurrir después de

la infestación y el daño foliar son incrementos en la concentración de fenoles (Leszczynsky, 1985), alcaloides (Baldwin, 1988) y cambios en los contenidos de aminoácidos (Ciepiella, 1989).

Recien están conociéndose los mecanismos de transducción de las señales para la activación de defensas en las plantas contra el ataque de patógenos (Lamb et al., 1989; Stacey et al., 1992) y los mecanismos moleculares detrás de la inducción de proteínas (Ho y Sachs, 1989). Sin embargo, ya se postula que papel podrían tener algunos compuestos en las plantas, haciendo parte de la señal y transducción de la respuesta al daño. El ácido salicílico (Raskin, 1992) y otras moléculas con características propias de fitohormonas, como ácido abscísico (Sánchez-Serrano et al., 1991) y el ácido jasmónico (Staswick, 1992), estarían implicadas en la expresión de genes específicamente inducidos por daño. La síntesis de inhibidores de proteasas en respuesta al ataque de insectos o patógenos mediado por ácido jasmónico es un ejemplo de la inducción de respuestas defensivas activadas por estas señales (Ryan, 1990; Farmer y Ryan, 1992). En una novedosa vía de transducción de esta señal, Wildon et al., (1992) concluyen que señales eléctricas estarían involucradas en el mecanismo para la respuesta sistémica ante el daño que lleva a la síntesis de estos inhibidores. Entre las proteínas que han sido descritas de tener un rol defensivo en la planta están las chitinasas, los inhibidores de tripsina/ -amilasas y las tioninas en cebada (Kragh et al., 1990; García-Olmedo et al., 1992; Apel et al., 1990), lectinas (Chrispeels et al., 1991), proteínas de las paredes celulares, como extensinas, proteínas ricas en glicina (PsRG), proteínas ricas en prolina (PsRP) y proteínas ricas en arabinogalactanos (Showalter, 1993) en otras especies.

En cebada se ha descrito la inducción de peroxidasas por la inoculación con *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, agente causante de la enfermedad llamada "polvillo" en esta especie (Hislop y Stahmann, 1971). Se han descrito similares cambios en la actividad peroxidasa en el fluido intercelular de tallos de hojas de trigo infectadas. La mayor actividad corresponde a la inducción de dos isoenzimas de peroxidasas involucradas con la respuesta de infección por patógenos (Holden y Rohringer, 1985). Las peroxidasas catalizan reacciones de entrecruzamiento entre macromoléculas como lignina (Zieslin y Ben-zaken, 1991). Peroxidasas inducidas por la inoculación con patógenos, llevarían a cabo la deposición de compuestos fenólicos similares a lignina en los sitios de penetración y daño en la hoja, que proveerían a la planta de una barrera frente a la degradación de la pared celular y a la penetración del hongo en el tejido (Vance et al.,

1980; Graham y Graham, 1991). Esto ha sido descrito en cebada (Aist y Israel, 1986; Wright y Heale, 1988), en que la insolubilización de compuestos similares a lignina en la pared y en la papilla (respuesta morfológica), en los sitios de infectación, se relaciona con la inhibición del ingreso del patógeno. Por otro lado, se ha propuesto al ácido jasmónico como un transductor intracelular de la señal provocada en plantas por heridas o por ataque de patógenos, hipótesis basada en la observación de que la aplicación exógena de jasmonato induce genes en diferentes especies de plantas que responden a heridas y patógenos. Sin embargo, el efecto del ácido jasmónico en la interacción de la cebada con *E. graminis* es complejo. Si bien el ácido jasmónico tendría un efecto de protección en la cebada contra el hongo, no estaría involucrado en el mecanismo de transducción de la señal que lleva a una inducción de proteínas relacionadas a patogénesis (Schweizer et al., 1993). La inducción de peroxidasas por infestación de áfidos u otros insectos no ha sido descrita anteriormente. La caracterización de respuestas defensivas en la cebada inducibles por áfidos es un campo de interés en la implementación de cultivos con resistencia a los insectos.

1.4 Respuestas fisiológicas y metabólicas en las plantas frente a estrés ambiental

Las plantas presentan diversas respuestas ante condiciones de estrés en el ambiente. Los cambios en mecanismos regulatorios del metabolismo permiten la sobrevivencia de la planta bajo estrés. Otros factores que afecten estas respuestas de aclimatación, podrían afectar aún más a las plantas bajo estrés. La infestación por áfidos y la sequía son dos factores que individualmente causan reducciones en la producción de los cereales. Resultan importantes efectos negativos en la producción cuando estos dos factores ocurren en sucesión, indicando que una interacción sinérgica podría ocurrir entre la infestación y la sequía en las plantas (Ferreter et al., 1988). Esto podría resultar si la infestación por áfidos imposibilita a la planta de responder oportuna y eficientemente al estrés hídrico.

La infestación por áfidos causa síntomas de estrés hídrico en las hojas de las plantas de cebada, inclusive en presencia de suficiente humedad en las raíces. *Diuraphis noxia* decrece los potenciales hídricos de plantas de cebada de 14 días de edad e incrementa los niveles de metabolitos osmóticamente activos en la célula, por acumulación de prolina y glicina-betaina en las hojas (Riedell, 1989). Se desconoce el mecanismo por el cual el pulgón ruso del trigo (*D. noxia*) causa síntomas propios del estrés por déficit de

agua en las hojas de plantas de cebada infestadas. Otro áfido de los cereales que ha sido descrito en reducir el crecimiento de las raíces en cebada es *Schizaphis graminum* (Castro et al., 1988) y provocar daño en la cutícula y la epidermis de las hojas (Al-Mousawi et al., 1983). Riedell (1989) ha propuesto que estos efectos pueden causar una disminución del ingreso de agua por el sistema radical o puede causar un incremento de la pérdida de agua por y desde las hojas y tendrían roles importantes en los efectos de la infestación por este áfido en los cambios en el estado hídrico de las plantas de cebada. En trigo, los efectos deletéreos que causa la infestación de *S. graminum*, afectan las respuestas adaptativas a nivel metabólico y fisiológico de aclimatación en las plantas frente al estrés por sequía (Dorschner et al., 1986). Sin embargo, en trigo al igual que en cebada se desconoce como la infestación por *S. graminum* afecta los procesos que mantienen el balance hídrico de las plantas en ambas especies, ya que en las investigaciones previas no se han realizado estudios detallados sobre el estado hídrico de las plantas de cebada bajo infestaciones prolongadas, como se llevó a cabo en esta tesis.

En plantas, las células y los tejidos muestran numerosas respuestas metabólicas bajo déficit de agua, algunas de ellas con una posible significancia adaptativa para enfrentar periodos de sequía. Por ejemplo, el estrés hídrico tiene importantes efectos en el metabolismo de los carbohidratos en plantas. Estos incluyen cambios en fotosíntesis, en translocación de fotosintatos, en partición de fotosintatos entre azúcares y almidón, en la tasa de hidrólisis de polisacaridos de reserva y en respiración (Kramer, 1983; Quick et al., 1992). Se ha señalado que ácidos orgánicos y carbohidratos estarían implicados en cumplir varias funciones en la respuesta metabólica y fisiológica de las plantas frente al estrés hídrico. El incremento en los niveles de azúcares solubles está descrito dentro del ajuste osmótico (acumulación de solutos) como un aspecto importante de adaptación en plantas mesófitas ante el déficit de agua. Sin embargo, otros estudios sugieren que el estrés hídrico llevaría a una disminución general de los azúcares solubles en las hojas (Hanson y Hitz, 1982). El ajuste osmótico es un mecanismo adaptativo por el cual el potencial hídrico en la célula puede ser disminuido sin ser acompañado de un cambio de turgencia. La mantención de turgencia permite la continuación de la elongación celular y facilita una mayor conductancia estomática en la planta a bajos potenciales hídricos (Turner y Jones, 1980). Se ha descrito que algunos iones inorgánicos, proteínas solubles y otros compuestos que contienen nitrógeno (glicina-betaina, prolina) son solutos que presentan un

incremento en plantas bajo estrés hídrico, aunque el papel específico y su importancia en la regulación osmótica no está bien entendida. Además, estos solutos aparecen bajo estrés en función de estabilizar la estructura de proteínas y membranas (Rhodes, 1987). El papel propuesto para el ajuste osmótico en mantener la fotosíntesis a bajos potenciales hídricos, pareciera no estar directamente relacionado con la acumulación de solutos (Girma y Krieg, 1992). Zúñiga et al., (1989) estudió la distribución de prolina en las hojas de cebada y demostró su acumulación en plantas bajo sequía. Debido a que la infestación por áfidos provoca en las plantas síntomas de estrés hídrico, se consideró importante en esta tesis cuantificar y determinar los cambios de este aminoácido en la cebada bajo diferentes niveles y tiempos de infestación. El papel potencial de que la infestación por áfidos afecte la acumulación de solutos osmorreguladores en las plantas, podría explicar y dar cuenta de los efectos de la infestación en alterar mecanismos adaptativos de aclimatación al déficit hídrico en los cereales.

El metabolismo del nitrógeno está dentro de los procesos en la planta más sensibles al déficit hídrico (Hsiao et al., 1976). Bajo sostenido estrés hídrico, en la hoja se presenta una degradación neta de proteínas y es mayor el metabolismo de los aminoácidos, pero disminuye el transporte por el floema de compuestos con nitrógeno fuera de la hoja. Esto resulta en una mayor concentración de aminoácidos libres (particularmente prolina) en hojas bajo estrés hídrico (Hanson y Hitz, 1982). La acumulación de prolina es una respuesta observada ampliamente en plantas expuestas a varios tipos de estrés ambiental (Stewart y Larher, 1980; Hanson y Hitz, 1982). En plantas bajo estrés hídrico, la acumulación de prolina es acompañada de la degradación de proteínas, además de la prolina libre cuya síntesis proviene del metabolismo de otros aminoácidos (Stewart, 1981). Se ha propuesto una variedad de funciones en la planta como consecuencia de la acumulación de prolina (osmorregulación por ajuste osmótico celular, hidratación de biopolímeros, reservorio de N y de energía soluble para ser utilizado al finalizar el estrés hídrico). Aspinall y Paleg (1981) han descrito las evidencias de que la acumulación de prolina (como un soluto compatible) tendría un importante papel en reducir la pérdida de agua en la célula, así como la importancia de esta respuesta en especies mesófitas. El ácido abscísico (ABA) y la prolina se acumulan en diferentes especies de plantas en respuesta a la sequía. En cebada, la acumulación de la hormona precede la acumulación de prolina y al rehidratar las plantas, la disminución en los niveles de ABA antecede la

disminución de prolina (Aspinall, 1980). Ambos eventos podrían estar enlazados en la respuesta adaptativa de la cebada ante el estrés hídrico. ABA está involucrado en múltiples procesos en el desarrollo y la fisiología en las plantas (dormancia de yemas y semillas, crecimiento, abscisión y senescencia). Además, el incremento en los niveles de ABA en plantas bajo estrés hídrico está relacionado con el cierre de los estomas, una importante respuesta en plantas bajo condiciones de sequía, evitando la pérdida de agua de las hojas por transpiración, al reducir la conductancia al vapor de agua a través de los estomas. El sitio primario de acción del ABA en las hojas totalmente diferenciadas son las células de guarda en la epidermis (Hornberg y Weiler, 1984). Dos vías posibles para incrementar la concentración de ABA en el apoplasto en esta región son por aumento del transporte a las hojas de ABA desde las raíces o por liberación del ABA desde los compartimientos en que se halla en el mesófilo. Esta última respuesta puede ser promovida por pequeños cambios en el estado hídrico de la hoja (Hartung et al., 1988). Está descrito que bajo infestación por áfidos, se presentan cambios en los potenciales hídricos y síntomas de estrés hídrico de las plantas de cebada (Riedell, 1989). Se ha postulado que la reducción del ingreso de agua por las raíces en estas plantas de cebada infestadas, podría corresponder a una reducida conductancia estomática. Sin embargo en esta tesis se demostrará que cambios en la fisiología estomática de plantas bajo infestación, serían determinantes en los efectos provocados por los áfidos en el estado hídrico de la cebada.

El pulgón verde afecta en la cebada el crecimiento vegetativo de zonas aéreas, con destrucción de áreas fotosintéticas por daño local (zonas cloróticas) en los tejidos foliares (Castro y Rumi, 1987). *S. graminum* decrece la fotosíntesis en cebada, lo que ha sido postulado que se debería al daño y clorosis foliar. Las hojas infestadas tienen tasas fotosintéticas bajas y contenidos de clorofila menores cuando son comparadas con los controles no infestados, presentando, además, mayores tasas de respiración (Gerloff y Ortmann, 1971). Otras especies de áfidos, como *Sitobion avenae* afectan en la cebada la eficiencia en la captura de la luz, disminuyendo la fotosíntesis (Blanco et al., 1992). En trigo, *S. graminum* decrece la asimilación de CO₂ por disminución de la capacidad fotosintética en el mesófilo (Ryan et al., 1987). Sin embargo, en esta tesis se señala que el estrés hídrico provocado en la planta por la infestación por áfidos, en particular por *S. graminum*, probablemente altera otros procesos metabólicos en la cebada, relacionados en mantener niveles normales de poder reductor, de azúcares y proteínas solubles en la planta.

Debido a que la infestación por áfidos provoca respuestas fisiológicas y metabólicas en las plantas, en esta tesis se postula como hipótesis que algunas de estas respuestas reflejarían el daño causado, en tanto otras serían respuestas defensivas en las plantas ante el estrés.

1.5 Objetivos

Como objetivo general se pretende determinar y estudiar cambios fisiológicos y metabólicos producidos en plantas de cebada por la infestación con áfidos y como objetivos específicos se han propuesto los siguientes:

- I.- Determinar los efectos de la infestación con el áfido *Schizaphis graminum* R. sobre el estado hídrico de plantas de cebada y caracterizar mecanismos fisiológicos y metabólicos como respuestas adaptativas al estrés hídrico provocado. Para ello, se evaluará en la planta bajo infestación el contenido relativo de agua, el potencial hídrico, niveles de ácido abscísico (ABA) y la conductancia estomática al vapor de agua.
- II.- Caracterizar el efecto en las plantas de cebada que la infestación con *S. graminum* presenta sobre metabolitos importantes para la fotosíntesis y el metabolismo del carbono. Se medirá el efecto en la concentración de clorofila, en los niveles de metabolitos solubles como azúcares, aminoácidos, proteínas y las tasas fotosintéticas de plantas sometidas a infestación.
- III.- Caracterizar en las plantas de cebada cambios de la actividad de enzimas relacionadas con respuestas defensivas (actividad enzimática de fenil alanina amonio liasa y peroxidasas) y la acumulación en la planta de algunos compuestos (fenoles) por infestación de áfidos.
- IV.- Estudiar y evaluar el efecto que tiene sobre la biología de los áfidos los cambios producidos por la infestación de *S. graminum* en el estado hídrico, nutricional y composición química de la cebada. Se determinarán la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r_m), la tasa promedio de crecimiento relativo (MRGR), la tasa de desarrollo ($1/D$) y la sobrevivencia de los áfidos en plantas y en dietas artificiales.

2. Materiales y Métodos

2.1 Cultivo de las plantas

Se sembró cebada *Hordeum vulgare* (cv Aramir) en potes con vermiculita estéril. Las condiciones de crecimiento en las cámaras de cultivo fueron $22 \pm 3^\circ\text{C}$ y fotoperiodo de 14/10 h (luz/oscuridad) durante el período de experimentación. Las plantas fueron regadas con solución nutritiva Hoagland 3 veces por semana, permaneciendo los potes marcados con etiquetas para identificar cada experimento en bandejas con agua corriente (Fig. 1).

2.2 Infestaciones de la cebada con *Schizaphis graminum* R.

Grupos de plantas de cebada cv Aramir de 10 y 16 días de siembra fueron infestadas con diferentes números iniciales de áfidos ápteros por planta: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20 y 40 ninfas de 3er estadio (Wilson et al., 1978) provenientes de la colonia en plantas de cebada del mismo cultivar. Los áfidos permanecieron en las plantas por intervalos de tiempo comprendidos entre 0 y 6 días, retirándolos para evaluar en las plantas los parámetros fisiológicos y metabólicos descritos más adelante en esta sección. Se realizaron cinéticas en tiempos más cortos (0, 4, 8, 12, 16, 24 h,...) con las densidades iniciales de áfidos descritas, para algunos de los parámetros evaluados.

2.2.1 Tasa intrínseca de crecimiento poblacional de los áfidos (r_m)

Plantas de cebada cv Aramir con diferentes densidades poblacionales de áfidos por planta, permanecieron con estos niveles de preinfestación por 4 días. Estas poblaciones iniciales de áfidos fueron retiradas, reinfestando las plantas de todos los grupos con dos áfidos (4to estadio) por planta. Se evaluó la tasa de crecimiento de la población (r_m) 5 días después, calculada a partir de la fase exponencial de la curva de crecimiento de la población:

$$r_m = \ln (N_f/N_i) / t \quad \text{es decir,} \quad r_m = (\ln N_f / \ln N_i) / t$$

$$N_f = \text{N}^\circ \text{ áfidos finales} \quad N_i = \text{N}^\circ \text{ áfidos iniciales} \quad t = \text{Número de días}$$



Figura 1. Condiciones de crecimiento de las plantas. Plantas de cebada *Hordeum vulgare* (cv Aramir) de 15 días de edad en potes con vermiculita en cámaras de cultivo bajo las condiciones descritas en la metodología ($22 \pm 3^\circ\text{C}$ y 14/10 h de luz/oscuridad), fueron utilizadas para los experimentos de infestación con *Schizaphis graminum* R.

2.2.2 Tasa de crecimiento relativo promedio (MRGR) y tasa de desarrollo de áfidos (1/D).

Grupos de plántulas de cebada cv Aramir sometidas a 4 días de infestación inicial con 0, 20 y 40 áfidos adultos de *S. graminum*, fueron utilizadas para evaluar estos parámetros. Las poblaciones de áfidos de la preinfestación son retiradas, numerando las plantas y colocando en cada una de ellas ninfas de 1er estadio provenientes de la colonia, las que han sido pesadas previamente. Estos áfidos son pesados nuevamente al cabo de 3 días de permanecer en las plantas, colocándolos nuevamente en ellas para obtener la tasa de desarrollo. La tasa promedio de crecimiento relativo (Adams & Van Emden, 1972) fué calculada con el peso de los áfidos para un periodo de 3 días por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{M.R.G.R. } (\mu\text{g}/\mu\text{g}/\text{día}) = \frac{\ln(\text{peso final, } \mu\text{g}) - \ln(\text{peso inicial, } \mu\text{g})}{\text{N}^{\circ} \text{ de días que se evaluó el incremento de peso}}$$

La tasa de desarrollo de los áfidos fue calculada con la expresión 1/D, donde D es el tiempo en días que toma cada uno de los áfidos para alcanzar el estado adulto e iniciar su reproducción.

2.2.3 Experimentos con dietas artificiales: Supervivencia de áfidos

El sistema usado para los ensayos con dietas artificiales es el descrito por Argandoña et al., (1983). Este consiste en colocar sobre una cápsula de vidrio, abierta por ambos extremos, una membrana de parafilm. Sobre la membrana se depositan gotas de dieta líquida con nutrientes colocando sobre esta otra membrana de parafilm. Para los ensayos de supervivencia se colocaron 10 ninfas (3er estadio) en el interior de cada cápsula y se contó cada 12 h el número de áfidos vivos hasta las 84 h. Se realizaron 5 repeticiones por cada tratamiento.

2.3 Contenido relativo de agua, peso fresco y peso seco de la cebada.

El contenido relativo de agua fue calculado de acuerdo a Wright (1977):

$$\text{C.R.A } (\%) = (\text{peso fresco} - \text{peso seco}) / (\text{peso a saturación} - \text{peso seco})$$

El peso a saturación fue determinado colocando tallos y hojas de cebada en agua destilada por 6 h a 25°C, secándolas rápida y ligeramente antes de pesar. Posteriormente, las hojas son mantenidas en estufa

por 5 días a 60°C para determinar el peso seco. El peso fresco y el peso seco fueron obtenidos pesando grupos de 10 plantas (tallos y hojas) antes y después de permanecer en estufa 5 días a 60°C.

2.4 Potencial hídrico de las plantas de cebada

Los potenciales hídricos de las plantas se evaluaron con la metodología de la bomba de presión descrita por Scholander et al., (1964). Las plantas fueron cortadas en la base del tallo, colocando los tejidos de la planta en una cámara de acero, cerrada herméticamente, dejando sólo el extremo cortado del tallo por fuera de la cámara. La cámara fue presurizada con nitrógeno hasta alcanzar una presión suficiente para que el agua del xilema salga por la zona cortada. La presión registrada en el manómetro (presión de balance) es igual a la presión negativa correspondiente al potencial hídrico de la planta.

2.5 Ácido abscísico (ABA)

Las determinaciones de ácido abscísico se realizaron colocando tejido fresco de hojas (1,0 g) cortado en trozos de 1 cm en 5 ml de EtOH al 85 % (v/v) por 24 h a 25 C. El extracto se filtró por medio de un prefiltro Millipore (0,2 μ m) y acidificado con H₃PO₄ (0,5 N) a pH 4,0. Muestras de 20 μ l fueron inyectadas en una columna Lichosphere 100 RP18 (Merck). La corrida isocrática se hizo con acetonitrilo:agua (70:30, v/v) con flujo de 2.5 ml/min. La cuantificación fue hecha por medición de la A236. La curva estándar fue calculada con (\pm) cis, trans-ABA estandar (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO) en EtOH al 85 % (v/v), con un tiempo de retención de 5,5 min en un HPLC Merck-Hitachi (Lipp, 1991).

2.6 Fotosíntesis y conductancia estomática al vapor de agua

La fotosíntesis neta se evaluó con un sistema abierto por medio de un analizador de gases infrarojo ADC tipo 225/2/SS/B, según la metodología descrita por Hawkins et al., (1987). El IRGA (Infra Red Gas Analyser) posee una fuente y un detector de radiación infrarroja. La cantidad de radiación que llega al detector es función de la cantidad de moléculas de CO₂ (absorbe radiación infrarroja de 4,26 μ m) que se encuentren entre la fuente de radiación y el detector. El instrumento posee dos cámaras llamadas de referencia (con flujo de un gas de concentración conocida de CO₂ en ppm) y una cámara de análisis (por la

cual se hace pasar aire del ambiente, midiendo la concentración de CO₂ del aire exterior). Esta medición absoluta permite conocer la concentración de CO₂ del aire que circulará posteriormente por ambas cámaras, concentración que disminuye en la cámara de análisis cuando al colocar la planta, la fotosíntesis neta fija el C en los tejidos. Esta medición diferencial se realizó con un flujo para ambas cámaras de 18 l/h. La temperatura al interior de las cámaras se controló por medio de un ventilador, que además disminuye la resistencia de la capa límite, manteniéndola constante.

La disminución de CO₂ en el interior de la cámara de análisis se registró en ppm de CO₂. Se midió en las hojas el área foliar utilizada, obteniendo la asimilación de CO₂ por hora y por dm² de hoja. Se evaluó la concentración de clorofila de la hoja utilizada, para expresar la tasa de fotosíntesis por mg de clorofila. Los cálculos usados para la determinación de la tasa de fotosíntesis fueron los siguientes:

El flujo de aire a través de las cámaras se obtuvo midiendo el tiempo que demora el aire en recorrer un determinado volumen:

$$J_{CO_2} = v/t \quad \text{flujo del aire en l/h} \quad A = \text{área foliar en dm}^2$$

Con estos valores es posible calcular el volumen de CO₂ asimilado por la hoja:

$$I_{CO_2} = J_{CO_2} \times A_{CO_2}$$

J_{CO_2} corresponde al flujo y A_{CO_2} es la lectura diferencial obtenida del IRGA en ppm. El volumen del CO₂ es 22,4 l/mol y su peso 44 g/mol. Con esto es posible obtener su densidad:

$$D = 44 \text{ g/mol} / 22,4 \text{ l/mol} = 2 \text{ g/l} \quad (D) \text{ densidad del CO}_2$$

Para determinar la masa de CO₂ acumulado en 1 hora (I') se calculó de la siguiente ecuación:

$$I'_{CO_2} = I_{CO_2} \times D_{CO_2}$$

Al tomar en cuenta el tejido foliar, tenemos:

$$i_{CO_2} = I'_{CO_2} / A \text{ (dm}^2) \quad \text{masa de CO}_2 \text{ asimilado por la hoja en 1 hora referida al área foliar.}$$

Para evaluar la conductancia estomática, el flujo del vapor de agua desde las hojas (transpiración) fue determinado por medio de un porómetro automático de estado estacionario Mk3 (Delta-T Devices, England). Las mediciones fueron realizadas colocando hojas intactas por su cara inferior (abaxial) frente al sensor y el flujo de vapor de agua por los estomas fue expresado como resistencia estomática (en s/cm), el

inverso de la conductancia. Los valores de resistencia obtenidos en las hojas fueron calculados de acuerdo a la curva de calibración y a las fórmulas descritas por Stiles et al., (1970).

2.7 Clorofila total

La cuantificación de Clorofila total se realizó según el método descrito por Arnon, con la modificación de Lichtenthaler y Wellburn (1983). Tejidos frescos de hojas (0,5 g) se maceraron en un mortero de porcelana con EtOH p.a. (96 % v/v), filtrando a través de papel filtro Whatman N° 2, y midiendo la absorbancia del filtrado a 649 y 665 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 240 (P/N 204-58000). El cálculo de la concentración de clorofila total ($\mu\text{g/ml}$ de extracto) se realizó mediante la fórmula:

$$\text{Clorofila Total } (\mu\text{g/ml}) = 18,08 (A_{649}) + 6,63 (A_{665})$$

2.8 Azúcares solubles (sacarosa, fructosa y glucosa)

Los azúcares solubles totales se cuantificaron por medio del método colorimétrico con el reactivo Antrona, descrito por Riazi et al., (1985). Tejido fresco de hojas de cebada (0,5 g) se colocó en EtOH al 85 % (v/v) a 25°C por 24 h, filtrando posteriormente en papel Whatman N° 1. Una alícuota de 0,1 ml de extracto etanólico se hizo reaccionar con 3 ml de Antrona (0,15 % p/v en H_2SO_4 al 72 % v/v) recién preparada a 100°C por 10 min. La reacción fue detenida en hielo y la absorbancia medida a 625 nm en un Spectronic 20. La concentración fue expresada a partir de una curva de calibración en equivalentes de glucosa.

La concentración de algunos azúcares individuales en las hojas de la cebada (sacarosa, fructosa y glucosa) fue determinada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) según la metodología de Nachtmann y Budna (1977). Los azúcares fueron obtenidos del tejido utilizando la metodología descrita para obtener los extractos etanólicos descritos. Los extractos se pasaron por un prefiltro Millipore (0,2 μm) antes de correr las muestras por una columna Merck (RP18) y ser caracterizados por medio de un detector de índice de refracción en gradiente isocrático de acetona: agua (55:45).

2.9 Aminoácidos libres y determinación de prolina

Los perfiles de los amino ácidos individuales en plantas control y sometidas a infestación se evaluaron por HPLC, realizando la extracción de amino ácidos libres de tejido fresco en EtOH al 85 %, purificándolos a través de una columna Dowex 50W (Sigma). Los derivados fluorescentes fueron obtenidos posteriormente con 9-Fluorenilmetilcloroformato (FMOC-Cl), separándolos en una columna ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) de 5 µm y detectándolos con un detector de fluorescencia Shimadzu RF-530. Los amortiguadores, solventes, flujos y gradientes, así como la metodología utilizada, están descritos por Labanauskas et al., (1981) y Chang et al., (1982). Prolina fue cuantificada colorimétricamente de acuerdo a la metodología de Bates et al., (1973) con el reactivo Ninhidrina ácida al 3 % (p/v) en H₂SO₄ (p.a.), que forma el complejo coloreado con prolina, aminoácido que se extrae a partir de tejido fresco en ácido sulfosalicílico al 3 % (p/v). La absorbancia del complejo Ninhidrina-prolina extraído en tolueno (p.a.), fue medida a 520 nm en un Spectronic 20.

2.10 Proteínas solubles

La concentración de las proteínas solubles en las plantas control y las sometidas a diferentes tratamientos se cuantificó por medio del método colorimétrico descrito por Bradford (1976). Tejido fresco de hojas es homogenizado en 3 ml de amortiguador de extracción Tris-HCl (62,5 mM, pH 6,8), SDS (2 %), β-Mercaptoetanol (0.5 %) y el inhibidor de proteasas PMSF (2 mM). El extracto se centrifugó a 10000 g x 30 min, tomando del sobrenadante una alícuota de 200 µl y agregando 5 veces este volumen en acetona p.a. fría (-20°C). Se agitó y dejó precipitar por 1 h a -20°C, centrifugando a 10000g x 5 min. La pella de proteínas fue liofilizada y resuspendida en 1 ml de NaOH 1N. Se tomó una alícuota y se hizo reaccionar con el reactivo de Bradford por 10 min a 25°C, midiendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-240 (P/N 204-58000). Se expresó la concentración de proteínas en base a la curva de concentración con BSA.

2.11 Compuestos fenólicos

La metodología utilizada para cuantificar la concentración de fenoles en cebada es la descrita por Torres et al., (1987). El tejido fresco de hojas de cebada controles y sometidas a infestación se homogeniza en 20 ml de MeOH (p.a.) al 98 % (v/v), colocado en agitación a 25°C por 12 h. Las muestras son filtradas en papel Whatman N° 1, realizando una separación y arrastre de otros componentes celulares con 20 ml de hexano p.a. en embudos de decantación por 5 veces. La fase MeOH:H₂O es filtrada llevando a un volumen estándar de 10 ml. Una alícuota de la muestra se coloca en H₂O a reaccionar con el reactivo Folin-Ciocalteu y Na₂CO₃ al 20 % (p/v) por 2 h a 50°C. La absorbancia del complejo coloreado se midió a 765 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-240 (P/N 204-58000).

Para cuantificar y evaluar la concentración de ácido ferúlico en los tejidos de la planta, las hojas fueron cortadas en trozos pequeños y sumergidos en EtOH al 80 % (v/v) durante 24 h. El extracto etanólico fue filtrado por medio de un prefiltro de acetato de celulosa Millipore (0.45 µm) y analizado por cromatografía líquida de alta resolución (Cromatógrafo Shimadzu LC-GB equipado con una columna Merck RP18). Las condiciones de operación fueron: tasa de flujo 1,3 ml/min, un gradiente de fase móvil linear de solvente A (H₂O pH 3) y B (acetonitrilo). 0-20 min (0 % -55 % B); 20-22 min (100 % B); 22-24 min (100 %); 25 min (0 % B). La detección se realizó a 236 nm. El tiempo de retención para el estándar de ácido ferúlico (Sigma, Co, USA) fue de 4,7 min.

2.12 Actividad PAL (fenil alanina amonio liasa)

La actividad PAL (EC 4.3.1.5) fue evaluada según de la metodología de Zucker (1965) cuantificando la formación de ácido trans-cinnámico. Para la extracción de proteínas a partir de tejido fresco se utilizó un buffer borato (0,1 M, pH 8,0), β-Mercaptoetanol (0,01 M) y PMSF (3 mM). Una alícuota del sobrenadante obtenido después de centrifugar a 10000g x 10 min a 4°C (centrifuga Sorvall RC-5B, rotor SS-34) fue utilizada para cuantificar la concentración de proteínas por el método de Bradford. Para evaluar la actividad de la PAL, se realizó una incubación a 37°C de una alícuota del sobrenadante con 100 µg de proteína, con L-fenilalanina 10 mM, borato de sodio 100 mM a pH 8,8 y β-Mercaptoetanol 10 mM en un volumen final de 3 ml. La formación del producto de la actividad de la PAL se cuantificó a 290 nm

en un espectrofotómetro Shimadzu UV-240. La actividad enzimática se definió como μ moles de ácido-transcinnámico formados por minuto (U).

2.13 Actividad peroxidasa

La actividad peroxidasa (EC 1.11.1.7) fue evaluada realizando un test enzimático descrito por Cassab et al., (1988). La actividad peroxidasa fue evaluada en geles nativos de poliacrilamida al 12 %, en condiciones no denaturantes. Las proteínas nativas fueron obtenidas homogenizando tejido fresco en hielo seco con el siguiente buffer de extracción a pH 8,0: Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 20 mM, EDTA 1 mM, KHCO₃ 10 mM, -Mercaptoetanol 50 mM y PMSF 4 mM. El homogenizado se centrifugó a 12000 g x 10 min a 4°C, tomando el sobrenadante con las proteínas para su precipitación con 5 volúmenes acetona p.a. fría (-20 C).

Después de centrifugar a 10000 g x 5 min a 4°C y liofilizar a sequedad la pella de proteínas, estos fueron resuspendidos en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 7,0). Posteriormente se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976), precipitando los μ g de proteínas requeridos nuevamente en acetona. Estos, fueron posteriormente resuspendidos directamente en el buffer de muestra y cargados en los bolsillos del gel nativo. Los geles fueron corridos a voltaje constante (200 volts) por 7 h. Terminada la corrida, el gel es sumergido en amortiguador citrato de sodio 0,1 M a pH 4,5 por 30 min. Posteriormente el gel fue transferido a la solución reveladora de las bandas de proteína con actividad peroxidasa, que contiene o-fenilendiamina 0,1 % (p/v), peróxido de hidrógeno 0.012 % (v/v) y buffers citrato de sodio 0,1 M a pH 4,5 y 0,5 M a pH 5,0. Una reacción de color amarillo-naranja, desarrollada en forma de bandas en el gel minutos después de añadir la solución reveladora, indica la actividad peroxidasa. La reacción es detenida agregando agua desionizada por 4 lavados sucesivos. Los geles son digitalizados inmediatamente por medio de un Scanner (ScanMan 256, Logitech, USA) para su posterior estimación de la actividad enzimática a través del programa Gel-Perfect 5-2. Al final de esta sección se describen sus fundamentos sobre la técnica de digitalización y análisis de las imágenes. Los geles debieron ser fotografiados rápidamente debido a la poca estabilidad del color.

Además, la actividad enzimática de peroxidasas fué evaluada a partir de extractos de proteínas totales, realizando un análisis por "Dot Blot". En este caso las proteínas obtenidas en condiciones no denaturantes descritas anteriormente, son inmovilizadas en membranas de nitrocelulosa (MFS, Dublin, CA, USA) de 0,45 μm , por medio de un aparato de microfiltración Bio-Dot (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Este equipo permite colocar una membrana de nitrocelulosa sobre un soporte de goma flexible en medio de 2 placas, sujetadas firme y herméticamente. La placa superior posee agujeros distribuidos en 12 columnas y 8 filas (96 en total) permitiendo a través de ellos, que en alícuotas de 200 μL de buffer Tris-HCl a pH 7,0, las proteínas sean "sembradas" inmovilizandolas en la membrana, en diluciones seriadas de 30, 15, 7,5 y 3,75 μg de proteína. La membrana de nitrocelulosa es colocada previo a esto por 30 min en amortiguador Tris HCl 0,1 M, pH 8,8. Colocadas las muestras se aplicó un leve vacío en el sistema, depositando las proteínas en el filtro de nitrocelulosa; Se agregaron posteriormente 200 μl de buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 8,8 para lavar cada uno de los agujeros, retirando posteriormente el vacío. El desarrollo de una curva estándar con peroxidasa de rábano (EC 1.11.1.7, tipo VI, sigma) permite estimar la actividad enzimática obtenida en las muestras, multiplicando el área del "Dot" por la intensidad del color de la reacción. Obtenidos los Dot Blots en las membranas, estas fueron colocadas en amortiguador citrato de sodio 0,1 M, pH 4,5, revelando la actividad peroxidasa en los Dots con la solución antes descrita, que contiene o-fenilendiamina, peróxido de hidrógeno y los buffers citrato de sodio. Se evaluó esta actividad de acuerdo a la intensidad del color resultante en los Dots, digitalizando y analizando densitométricamente los resultados.

La cuantificación de los resultados en los geles y en los Dot Blots, se llevó a cabo tomando imágenes digitalizadas por medio de un Scanner y posteriormente analizando densitométricamente estas imágenes por medio del sistema Gel-Perfect 5-2, software desarrollado por el Dr. Salvador Bozzo, Depto. de Medicina Experimental, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El sistema Gel-Perfect está basado en tres programas que llevan a cabo las labores básicas para realizar un análisis densitográfico:

a) Captación en imágenes de geles, membranas, etc., con un Scanner (ScanMan 256 Logitech), digitalizando la imagen, produciendo archivos TIFF (Tagged Image File Format).

b) Mediciones densitométricas del archivo TIFF usando el programa Gel 5-2. El tratamiento de la imagen inicial, permite cuantificar el resultado obtenido por la intensidad relativa de la respuesta medida. Se obtienen archivos OUTGEL.PS.

c) Impresión de gráficos y resultados usando lenguaje Postscript que lee los archivos OUTGEL:PS.

Los tres programas instalados en un computador AT386, son independientes entre si, es decir, se puede digitalizar en un PC, transportar el archivo TIFF generado a otro PC para su medición y luego el archivo OUTGEL.PS a otro sistema para la impresión de los informes.

2.13.1 Test de glicosilación

La caracterización de las peroxidasas como glicoproteínas se realizó directamente en los geles nativos descritos más adelante empleando el método de fluorescencia descrito por Eckhardt et al. (1976). En este, los geles corridos fueron fijados por 12 h en agitación en una solución de metanol al 40 % (v/v) y ácido acético al 5 %. Posteriormente, se oxidaron con ácido peryódico al 0,5 % (p/v) en ácido acético al 5 %, a 25°C por 2 h. A continuación, con la finalidad de eliminar el exceso de ácido peryódico, se lavaron con bisulfito de sodio 0,5 % en ácido acético 5 % (v/v), en tres lavados sucesivos de 10 minutos cada uno. Concluido esto, los geles se sumergieron durante 2 h en una solución que contiene dansilhidrazina al 0,09 % (p/v) en acetato de sodio 0,09 M, pH 5,6. La dansilhidrazina fue preparada al 1 % en EtOH y mezclada con el amortiguador de acetato de sodio. Una vez concluida la tinción, los geles fueron destañados con el amortiguador acetato de sodio 0,09 M, pH 5,6 durante 4 horas en lavados sucesivos, hasta que el fondo ("background") de la tinción desapareció. Las bandas con proteínas glicosiladas fueron observadas empleando un transiluminador de luz ultravioleta (Chromato-VUE transilluminator Model. TS-36).

2.14 Electroforesis SDS de proteínas

El patrón de proteínas de cebada se evaluó por electroforesis en geles de poli(acrilamida)-SDS (denaturante) al 10 y 12 % según la metodología de Laemmli (1970). El gel de resolución a pH 8,8 obtenido a partir de soluciones p/v de acrilamida:bisacrilamida (30 % : 0,8 %), buffer Tris-HCl 1,5 M y SDS al 10 % se dejó a concentraciones finales de acrilamida de 10 y 12 %. El gel concentrador a pH 6,8

obtenido a partir de soluciones p/v de acrilamida:bisacrilamida (30 % : 0,8 %), buffer Tris-HCl 0,5 M y SDS al 10 % se dejó a una concentración de acrilamida de 4 %. El buffer de muestra a pH 6,8 con el cual se cargaron las proteínas en los bolsillos del gel, estaba compuesto por Tris-HCl 0,0625 M, β -Mercaptoetanol 0,5 % (v/v), azul de bromofenol 0,004 % y SDS al 2 %. Las muestras eran mantenidas a baño María por 5 min previamente a ser cargadas con el objeto de denaturar completamente las proteínas. Los geles de tamaño normal (180 x 130 x 1 mm) se corrieron a voltaje constante (200 Volts) por 7 h y los mini geles (95 x 80 x 1 mm) a 150 Volts por 5 h, utilizando como buffer Tris-HCl 0,25 M, glicina 0,192 M y SDS 0,1 % a pH 8,3.

Las proteínas utilizadas como estándar de masa molecular conocida a partir de kits (Sigma Co. MO, USA) comprenden los siguientes marcadores: Lisozima (14,3 KD), β -Lactoglobulina (18,4 KD), Tripsinógeno (24 KD), Pepsina (34,7 KD), Albumina de huevo (45 KD), Albumina de bovino (66 KD), Fosforilasa b (97,4 KD) y β -Galactosidasa (116 KD). Las masas moleculares de las proteínas de las muestras fueron determinadas por interpolación de la curva de movilidad relativa en los geles en función del logaritmo de la masa molecular estándar de cada marcador.

Las bandas de proteínas en los geles fueron reveladas con la tinción de plata utilizando el método de Nielsen y Brown (1984). Inmediatamente después de terminar la corrida, las proteínas en el gel se fijaron con una solución de ácido tricloroacético al 10 % (v/v) en agitación por 30 min., seguido de 3 lavados (10 min. c/u) con EtOH al 10 % (v/v) y ácido acético al 5 % (v/v). A continuación el gel es oxidado por 5 min con dicromato de potasio 3,4 mM y ácido nítrico 3,2 mM, lavando posteriormente 2 veces (5 min cada vez) con agua desionizada. La plata es precipitada en las proteínas añadiendo una solución de nitrato de plata 12 mM por 30 min en oscuridad. Luego se lava por 1 min con agua desionizada, agregando posteriormente la solución reductora que contiene carbonato de sodio 0,28 M y formaldehído 0,0185 % (v/v) renovándola cada 5 min, hasta que se revelen claramente las bandas de proteínas. La reacción de revelado es detenida con ácido acético al 5 % (v/v). Los geles mantenidos en esta solución son fotografiados y analizados densitométricamente por medio del sistema Gel-Perfect 5-2 descrito anteriormente en la sección 2.12:

2. Resultados

3.1 Efecto del nivel de infestación por *S. graminum* en el estado hídrico de la cebada

3.1.1 Incremento del número de áfidos en el tiempo en los ensayos de infestación artificial

Para determinar el aumento que presentó la población de áfidos en las plantas, se contó el número de áfidos por planta al final de los experimentos de infestación artificial. El número de áfidos de *S. graminum* que resulta al final de los tratamientos de infestación se incrementó en el tiempo en directa relación con el número de áfidos iniciales colocados por planta. Este incremento del número de áfidos es de carácter exponencial y se debe a la reproducción partenogenética que presentan este grupo de insectos (Tabla 1).

3.1.2 Contenido relativo de agua, peso fresco y peso seco

Debido a que los áfidos provocan síntomas de estrés por sequía en las plantas infestadas, fueron evaluados estos parámetros en la cebada que indican el estado hídrico de la planta. Se determinó que el contenido relativo de agua en las plantas de cebada disminuyó por efecto de la infestación con *S. graminum*, y se evaluó el efecto que tienen sobre este parámetro los diferentes niveles de infestación. A mayor número de áfidos que se encuentren en la planta después de algunos días de infestación, mayor es la reducción en el contenido relativo de agua. En plantas control sin infestar, el contenido relativo de agua fue sobre el 92 %, mientras que en plantas sometidas 6 días a una infestación de 10 áfidos iniciales, disminuyó a solo el 82 % (Tabla 1).

Comparado con el control sin infestar de 16 días, las plantas infestadas por 6 días con 10 áfidos iniciales, terminaron con un peso fresco inferior en 25 %. Plantas en este estado de desarrollo infestadas con 20 áfidos iniciales presentaron una reducción de peso fresco del 36 % comparado con el control (Tabla 1). Con respecto al control sin infestar de 21 días, las plantas infestadas por 6 días con 10 y 20 áfidos iniciales, presentaron una reducción importante en el peso fresco del 18 % y el 25 %, respectivamente. La reducción en el peso seco, presentó un patrón similar al encontrado con el peso fresco, en cuanto a ser mayor la reducción en las plantas sometidas a infestaciones con mayores densidades poblacionales de

Tabla 1. Efecto de diferentes niveles de infestación por *Schizaphis graminum* en el estado hídrico de plantas de cebada de edades diferentes.

Afidos / Iniciales	Planta Finales	Conteni. Rel. de Agua (% de agua)	Peso Fresco (16 días) (mg/10 plantas)	Peso Seco (16 días) (mg/10 plantas)	Peso Fresco (21 días) * (mg/10 plantas)	Peso Seco (21 días) * (mg/10 plantas)
0	0	92 ± 2	1.58 ± 0.09	0.14 ± 0.02	1.92 ± 0.07	0.18 ± 0.02
2	18 ± 3	90 ± 3	1.60 ± 0.08	0.14 ± 0.01	1.86 ± 0.08	0.18 ± 0.01
4	42 ± 8	87 ± 3	1.53 ± 0.06	0.13 ± 0.01	1.84 ± 0.06	0.17 ± 0.01
5	52 ± 8	N.D.	1.55 ± 0.06	0.15 ± 0.01	1.76 ± 0.08	0.17 ± 0.01
6	66 ± 12	86 ± 2	1.38 ± 0.04	0.12 ± 0.02	1.72 ± 0.04	0.16 ± 0.02
8	82 ± 15	83 ± 4	1.35 ± 0.04	0.11 ± 0.01	1.65 ± 0.04	0.15 ± 0.01
10	104 ± 20	82 ± 3	1.20 ± 0.03	0.10 ± 0.01	1.60 ± 0.03	0.14 ± 0.01
15	136 ± 22	N.D.	1.25 ± 0.03	0.12 ± 0.01	1.52 ± 0.04	0.13 ± 0.02
20	182 ± 25	N.D.	1.05 ± 0.04	0.10 ± 0.01	1.42 ± 0.04	0.13 ± 0.01

Once grupos de plantas de cebada cv Aramir de 10 y 16 días (*) de edad fueron infestadas con diferentes densidades poblacionales de áfidos. Después de 6 días se contaron el número final de áfidos de cada grupo y cada uno de los parámetros fue evaluado, tomando en cuenta tallos y hojas de la planta. El contenido relativo de agua corresponde a los cálculos realizados para plantas de 16 días de edad al final de 6 días de infestación. Cada valor es el promedio de 4 repeticiones ± el error estándar. N.D.: No determinado.

áfidos a edades tempranas. Esta reducción alcanzó a ser del 35 % (con respecto al control de la misma edad) en plantas de 16 días de edad e infestadas por 6 días con 20 áfidos iniciales por planta. En plantas de 21 días de edad (infestadas por 6 días con 20 áfidos iniciales por planta) la reducción en peso seco comparado con el control, alcanzó el 28 %. Al comparar con el control de la misma edad, los tratamientos con 10 áfidos iniciales, en plantas con 16 y 21 días de edad y 6 de infestación, la reducción en el peso seco fue del 29 % y del 22 %, respectivamente (Tabla1).

Los cambios encontrados en el peso fresco y seco de plantas de cebada sometidas por 6 días a infestaciones entre 0, 10 y 20 áfidos iniciales por planta, mostraron que existe una susceptibilidad mayor de las plantas al infestarse en estados de desarrollo temprano (a 10 días de edad), en comparación con plantas de mayor edad (16 días) sometidas a los mismos niveles de infestación.

3.1.3 Potencial hídrico (Ψ)

Este parámetro es frecuentemente utilizado para indicar el nivel de estrés por sequía al que esta sometida una planta. Se hallaron potenciales hídricos más negativos en la cebada por la infestación con *S. graminum*. En los niveles de infestación al que fueron sometidas las plantas, los potenciales hídricos fueron más negativos a tiempos de infestación mayores (Fig. 2, A y B). Potenciales hídricos de - 0,23 MPa hallados en las plantas control sin infestar de 16 días de edad, disminuyeron a - 0,80 MPa en plantas de la misma edad al cabo de 6 días de infestación con 10 áfidos iniciales por planta (Fig. 2A). Evaluando esta variación a tiempos más cortos, duplicando el número de áfidos iniciales por planta, al cabo de 72 horas de infestación, se hallaron cambios importantes del potencial hídrico, que con respecto al control sin infestar, alcanzó valores de - 0,55 MPa para el grupo de plantas con 20 áfidos iniciales (Fig 2B). Plantas de cebada cv Aramir después de varios días de infestación por el áfido *Schizaphis graminum*, presentaron menores pesos fresco y seco, bajos potenciales hídricos e inferiores contenidos relativos de agua en las hojas, todos ellos síntomas de estrés hídrico. El desarrollo de estos cambios en el estado hídrico de la cebada, está relacionado con el nivel y la duración de la infestación al que está sometida la planta.

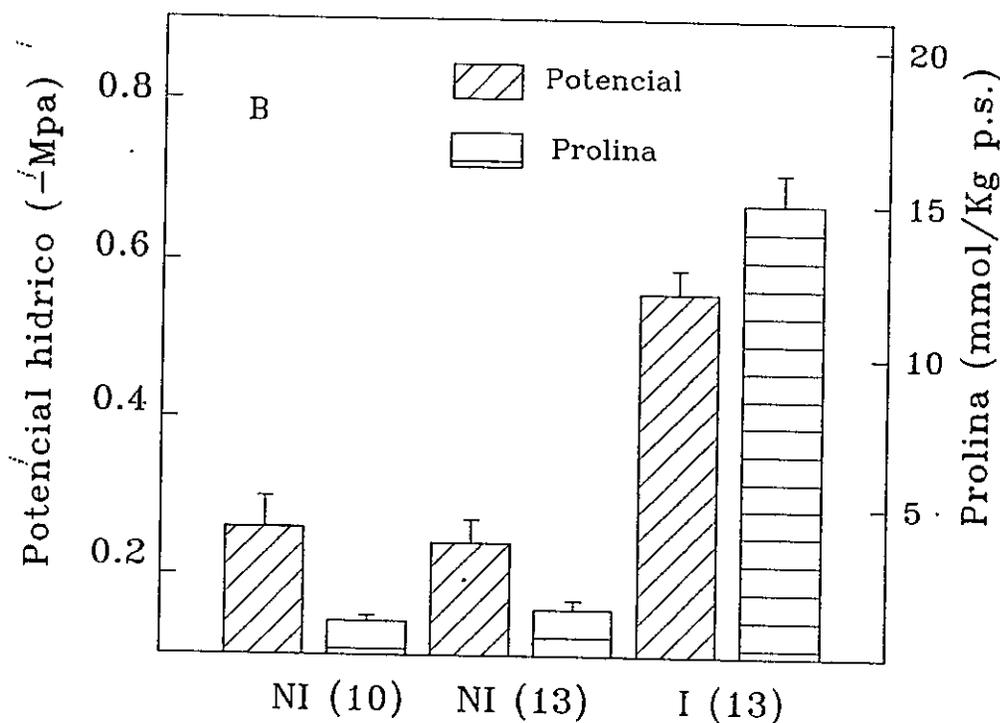
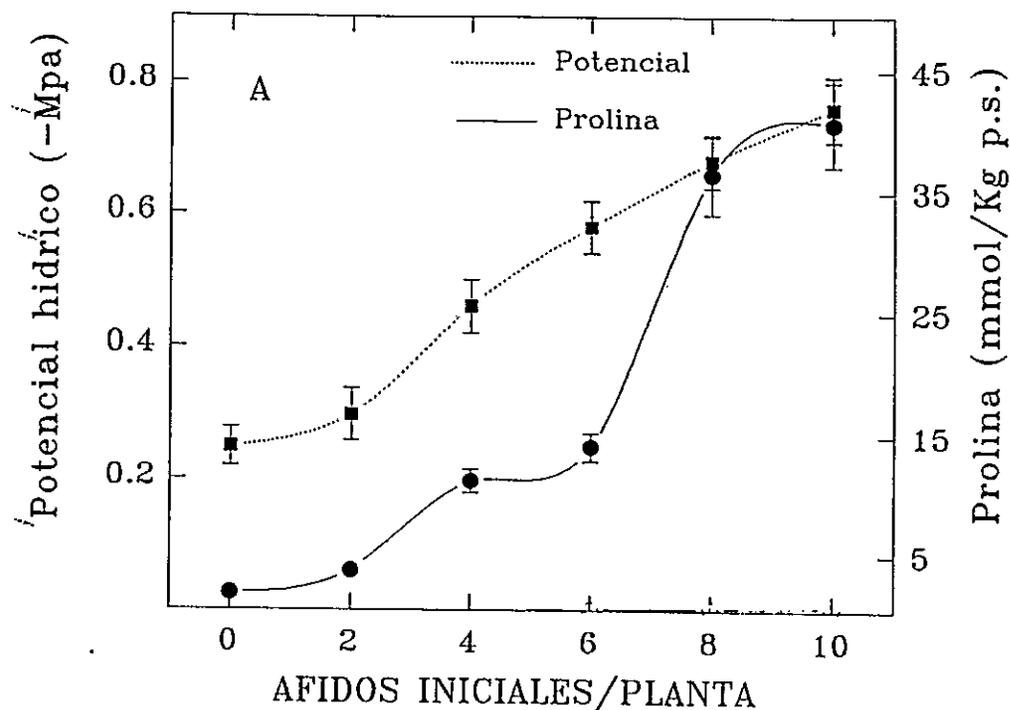


Figura 2. Efecto de la infestación por *S. graminum* en los potenciales hídricos y en los niveles de prolina de plantas de cebada. (A) Potencial hídrico y niveles de prolina en plantas de 16 días de edad y 6 de infestación con diferentes densidades poblacionales de áfidos. (B) Potencial hídrico y niveles de prolina en plantas control (NI) sin áfidos a 10 y 13 días de edad o plantas (I) con 20 áfidos iniciales por planta a 13 días de edad y 3 días de infestación. Cada punto es el promedio de 5 (potencial hídrico) y 3 muestras (prolina) \pm el error estándar (e.e.).

3.1.4 Contenido de ácido abscísico (ABA) y resistencia estomática al vapor de agua.

Plantas bajo infestación con importantes cambios en el estado hídrico podrían presentar un incremento en los niveles de ABA como ha sido descrito en plantas bajo sequía. Un aumento en los niveles de ABA podría estar relacionado con cambios en el cierre de los estomas. Para caracterizar esto, se evaluó el contenido de ABA total en las hojas y la resistencia estomática hasta 96 h después de infestar las plantas. Mayores niveles de ácido abscísico fueron encontrados en hojas de plantas infestadas, con un máximo a 72 h de infestación con 20 áfidos iniciales por planta. Este incremento neto del contenido de ABA en plantas infestadas fue determinado desde las 24 h de inicio de la infestación, niveles que aumentaron y permanecieron altos hasta las 72 h. A las 96 h de inicio de la infestación, la cantidad de ABA total bajó en las hojas infestadas en relación a los niveles encontrados en las plantas sin áfidos (Fig. 3A).

Los patrones diurnos de resistencia estomática entre las 0 y 96 h de plantas de cebada sin infestar (control) e infestadas por *S. graminum*, son distintos. En las primeras 48 h, ambos patrones no fueron significativamente diferentes (test- t, $P > 0.198$). Sin embargo, las hojas de plantas infestadas presentaron una resistencia estomática significativamente inferior ($P < 0.001$) a los valores hallados en los controles en las horas de luz (60 y 84 h) y mayor ($P < 0.001$) en el periodo de oscuridad (a las 72 h). Al cabo de 96 h (oscuridad), la resistencia de los estomas fué significativamente más baja ($P < 0.001$) en las hojas infestadas que en las control (Fig. 3. A y B).

Para determinar si la resistencia estomática en las hojas infestadas por 96 h se recuperaba al suministrarles ABA exógeno, hojas del grupo control y del grupo infestado fueron cortadas en la zona basal de la planta y colocadas por este extremo en 3 soluciones de concentración creciente de ABA y se evaluó la resistencia de los estomas al vapor de agua a las 0, 3 y 6 h de incubación. El patrón de incremento de la resistencia estomática frente al ABA exógeno, fue similar para los tratamientos control e infestado (Fig. 3B). A las 3 y 6 h, en la concentración mayor de ABA utilizada, la resistencia estomática en las hojas control fué 50 % más alta que la encontrada en hojas de plantas previamente infestadas. Para las hojas infestadas, la resistencia estomática fue similar a las 6 h de incubación en las dos concentraciones de ABA. En hojas de ambos grupos (control e infestadas) incubadas con agua, la resistencia de los estomas disminuyó, haciéndose nula (0 s/cm) a las 6 h de incubación.

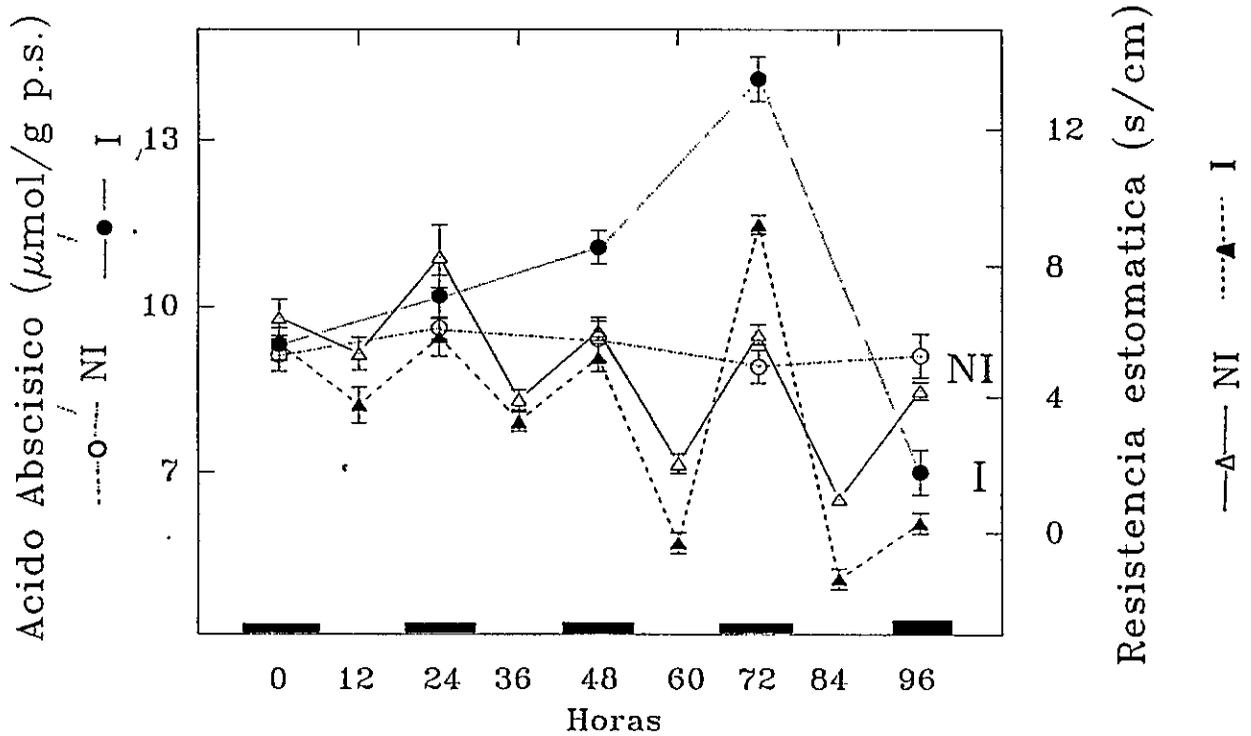


Figura 3A. Ciclo diario de los niveles de ácido abscísico y de la resistencia estomática en plantas de cebada control y bajo infestación. Plantas de cebada de 10 días de edad se infestaron inicialmente con 20 áfidos adultos por planta. Se evaluó el nivel de ABA en hojas de plantas control sin infestación (NI --o--) y en las hojas de plantas infestadas (I --●--) cada 24 h y cada 12 h la resistencia estomática en plantas control (NI --Δ--) e infestadas (I --◆--). Para las mediciones de los niveles de ABA, cada valor es el promedio de 3 muestras y para la resistencia de los estomas el promedio de 8 muestras \pm e.c.

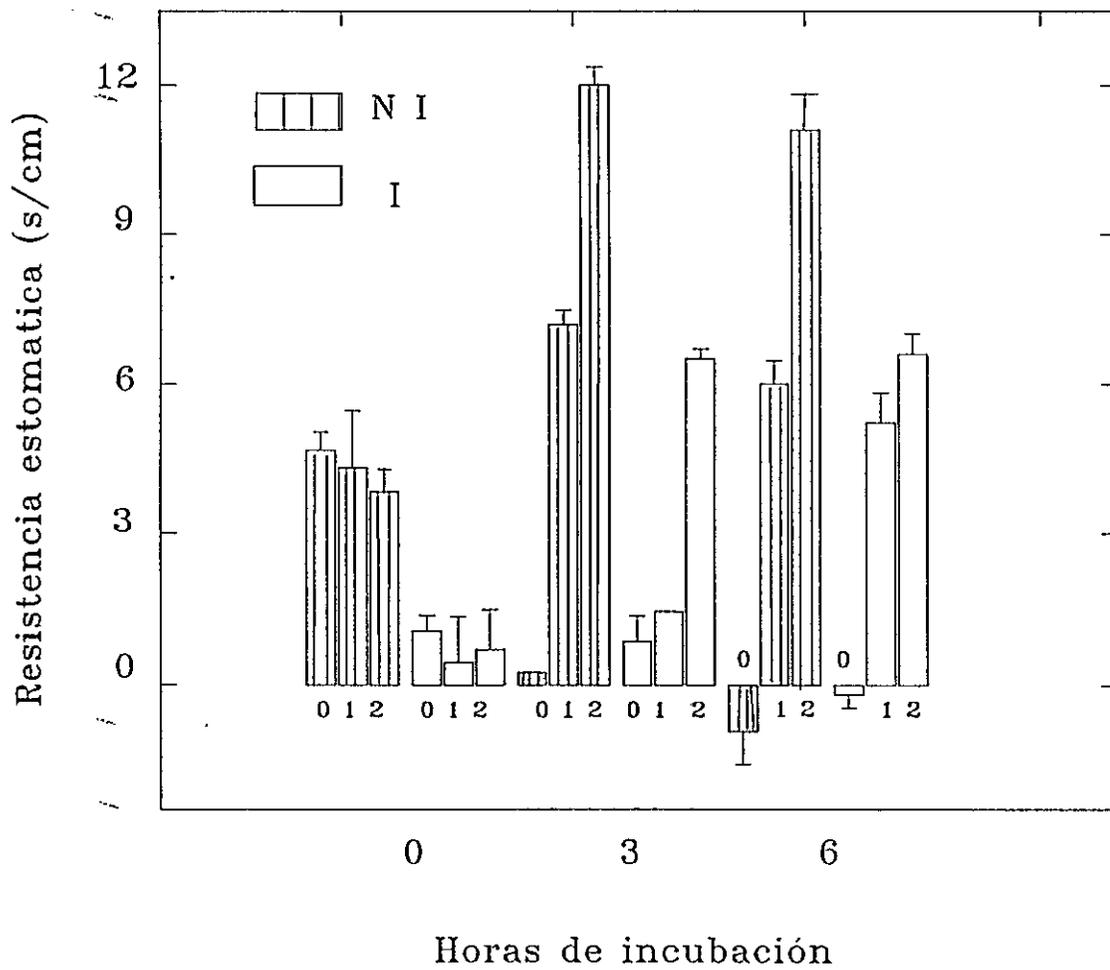


Figura 3B. Respuesta de la resistencia estomática en las hojas al incubarlas con ABA exógeno. Hojas de plantas del grupo control, no infestadas (NI) y del grupo de infestadas por 96 h (I) fueron cortadas e incubadas por 6 h en solución control (0x, agua sin ABA), o en soluciones con 3.8 (1x) y 7.6 (2x) $\times 10^{-5}$ M de ABA. Cada punto es el promedio de 8 mediciones \pm e.e..

La resistencia estomática al vapor de agua mostró un patrón diurno similar en plantas infestadas y plantas control entre las 0 y 48 h desde el inicio de la infestación. Esto contrasta con la menor resistencia en los periodos de luz (60 y 84 h) y mayor en oscuridad (72 h) en plantas sometidas a infestación. Estos cambios en la fisiología de los estomas podrían obedecer -en periodos de luz- a la redistribución diurna y -en periodos de oscuridad- al incremento transitorio de ABA en las hojas de este grupo de plantas. Sin embargo, a pesar del incremento neto de ABA en plantas infestadas, la resistencia de los estomas fue menor en estas plantas en las horas de luz, facilitando con ello la pérdida de agua. Además, en hojas que previamente permanecen infestadas, a las 96 h de infestación, la resistencia de los estomas al vapor de agua es mínima a pesar de corresponder a un periodo de oscuridad. La restauración de la fisiología estomática en el control de la pérdida de agua, al cortar estas hojas e incubarlas con ABA exógeno es indicativo que el áfido *S. graminum* afectaría en la cebada la capacidad de síntesis y redistribución de esta hormona en tiempos de infestación prolongados. Los bajos niveles de ABA en las plantas (en infestaciones prolongadas) afectarían irreversiblemente la regulación de la pérdida de agua de la planta a través de los estomas.

3.2 Efecto de la infestación por *Schizaphis graminum* en los niveles de clorofila, proteínas, aminoácidos solubles y en la fotosíntesis de plantas de cebada

Para caracterizar cómo los niveles de clorofila, proteínas y aminoácidos solubles en las hojas de cebada son afectados por la infestación y cómo esto podría afectar la fotosíntesis, fueron evaluadas las concentraciones de estos metabolitos y la fijación de CO₂ en las plantas.

3.2.1 Clorofila total

La infestación de la cebada con el áfido *S. graminum*, provoca clorosis en las plantas, la que se manifiesta localizada en sitios de la hoja en que se alimenta el pulgón. En grupos de cebada de 16 días de edad, sometidas a infestaciones con densidades poblacionales iniciales entre 0 y 10 áfidos por planta, al cabo de 6 días de infestación, los niveles de clorofila total disminuyeron en relación al número de áfidos (Fig. 4A). En las plantas con 10 áfidos iniciales, la concentración de clorofila solo alcanzó el 27 % de la

concentración del control de 16 días sin infestar. Con estas densidades poblacionales, la reducción de la cantidad de clorofila foliar en los tratamientos intermedios (2, 4, 6 y 8 áfidos iniciales por planta) alcanzó un grado de correlación de 0.95 en relación al nivel de infestación.

A lo largo del tiempo de infestación, a 3 días de infestar con 20 áfidos iniciales, se halló que el nivel de clorofila total en las plantas de 13 días de edad, es 10 mg por g de peso seco, 72 % de la encontrada en el control de 13 días de edad sin infestar (Fig. 4B). Enzimas presentes en la saliva del pulgón verde posiblemente son los principales causas de la aparición de clorosis y la destrucción de los tejidos en la cebada en las zonas donde se alimenta. Los bajos niveles de clorofila en las hojas bajo infestación afectarían los niveles de captación de luz y disminuiría las tasas de fotosíntesis en las plantas de cebada.

3.2.2 Proteínas solubles

Los niveles de proteínas solubles en las hojas de la cebada sometidas a infestaciones con *S. graminum* por 6 días disminuyeron significativamente (Fig. 5). En el grupo de mayor infestación inicial (10 áfidos por planta) los niveles de proteínas solubles sólo alcanzaron un 30 % del nivel determinado en los controles de 16 días de edad. Esta disminución en proteínas solubles de cebada en los 6 grupos, fue proporcional al nivel de infestación al que estaba sometida la planta.

Los niveles de proteínas solubles en la cebada son afectados por la infestación de *S. graminum*. Esto podría estar determinado indirectamente por el efecto del estrés hídrico provocado en la cebada por la infestación, sobre la tasa de síntesis y la tasa de recambio de las proteínas en la hoja. En cebada, la reducción de los niveles de proteínas solubles (entre ellas Rubisco) y tal vez cambios en su actividad, explicarían efectos directos del estrés hídrico provocado por los áfidos sobre la fotosíntesis.

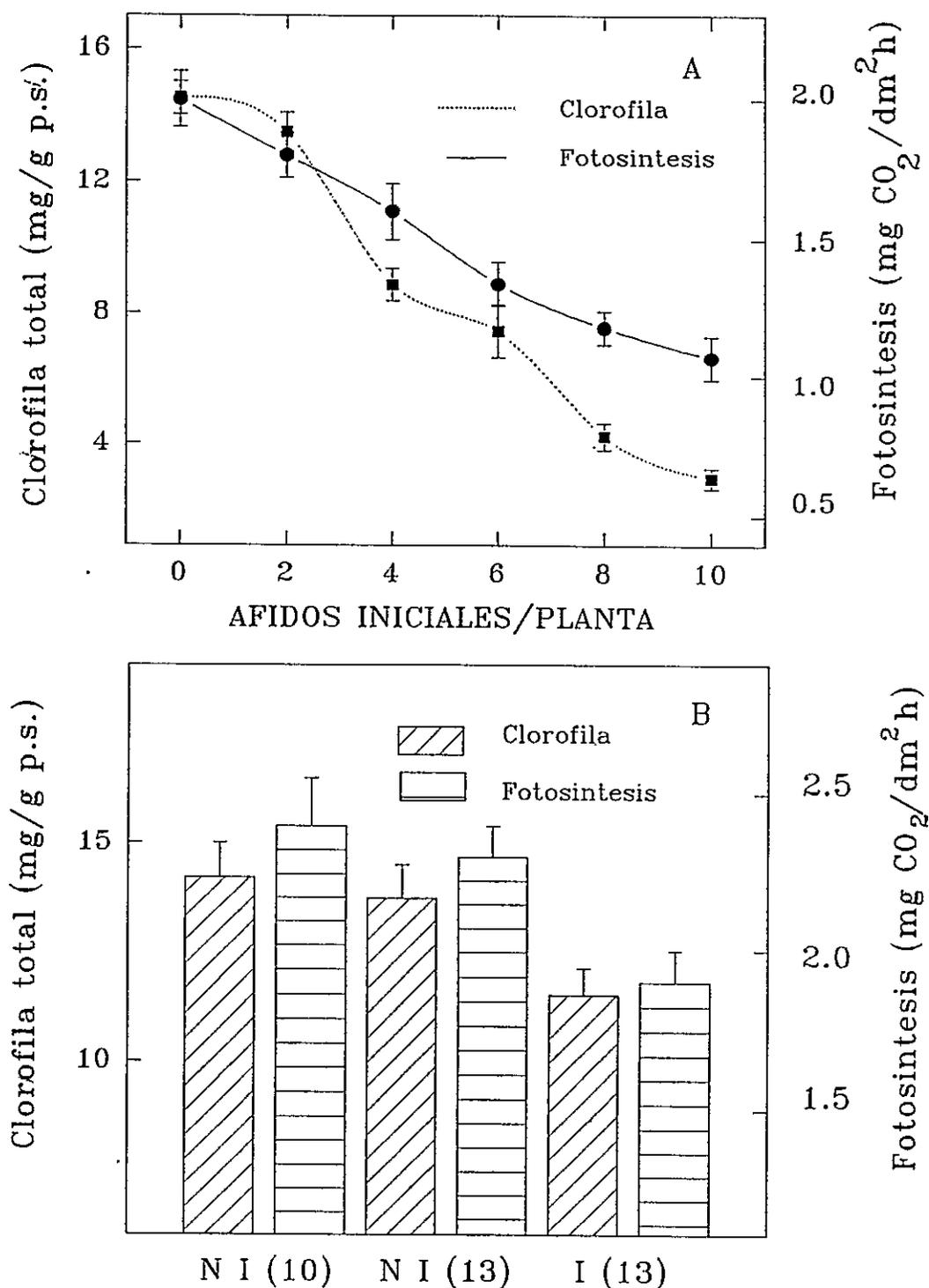


Figura 4. Efecto de la infestación por *S. graminum* en los niveles de clorofila y en las tasas de fotosíntesis de plantas de cebada. (A) Clorofila total y fotosíntesis en plantas de 16 días de edad con 6 días de infestación con diferentes densidades poblacionales de áfidos y en (B) plantas control (NI) de 10 y 13 días de edad sin áfidos o en plantas de 13 días de edad y 3 días de infestación (I) con 20 áfidos iniciales por planta. Para ambos parámetros, cada punto es el promedio de 4 muestras \pm e.e..

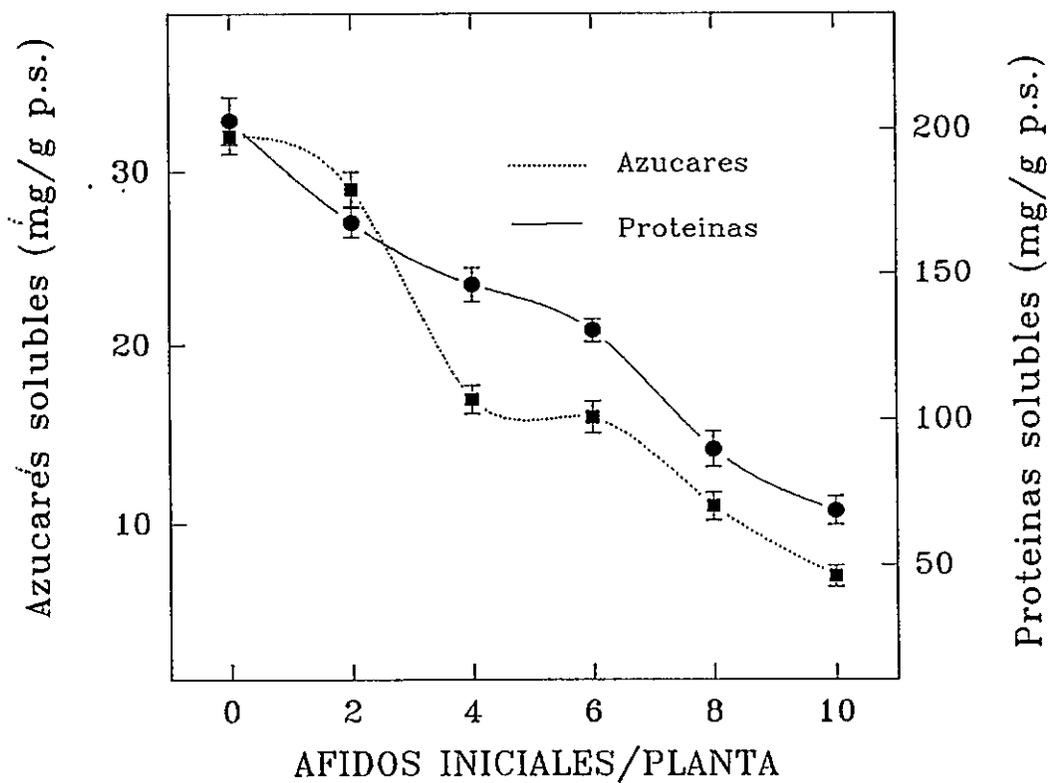


Figura 5. Efecto de la infestación por *S. graminum* en los niveles de azúcares solubles y proteínas solubles en plantas de cebada. Niveles de azúcares y proteínas solubles en plantas de 16 días de edad y 6 de infestación con diferentes densidades poblacionales de áfidos. Cada punto es el promedio de 3 muestras \pm e.e..

3.2.3 Efecto de la infestación por *Schizaphis graminum* en la composición de aminoácidos libres en cebada

La acumulación de aminoácidos ha sido descrita como otro de los efectos del estrés hídrico en plantas. Se cuantificó el nivel de algunos aminoácidos libres (no proteicos), presentes en las hojas de plantas control y plantas con 72 h de infestación con *S. graminum*. El contenido relativo de algunos aminoácidos individuales de plantas de cebada control e infestadas, indican que los ácidos glutámico (Glu) y aspártico (Asp), serina (Ser), glicina (Gly), arginina (Arg) y alanina (Ala) son entre otros los aminoácidos más representativos en ambos grupos de plantas (Fig. 6). Diferencias con respecto al control en los niveles de glicina, histidina (His), arginina, prolina (Pro), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe) en las plantas infestadas, sugieren cambios importantes en el metabolismo de algunos aminoácidos por la infestación. Sin embargo, la similitud en los perfiles del contenido relativo de más de la mitad de los aminoácidos libres, sugieren que el "pool" de estos metabolitos no presentan cambios significativos, en este tiempo de infestación. Cambios en los niveles de prolina en la cebada fueron determinados en plantas bajo tiempos de infestación mayores y sometidas a otros tratamientos (sección 3.3.2 y 3.7).

3.2.4 Fotosíntesis

La fotosíntesis en cebada es afectada significativamente por la infestación con *S. graminum*. Para los mismos niveles de infestación descritos anteriormente, después de 6 días, la fotosíntesis en el grupo de plantas más infestado es en promedio de 1.1 mg CO₂/dm²h, alcanzando sólo el 50 % del valor hallado en el control sin infestar de 16 días de edad (Fig. 4A). Al evaluar en este mismo grupo sólo 72 horas después de haber iniciado la infestación, se halló una reducción en la fotosíntesis que alcanzó el 15 % comparando al respectivo control sin infestar de 13 días de edad. En plantas infestadas con 20 áfidos iniciales, esta reducción a 72 h después de infestar, corresponde a un 35 % comparado con el control de 13 días de edad (Fig. 4B). En cebada, la reducción en los niveles de clorofila total, unido a los menores niveles de proteínas solubles (entre ellas Rubisco), podrían deberse principalmente al daño provocado por los áfidos. Alteraciones en la actividad y en el recambio de algunas enzimas que participan en fotosíntesis, explicarían efectos directos del estrés hídrico provocado por los áfidos en las tasas de asimilación de CO₂.

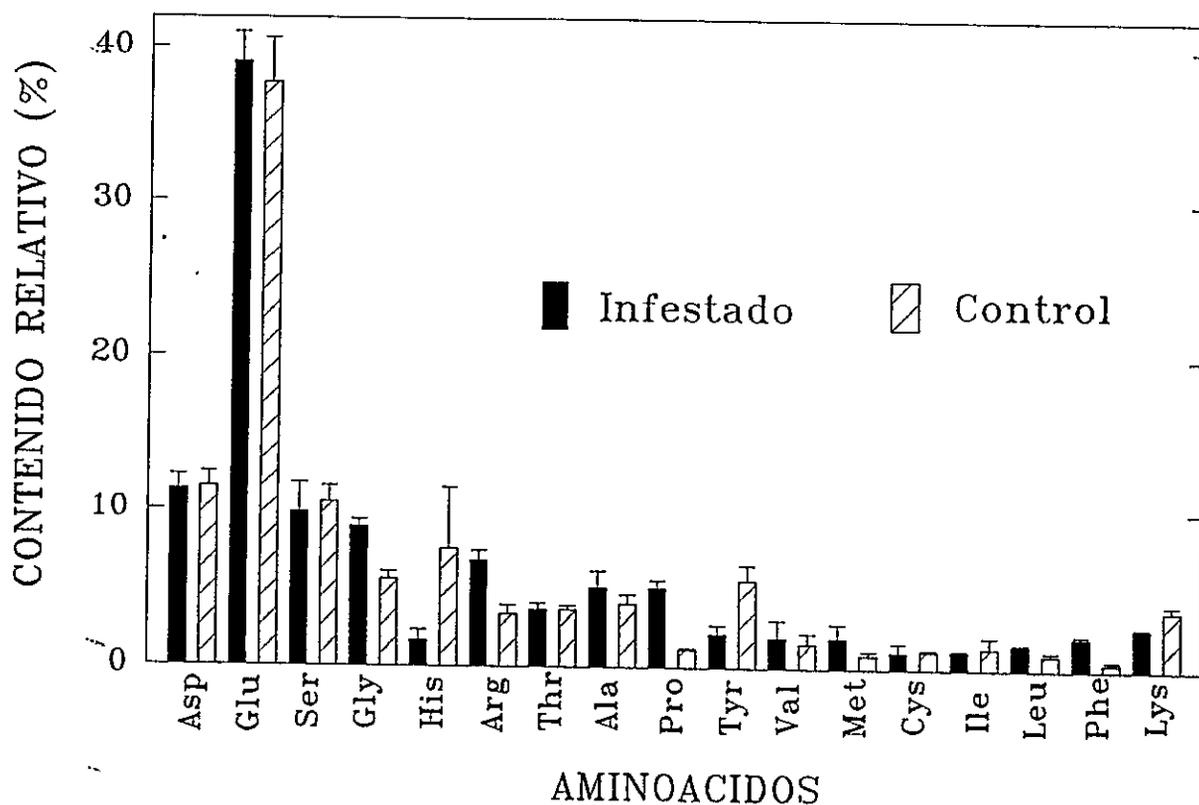


Figura 6. Contenido relativo de aminoácidos solubles en las hojas de cebada. Se cuantificó el nivel de algunos aminoácidos solubles en plantas control sin infestar y plantas de 13 días de edad y 3 de infestación con *S. graminum*. Cada punto es el promedio de 2 muestras \pm e.e.. El contenido relativo (%) se expresó como el porcentaje del contenido de cada aminoácido con respecto a la suma del contenido total de aminoácidos (100 %) para cada muestra determinada.

3.2.5 Efecto de la infestación por *Schizaphis graminum* y *Rhopalosiphum padi* sobre parámetros fisiológicos y niveles de algunos metabolitos en la cebada

Para comparar el efecto causado sobre algunos parámetros en la cebada por la infestación con *S. graminum* con el efecto causado por otra especie de áfido (*R. padi*), plantas de 10 días de edad fueron infestadas con 5 áfidos de cada especie por planta. Parámetros relacionados con el estado hídrico y la fotosíntesis en las plantas evaluados 5 días después, mostraron que las plantas infestadas con *S. graminum* presentaron potenciales hídricos más bajos y mayores reducciones en los niveles de proteínas solubles, clorofila total y tasas fotosintéticas (Tabla 2). Los mayores cambios encontrados en los niveles de clorofila y en las tasas fotosintéticas en las plantas infestadas por *S. graminum*, podrían deberse a diferencias en las enzimas presentes en la saliva y/o en la conducta alimentaria entre estas especies de áfidos. Estas diferencias, afectarían el nivel de daño foliar y la magnitud de otros cambios en las plantas de los cereales que provocaría la infestación de cada especie.

3.3 Efecto de la infestación por *Schizaphis graminum* en la proporción y concentración de los azúcares sacarosa, glucosa, fructosa, además en los niveles del aminoácido prolina en cebada.

La acumulación de solutos es un aspecto importante de adaptación en plantas ante el déficit de agua. Ya que las plantas de cebada infestadas presentan síntomas de este tipo de estrés, cambios en la proporción de los niveles de azúcares como fructosa, glucosa y sacarosa en plantas infestadas con *S. graminum*, junto con la acumulación de otros solutos (e.g. prolina), podrían ser parte en la cebada de una importante respuesta metabólica ante el déficit hídrico provocado. Para evaluar si en la cebada la acumulación de azúcares solubles y de prolina hacen parte de este importante mecanismo, se determinó el nivel de estos solutos en plantas bajo infestación por áfidos.

Tabla 2. Efecto de la infestación por *Schizaphis graminum* y *Rhopalosiphum padi* en algunos parámetros fisiológicos y niveles de metabolitos en cebada.

Tratamiento	Potencial Hídrico (MPa)	Proteína Soluble (mg / g peso s)	Clorofila Total (mg / g peso s)	Fotosíntesis (mg CO ₂ /dm ² h)
Control	-0.27 ± 0.05 a	218 ± 15 a	9.3 ± 0.4 a	3.16 ± 0.1 a
Infestado				
<i>S. graminum</i>	-0.60 ± 0.05 c	124 ± 16 b	4.3 ± 0.3 c	1.70 ± 0.08 c
<i>R. padi</i>	-0.42 ± 0.08 b	204 ± 12 a	6.6 ± 0.4 b	2.54 ± 0.09 b

Grupos de plantas de 10 días de siembra fueron infestadas con 5 áfidos por planta. Los diferentes parámetros en la cebada se evaluaron 5 días después de infestación. Promedios ± error estándar de 4 repeticiones. Letras diferentes entre filas de una misma columna, se refieren al nivel de significancia con respecto al control (Kruskal-Wallis; 0.05 (b) > P < (c) 0.01).

3.3.1 Azúcares solubles totales

La variación encontrada en la concentración de azúcares solubles en plantas de 16 días de edad y 6 de infestación a diferentes niveles, fue similar al patrón encontrado en la reducción del contenido de clorofila, en la disminución de la actividad fotosintética y en los niveles de proteínas solubles. Con respecto al control, la disminución en los azúcares solubles determinada en las plantas con mayor nivel de infestación inicial, alcanzó a ser el 70 % (Fig. 5). A tiempos más cortos de infestación la determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de cambios en la concentración relativa y particular de los azúcares glucosa, fructosa y sacarosa, mostró variaciones importantes entre ellos (Fig. 7). A 72 horas de infestación inicial con densidades poblacionales entre 0 y 20 áfidos por planta, se halló una disminución en la concentración de sacarosa, de 19 a 8 mg por g de peso seco (reducción del 60 %). En los niveles intermedios de infestación con 5, 10 y 15 áfidos iniciales, la reducción en la concentración en la planta de sacarosa, alcanzó el 40, 45 y 50 %, respectivamente, disminución que no mostró una correlación directa con el número de áfidos en la planta. La concentración de glucosa, fructosa y sacarosa a 72 horas de infestación con densidades poblacionales entre 0 y 20 áfidos iniciales por planta, mostró una variación en la proporción de ellos relacionada nuevamente con el nivel de infestación al que está sometida la planta. El patrón de variación para glucosa y fructosa fue similar, pero contrasta con lo hallado para la sacarosa: para ambos azúcares se halló una mayor concentración, en directa relación con el número de áfidos iniciales en la planta. La glucosa y fructosa tienen en las plantas control sin infestar de 13 días de edad, una concentración de 18 y 14 mg por g de peso seco respectivamente, incrementándose a las 72 horas de infestar con 20 áfidos iniciales por planta a 27 y 25 mg por g de peso seco. En los niveles de infestación intermedios, entre 0 y 20 áfidos iniciales, a las 72 horas de infestación, los niveles de glucosa y fructosa fueron siempre más altos en relación a los niveles encontrados en el control sin infestar, entre 20 y 25 mg por g de peso seco para cada azúcar (Fig. 7). Estos cambios en la proporción relativa en mg por g de peso seco muestra que los niveles de fructosa y de glucosa aumentan proporcionalmente con el mayor nivel de infestación, hasta alcanzar a duplicar su valor, lo que podría explicar el incremento por infestación del 40 % al sumar estos azúcares. En tanto para la sacarosa, la reducción alcanza a ser de 4 veces en el grupo más infestado con respecto al valor del control sin infestar.

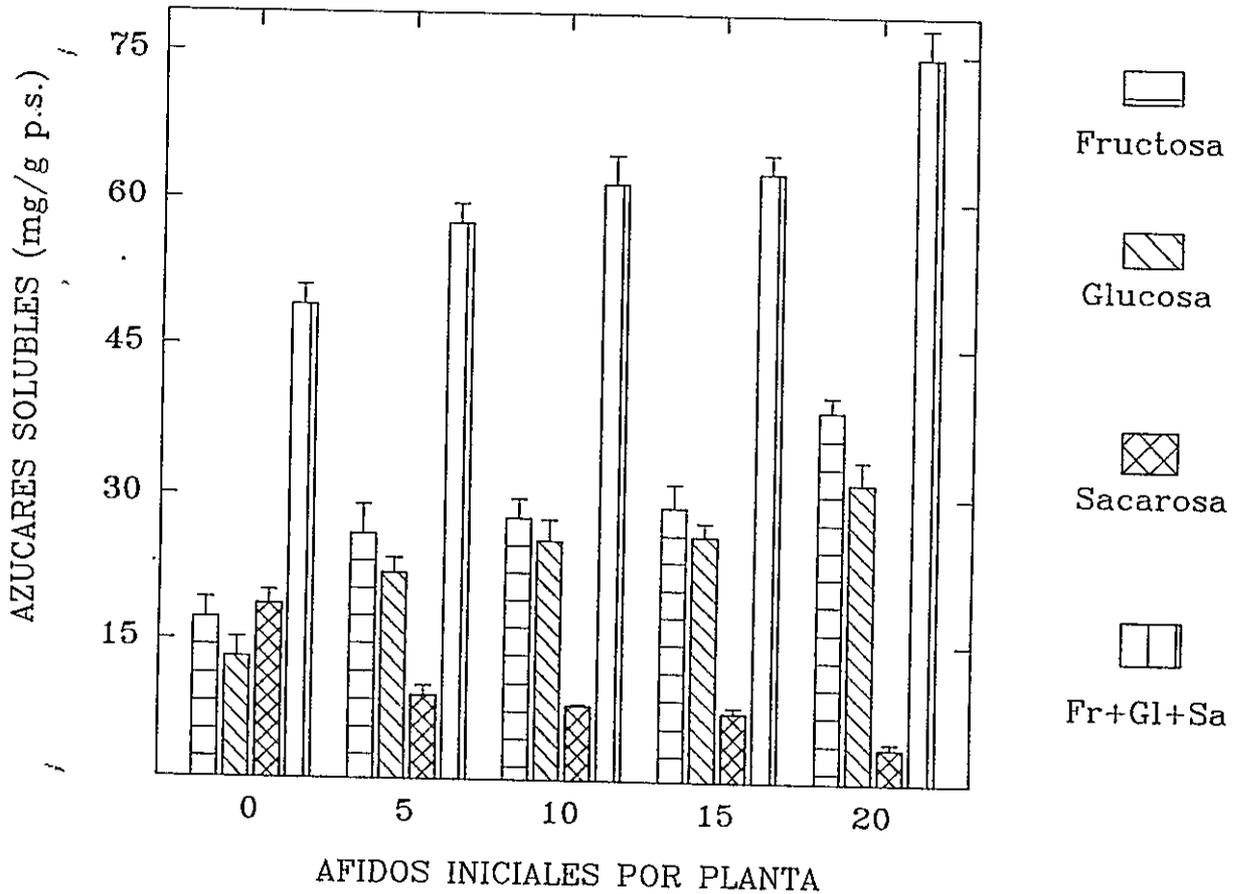


Figura 7. Contenido de los azúcares fructosa, glucosa y sacarosa en plantas de cebada. Los niveles de estos azúcares fueron evaluados a las 72 h de infestación con 0, 5, 10, 15 y 20 áfidos iniciales por planta de *S. graminum*. El total de azúcares solubles es la suma del contenido individual de los tres azúcares en cada grupo de plantas. Cada valor es el promedio de 3 muestras \pm e.e..

La concentración de sacarosa en la cebada sometida a infestación por *S. graminum*, mostró una disminución progresiva a tiempos de infestación mayores. La cinética del contenido de sacarosa en las hojas, realizada entre las 0 y 120 h de infestar las plantas con 20 y 40 áfidos iniciales, mostró una reducción significativa en los niveles de este azúcar a tiempos cortos de infestación, (Fig. 8). En el grupo de plantas infestadas con 40 áfidos iniciales por planta, a 5 días de infestación, sólo se encontró un 25 % de la concentración hallada en el control sin infestar. En el grupo de plantas infestadas con la mitad de esta cantidad de áfidos, la concentración de sacarosa sólo llega a ser de 50 % del valor control. Es interesante anotar que a las 24 horas de inicio de la infestación, en el grupo más infestado (40 áfidos iniciales/planta), se encontró una menor concentración de sacarosa en la planta de cebada con respecto al control (test de t, $P < 0.05$). Esta rápida disminución en la concentración de sacarosa, llega a ser significativa a las 72 horas en el grupo de plantas infestadas con 20 áfidos iniciales ($P < 0.01$).

Los cambios determinados a las 72 h en la proporción de los niveles de fructosa, glucosa y sacarosa en plantas infestadas con *S. graminum*, podría ser parte en la cebada de una importante respuesta metabólica ante el déficit hídrico provocado por áfidos. A las 96 y 120 h, la caída en los niveles de azúcares solubles en la cebada bajo infestación podría explicarse por las menores tasas de fijación de CO_2 y al deterioro del metabolismo que ocurre en la planta. Esto sugiere que en infestaciones prolongadas la infestación por *S. graminum*, podría afectar en la cebada la capacidad de ajustar osmóticamente por medio de estos solutos ante el estrés hídrico provocado. Además, la significativa disminución de sacarosa en la planta a tiempos cortos de infestación, podría tener importantes efectos en la nutrición de los áfidos en las plantas.

3.3.2 Prolina

En plantas de cebada de 16 días de edad, fueron determinados niveles de prolina de 2 mmoles/Kg de peso seco, con incremento en los niveles de 20 veces en hojas de plantas infestadas con más de 100 áfidos por planta (6 días de infestación con 10 áfidos iniciales). El aumento más significativo ($P < 0.01$) en los niveles de prolina en la cebada, fue observado en los grupos de mayor infestación inicial (8 y 10 áfidos iniciales) comparados con el control. Los grupos sometidos a infestaciones más bajas (2, 4 y 6 áfidos) presentaron una acumulación de prolina inferior a la descrita para los dos últimos grupos (Fig. 2A). Este aumento en la

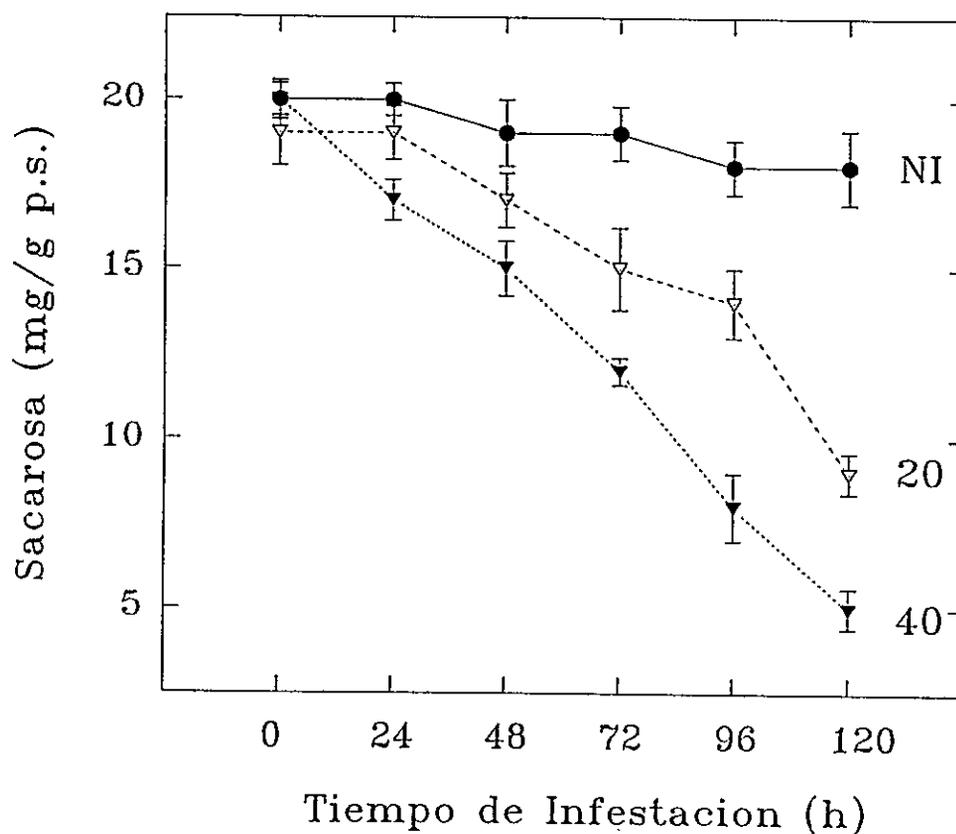


Figura 8. Ciclo diario del contenido de sacarosa en hojas de cebada cv Aramir. Grupos de plantas de 10 días de edad se infestaron con 20 o 40 adultos de *S. graminum* por planta. Los niveles de sacarosa se midieron por HPLC en todos los grupos de plantas cada 24 h por 5 días. NI: No infestado. 20: 20 áfidos iniciales por planta. 40: 40 áfidos iniciales por planta. Cada punto es el promedio de 3 muestras \pm e.e..

concentración de prolina esta relacionado entre otros, con cambios en el potencial hídrico de las plantas de cebada infestadas por *S. graminum*. Plantas infestadas por 3 días con 20 áfidos iniciales, presentan un nivel de prolina significativamente superior (test-t, $P < 0.01$) a los niveles en las plantas control (Fig. 2B).

La relación entre la disminución de los potenciales hídricos en plantas de cebada infestadas con la acumulación de prolina en las hojas, indicaría tal como ha sido postulado, que cambios en los componentes del potencial hídrico, podrían ser parte del mecanismo para gatillar su acumulación. La disminución de los potenciales hídricos en plantas infestadas podría tener relación con la acumulación de prolina y de ácido abscísico, metabolitos importantes en la respuesta de adaptación en la cebada bajo estrés por sequía. El papel de este mecanismo y la relación que tendría con la conservación del estado hídrico en la planta bajo infestación será discutido.

3.4 Efecto de la infestación por *Schizaphis graminum* en metabolitos con posible rol defensivo y su efecto sobre los áfidos

Ha sido descrito que compuestos fenólicos en dietas artificiales presentan efectos antialimentarios o tóxicos contra *S. graminum*. Para evaluar en cebada si la infestación con áfidos provoca cambios en los niveles de fenoles totales o incrementos en algunos de ellos, fueron determinados las concentraciones de estos metabolitos en las plantas bajo infestación. Además, se determinaron los efectos tóxicos que presentó un dihidroxifenol sobre *S. graminum*, cuyo nivel aumento en la planta por la infestación con esta especie.

3.4.1 Fenoles totales

La concentración de fenoles totales en la cebada, a 6 días de infestación con densidades poblacionales entre 0 y 10 áfidos iniciales, no fue diferente a los niveles determinados en el control (Fig. 9).

3.4.2 Ácido ferúlico

En la caracterización de cambios en la concentración de algunos compuestos fenólicos descritos en relación a metabolitos defensivos en plantas, se determinó un incremento en la concentración de ácido ferúlico (un dihidroxifenol) en la cebada, para los mismos niveles de infestación descritos en relación a

fenoles totales. El ácido ferúlico en la planta se incrementó en función de la infestación, de 4,5 $\mu\text{mol/Kg pf}$ en los controles hasta 14,3 $\mu\text{mol/Kg pf}$ en las plantas sometidas a la mayor infestación (Fig. 9). Es probable que cambien otros compuestos fenólicos simples no determinados en las plantas infestadas y esto pueda explicar el hecho de que niveles similares de fenoles totales se presenten en plantas sometidas a diferentes infestaciones iniciales.

3.4.3 Sobrevivencia de áfidos en dietas artificiales con ácido ferúlico

Para determinar si habría un efecto del ácido ferúlico en la biología de *Schizaphis graminum*, se incorporó este compuesto en distintas concentraciones a dietas artificiales y se evaluó la sobrevivencia de los áfidos entre las 0 y 96 h. Se expresó la sobrevivencia en las dietas como el porcentaje del número inicial de áfidos que permanecen vivos a los diferentes tiempos. La sobrevivencia de ninfas alimentadas en dietas artificiales con este compuesto fué afectada en concentraciones por sobre 10 μM , alcanzando a esta concentración sólo el 50 % de sobrevivencia a 36 h de inicio del experimento (en el grupo control, el 50 % se alcanza a las 60 h). En los otros grupos alimentados con las dietas a concentraciones más altas de este compuesto (20, 30 y 40 μM) el 50 % de sobrevivencia se alcanza rápidamente, entre las 12 y 24 h de inicio de los ensayos (Fig. 10). Para los diferentes tiempos evaluados, la concentración de ácido ferúlico en las dietas artificiales o dosis letal con la cual la sobrevivencia es del 50 % (DL₅₀) fué de 16 μM . Este efecto tóxico del compuesto en las dietas artificiales ocurre en el rango de concentración en que el ácido ferúlico (4,5 - 14,3 $\mu\text{mol/Kg p f}$) fué encontrado en las plantas control e infestadas por 6 días con 10 áfidos iniciales, respectivamente.

Los efectos del ácido ferúlico en los ensayos con dietas artificiales en la sobrevivencia de *S. graminum*, sugieren que la inducción de este compuesto por la infestación con esta especie, podría afectar la biología de los áfidos en la planta.

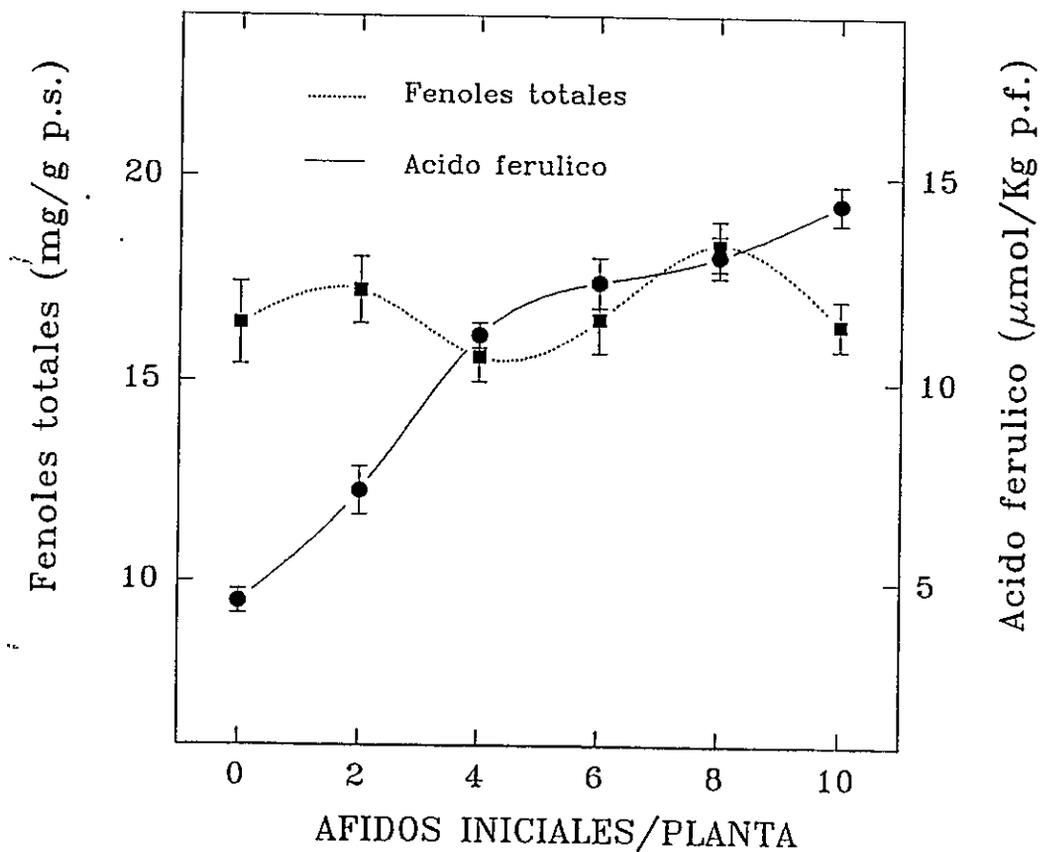


Figura 9. Efecto de la infestación en los niveles de fenoles totales y ácido ferúlico. Se evaluó el contenido de estos compuestos en plantas de 16 días de edad y 6 de infestación con diferentes densidades poblacionales de áfidos, con 0 a 10 áfidos iniciales por planta. En la determinación de ambos metabolitos cada valor es el promedio de 3 muestras \pm e.e..

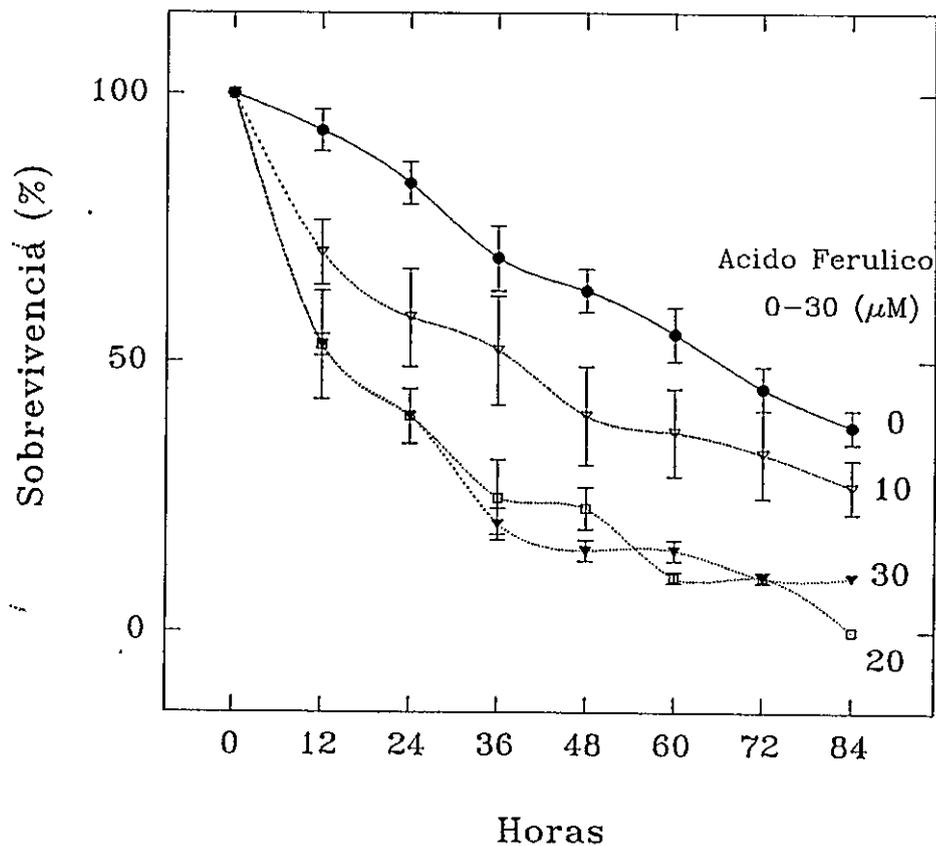


Figura 10. Experimentos con dietas artificiales. Efecto sobre la sobrevivencia de los áfidos del ácido ferúlico en dietas artificiales que presentan una concentración creciente del compuesto (0, en la dieta artificial control -sin ácido ferúlico- o con la misma dieta más 10, 20 y 30 μM).

3.5 Efecto de la infestación por *Schizaphis graminum* en actividades enzimáticas relacionadas con respuestas de defensa en la cebada ante estrés biótico

3.5.1 PAL (fenil-alanina-amonio-liasa)

La actividad PAL se evaluó en tiempos cortos de infestación (0 y 24 h). Se presentó un máximo en la actividad de esta enzima a las 16 h de infestación de las plantas con 20 áfidos iniciales de *S. graminum*. La actividad PAL en las plantas infestadas fué inducida en este máximo un 100 % comparado con los niveles hallados en su respectivo control. La actividad de está enzima fue afectada por el fotoperíodo al que se encontraban las plantas, aumentando en 1,5 veces los niveles en ambos tratamientos en el periodo de luz con relación a los niveles de actividad en el periodo de oscuridad (Fig. 11).

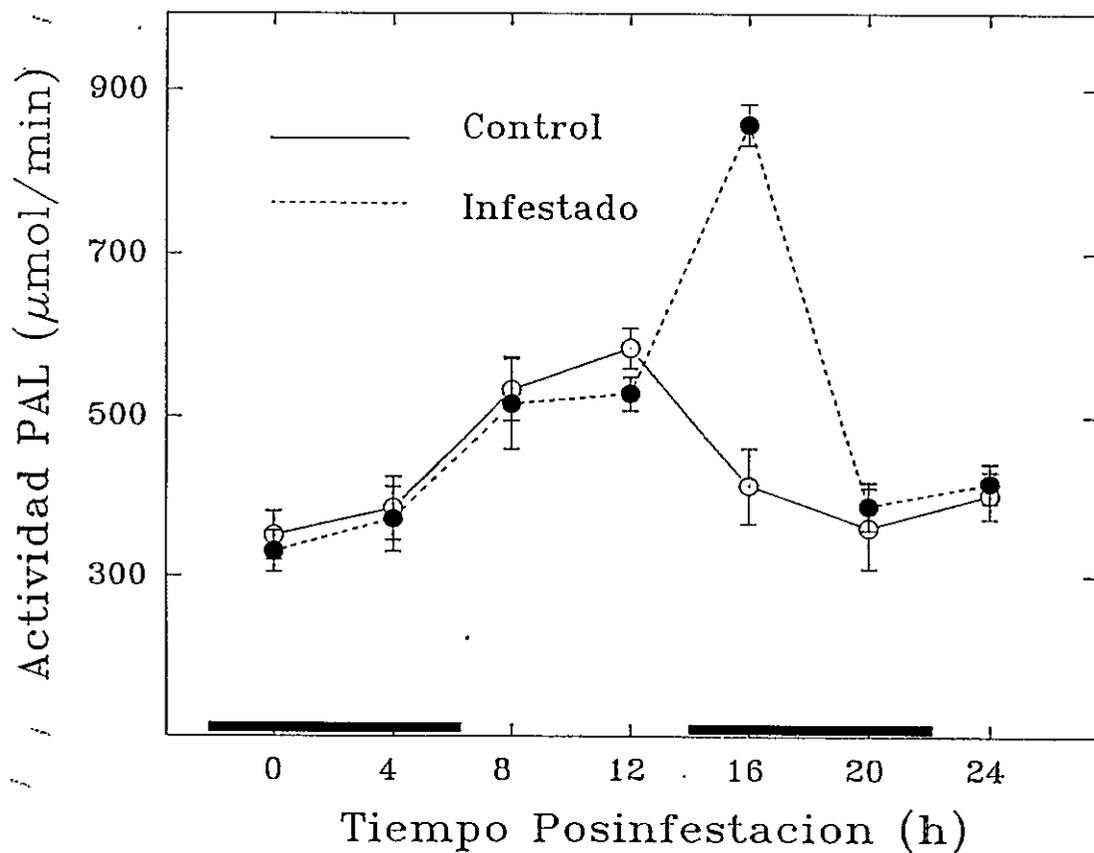
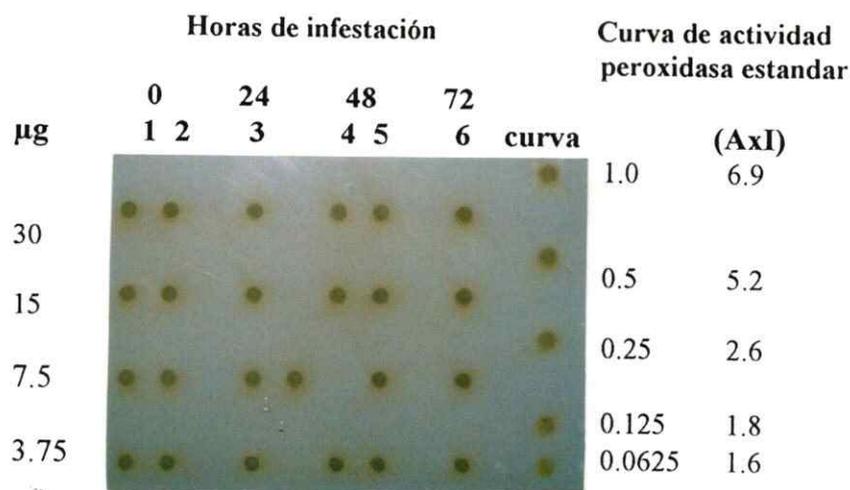


Figura 11. Actividad fenil alanina amonio liasa (PAL). La actividad PAL fue evaluada a través de un ciclo diurno de 24 h en plantas control e infestadas con 20 áfidos iniciales por planta cada 4 h. Las barras oscuras en el eje x indican periodos de oscuridad. Cada punto es el promedio de 3 muestras \pm e.e..

3.5.2 Peroxidasas

La actividad peroxidasa es mayor en extractos de proteínas de plantas infestadas por *S. graminum* que la de extractos de plantas control. En la cinética de actividad en relación al tiempo de infestación con 20 áfidos iniciales por planta (entre 0 y 72 h, determinada en Dot-Blots), se halló por análisis densitométrico, un aumento de actividad del 50 % a 48 h de inicio de la infestación, mayor actividad que permanece por sobre los niveles determinados en los controles a las 72 h (Figs. 12A y 12B). La actividad enzimática en la curva estándar con peroxidasa de rábano, determinada bajo las mismas condiciones de revelado para las muestras aparece en la Fig. 12B. Al duplicar a 40 el número de áfidos iniciales por planta, la actividad enzimática de peroxidasas, 48 h de iniciada la infestación, es 3 veces mayor en extractos provenientes de plantas infestadas, comparado con la actividad del control (Fig. 12C).

Para evaluar si el incremento en la actividad enzimática en plantas infestadas era debido a síntesis de peroxidasas que no están expresadas en los controles, se corrieron electroforesis de las proteínas en su conformación nativa en geles no denaturantes. La actividad peroxidasa evaluada directamente en el gel, mostró varias bandas con esta actividad en los controles y en plantas infestadas. Estas bandas pueden ser divididas en tres grupos de acuerdo a su movilidad electroforética, presentándose una banda adicional (B) distinguible sólo en las corridas de proteínas de plantas infestadas (Fig. 13A). El grupo que migró más rápido (D) está constituido de una sola banda, igual que el grupo de movilidad intermedia (C). El grupo de peroxidasas que corrió cerca de la parte superior del gel (A) presentaron la mayor intensidad en la tinción, formado por 2 bandas. Además, la tinción por actividad peroxidasa en cada una de las bandas de todos los grupos, es superior en las proteínas de plantas infestadas a la tinción por actividad en las de plantas control. Los niveles de actividad peroxidasa en los controles son 50 % más bajos que los niveles determinados densitométricamente en el grupo (A), correspondiente a proteínas de plantas infestadas (Fig. 13B). El test de glicosilación realizado en geles nativos corridos en las condiciones descritas, mostró una reacción positiva a la marcación con dansilhidrazina en todas las bandas, indicando que están glicosiladas.



48 h postinfestación

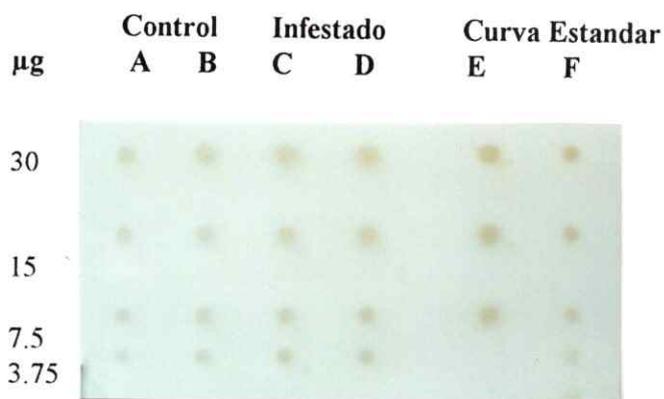
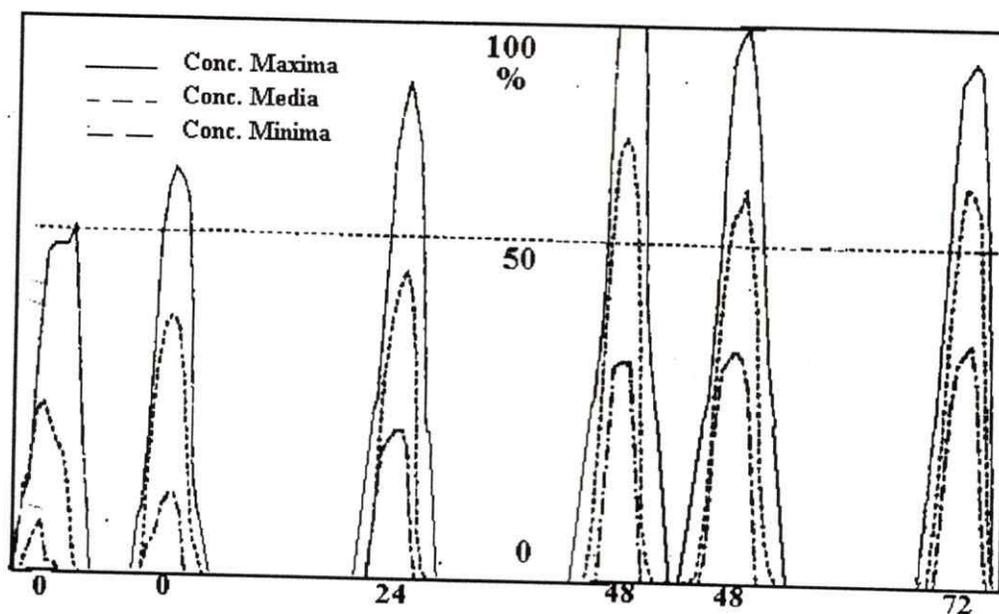
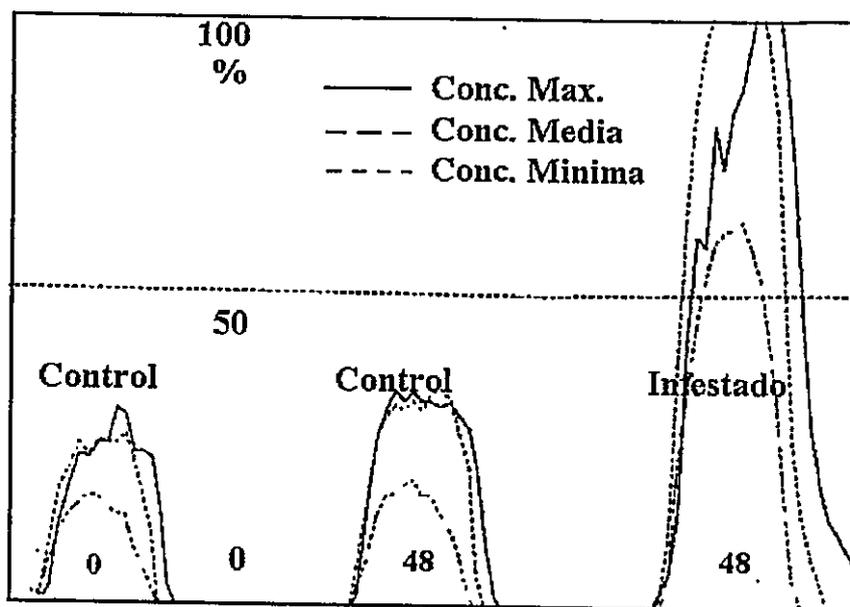


Figura 12. *Actividad peroxidasa en Dot-Blots.* (A) Membranas de nitrocelulosa después del revelado por actividad peroxidasa. Las muestras se colocaron en alicuotas de 200 μl , en diluciones seriadas de 30, 15, 7.5, y 3.75 μg de proteína. La actividad peroxidasa fue evaluada de proteínas de plantas de cebada a las 0, 24, 48 y 72 hs de infestación inicial con 20 áfidos por planta. Se utilizó peroxidasa de rábano para la curva estandar (1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 μg de peroxidasa VI). El nivel de actividad peroxidasa de los "Dots" en la membrana superior aparecen en la página siguiente.



Actividad Peroxidasa en Dots						Actividad relativa respecto al control*			
0		24		48		72	Dot	Area x Intensidad del control	(%)
1	2	3	4	5	6	1*	1.00	100	
*	*	*	*	*	*	2	1.03	100	
						3	1.56	156	
						4	2.09	209	
						5	1.82	182	
7	8	8	10	11	12	6	1.69	169	
*	*	*	*	*	*	7*	0.33	75	
						8	0.55	125	
						9	0.68	154	
						10	1.04	236	
						11	0.98	223	
						12	0.94	214	

(B) *Estimación de la actividad peroxidasa.* Se llevo a cabo por digitalización y análisis densitométrico de la membrana superior de la Figura 12A. Se indican los niveles de actividad peroxidasa de los Dots en las filas con 30 μg (1 a 6) y 15 μg (7 a 12) de proteínas. Los valores del nivel de la actividad (área x intensidad) de las muestras están dados en términos relativos (sin unidades) y como el % del nivel de actividad comparado con el control (se asignó un 100 % para la actividad del control de la misma edad sin infestación).



Actividad Peroxidasa en Dots

Controles Infestado



Actividad relativa respecto al control*

Dot	A x I	% del control
1	2.15	72
2*	3.00	100
3	8.90	297
4	1.90	68
5*	2.80	100
6	9.15	327
7	1.10	82
8*	1.35	100
9	4.70	350

(C) *Estimación de la actividad peroxidasa.* Dot-Blots de proteínas de plantas de 12 días de edad a 48 h de infestación inicial con 40 áfidos por planta. Los controles (no infestados) a los 10 y 12 días de edad. Se sembró en los dots alícuotas con 50, 25 y 12.5 µg de proteínas de los tratamientos. Los valores del nivel de la actividad (área x intensidad) de las muestras están dados en términos relativos (sin unidades) y como el % del nivel de actividad comparado con el control (se asignó un 100 % para la actividad del control de la misma edad sin infestación).

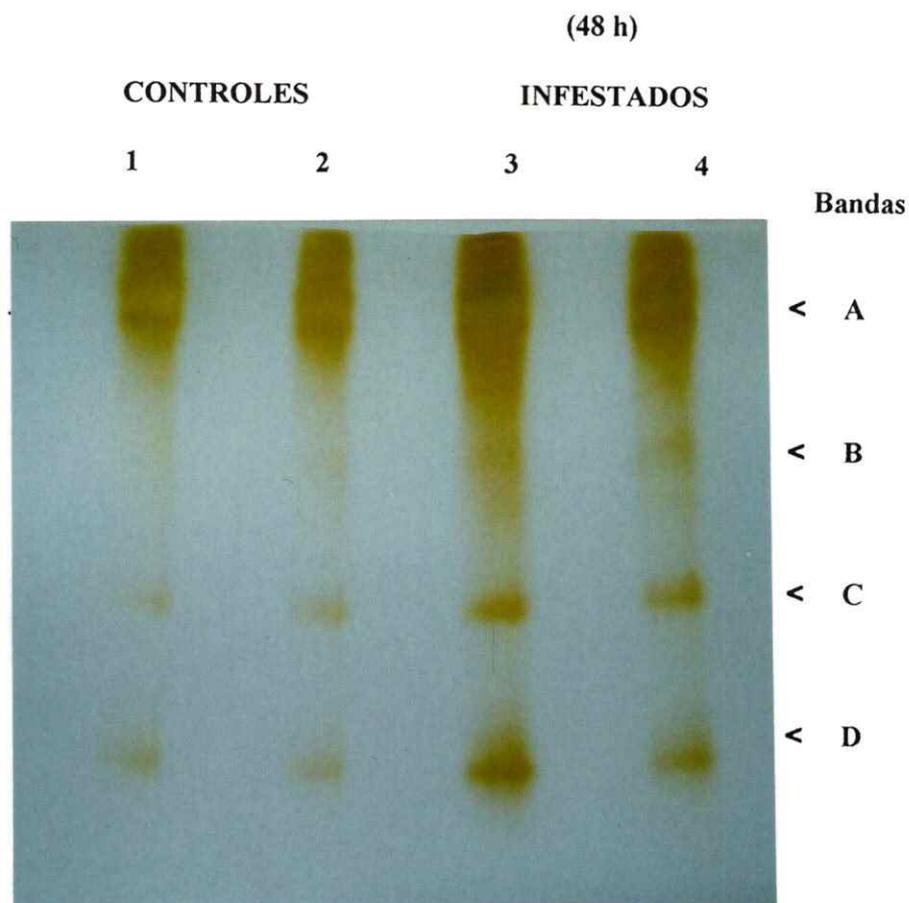
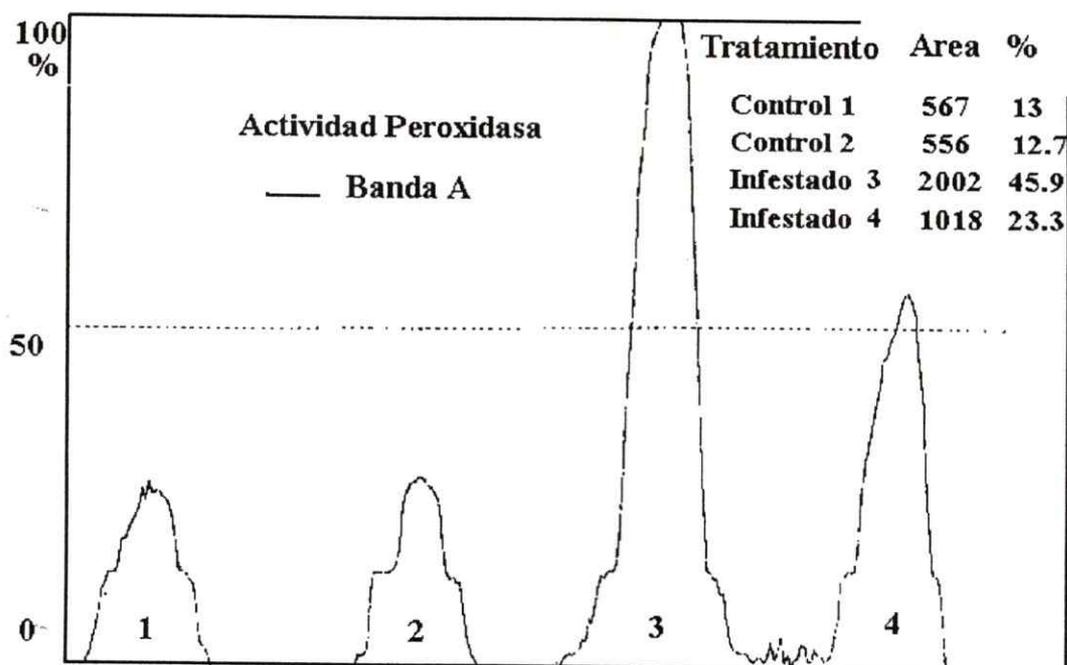


Figura 13. *Actividad peroxidasa en geles no denaturantes.* (A) Proteínas en su conformación nativa de plantas de cebada control (carriles 1 y 2) e infestadas por 48 h (carriles 3 y 4), se corrieron en geles de acrilamida y bajo condiciones no denaturantes, realizando el revelado de las bandas con actividad peroxidasa con la solución de o-PNA y H_2O_2 a pH 5,0. Cada carril se cargo con 60 μg de proteínas de cebada. Grupos de bandas con esta actividad (A, B, C, D) fueron observados tanto en los controles como en proteínas de plantas bajo infestación. La estimación de actividad aparece en la Fig. 13B.



Actividad peroxidasa relativa en las bandas
(el total en cada columna suma 100 %)

Bandas	A	B	C	D
control 1	10	8	12	8
control 2	10	8	12	8
infestado 1	52	48	42	50
infestado 2	28	36	34	34

(B). *Estimación de la actividad peroxidasa en el gel nativo.* Todos los carriles (1, 2, 3, 4) se cargaron con 60 μg de proteína. En la parte superior, densitograma del grupo de proteínas en la banda A, en que la actividad peroxidasa aparece expresada en términos relativos (area) y como el porcentaje para cada carril. Abajo: Tabla con la actividad relativa de peroxidases de los carriles control (1 y 2) e infestado (3 y 4) de cada una de las bandas (A, B, C, D) determinadas en el gel. La digitalización y cálculos para estimar la actividad peroxidasa fueron realizados con el programa Gel-Perfect 5.2.

La rapidez en la respuesta en la mayor actividad peroxidasa en plantas de cebada infestadas con el áfido *S. graminum*, está relacionada con los niveles de infestación inicial al que fué sometida la planta, tal como ha sido discutido para otras respuestas fisiológicas y metabólicas. La inducción en la actividad de estas enzimas en cebada por infestación de áfidos no ha sido descrita previamente. Además, es importante señalar que debido al carácter de glicoproteínas que presentan estas enzimas, esto puede dar como resultado que en los geles nativos, una misma proteína presente dos bandas con actividad peroxidasa, debido a que la movilidad relativa de la proteína podría cambiar si el número de residuos del azúcar es diferente.

3.6 Efecto de la infestación por *Schizaphis graminum* en patrones electroforéticos SDS de proteínas de cebada

Los patrones electroforéticos de proteínas de la cebada en geles SDS son diferentes en plantas que han estado sometidas a infestación. El análisis densitométrico de los geles mostró que los patrones de proteínas de los controles de 10 y 16 días de edad no presentan diferencias, contrastando con algunas bandas que no están presentes en el patrón de plantas infestadas por 6 días. Además, se encontró la presencia en el patrón proteico de estas plantas algunas bandas de bajo peso molecular (46, 29, 20 y 13 KD) que no se corresponden a bandas en el patrón del control. Estas diferencias podrían deberse a degradación de péptidos mayores (proteínas de alto peso molecular) en las hojas de plantas bajo periodos de infestación prolongados, similar a lo que ocurre en el proceso de senescencia foliar.

En tiempos de infestación más cortos (72 h) los patrones electroforéticos de proteínas de plantas control e infestadas no presentaron diferencias importantes, con similitud en la totalidad de las bandas en ambos tratamientos (Figs. 14). Es prudente señalar que la separación de las proteínas en los geles, presenta las limitaciones propias de esta técnica, lo que podría superarse realizando geles bidimensionales. En todo caso, estos resultados junto a los patrones obtenidos en los geles nativos para evaluar la actividad peroxidasa, sugieren que la mayor actividad enzimática en plantas infestadas, se debería a inducción y/o a un incremento en la actividad de peroxidases que son expresadas constitutivamente en la cebada, ya que estas bandas se encontraron también en plantas control sin infestación.

PATRONES DE PROTEINAS

(Electroforesis SDS)

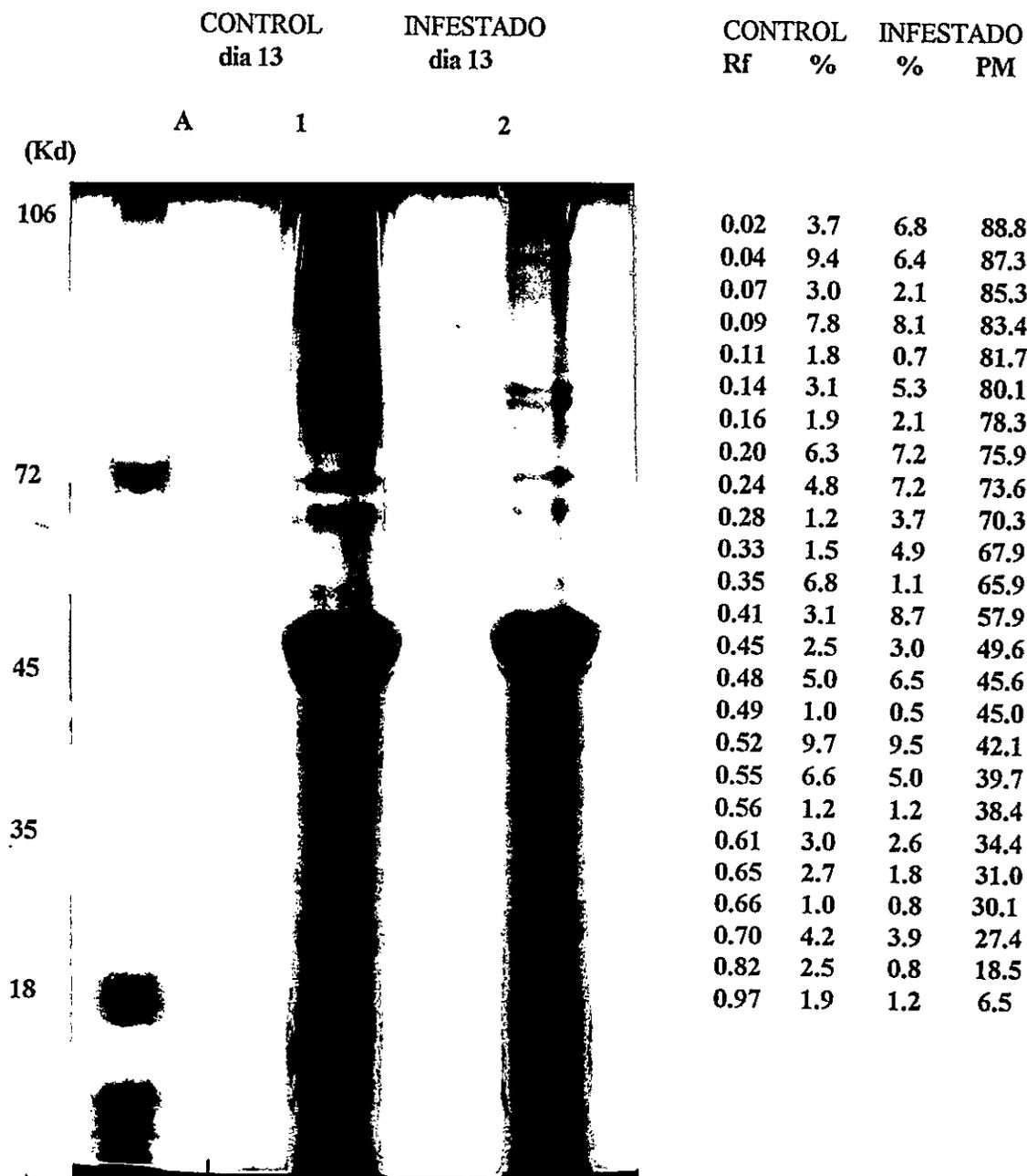


Figura 14. Patrones de proteínas de cebada. Electroforesis SDS de proteínas de plantas de cebada control de 13 días de edad (carril 1) y de 13 días de edad y 3 días de infestación (carril 2) con *S. graminum*. Las bandas de proteínas se analizaron por medio de tinción con plata, digitalizando la imagen del gel y realizando el análisis densitométrico con el programa Gel-Perfect 5-2. Carril A (pessos moleculares estandard). En la tabla aparecen los resultados del análisis densitométrico.

3.7 Efecto de la infestación, de daño mecánico y de sequía en la cebada

La infestación por *S. graminum* causa síntomas de estrés hídrico en las plantas de cebada. Además, este áfido ha sido descrito como una especie que daña la cutícula y la epidermis en las hojas. Para comparar los efectos de la infestación por áfidos con algunos efectos de la sequía o del daño foliar artificial en la cebada, se evaluaron parámetros fisiológicos, la concentración de algunos metabolitos y el patrón de resistencia estomática en plantas bajo cada uno de estos tratamientos.

3.7.1 Parámetros fisiológicos y niveles de metabolitos en la cebada

Con respecto al control, los potenciales hídricos de las plantas de cebada disminuyen significativamente en tratamientos de infestación (ANOVA, $P < 0.01$) y de déficit de agua ($P < 0.01$) y la concentración de prolina aumentó en las hojas de cebada sometidas a estos dos tratamientos 11 ($P < 0.01$) y 14 veces ($P < 0.01$), respectivamente (Tabla 3). Los niveles de azúcares y de proteínas solubles en la cebada son afectados por los tres tratamientos, siendo importante esta disminución comparada con el control (52 %) en plantas infestadas por *S. graminum* o en aquellas bajo sequía (38 %); Similar disminución fue determinada en la concentración de proteínas solubles, alcanzando 38 % para las infestadas y 28 % para plantas bajo déficit de agua. Después de 5 días de infestación por *S. graminum*, el contenido de clorofila en la cebada sólo es del 55 % del contenido en los controles de la misma edad. Las hojas con daño mecánico presentan el mismo nivel de reducción en el contenido de clorofila que plantas bajo sequía, después de 5 días de tratamiento (c. 20 % de reducción). Con relación a la fotosíntesis, la disminución alcanzó a ser del 56 % (expresada en mg de $\text{CO}_2/\text{dm}^2\text{h}$) o de 26 % (expresada en mg de CO_2/mg de clorofila total) en las plantas infestadas. En las fotos de la Fig. 15 aparecen los tratamientos de infestación y daño mecánico artificial. Detalles de los tratamientos aparecen en los métodos y el nivel de significancia entre tratamientos en los resultados de la Tabla 3.

Tabla 3. Efecto de 5 días de tratamiento de infestación, daño y sequía en parámetros fisiológicos y en la concentración de metabolitos en plantas de cebada.

Tratamiento	Potencial Hídrico (MPa)	Azúcares Solubles (mmol/Kg p s)	Proteínas Solubles (mg/g p s)	Prolina (mmol/Kg p s)	Clorofila Total (mg/g p s)	Fotosíntesis (mg CO ₂ /mg Cl)
Control A	-0.28 ± 0.06 a	122 ± 4 a	143 ± 6 a	4.2 ± 0.4 a	8.1 ± 0.4 a	2.37 ± 0.08 a
Control B	-0.26 ± 0.08 a	117 ± 4 a	140 ± 5 a	3.8 ± 0.3 a	7.9 ± 0.3 a	2.54 ± 0.04 a
Infestación	-0.84 ± 0.09 c	56 ± 5 c	87 ± 5 b	42.3 ± 4.4 c	4.4 ± 0.4 c	1.89 ± 0.06 b
Daño	-0.40 ± 0.10 a	101 ± 4 a	129 ± 4 a	10.3 ± 2.0 a	6.5 ± 0.3 b	N.D.
Sequía	-0.78 ± 0.05 c	73 ± 4 b	102 ± 6 b	53.3 ± 4.8 c	6.5 ± 0.4 b	N.D.

Grupos de 20 plantas de cebada cv Aramir de 10 días de edad se utilizaron en los experimentos. Controles, sin tratamientos: (control A) plantas de 10 días de edad y (control B) plantas de 15 días de edad. El 3er grupo de plantas fue infestado con 20 áfidos adultos de *S. graminum* (población que alcanzó en los 5 días un promedio de 160 áfidos por planta). El daño mecánico artificial se realizó hirviendo las hojas dos veces por día con 20 pinchazos de un microcapilar de vidrio por 5 días. El tratamiento de estrés hídrico fue realizado, suspendiendo el suministro de agua a las plantas 7 días después de sembradas. Cada valor es el promedio de cuatro muestras ± el error estándar. N. D.: no determinado. Las letras entre columnas difieren significativamente de a en b: $P < 0.05$ y en c: $P < 0.01$ (ANOVA).



Figura 15. *Plantas de cebada sometidas a infestación o daño artificial.* Arriba, en la parte superior aparecen de izq. a der., en la primera bandeja, plantas de 10 días de edad, que se infestarán respectivamente por 24, 48 y 96 h (20 áfidos por planta) o, en la segunda bandeja, plantas de 10 días de edad que serán heridas mecánicamente por iguales períodos de tiempo (20 pinchazos por planta cada 12 h). En la parte inferior de la foto, ambos grupos de plantas después de los tratamientos. Notese la pérdida de turgencia y clorosis de las plantas de los grupos infestados por más de 24 h.

3.7.2 Resistencia de los estomas al vapor de agua

El daño mecánico artificial no afectó el patrón de resistencia de los estomas. Los patrones diurnos de resistencia estomática en plantas de cebada infestadas por *S. graminum* o bajo déficit de agua, son diferentes entre ellos y respecto del control (Fig. 16). En el grupo infestado, entre las 0 y 48 h de inicio de la infestación, la resistencia de los estomas mostró un patrón similar al encontrado en plantas control sin infestar. Después de este tiempo, la resistencia estomática fue menor en periodos de luz (60 y 84 h) y mayor durante el período de oscuridad (72 h) en plantas infestadas que en los controles. A 96 h de inicio de la infestación, el grupo de plantas infestadas, no presentó el aumento en la resistencia estomática para el período de oscuridad hallado a las 72 h (ver sección 3.1.4). Plantas de cebada sometidas a déficit de agua, presentaron entre las 0 y 60 h un patrón con menor resistencia de los estomas en los periodos de luz (12, 36 y 60 h) y significativamente mayor en los periodos de oscuridad (24 y 48 h) que el patrón diurno del control sin sequía.

Los resultados con las plantas sometidas a heridas artificiales -la leve disminución de los potenciales hídricos y la similitud con los controles del patrón de resistencia de los estomas- indican que el daño causado en la cutícula y en la epidermis de las hojas de cebada (postulado en otras investigaciones) no pareciera ser un factor clave en alterar el estado hídrico de la planta.

3.7.3 Daño foliar provocado por áfidos y por daño mecánico artificial en cebada

Para comparar en la cebada el daño foliar provocado por la infestación con el provocado por daño mecánico artificial, así como para evaluar la posible acción de patógenos transmitidos por los áfidos, grupos de plantas de 10 días de edad se infestaron por 24 h (Nº 1), 48 h (Nº 2) y 96 h (Nº 3) con 20 áfidos por planta y otros grupos se hirieron 20 veces cada 12 h por 24 h (Nº 1), 48 h (Nº 2) y 96 h (Nº 3). En la foto de la Fig. 17A pueden verse plantas infestadas por solo 24 h (Nº 1), que presentan después de 72 h, puntos cloróticos similares a los que ocurren en plantas que permanecen infestadas por 96 h (Nº 3). Los puntos locales de daño (clorosis) posteriormente, a las 120 h, cambian a un color rojo, sin presentarse un aumento de la superficie foliar afectada. A 48 h, en plantas de cebada dañadas mecánicamente por 48 h (Nº

2), no se observan sitios cloróticos (Fig. 17A), aunque puntos locales de daño fueron observados en estas plantas posteriormente, a las 96 h (Fig. 17B).

El grupo dañado por 96 h presentó una reducción significativa en la concentración de clorofila. La manifestación y localización de puntos cloróticos en las hojas de las plantas infestadas solo por cortos intervalos de tiempo (24 h), descarta que en los tiempos en que fueron realizados los experimentos, los cambios determinados en la cebada sea por la acción de patógenos. La presencia y el efecto del daño de patógenos en plantas infestadas, se presentarían como síntomas que deberían manifestarse a pesar del retiro de la infestación y extenderse en las hojas (clorosis) en sitios distintos a aquellos donde se alimentaron los áfidos.

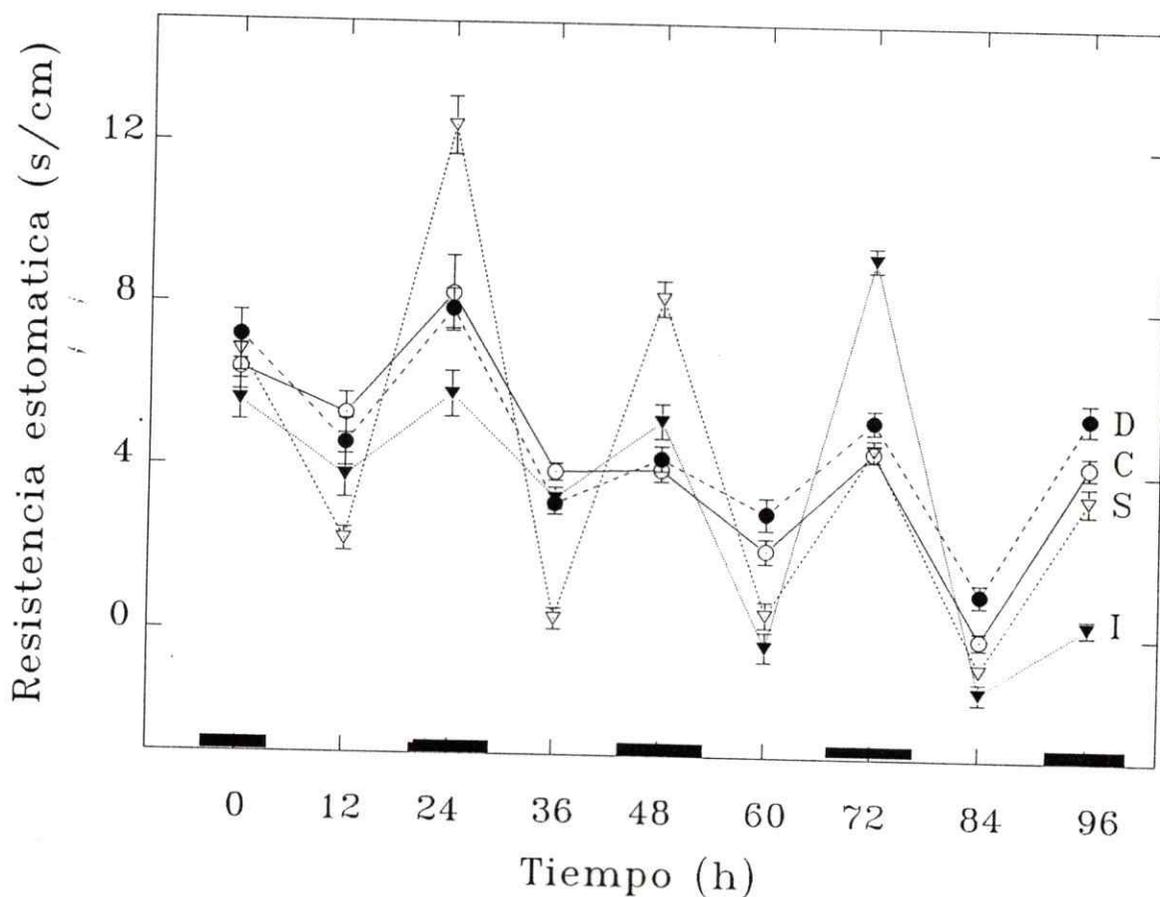


Figura 16. Patrones de resistencia estomática en plantas bajo sequía, daño artificial e infestación. En un régimen de luz/oscuridad, se realizó un ciclo diurno de resistencia de los estomas evaluando este parámetro cada 12 h en plantas control sin tratamiento (C -O-) o en plantas sometidas a sequía (S -∇-), daño mecánico artificial (D -●-) e infestación inicial con 20 áfidos por planta (I -♦-). Los tratamientos de estrés se realizaron en plantas de 10 días de edad por 5 días como se describe en los métodos. Cada valor es el promedio de 8 muestras ± el e. e.. Para comparar entre los tratamientos, se incluyeron los datos de resistencia estomática en plantas infestadas (I) que corresponden a la Fig. 3.



Figura 17. *Clorosis en hojas de plantas de cebada control, heridas artificialmente o infestadas por *S. graminum*. (Izq.) Plantas heridas artificialmente a las 48 h (daño 2), bajo infestación con 20 áfidos iniciales por planta por 24 h (infestado 1) y por 72 h (infestado 3) con 20 áfidos iniciales por planta. (Der.) Hoja de plantas a las 120 h de ser heridas artificialmente y hojas de plantas sometidas a 120 h de infestación. Los sitios cloróticos son los lugares de daño foliar provocado por los pinchazos (daño artificial) o por los áfidos (daño por infestación).*

3.8 Efectos sobre los áfidos de cambios provocados en la cebada por la infestación de *Schizaphis graminum*.

Se consideró importante evaluar si era afectada la biología de estos insectos al alimentarse y desarrollarse en plantas que presentaron cambios en su composición provocados por infestación u otros tratamientos. Se evaluó el crecimiento poblacional de los áfidos para determinar la tasa intrínseca de incremento de la población, ya que se postula que esta podría ser afectada por los cambios mencionados, al someter previamente las plantas a diferentes niveles de infestación.

3.8.1 Tasa intrínseca de crecimiento poblacional de los áfidos (r_m).

En experimentos con grupos de plantas de cebada de 16 días de edad y 5 días de preinfestación con *S. graminum* (entre 0 y 10 áfidos iniciales por planta), no se encontró diferencias significativas (tes-t, $P > 0.05$) en la población producida por una nueva infestación con dos áfidos (de 3er estadio) por planta por 5 días (Fig. 18A). El número de áfidos finales de la segunda infestación, al cabo de 5 días, fué en promedio de 13 áfidos para los 6 grupos. La tasa intrínseca de crecimiento de la población no fué significativamente diferente entre los grupos preinfestados y el control (Fig. 18B). Debido a los límites de duración de los experimentos con las plantas bajo infestación, se determinó que evaluar otros parámetros en los áfidos, podrían mostrar si los cambios provocados en la composición de la planta afectarían la biología de los insectos. La dificultad en obtener de las plantas de cebada una medida en forma directa de su calidad como alimento disponible para los áfidos, planteó la necesidad de determinar en los insectos otros parámetros con lo que esto pudiera ser evaluado. Los áfidos dependen de las plantas para su nutrición y estudios en que se ha determinado la calidad del alimento, indican que áfidos con alimento de alta calidad, alcanzan un mayor tamaño y se desarrollan más rápidamente que con alimento de inferior calidad. La tasa de crecimiento relativo ($mrgr$) de un áfido (que es su ganancia de peso por unidad de peso y por unidad de tiempo) y la tasa de desarrollo ($1/D$) de un áfido (que es el tiempo requerido para desarrollarse desde su nacimiento hasta el estado adulto) son medidas indirectas que indicarían la calidad del alimento que representan las plantas de cebada para los áfidos.

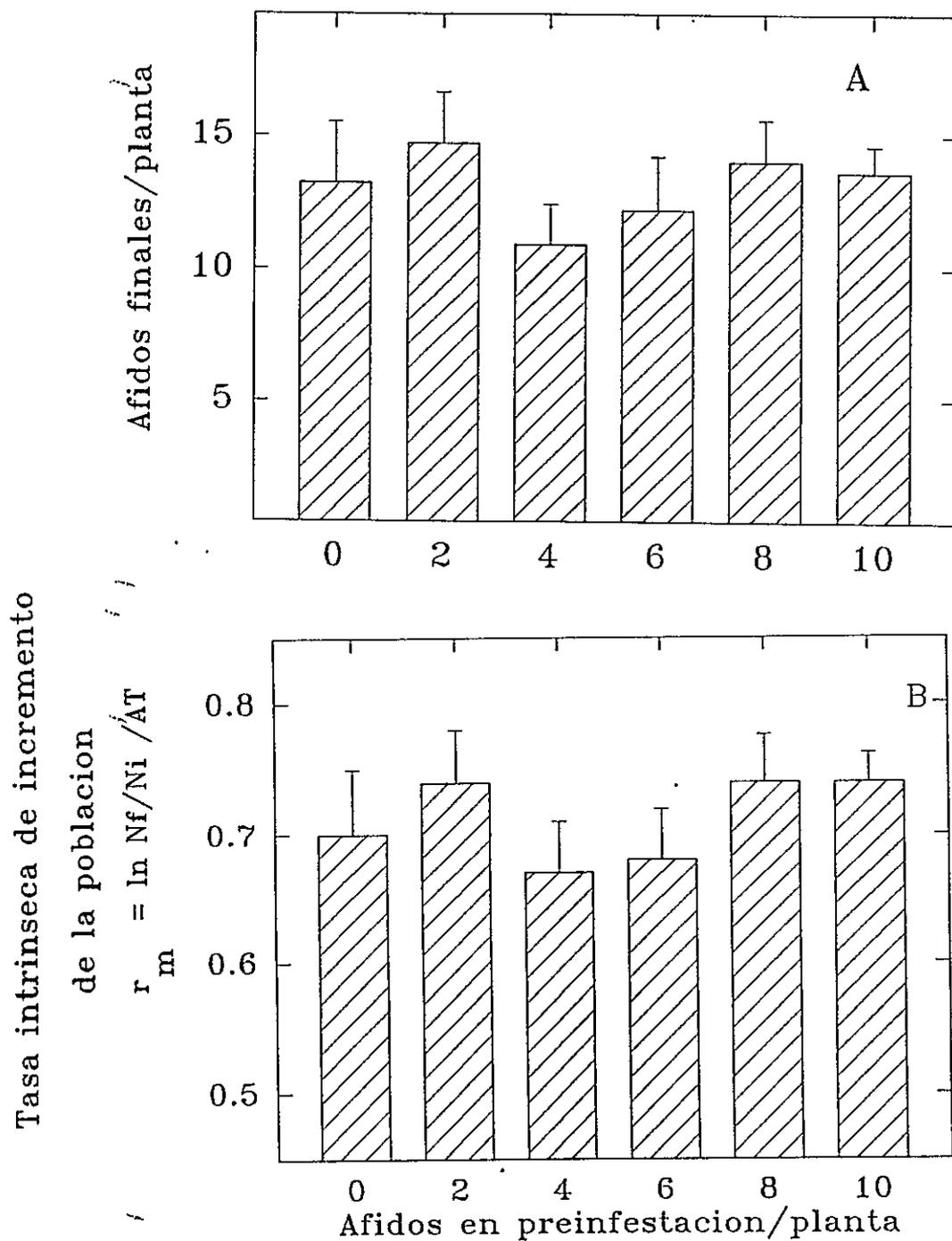
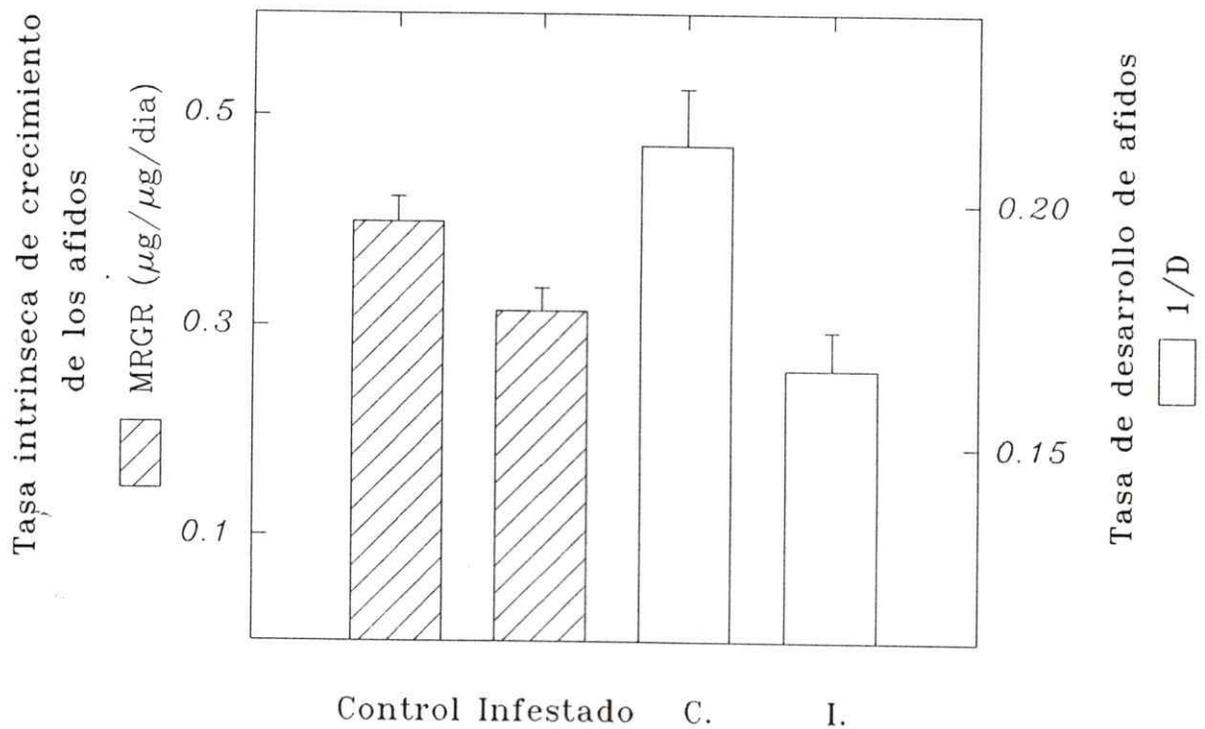


Figura 18. Tasa intrínseca de incremento de la población de áfidos (r_m). Plantas de cebada de 10 días de edad se infestaron con diferentes niveles (grupos con 0, 2..., 10 áfidos por planta) de *S. graminum*. 4 días después esta primera población de áfidos fué removida. (A) 2 áfidos se colocaron por planta en cada uno de los 6 grupos y el número de áfidos por planta 5 días después, permitió calcular la tasa de incremento de la población, r_m , (B) que fué calculada como el $\ln(N_f/N_i) / t$ ($t=5$ días). Cada valor representa un promedio ($n=10$) \pm e.e..



(C). Tasa promedio de crecimiento relativo (MRGR) y tasa de desarrollo (1/D) de áfidos. Plantas de cebada de 10 días de edad se infestaron por 5 días con 10 áfidos iniciales por planta. Esta población de áfidos fué retirada, colocando en plantas control y en plantas previamente sometidas a infestación, ninfas de *S. graminum* de 1er o 2do estadio de desarrollo. La tasa promedio de crecimiento (MRGR) y la tasa de desarrollo fue calculada como se describe en los métodos. Cada valor representa un promedio ($n=8$) \pm e.e..

3.8.2 Tasa intrínseca promedio de crecimiento (MRGR) y tasa de desarrollo de los áfidos (1/D).

Ninfas de *S. graminum* de 1er y 2do estadio colocadas en plantas control o plantas sometidas a una infestación previa por 5 días con 10 áfidos iniciales por planta, presentan tasas de crecimiento y tasas de desarrollo diferentes entre los dos tratamientos. La menor tasa intrínseca de crecimiento en las ninfas en plantas previamente infestadas (solo el 79 %) y la menor tasa de desarrollo (72 %) indican que los cambios provocados por la infestación de *S. graminum* afectan significativa (test de t, $P < 0.05$) y negativamente estos parámetros de la biología de los áfidos (Fig. 18C).

3.9 Efectos sobre los áfidos de cambios provocados en la cebada por infestación, por daño mecánico artificial o por déficit de agua

3.9.1 Tasa intrínseca de crecimiento (MRGR) y tasa de desarrollo (1/D) de áfidos

Para comparar el efecto en la biología de los áfidos de la infestación por *S. graminum*, con el causado por déficit hídrico o por el daño artificial en la cebada, fueron evaluadas las tasas de crecimiento y las tasas de desarrollo de ninfas colocadas a desarrollarse en plantas previamente sometidas a estos tratamientos. Áfidos que se desarrollaron en plantas de cebada previamente infestadas, tienen significativamente las más bajas tasas de MRGR (test-T, $T = 5.303$, d.f.= 8, $P < 0.001$) y 1/D (test-T, $T = 7.205$, d.f.= 8, $P < 0.001$) c. 82 % y 68 %, respectivamente, comparado con las tasas de ninfas en plantas control sin previa infestación. Los áfidos que se desarrollan en el grupo de plantas sujetas a déficit hídrico, también poseen bajas tasas de MRGR ($T = 1.886$, d.f.= 8, $P > 0.09$) y 1/D ($T = 3.856$, d.f.= 8, $P < 0.001$), c. 89 % y c. 77 %, respectivamente. Los áfidos que se desarrollan en hojas de cebada heridas artificialmente, tienen tasas similares de MRGR ($T = 1.886$, d.f.= 8, $P > 0.7$, c. 97 %) y 1/D ($T = 0.930$, d.f.= 8, $P > 0.28$, c. 92 %) de las tasas de áfidos en desarrollo en plantas control (Fig. 19). Bajos niveles de azúcares y proteínas solubles en plantas infestadas podrían afectar en parte y dar cuenta de bajas tasas de desarrollo de los áfidos en estas plantas. Además, se discutirán otros factores que podrían estar reduciendo la cantidad de nutrientes ingeridos por los áfidos en plantas con bajos potenciales hídricos, relacionados principalmente con el mecanismo de alimentación de estos insectos.

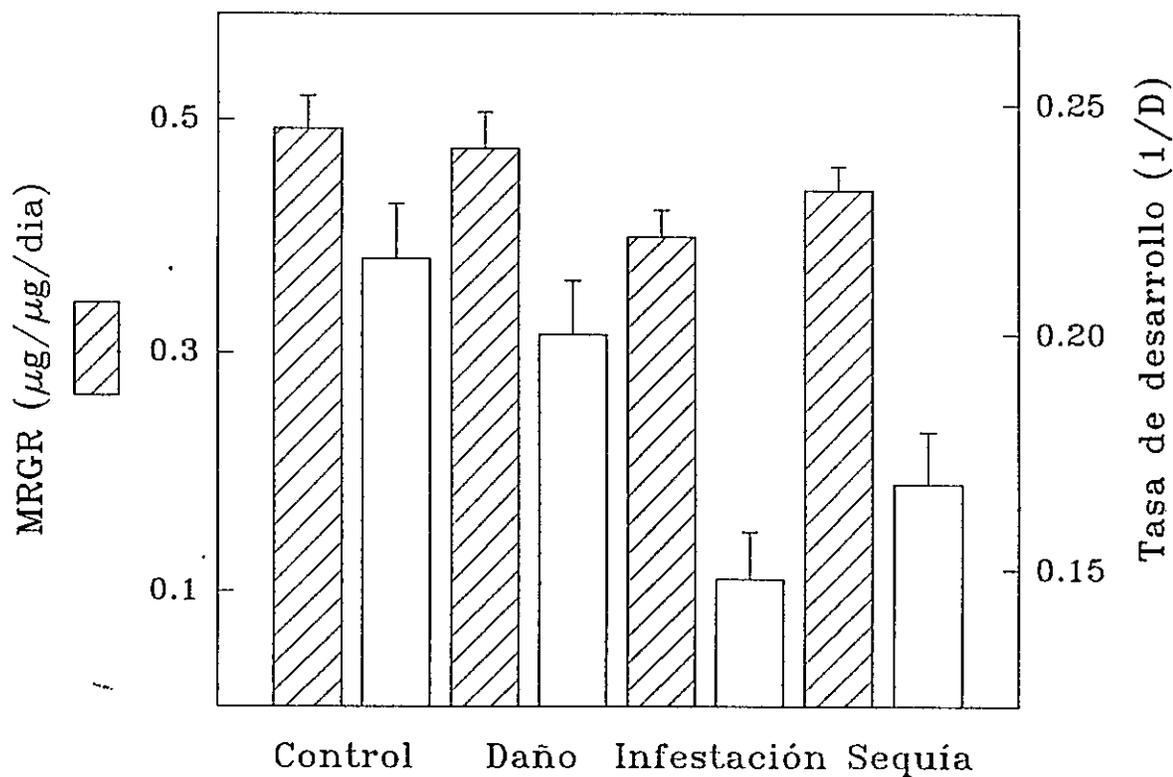


Figura 19. Tasa promedio de crecimiento relativo (MRGR) y tasa de desarrollo (1/D) de áfidos en plantas bajo sequía, daño artificial y previa infestación. Tasas de crecimiento y desarrollo de ninfas de *S. graminum* que se desarrollaron en plantas control sin tratamiento (C), bajo sequía (S), con daño mecánico artificial (D) o infestación inicial con 20 áfidos por planta (I). Cada valor es el promedio de 10 muestras \pm e.e. Las ecuaciones para calcular ambas tasas y como se realizaron los tratamientos aparecen descritas en la sección materiales y métodos.

4. Discusión

En esta tesis se estudiaron cambios fisiológicos y metabólicos producidos en plantas de cebada por infestación con áfidos. Se postuló la hipótesis de que la infestación por áfidos provoca respuestas fisiológicas y metabólicas en las plantas, algunas de las cuales reflejan el daño causado, en tanto que otras son respuestas defensivas en las plantas ante el estrés. Aspectos principales de la discusión será proponer una explicación del deterioro hídrico que presenta la cebada bajo infestación, el efecto que estos cambios provocados por *S. graminum* tienen en el metabolismo del carbono en la planta y el papel que podrían tener respuestas defensivas en la planta frente a los áfidos.

Estado hídrico de las plantas infestadas por *Schizaphis graminum* y caracterización de respuestas metabólicas y fisiológicas en la cebada ante el estrés hídrico provocado por los áfidos.

Hasta ahora se desconocía el mecanismo por el cual la infestación por áfidos causa un deterioro significativo en el estado hídrico de las plantas bajo infestación. *S. graminum* ha sido descrito como una especie que reduce el crecimiento de las raíces (Castro et al., 1988) y que daña la cutícula y la epidermis en las hojas (Al-Mousavi et al., 1983). En esta condición, se reduciría el ingreso de agua por las raíces y las hojas perderían agua. Sin embargo, es posible que respuestas fisiológicas y metabólicas inducidas por el estrés hídrico provocado en las plantas, incluyendo incremento en niveles de ácido abscísico (ABA), cierre de estomas e incremento de osmolaridad celular, sean afectados por la infestación, explicando los cambios en el estado hídrico de la cebada infestada por áfidos.

El incremento transitorio hasta las 72 h en los niveles de ABA determinado en plantas de cebada infestadas, probablemente sea debido a inducción en la síntesis de esta hormona (Zeevaart, 1980). El mecanismo de biosíntesis de ABA dependiente de estrés aún no está claro. Sin embargo, se ha postulado que la inducción es gatillada por pérdida de turgencia en las hojas (Raschke, 1982) o por reducción en el volumen celular (Ackerson y Radin, 1983). Evidencias aportadas del estudio de la biosíntesis de ABA indican que esta hormona es sintetizada utilizando como precursores a las xantofilas (Zeevaart et al.,

1991). En mutantes de maíz (*Zea mays*), en los que la lesión génica afecta los pasos iniciales de la biosíntesis de carotenoides dentro del cloroplasto, hay una importante reducción en los niveles de ABA (Moore y Smith, 1985). La caída en los contenidos de ABA en la cebada a 96 h de infestar las plantas con *S. graminum*, podría explicarse por disminución en los niveles de precursores (carotenoides) en la hoja, con efectos negativos en la síntesis de la hormona.

El cierre de los estomas se inicia por redistribución del ABA almacenado desde cloroplastos del mesófilo a el apoplasto (Cornish y Zeevaart, 1985), proceso que depende de los gradientes de pH dentro de la hoja, las propiedades de ácido-debil de la molécula de ABA y de las propiedades de permeabilidad de la membrana celular. Una probable explicación para el cambio en la resistencia estomática de las plantas de cebada bajo infestación podría ser por alteración de la distribución subcelular y el metabolismo del ABA en el mesofilo durante las horas de luz, que impediría el acceso de esta hormona a los sitios de acción en las células de guarda de la epidermis (Trejo et al., 1993). Además, se ha postulado en investigaciones recientes que cambios en las relaciones hídricas (potencial hídrico) a nivel de la epidermis, podrían estar actuando como moduladores de la respuesta de los estomas frente al incremento de ABA (Tardieu y Davies, 1992). En hojas que permanecieron con áfidos bajo 96 h de infestación, la resistencia de los estomas al vapor de agua es mínima (cerca a 0 s/cm) y la clorosis en estas plantas provocada por la infestación da cuenta del daño en los cloroplastos del mesófilo, organelo postulado como sitio de síntesis y almacenamiento de ABA. Este deterioro de los cloroplastos podría explicar los niveles bajos de ABA encontrados para estas plantas a las 96 h de infestación.

Así, los pesos frescos inferiores, los potenciales hídricos bajos y los contenidos relativos de agua menores en la cebada bajo infestación por *S. graminum*, serían consecuencias de una alteración en la resistencia estomática en las plantas en las horas de luz. En esta tesis los resultados de los experimentos con plantas bajo daño mecánico sugieren que factores postulados por Riedell (1989) en trigo bajo infestación -como el daño causado en la cutícula y en la epidermis de las hojas- no serían determinantes en los cambios del estado hídrico de la cebada bajo infestación. En relación a la respuesta en el patrón de conductancia de plantas de cebada bajo sequía (entre las 12 a 60 h), podría estar relacionada con lo sugerido en que una

"señal de ABA" en el xilema en plantas bajo estrés hídrico, podría proveer a la planta con un mecanismo de medición del estado hídrico del suelo en la zona radical (Tardieu y Davies, 1992).

El incremento de la actividad y cambios en la expresión de isoenzimas de α -amilasas en hojas de cebada bajo estrés hídrico (Jacobsen et al., 1986) unido a la estimulación de la conversión de almidón a sacarosa a tiempos cortos de estrés hídrico (Fox y Geiger, 1985) es en parte una explicación probable para el incremento temprano de azúcares solubles -en particular de los monosacáridos glucosa y fructosa- en plantas bajo infestación. Además, los cambios determinados en la proporción de estos azúcares y sacarosa en las hojas, podría estar relacionado con ambos procesos para incrementar el potencial osmótico celular, facilitando así la retención de agua en el tejido. Sin embargo, a mayor nivel y tiempo de infestación, la menor proporción de sacarosa en relación con estos monosacáridos es contradictoria con antecedentes descritos para otras especies diferentes a cebada, que muestran baja en los niveles de almidón así como igual o incremento en el nivel de sacarosa en las hojas de plantas bajo sequía (Quick et al., 1992). La mayor actividad de enzimas -invertasa y sacarosa sintasa- que degradan sacarosa a fructosa y glucosa, podría incrementar los niveles de estos monosacáridos en las plantas infestadas, como ocurre en hojas de cebada infectadas con *E. graminis* f. sp. hordei, en que el efecto del patógeno sobre la actividad invertasa, incrementó la hidrólisis de sacarosa a glucosa y fructosa (Scholes et al., 1993). Además, estos autores sugieren junto a Wright (1992) que en la medida que progresa la infección, habría una inhibición de las tasas de fotosíntesis, como resultado de la pérdida de actividad y/o la cantidad de enzimas fotosintéticas del ciclo de Calvin (Scholes, 1992). Con respecto a esto, es válido esperar que la inhibición en fotosíntesis causada por el estrés hídrico en las plantas bajo infestación, sea determinante en que menos sacarosa esté siendo producida en términos absolutos.

Prolina es un soluto compatible acumulado en las hojas en respuesta a varios tipos de estrés ambiental y su inducción es común durante el ajuste osmótico en varias especies. Se ha descrito la acumulación de prolina en las hojas de cebada tratadas con PEG (Riazi et al., 1985) o solamente con ABA o en combinación con sales como NaCl o KCl (Pesci, 1988). La señal que altera los niveles celulares de prolina, no se debe simplemente a un cambio de turgencia celular, estando asociado además, con procesos

relacionados al potencial osmótico de la célula (Hanson y Hitz, 1982) y cambios de pH citoplasmáticos (Pesci y Beffagna, 1985). Correlaciones entre la acumulación de prolina y ABA han sugerido que ambos eventos podrían estar enlazados en la respuesta adaptativa de la cebada ante el estrés hídrico (Stewart y Voetberg, 1985).

En plantas de cebada la acumulación tanto de ABA como de prolina fueron eventos determinados por la infestación por *S. graminum*, aunque la manera como estos podrían estar relacionados no es clara. A pesar de la disminución en los contenidos de ABA, en infestaciones prolongadas, los niveles de prolina permanecen altos. Esto sugiere que la acumulación de prolina en cebada no sería dependiente sólo de los niveles de ABA, dando alternativa a otros mecanismos postulados que estarían involucrados en su acumulación. Evidencias para que la acumulación de prolina en cebada se deba a disminución en la tasa de oxidación se basan en la inhibición de la oxidación de prolina en hojas de cebada bajo sequía (Stewart et al., 1977), así como la inhibición de las tasas de oxidación de prolina en mitocondrias aisladas de plantas de *Zea mays* sometidas a estrés hídrico (Sells y Koeppel, 1981), causado por una caída en la actividad de la primera enzima en la vía de oxidación de prolina, prolina deshidrogenasa (PDH), en respuesta al estrés (Rayapati y Stewart, 1991). Sin embargo, la caracterización del efecto del estrés hídrico y tratamientos de ABA exógeno en la actividad de PDH en maíz, ha permitido concluir que ABA no sería parte, al menos, de la vía que conecta la disminución en la actividad de PDH y el estrés por sequía (Dallmier y Stewart, 1992). Esto podría explicar los altos niveles de prolina que permanecen en las hojas de cebada infestada, a pesar de la reducción de metabolitos postulados importantes (e.g. ABA) en su acumulación en la planta.

Debido a que las hojas de cebada en infestaciones prolongadas tienen bajos niveles de carbohidratos solubles, es factible que la infestación por *S. graminum* afecte la capacidad de las plantas para ajustarse osmóticamente ante el estrés hídrico provocado. Las implicaciones metabólicas de reducidas tasas fotosintéticas causadas por la infestación con *S. graminum*, podrían afectar los factores que gobiernan la partición de productos de fotosíntesis entre carbohidratos y aminoácidos (Winter et al., 1992). La asimilación de CO₂ durante el estrés hídrico es importante para la acumulación de prolina (Joyce et al., 1992). Las plantas de cebada sometidas a un periodo de 48 h de oscuridad, fueron incapaces en convertir

glutamato a prolina durante estrés por sequía, indicando que los carbohidratos en las hojas, juegan un rol importante en la acumulación de este aminoácido (Stewart, 1981). El bajo nivel de carbohidratos en plantas de cebada después de varios días de infestación podría limitar el flujo de carbono para la síntesis de prolina. Incluso, debido a que los áfidos remueven azúcares y compuestos que contienen nitrógeno, podrían reducir la cantidad de nitrógeno disponible para la síntesis de prolina y esto pueden ser evidencias para explicar porque las plantas de cebada infestadas con *S. graminum*, acumulan menos prolina (11 veces comparado con 14) en respuesta al estrés hídrico provocado que plantas con similar reducción en el potencial hídrico sin infestación.

En plantas de cebada infestadas por *S. graminum* los niveles de clorofila disminuyen mientras que los niveles de prolina se incrementaron. Estos cambios también se determinaron en plantas de cebada sometidas a sequía. Los altos niveles de prolina sugieren que este aminoácido (como un compuesto de depósito) tenga relación en la formación de clorofila después de la cesación del estrés hídrico, como ha sido postulado en trigo bajo este tipo de estrés (Bengston et al., 1978). El ácido glutámico es un precursor tanto para clorofila (Beale, 1991) como para la síntesis de prolina (Thompson, 1980) y experimentos en cotiledones de rábano para demostrar el enlace entre la síntesis de ambos compuestos, indican que se compite por el glutamato como precursor común (Le Dily et al., 1993).

La infestación de la cebada por *S. graminum* afecta el estado hídrico de la planta (Cabrera et al., 1994). Los mecanismos inducidos temporalmente (metabólicos y fisiológicos) ante el estrés hídrico provocado, como el incremento de los niveles de ABA, de solutos osmóticos (monosacáridos solubles y prolina) y cambios en la fisiología de los estomas, son importantes respuestas en la cebada ante la infestación. La disminución en los pesos frescos y en los contenidos relativos de agua de las plantas infestadas, sugiere que ante el estrés hídrico provocado por el áfido *S. graminum*, estos mecanismos en la cebada son afectados e insuficientes después de varios días de infestación, en prevenir la pérdida de agua de la planta. Este desbalance del exceso de pérdida de agua en relación al ingreso de ella por las raíces, da cuenta de la disminución del contenido de agua en las plantas de cebada.

Fotosíntesis y metabolitos importantes en el metabolismo del carbono en la cebada que son afectados por la infestación con *Schizaphis graminum*

Generalmente, la disminución de la fotosíntesis es relacionada con una reducción en la conductancia estomática (Farquhar y Sharkey, 1982). En esta investigación se halló que plantas de cebada infestadas con el áfido *S. graminum*, tienen niveles de asimilación de dióxido de carbono inferiores a los niveles determinados en plantas control sin infestar. Sin embargo, a pesar de mostrar cambios en el patrón de resistencia estomática, no presentaron niveles inferiores de conductancia al vapor de agua en las horas de luz. En trigo, está descrito que *S. graminum* induce una disminución en la asimilación de CO₂ por reducción en la capacidad fotosintética en el mesófilo, mucho más que por una inferior conductancia estomática al vapor de agua (Ryan et al., 1987). Los análisis de los componentes de conductancia al CO₂ en los estomas y en el mesófilo, sugieren que cada vez es menos importante para las tasas de asimilación la conductancia a nivel de los estomas y más importantes las limitaciones en el mesófilo, cuando hay incrementos de los niveles de estrés hídrico al que se encuentre la planta (Cornic et al., 1989). Así, las tasas de asimilación de CO₂ son afectadas y responden a variaciones pequeñas en el estado hídrico general de la hoja y parte de esta disminución se atribuye a efectos no estomáticos (como sería lo descrito en trigo y se sugiere de los resultados en esta tesis en cebada) a nivel del cloroplasto, presentándose el transporte de electrones y la fosforilación como los mayores blancos de la inhibición (Kaiser, 1987).

Estudios en plantas superiores sugieren que frente al estrés hídrico se presentan efectos directos sobre procesos metabólicos más importantes que los causados por el cierre de los estomas. Bajo estrés hídrico, la respiración se incrementa en proporción de la fotosíntesis bruta y la fotosíntesis neta. Las implicaciones en la fotosíntesis neta del estrés hídrico provocado en la cebada por la infestación de *S. graminum*, podría incluir efectos tanto sobre la fotosíntesis bruta como también en la producción de CO₂ liberado por procesos respiratorios (fotorespiración y respiración mitocondrial) en la luz (Lawlor, 1983). Además, mediciones de los productos de captura de energía y transporte de electrones en los tilacoides (NADPH y ATP) requeridos para la regeneración de ribulosa 1,5-bifosfato (RuBP) y para la síntesis de azúcares,

sugieren que como consecuencia del estrés hídrico resultaría una disminución del contenido de intermediarios del ciclo de Calvin en los tejidos fotosintéticos en las plantas (Stuhlfauth et al., 1991).

La inhibición de la síntesis proteica es una respuesta inicial a una variedad de estrés ambiental, incluyendo sequía. Está claro que dependiente del tipo de estrés, se presenta la inducción de la expresión de genes específicos y la síntesis de "proteínas-inducidas por estrés" (Ho y Sachs, 1989). En cebada la modificación de la expresión génica inducida por ABA ha sustentado la hipótesis de que esta hormona es clave en la respuesta frente a la sequía, debido a que la aplicación de ABA exógeno, induce la expresión de la mayoría de genes inducidos por estrés hídrico (Grossi et al., 1992). Los niveles de proteínas solubles son afectados en cebada por la infestación de *S. graminum*. Esto podría estar determinado por el efecto del estrés hídrico inducido en la cebada por la infestación, sobre la tasa de síntesis y la tasa de recambio de las proteínas en la hoja. Los efectos directos de la sequía sobre el recambio de las proteínas, podría llevar a perder cerca del 40-60% de las proteínas foliares en las plantas bajo estrés hídrico (Hanson y Hitz, 1982). El estrés hídrico afecta la síntesis y la actividad de la ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), enzima que puede constituir cerca del 50% de las proteínas foliares solubles (Lawlor et al., 1989). Los efectos negativos sobre los niveles y posiblemente la menor actividad de algunas proteínas solubles en cebada producidos por la infestación, contrastan con el efecto positivo sobre la fotosíntesis de otro tipo de estrés. Los cambios en la actividad de algunas enzimas del metabolismo del carbono (sedoheptulosa 1,7-bifosfatasa en el estroma y fructosa 1,6-bifosfatasa en el citosol) son considerados parte de factores descritos en incrementar la capacidad fotosintética en las hojas durante la aclimatación de plantas a bajas temperaturas, como son incremento en los niveles de proteínas solubles, en tasa de transporte de electrones y la mayor actividad de enzimas como la Rubisco y fructosa 1,6-bifosfatasa en el estroma (Holaday et al., 1992).

Diferentes especies de áfidos presentan en la saliva celulasas, lipasas y enzimas proteolíticas que (unidas a pectinasas y poligalacturonasas) son inyectadas por los áfidos en los tejidos de la hoja durante su alimentación. La presencia de estas enzimas en la saliva de algunas especies de áfidos ha sido postulada como el principal factor causante de daño foliar en plantas infestadas. Se ha descrito para la saliva de *S.*

graminum la presencia de pectinasas y poligalacturonasas (Runlin et al., 1991). La reducción en los niveles de clorofila en la cebada infestada, estaría relacionado con la destrucción de la estructura y función de organelos en el mesófilo, tal como ha sido descrito para esta y otras especies de áfidos. Al-Mousawi et al. (1983) en un estudio ultraestructural del daño causado por la actividad alimentaria de *S. graminum* en cultivares susceptibles y resistentes de trigo, describe que los cloroplastos son los organelos que primero son afectados en las zonas infestadas de la hoja. En trigo y otros cereales, el daño foliar causado por el áfido *Diuraphis noxia*, determinado también por un estudio ultraestructural de los grana (estructura funcional del cloroplasto por apilamiento de las membranas tilacoides) mostró un severo deterioro dentro de los primeros 5 días de infestación (Fouché et al., 1984). Así mismo, el daño ocasionado en células del mesófilo y en los cloroplastos en plantas de trigo por el áfido *Metopolophium dirhodum* (Brzezina et al., 1986) es discutida en relación al efecto negativo en el proceso fotosintético. Estos eventos de daño relacionados con la actividad alimentaria de *S. graminum* conduciría a alteraciones importantes de la actividad fotosintética en las células de la cebada afectadas, reduciendo así la capacidad en los tejidos de la planta para la asimilación de carbohidratos.

La pérdida de clorofila y la disminución en los niveles de proteínas en plantas de cebada infestadas por *S. graminum*, están dentro de las manifestaciones propias (además de otros procesos) de senescencia en las hojas. Se ha sugerido que una disminución en la actividad del cloroplasto, provocada por la disrupción de su estructura, serían eventos primarios de la senescencia foliar. Además, la senescencia de las hojas es caracterizada por la degradación de los componentes de la pared celular y de la membrana, lo que llevaría a una pérdida de la estructura del tejido y de la compartimentalización celular (Noodén y Leopold, 1988). Es posible que producto de la infestación por *S. graminum*, se gatillen en las plantas de cebada los mecanismos de senescencia, donde el etileno ha sido identificado como el factor más importante dentro de las hormonas vegetales y reguladores del crecimiento.

Así, serían varias las causas de la reducción de las tasas de fotosíntesis en plantas de cebada infestadas por *S. graminum*. La disminución de los potenciales hídricos en las hojas de cebada, podría estar afectando las tasas de asimilación a nivel del mesofilo, inhibiendo procesos como el transporte de electrones y la

fosforilación. Esto tendría consecuencias en los niveles en la célula de poder reductor, afectando los niveles de intermediarios del ciclo de Calvin. Consecuencia del estrés hídrico habrían mayores tasas respiratorias en la planta bajo infestación. Reducciones en los niveles de clorofila y proteínas solubles (Rubisco) explicarían alteraciones directas en las tasas de fotosíntesis. Es posible que la infestación acelere la senescencia foliar y que el deterioro de las hojas sea parte de este proceso gatillado en la cebada por el daño provocado por los áfidos.

Inducción de enzimas y cambios en los niveles de ácido ferúlico en cebada por la infestación con *Schizaphis graminum*.

La inducción de la actividad peroxidasa en plantas de cebada por la infestación con el áfido *S. graminum*, está relacionada con los niveles de infestación inicial al que está sometida la planta, tal como ha sido discutido para otras respuestas fisiológicas y metabólicas. La inducción en la actividad de estas enzimas en cebada por infestación de áfidos no ha sido descrita anteriormente. La "inducción" de los 3 grupos de bandas en los extractos de proteínas de plantas infestadas por *S. graminum*, está referida a un aumento en la tinción por actividad de peroxidasas aniónicas, pero se desconoce a que nivel molecular de regulación está el control de esta actividad mayor en las plantas de cebada infestadas (incremento de la síntesis o de la actividad de proteínas ya sintetizadas). El incremento de esta actividad en plantas infectadas por el patógeno *E. graminis* es consecuencia del incremento de dos isoenzimas con valores de pI de 8.5 y 5.2 de al menos seis isoenzimas de peroxidasas extracelulares en cebada (Kerby y Somerville, 1989). Se desconoce si la expresión de estas peroxidasas en cebada son producto de la inducción de diferentes genes o son el resultado de modificaciones postraduccionales (por ejemplo, por diferentes niveles de glicosilación) de una proteína. Esto podría dar cuenta y explicar en los resultados obtenidos que una enzima presente diferentes posiciones (movilidades relativas) en el gel.

La acumulación de peroxidasas aniónicas en tejidos de cotiledón de soya, en respuesta a un "inductor", un glucano de la pared celular del hongo *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea* (Graham y Graham, 1991) indica que una posible señal de la infección por patógenos para la planta, que podría activar esta

respuesta, podrían ser componentes estructurales de origen fúngico (fragmentos de la pared celular), producto de la actividad de enzimas (pectinasas) descritos como potentes inductores. Las pectinasas están entre las primeras enzimas hidrolíticas producidas por patógenos microbianos de plantas durante los pasos iniciales conducentes a la infección del tejido. Evidencias en *Ricinus communis*, indican que la actividad inductora de una endopoligalacturonasa del hongo *Rhizophus stolonifer* es consecuencia de la liberación por esta enzima de fragmentos pécticos de la pared celular vegetal, que actúan como inductores primarios de la producción de fitoalexinas, en respuesta a la infección. Conclusiones similares han sido descritas para la bacteria *Erwinia carotovora* en soya y otras especies (Lamb et al., 1989). Debido a la presencia de pectinasas y poligalacturonasas en la saliva de *S. graminum* (Runlin et al., 1991) es posible que la inducción de la actividad peroxidasa en plantas de cebada sea una respuesta defensiva gatillada por fragmentos de la pared vegetal liberados por las enzimas del áfido.

En cebada, una de las respuestas descritas frente a daño artificial y al ataque por *E. graminis* f.sp. hordei, es un proceso de reparación consistente en deposición de agregados citoplasmáticos en la pared celular en los sitios de daño o de penetración del patógeno (Russo y Bushnell, 1989). Los cambios en la actividad peroxidasa determinados en plantas de cebada infestadas, sugieren que estas enzimas podrían tener roles funcionales específicos (lo que ha sido propuesto frente a patógenos), en depositar compuestos similares a lignina en los sitios de daño. La actividad peroxidasa inducida por áfidos podría estar relacionada con la insolubilización de compuestos fenólicos en la pared ante el daño en respuesta al ataque por *S. graminum*. A pesar de no desarrollar en esta tesis experimentos conducentes a validar esta hipótesis, el incremento del ácido ferúlico en plantas infestadas, uno de los componentes de la pared celular en cebada y en trigo (Smart y O'Brien, 1979), podría estar relacionado entre otros aspectos, con la deposición de compuestos fenólicos en la pared, como una importante respuesta en la cebada ante el daño por infestación.

Las bases bioquímicas para la resistencia de la cebada frente a los áfidos compromete factores diversos en la planta, como son defensas morfológicas y diferentes compuestos naturales (Corcuera, 1993). Las plantas de cebada infestadas por *S. graminum* no presentan cambios en los niveles de fenoles totales. Sin embargo, el incremento en las hojas de ácido ferúlico y el efecto deletéreo sobre los áfidos que este

compuesto presentó en dietas artificiales a concentraciones similares a las determinadas en la planta, indica que además de lo planteado en relación a la pared celular, podría estar involucrado en la protección (resistencia) de la cebada frente a los áfidos. Leszczynski et al., (1985) ha descrito que el metabolismo y el contenido de compuestos fenólicos en cultivares resistentes y susceptibles de trigo son afectados por la infestación de *R. padi*. Los incrementos de la actividad de dos enzimas claves en la biosíntesis de fenoles, fenilalanina amonio liasa (PAL) y tirosina amonio liasa (TAL) se correlacionaron con este mayor contenido de compuestos fenólicos bajo infestación por *R. padi*. Cambios en el contenido de fenilalanina y tirosina en estos cultivares bajo infestación por *Sitobion avenae* están relacionados con el incremento de actividad de estas enzimas (Ciepiella, 1989). En cebada, está descrita la mayor actividad de PAL por infección de *Puccinia hordei*, aunque no se hallaron cambios en el contenido de compuestos fenólicos (Harms y Terbea, 1984). La mayor actividad de PAL en plantas infestadas por áfidos, podría estar relacionada con la síntesis de compuestos deletéreos en la biología de los insectos. En esta tesis se determino la rápida inducción de esta enzima en las primeras 24 h de infestación en plantas infestadas con *S. graminum*, lo que está dentro de los tiempos descritos de su inducción por el ataque de patógenos. El efecto que compuestos fenolicos presentes en cuatro cultivares de trigo causaron en la alimentación del áfido *Rhopalosiphum padi*, sugiere que los niveles de estos compuestos en la planta podrían estar asociados al proceso de selección del hospedante por los áfidos y que los dihidroxifenoles (e.g. ácidos ferúlico, cafeico y pirocatecol) serian particularmente tóxicos para los áfidos de los cereales (Leszczynski et al., 1985). Entre otros, los fenoles como compuestos naturales en cebada podrían estar relacionados de alguna manera con el grado de resistencia frente a los áfidos. Kanehisa et al., (1987) evaluó el efecto sobre *S. graminum* de compuestos hallados en hojas de diferentes cultivares de cebada en experimentos con dietas artificiales. Los ácidos fenólicos (ferúlico, siríngico, vanílico, clorogénico y 3, 5-cinnámico) presentaron importantes efectos en los áfidos, disminuyendo la sobrevivencia de ellos. En esta tesis, los efectos del ácido ferúlico en los ensayos con dietas artificiales en la sobrevivencia de *S. graminum*, sugieren que la inducción de este compuesto en la cebada, podría afectar -además de otros factores discutidos- la biología de los áfidos en las plantas. Es probable que al menos parte de los efectos deletéreos determinados

en las tasas de ganancia de peso y desarrollo de *S. graminum* en plantas preinfestadas, pueda deberse a la acumulación de ácido férulico y a la presencia en cebada de otros compuestos fenólicos no determinados en esta investigación.

Han sido descritos incrementos en el contenido de ácidos hidroxámicos en plantas de maíz inducido por áfidos (Niemeyer et al., 1989) por heridas causadas por lepidópteros (Gutiérrez et al., 1988) o por heridas causadas por daño artificial (Morse et al., 1991a). Dos tipos distintos de daño foliar en maíz (cortes finos con remoción de tejido o por destrucción mecánica sin retirarlo) afectaron diferencialmente la sobrevivencia y la tasa de crecimiento del áfido *R. padi* en las hojas (Morse et al., 1991b). Las causas de este efecto no son fáciles de señalar, lo que podría explicarse por cambios en algunos nutrientes, como el balance de aminoácidos en la planta (Ciepiella, 1989) o incremento en la concentración de compuestos tóxicos, como fenoles o ácidos hidroxámicos (Thackray et al., 1988). En esta tesis, las tasas de crecimiento y desarrollo de ninfas de *S. graminum* colocadas en plantas de cebada sometidas a daño no fueron diferentes a las tasas de ninfas que se alimentan en plantas control. Debido a que ambos parámetros fueron afectados significativamente en las ninfas en plantas sometidas previamente a infestación, es probable que el efecto sobre la biología de los áfidos de estos tratamientos en las plantas, se deba a diferencias en la respuesta en la cebada de los cambios provocados frente al daño artificial y frente al áfido *S. graminum*. Sin embargo, el deterioro general del metabolismo en la cebada, así como los bajos niveles de azúcares y proteínas solubles encontrados en plantas infestadas podrían ser importantes factores nutricionales que afectarían y explicarían . . . las bajas tasas de desarrollo de los áfidos en estas plantas. Estudios adicionales sobre la nutrición de los áfidos en dietas artificiales donde los niveles de sus constituyentes puedan ser cambiados independientemente podrían ser especialmente valiosos para establecer una mejor comprensión sobre el papel de estos metabolitos en relación al estrés provocado en la planta por los áfidos y el desarrollo de los insectos.

Contrario a las observaciones con dietas artificiales, la acumulación de glicina-betaina y prolina en las hojas no afecta el comportamiento de alimentación del áfido en plántulas de cebada bajo estrés hídrico (Zúñiga et al., 1989). En plantas de trigo crecidas hidropónicamente, los adultos de *S. graminum*

mostraron una caída en la longevidad y en la fecundidad cuando los niveles de estrés hídrico alcanzan un nivel importante (por disminución del potencial osmótico al agregar polietilenglicol al medio) con el potencial hídrico del medio de -0.75 MPa o inferior (Summer, 1983). A pesar de la posible influencia de la osmoregulación, en las células del floema, el potencial de presión disminuye a cero bajo estrés hídrico severo. El efecto directo de un bajo potencial de presión probablemente sea muy importante para los áfidos o insectos "chupadores", debido a que la presión hidrostática es considerada determinante en el esfuerzo físico necesario para obtener alimento (Holtzer et al., 1988). *Schizaphis graminum* se alimenta preferencialmente desde los tejidos vasculares en sorgo (Campbell, 1982) y del floema en cebada (Zúñiga et al., 1989) y se acepta que la mayor fuente de alimento para los áfidos es la savia del floema. Es probable que las ninfas de *S. graminum* que se desarrollaron en plantas infestadas o bajo sequía tengan incluso baja ingestión de savia del floema como resultado de los bajos potenciales hídricos en las hojas, afectando la cantidad de nutrientes ingeridos.

De acuerdo a los objetivos y resultados que han sido discutidos en esta tesis, se puede concluir que:

- I.- Las plantas de cebada infestadas por el áfido *S. graminum*, presentan síntomas de déficit hídrico. La acumulación de solutos, el incremento transitorio de ABA y los cambios en el patrón de resistencia de los estomas estarían relacionados con procesos metabólicos y fisiológicos de adaptación en la planta ante el déficit de agua provocado por los áfidos.
- II.- Después de varios días de infestación la disminución del peso fresco, de los contenidos relativos de agua y de los potenciales hídricos en las hojas de cebada, sugiere que las respuestas fisiológicas y metabólicas de adaptación ante el estrés hídrico provocado, son afectadas por los áfidos e insuficientes en prevenir la pérdida de agua de la planta.
- III.- Las plantas de cebada con altos niveles de infestación por *S. graminum*, presentan después de varios días, niveles inferiores de azúcares solubles, de proteínas solubles, de clorofila total y bajas tasas fotosintéticas. Los resultados en esta tesis sugieren que algunos de estos cambios podrían estar relacionados directamente con el daño foliar causado por los áfidos. Sin embargo, parte de estos cambios podrían ser el resultado del déficit hídrico provocado en las plantas por la infestación.

IV.- El incremento de la actividad de las enzimas PAL y peroxidasas, podría estar relacionado con procesos defensivos en la cebada bajo infestación. La reparación de paredes celulares dañadas por insolubilización de compuestos fenólicos similares a precursores de lignina, podría ser parte de una importante respuesta ante la infestación. Es necesario la caracterización de este mecanismo inducido por los áfidos, como ya ha sido descrito frente a patógenos.

V.- Las tasas promedio de crecimiento relativo y desarrollo de los áfidos, refleja en los insectos los cambios que ocurren en las plantas bajo infestación. Bajos niveles de azúcares solubles, de proteínas solubles y de sacarosa hallados en plantas infestadas pueden ser importantes factores nutricionales que afectan el desarrollo de los áfidos. Sin embargo, los efectos que sobre los áfidos podrían tener cambios producidos en las plantas, podrían explicarse por la acumulación de compuestos, deletéreos para la biología de estos insectos.

Los resultados apoyan la hipótesis propuesta en esta investigación y por lo tanto, sugieren que algunas de las respuestas metabólicas y fisiológicas en la cebada por la infestación por el áfido *Schizaphis graminum* R. serían consecuencia directa del daño foliar (clorosis, tasas fotosintéticas bajas, bajos niveles de ABA y pérdida de la regulación estomática) causado en los tejidos por la actividad alimentaria y enzimas presentes en la saliva de los áfidos. A pesar de esto, son inducidas en la cebada respuestas adaptativas frente al déficit hídrico provocado por la infestación, similares a las que presentan las plantas bajo sequía (acumulación de solutos y de ABA). Otras respuestas, de carácter defensivo ante los áfidos similares a las que presentan plantas bajo estrés biótico (inducción de enzimas como PAL y peroxidasas), estarían probablemente involucradas en la síntesis de compuestos tóxicos deletéreos para los insectos y en procesos de reparación como de reforzamiento de los tejidos dañados. Algunos cambios metabólicos provocados en la cebada por la infestación (acumulación de ácido ferúlico y la baja en azúcares y proteínas solubles) podrían ser tóxicos para los áfidos, o al menos, deletéreos para el desarrollo de estos insectos.

Bibliografía

- Ackerson, R. C. y Radin, J. W. (1983) Abscisic acid accumulation in cotton leaves in response to dehydration at high pressure. *Plant Physiol.* 71, 432-433.
- Adams, J. B. y Van Emden, H. H. (1972) The biological properties of aphids. En: *Aphid Tecnology*. Van Emden, H. F. (ed). Academic Press, London. pp. 88-89
- Aist, J. R. y Israel, H. W. (1986) Autofluorescent and ultraviolet-absorbing components in cell wall and papillae of barley coleoptiles and their relationship to disease resistance. *Can. J. Bot.* 64, 266-272
- Al-Mousawi, A. H., Richardson, P. E. y Burton, R. L. (1983). Ultrastructural studies of greenbug (Homoptera: Aphididae) feeding damage to susceptible and resistant wheat cultivars. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 76, 964-971.
- Apel, K., Bohlmann, H. y Reimann-Philipp, U. (1990) Leaf thionins, a novel class of putative defence factors. *Physiol. Plant.* 80, 315-321
- Argandoña, V. H., Luza, J. G., Niemeyer, H. M. y Corcuera, L. J. (1980) Role of hydroxamic acids in the resistance of cereals to aphids. *Phytochemistry* 19, 1665-1668
- Argandoña, V. H., Corcuera, L. J., Niemeyer, H. M. y Campbell, B. C. (1983) Toxicity and feeding deterency of hydroxamic acids from Gramineae in synthetic diets against the greenbug *Schizaphis graminum*. *Ent. exp. appl.* 24, 134-138
- Aspinall, D. (1980) Role of abscisic acid and other hormones in adaptation to water stress. En: *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*. Turner, N. C. y Kramer, P. J. (eds.). John Wiley and Sons, New York. pp. 155-157
- Aspinall, D., y Paleg, L. G. (1981) Proline accumulation: Physiological aspects. En: *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. Paleg L. G. y Aspinall, D. (eds.), Academic Press, Sidney, pp 205-241.
- Ave, D. A., Gregory, P. y Tingey, W. (1987) Aphid repellent sesquiterpenes in glandular trichomes of *Solanum berthaultii* and *S. tuberosum*. *Entomol. exp. appl.* 44, 131-138
- Baldwin, I. T. (1988) Damage induced alkaloids in tobacco: Pot bound plants are not inducible. *Jour. Chem. Ecol.* 14, 1113-1120
- Bates, L., Waldren, R. y Teare, I. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39, 205-207
- Beale, I. S. (1991) Biosynthesis of the tetrapyrrole pigment precursor, -aminolevulinic acid, from glutamate. *Plant Physiol.* 93, 1273-1279
- Beck, D. L., Dunn, G. M., Routley, D. G. y Bowman, J. S. (1983) Biochemical basis of resistance in corn to the corn leaf aphid. *Crop Science* 23, 995-998

- Bengston, C., Klockare, B., Klockare, R., Larsson, S. y Sundquist, C. (1978) The after-effect of water stress on chlorophyll formation during greening and the level of abscisic acid and proline in dark-grown wheat seedlings. *Physiol. Plant.* 43, 205-212
- Blanco, R. L., Adamson, H. Y. y Hales, D. F. (1992) Chlorophyll fluorescence in barley infested with aphids. *Proceedings of the XIX International Congress of Entomology*, p. 167. Beijing, China.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation for microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Brooks, C. J. W. y Watson, D. G. (1985) Phytoalexins. *Nat. Prod. Rep.* 5, 427-459
- Brzezina, A. S., Spiller, N. J. y Llewellyn, M. (1986) Mesophyll cell damage of wheat plants caused by probing of the aphid, *Metopolophium dirhodum*. *Ent. exp. appl.* 42, 195-200
- Cabrera, H. M., Argandoña, V. H. y Corcuera, L. J. (1994). Metabolic changes in barley seedlings at different aphid infestation levels. *Phytochemistry* 35, 317-319
- Campbell, B. C., McLean, D. L., Kinsey, M. G., Jones, K. C. y Dreyer, D. L. (1982) Probing behavior of the greenbug (*Schizaphis graminum* biotype C) on resistant and susceptible varieties of sorghum. *Entomol. exp. appl.* 31, 140-146
- Campbell, B. C. y Dreyer, D. L. (1985) Host-plant resistance of sorghum: differential hydrolysis of pectic substances by polysaccharases of greenbug biotypes (*Schizaphis graminum*. Homoptera: Aphididae). *Arch. Insect Biochem. and Physiol.* 2, 203-215
- Campos, L. (1976) Los pulgones de los cereales. *El Campesino* 107, 38-41
- Cassab, G. I., Lin, J. J., Lin, J. S. y Varner, J. E. (1988) Ethylene effect on extensin and peroxidase distribution in the subapical region of pea epicotyls. *Plant Physiol.* 88, 522-524
- Castro, A. M. y Rumi, C. P. (1987) Greenbug damage on the aerial vegetative growth of two barley cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 27, 263-271
- Castro, A. M., Rumi, C. P. y Arriaga, H. O. (1988) Influence of greenbug on root growth of resistant and susceptible barley genotypes. *Environ. Exp. Bot.* 28, 61-72
- Ciepiella, 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*. *Entomol. exp. appl.* 51, 277-281
- Corcuera, L. J., Queirolo, C. B. y Argandoña, V. H. (1985) Effects of 2-*-D*-glucosyl-4-hydroxy-7-methoxy-1,2-benzoxazin-3-one on *Schizaphis graminum* (Rondani) (Insecta, Aphididae) feeding on artificial diets. *Experimentia* 41, 514-516
- Corcuera, L. J. (1993) Biochemical basis for the resistance of barley to aphids. *Phytochemistry* 33, 741-747

- Cornic, G. Prioul, J. L. y Louason, G. (1983) Stomatal and non-stomatal contribution in the decline in leaf net CO₂ uptake during rapid water stress. *Physiol. Plant.* 58, 295-301
- Cornish, K. y Zeevaart, J.A.D. (1985) Movement of abscisic acid into the apoplast in response to water stress in *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiol.* 78, 623-626.
- Chrispeels, M. J. y Raikhel, N. V. (1991) Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell* 3, 1-9
- Chang, J., Knecht, R. y Braun, D. G. (1982) A complete separation of dimethylaminoazobenzene-sulphonyl-amino acids. *Biochem. J.* 203, 803-806
- Dallmier, K. A. y Stewart, C. R. (1992) Effect of exogenous abscisic acid on proline dehydrogenase activity in maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiol.* 99, 762-764
- Dillwith, J. W. y Berberet, R. C. (1990) Lipids at the aphid-plant interface. En: *Aphid-Plant Genotype Interactions*. Campbell, R. K. y Eikenbary, R. D. (eds.) Elsevier, U. K., pp. 207-223
- Dorschner, K. W., Jhonson, R. C., Eikenbary, R. D. y Ryan, J. D. (1986) Insect-plant interactions: Greenbugs (Homoptera: Aphididae) disrupt acclimation of winter wheat to drought stress. *Environ. Entomol.* 15, 118-121
- Dreyer, D. L. y 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.
- Dreyer, D. L. y Campbell, B. C. (1987) Chemical basis of host-plant resistance to aphids. *Plant Cell Envir.* 10, 353-361
- Eckhardt, A. E., Hayes, C. E. y Goldstein, I. J. (1976) A sensitive fluorescent method for the detection of glycoproteins in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* 73, 192-197
- Farmer, E. E. y Ryan C. A. (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4, 129-134
- Farquhar, G. D. y Sharkey, T. D. (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 317-345.
- Fereres, A., Gutierrez, C., Del Estal, P. y Castañera, P. (1988) Impact of the english grain aphid, *Sitobion avenae* (F.) (Homoptera: Aphididae), on the yield of wheat plants subjected to water deficits. *Environ. Entomol.* 17, 596-602
- Fouché, A., Verhoeven, R. L., Hewitt, P. H., Walter, M. C., Kriel, C. F., y Dejager, J. (1984) Russian aphid (*Diuraphis noxia*) feeding damage on wheat, related cereals and a Bromus grass species. En: *Progress in Russian Wheat Aphid (Diuraphis noxia Mordw.) Research in the Republic of South Africa*. Walters, M. C. (ed.) Tech. Commun. Dep. Agric. Repub. S. Afr. 191, 22-23

- Fox, T. C. y Geiger, D. R. (1985) Osmotic response of sugar beet leaves at CO₂ compensation point. *Plant Physiol.* 80, 239-241
- Fröst, S., Harbone, J. B. y King, L. (1977) Identification of the flavonoids in five chemical races of cultivated barley. *Hereditas* 85, 163-168
- García-Olmedo, F., Salcedo, G., Sanchez-Monge, R., Hernandez-Lucas, C., Carmona, M. J., Lopez-Fando, J. J., Fernandez, J. A., Gomez, L., Royo, J., García-Maroto, F., Castagnaro, A. y Carbonero, P. (1992) Trysin/ α -amylase inhibitors and thionins: Possible defence proteins from barley. En: *Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*. Shewry, P. R. (ed.) CAB International, Wallingford, U. K.
- Gerloff, E. D. y Ortmann, E. E. (1971) Physiological changes in barley induced by greenbug feeding stress. *Crop Sci.* 11, 174-176.
- Girma, F. S. y Krieg, D. R. (1992) Osmotic adjustment in sorghum II. Relationship to gas exchange rates. *Plant Physiol.* 99, 583-588
- Graham, M. Y. y Graham, T. L. (1991) Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea* wall glucan. *Plant Physiol.* 97, 1445-1455
- Grossi, M., Cattivelli, L., Terzi, V. y Stanca, A. M. (1992) Modification of gene expression by ABA, in relation to drought and cold stress in barley shoots. *Plant Physiol. Biochem.* 30, 97-103
- Guenzi, W. D. y McCalla, T. M. (1966) Phenolic acids in oats, wheat, sorghum, and corn residues and their phytotoxicity. *Agron. Jour.* 58, 303-304
- Gutierrez, C., Castañera, P. y Torres, V. (1988) Wound-induced changes in DIMBOA (2,4 dihydroxy-7-methoxy-2H-1, 4 benzoxazin-3(4H)-one) concentration in maize plants caused by *Sesamia nonagroides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. appl. Biol.* 113, 447-454
- Hanson, A. D., Traynor, P. L., Ditz, K. M. y Ricosky, D. A. (1981) Gramine in barley forage-effects of genotype and environment. *Crop Sci.* 21, 726-730
- Hanson, A. D. y Hitz, W. D. (1982) Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 163-203
- Hanson, A. D., Ditz, K. M., Singletary, G. W. y Leland, T. J. (1983) Gramine accumulation in leaves of barley grown under high temperature stress. *Plant Physiol.* 71, 896-904
- Harbone, J. B. (1986) Recent advances in chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.* 4, 323-344
- Harms, H. y Terbea, M. (1984) Metabolism of phenolic compounds in healthy and brown rust-infected barley and wheat varieties. *Phytopath. Z.* 111, 283-288
- Hartung, W., Radin, J. W. y Hendrix, D. L. (1988) Abscisic acid movement into the apoplastic solution of water stressed cotton leaves. Role of apoplastic pH. *Plant Physiol.* 86, 908-913

- Haslam, E. (1986) Secondary metabolism-Fact and fiction. *Nat. Prod. Rep.* 3, 217-249
- Hawkins, C. D. B., Aston, M. J. y Whitecross, M. I. (1987) Short-term effects of aphid feeding on photosynthetic CO₂ exchange and dark respiration in legume leaves. *Physiol. Plant.* 71, 379-383
- Heinrichs, E. A. (1988) Global food production and plant stress. En: *Plant Stress-Insect Interactions*. Heinrichs, E. A. (ed.) John Wiley & Sons, New York
- Hislop, E. C. y Stalman, M. A. (1971) Peroxidase and ethylene production by barley leaves infected with *Erysiphe graminis* f. sp. hordei. *Physiol. Plant Path.* 1, 297-312
- Ho, T. -H. D. y Sachs, M. M. (1989) Stress-induced proteins: Characterization and the regulation of their synthesis. *The Biochemistry of Plants*, Vol 15, Academic press, pp 347-378
- Hofman, J. y Hofmanova, O. (1969) 1,4-Benzoxazin derivatives in plants. Sephadex fractionation and identification of a new glucoside. *Europ. J. Bioche.* 8, 109-112
- Holaday, A. S., Martindale, W., Alred, R., Brooks, A. L. y Leegood, R. C. (1992) Changes in activities of enzymes of carbon metabolism in leaves during exposure of plant to low temperature. *Plant Physiol.* 98, 1105-1114
- Holden, D. W. y Rohringer, R. (1985) Peroxidases and glycosidases in intracellular fluids from noninoculated and rust-affected wheat leaves. *Plant Physiol.* 79, 820-824
- Holtzer, T. O., Archer, T. L. y Norman, J. M. (1988) Host plant suitability in relation to water stress. En: *Plant Stress-Insect Interactions*. Heinrichs, E. A. (ed.) John Wiley & Sons, New York, pp. 111-137
- Horber, E. (1980) Types and classification of resistance. En: *Breeding Plants Resistant to Insects*. Maxwell, F. G. y Jennings, P. R. (eds.). Wiley, New York, pp. 15-21
- Hornberg, C. y Weiler, E. W. (1984) High affinity binding sites for abscisic acid on the plasmalemma of *Vicia faba* guard cells. *Nature* 310, 321-324
- Hsiao, T. C., Acevedo, E., Fereres, E. y Henderson, D. W. (1976) Stress metabolism: water stress, growth, and osmotic adjustment. *Phil. trans. R. Soc. Lond.* 273, 479-500
- Jacobsen, J. V., Hanson, A. D. y Chandler, P. C. (1986) Water stress enhances expression of an α -amylase gene in barley leaves. *Plant Physiol.* 80, 350-359
- Joyce, P. A., Aspinall, D. y Paleg, L. G. (1992) Photosynthesis and the accumulation of proline in response to water deficit. *Aust. J. Plant Physiol.* 19, 249-261
- Kaiser, W. M. (1987) Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiol. Plant.* 71, 142-149.
- Kanehisa, K., Tsumuki, H., Shiraga, T. y Kawada, K. (1987) Characters of barley resistance to cereal aphids. (3) A surveying method for substances responsible for the resistance to aphids by artificial rearing. *Nogaku Kenkyu* 61, 161-170

- Kanehisa, K., Tsumuki, H., Kawada, K. y Rustamani, M. A. (1990) Relations of gramine contents and aphid populations on barley lines. *Appl. Ent. Zool.* 25, 251-259
- Kerby, K. y Somerville, S. C. (1989) Enhancement of specific intercellular peroxidases following inoculation of barley with *Erysiphe graminis* f. sp. hordei. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35, 323-337
- Klingauf, F. K., Nocker-Wenzel, K. y Rottger, U. (1978) Die Rolle peripherer Pflanzenwache für den Befall durch phytophage Insekten. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheit und Pflanzenschutz* 85, 228-237
- Kragh, K. M., Jacobsen, S. y Mikkelsen, J. D. (1990) Induction, purification and characterization of barley leaf chitinase. *Plant Science* 71, 55-68
- Kramer, P. J. (1983) *Water relations of plants*. Academic Press, New York
- Labanauskas, C. K., Schouse, P., Stolzy, L. H. y Handy, M. F. (1981) Protein and free aminoacids in field-grown cowpea seeds as affected by water stress at various growth stages. *Plant and Soil* 63, 355-368
- Laemli, U. K. (1970) Clavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lamb, C. J., Lawton, M. A., Dron, M. y Dixon, R. A. (1989) Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56, 215-224
- Lawlor, D. W. (1983) Integration of biochemical processes in the physiology of water-stressed plants. En: *The Effects of Stress on Photosynthesis*. Marcelle, R., Clijsters, H., Van Pousse, M. (eds.) Dr. W. Junk, Publ., The Hague, pp. 35-44.
- Lawlor, D. W., Jimenez, C., Ward, D. y Young, A. (1989) Regulation of photosynthetic carbon metabolism in water stressed sunflower. En: *Techniques and New Developments in Photosynthesis Research*. Barber, J. y Malkin, R. (eds.) Plenum Press, London, 591-595
- Le Dily, F., Billard, J-P., Le Saos, J. y Huault, C. (1993) Effects on NaCl and gabaculine on chlorophyll and proline levels during growth of radish cotyledons. *Plant Physiol. Biochem.* 31, 303-310
- 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). *Z. Ang. Ent.* 100, 343-348
- Leszczynski, B., Warchol, J. y Niraz, S. (1985) The influence of phenolic compounds on the preference of winter wheat cultivars by cereal aphids. *Insect Sci. Applic.* 6, 157-158
- Lichtenthaler, H. K. y Wellburn, A. R. (1983) Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Bioch. Soc. Transact.* 11, 591-592
- Lipp, J. (1991) Detection of ABA and proline in pollen. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 187, 211-216
- Lowe, H. J. B., Murphy, G. J. P. y Parker, M. L. (1985) Non-glaucousness, a probable aphid-resistance character of wheat. *Ann. appl. Biol.* 106, 555-560

- Moore, R. y Smith, J. D. (1985) Gravidresponsiveness and abscisic acid content of *Zea mays* seedlings treated with fluridone. *Planta* 162, 342-344.
- Morse, S., Wratten, S. D., Edwards, P. J. y Niemeyer, H. M. (1991a) Changes in the hydroxamic acid content of maize leaves with time and after artificial damage; implications for insect attack. *Ann. appl. Biol.* 119, 239-249
- 1991b The effect of maize leaf damage on the survival and growth rate of *Rhopalosiphum padi*. *Ann. appl. Biol.* 119, 251-256
- Mullet, J. E. (1988) Chloroplast development and gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 39, 475-502
- Nachtman, F. y Budna, K. W. (1977) Sensitive determination of derivatized carbohydrates by High-Performance-Liquid-Chromatography. *J. Chromato.* 155, 107-110
- Nielsen, B. L. y Brown, L. (1984) The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 141, 311-318
- Niemeyer, H. M. (1988) Hydroxamic acids (4-hydroxy-1, 4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the Gramineae. *Phytochemistry* 27, 3349-3358
- Niemeyer, H. M., Pesel, E., Copaja, S. V., Bravo, H. R., Franke, S. y Francke, W. (1989) Changes in hydroxamic acid levels of wheat plants induced by aphid feeding. *Phytochemistry* 28, 447-449
- Niemeyer, H. M. (1992) Aspectos ecológicos y moleculares de la interacción entre áfidos y sus plantas hospederas. *Revista Chilena de Historia Natural* 65, 103-114
- Noodén, L. D. y Leopold, A. C. (1989) Senescence and aging in plants. Academic Press, New York
- Pesci, P. y Beffagna, N. (1985) Effects of weak acids on proline accumulation. *Plant Cell Environ* 8, 129-133.
- Pesci, P. (1988) Ion fluxes and abscisic acid-induced proline accumulation in barley leaf segments. *Plant Physiol.* 86, 927-930.
- Pimentel, D. (1991) Diversification of biological control strategies in agriculture. *Crop Prot.* 10, 243-253
- Poehlman, J. M. (1985) Adaptation and Distribution. En: Barley. Rasmusson, D. C. (ed.). *Agronomy Monograph No 26*, Am. Soc. Agron., Crop Sci. Soc. Am. y Soil Sci. Soc. Am. Madison, Wisconsin (USA). pp. 1-17
- Quick, W. P., Chaves, M. M., Wendler, R., David, M., Rodrigues, M. L., Passaharinho, J. A., Pereira, J. S., Adcock, M. D., Leegood, R. C. y Stitt, M. (1992) The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant Cell Environ.* 15, 25-35.
- Raschke, K. (1982) Involvement of abscisic acid in the regulation of gas exchange: evidence and inconsistencies. In: *Plant Growth Substances*. P. F. Wareing (ed). Academic Press, London, pp. 581-590.

- Rayapati, P. J. y Stewart, C. R. (1991) Solubilization of a proline dehydrogenase from maize (*Zea mays* L.) mitochondria. *Plant. Physiol.* 95, 787-791.
- Raskin, I. (1992) *Update on signaling*. Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiol.* 99, 799-803
- Riazi, A., Matsuda, K. y Arslan, A. (1985) Water-stress induced changes in concentrations of proline and other solutes in growing regions of young barley leaves. *Jour. Exp. Botany* 36, 1716-1725.
- Riedell, W. E. (1989) Effects of russian wheat aphid infestation on barley plant response to drought stress. *Physiol. Plant.* 77, 587-592
- Rhodes, D. (1987) Metabolic responses to stress. En: *The Biochemistry of Plants*, Vol 12, David, D. D. (ed.). Academic Press, New York, pp 201-233.
- Runlin, Ma., Resse, J. C., Black, W. C. y Bramel-Cox, P. (1991) Detection of plant cell wall-degrading enzymes in greenbug saliva. En: *Proceedings, Aphid-Plant Interactions: Populations to Molecules*. Peters, J. A., Webster, C. S. y Choluler, C. S. (eds.) Oklahoma State University, OK, 335 pp.
- Russo, V. M. y Bushnell, W. R. (1989) Responses of barley cells to puncture microneedles and to attempted penetration by *Erysiphe graminis* f.sp. hordei. *Can. J. Bot.* 67, 2912-2921
- Rustamani, M. A., Kanehisa, K., Tsumuki, H. y Shiraga, T. (1992) Additional observations on aphid densities and gramine contents in barley lines. *Appl. Entomol. Zool.* 27, 152-155
- Ryan, J. D., Johnson, R. C., Eikenbary, R. D. y Dorschner, K. W. (1987) Drought/greenbug interactions: Photosynthesis of greenbug resistant and susceptible wheat. *Crop Sci.* 27, 283-288
- Ryan, C. A. (1990) Protease inhibitors in plants: Genes for improving defences against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 425-449.
- Salas, M. L., Corcuera, L. J. y Argandoña, V. H. (1990) Effect of potassium nitrate on gramine content and resistance of barley against the aphid *Schizaphis graminum*. *Phytochemistry* 29, 3789-3791
- Salas, M. L. y Corcuera, L. J. (1991) Effect of environment on gramine content in barley leaves and susceptibility to the aphid *Schizaphis graminum*. *Phytochemistry* 30, 3237-3240
- Sánchez-Serrano, J. J., Amati, S., Ebneith, M., Hildmann, T., Mertens, R., Peña-Cortés, H., Prat, S. y Willmitzer, L. (1991) The involvement of ABA in wound responses of plants. En: *Abscisic Acid, Physiology and Biochemistry*. Davies, W. J. y Jones, H. G. (eds.). Environmental Plant Biology Series, ios Scientific Publishers. Oxford, U. K., pp.210-216
- Scholander, P. F., Hammel, H. T., Hemingsen, E. S. y Brandstret, E. D. (1964) Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and some other plants. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 52, 119-125
- Scholes, J. D. (1992) Photosynthesis: celular and tissue aspects in diseased leaves. En: *Pests and Pathogens Plant Responses to Foliar Attack*. Ayres, P. G. (ed.). Environmental Plant Biology Series, ios Scientific Publishers, Oxford, U. K., pp. 85-101

- Scholes, J. D., Lee, P. J., Horton, P. y Lewis, D. H. (1993) Invertase: the key to understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. hordei). *New Phytol.* 8, 544-548
- Schweizer, P., Gess, R. y Mösigler, E. (1993) Effect of jasmonic acid on the interaction of barley (*Hordeum vulgare* L.) with the powdery mildew *Erysiphe graminis* f. sp. hordei. *Plant Physiol.* 102, 503-511
- Sells, G. D. y Koeppel, D. E. (1981) Oxidation of proline by mitochondria isolated from water-stressed maize shoots. *Plant Physiol.* 68, 1058-1063
- Showalter, A. M. (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5, 9-23
- Smart, M. G. y O'Brien, T. P. (1979) Observations on the scutellum. III* Ferulic acid is a component of the cell wall in wheat and barley. *Aust. J. Plant Physiol.* 6, 485-491
- Smith, C. M. (1989) What is plant resistance to insects?. En: *Plant Resistance to Insects. A Fundamental Approach.* Smith, C. M. (ed.). John Wiley & Sons, New York.
- Stacey, G., Gresshoff, P. M. y Keen, N. T. (1992) Signal Sensations. Friends and foes: New insights into plant-microbe interactions. *Plant Cell* 4, 1171-1179
- Starks, K. J. y Webster, J. A. (1985) Insects and related pests. En: *Barley.* Rasmusson, D. C. (ed.). Agronomy Monograph No. 26, Am. Soc. Agron., Crop Sci. Soc. Am. y Soil Sci. Soc. Am. Madison, Wisconsin (USA). pp. 335-365
- Staswick, P. E. (1992) *Update on signaling.* Jasmonate, genes, and fragrant signals. *Plant Physiol.* 99, 804-807
- Stewart, C. R., Boggess, S. F., Aspinall, D. y Paleg, L. G. (1977) Inhibition of proline oxidation by water stress. *Plant Physiol.* 59, 930-932
- Stewart, C. R. (1978) The role of carbohydrates in proline accumulation in wilted barley leaves. *Plant Physiol.* 61, 775-778
- Stewart, C. R. y Larher, F. (1980) Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress. En: *The Biochemistry of Plants. Vol 5,* Mifflin, B. J. (ed.). Academic Press, New York. pp. 609-635
- Stewart, C. R. (1981) Proline accumulation: Biochemical Aspects. En: *Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants.* Paleg, L. G. y Aspinall, D. (eds.). Academic Press, Sidney. pp. 206-243
- Stewart, C. R. y Voetberg, G. (1985) Relationship between stress-induced ABA and proline accumulations and ABA-induced proline accumulation in excised barley leaves. *Plant Physiol.* 79, 24-27.
- Stiles, G., Monthei, R. T. y Bull, B. (1970) A diffusive resistance porometer for field use. *Jour. Appl. Ecol.* 7, 617-638

- Stuhlfauth, T., Beckedahl, J. y Fock, H. P. (1991) The response of energy charge, NADPH and free phosphate pools on water stress. *Photosynthetica* 25, 11-15
- Summer, L. C., Need, J. T., McNew, R. W., Dorschner, K. W., Eikenbary, R. D. y Johnson, R. C. (1983) Response of *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae) to drought-stressed wheat, using polyethylene glycol as a matricum. *Environ. Entomol.* 12, 919-922.
- Tardieu, F y Davies, W. J. (1992) Stomatal response to abscisic acid is a function of current plant water status. *Plant Physiol.* 98, 540-545.
- 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, 2da parte. Environmental aspects of applied biology, pp. 225-227
- Thompson, J. F. (1980) Arginine synthesis, proline synthesis and related processes. En *The Biochemistry of Plants*, Vol 5, Mifflin, B. J. (ed.). Academic Press, New York, 375-402
- Todd, G. W., Getahun, A. y Cress, D. C. (1971) Resistance in barley to hte greenbug, *Schizaphis graminum*. 1. Toxicitty of phenolic and flavonoid compounds and related substances. *Ann. Ent. Soc. Am.* 64, 718-722.
- Torres, A. M., Mau-Lastovicka, T. y Rezaaiyan, R. (1987) Total phenolics and High-Performance Liquid Chromatography of phenolic acids of avocado. *J. Agri. Food Chem.* 35, 921-925
- Trejo, C. L, Davies, W. J. y P. Ruiz, Lucero del Mar (1993) Sensitivity of stomata to abscisic acid; An effect of the mesophyll. *Plant Physiol.* 102, 497-502
- Tsumuki, H., Kanehisa, K. y Kawada, K. (1989) Leaf surface wax as a possible resistance factor of barley to cereal aphids. *Appl. Ent. Zool.* 24, 295-301
- Turner, N. C. y Jones, M. M. (1980). Turgor maintenance by osmotic adjustment: A review and evaluation, En: *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*. Tuerner, N. C. y Kramer, P. J. (eds.) Wiley, New York, pp 87-103.
- Vance, C. P., Kirk, T. K., Sherwood, R. T. (1980) Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18, 259-288
- Varanda, E. M., Zúñiga, G. E., Salatino, A., Roque, N. F. y Corcuera, L. J. (1992) Effect of ursolic acid from epicuticular waxes of *Jacaranda decurrens* on *Schizaphis graminum*. *Jour. Nat. Prod.* 55, 800-803
- Weibel, D. E. y Starks, K. J. (1986) Greenbug nonpreference for bloomless sorghum. *Crop Sci.* 26, 1151-1154
- Wildon, D. C., Thain, J. F., Minchin, P. E. H., Gubb, I. R., Reilly, A. J., Skipper, Y. D., Doherty, H. M., O'Donnell, P. J. y Bowles, D. J. (1992) Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* 360, 62-65

- Wilson, R. L., Starks, K. J. y Wood, E. A. (1978) Resistance in four oat lines to two biotypes of the greenbug. *J. Econ. Entomol.* 71, 886-887
- Williams, W. G., Kennedy, G. G., Yamamoto, R. T., Thacker, J. D. y Rordner, J. (1980) 2-Tridecanone, a naturally occurring insecticide from the wild tomato *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum*. *Science* 207, 888-889
- Winter, H., Lohaus, G. y Heldt, H. W. (1992) Phloem transport of amino acids in relation to their cytosolic levels in barley leaves. *Plant Physiol.* 99, 996-1004
- Wright, S. T. C. (1977) The relationship between leaf water potential and the levels of abscisic acid and ethylene in excised wheat leaves. *Planta* 134, 183-189
- Wright, A. J. y Heale, J. B. (1988) Host responses to fungal penetration in *Erisiphe graminis* f. sp. *hordei* infections in barley. *Plant Pathol.* 37, 131-140
- Wright, D. P. (1992) The effect of powdery mildew on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of wheat leaves. Ph. D. tesis, Universidad de Sheffield.
- Zeevaart, J. A. D. (1980) Changes in the levels of abscisic acid and its metabolites in excised leaf blades of *Xanthium strumarium* during and after water stress. *Plant Physiol.* 66, 672-678
- Zeevaart, J.A.D., Rock, C.D., Fantauzzo, F., Heath, T.G. y Gage, D.A. (1991) Metabolism of ABA and its physiological implications. En: *Abscisic Acid: Physiology and Biochemistry*. W. J. Davies y H. G. Jones (eds.). BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, pp 39-52.
- Zerené, M. Z., Caglevic, M. D. y Ramirez, I. A. (1988) Un nuevo áfido de los cereales detectado en Chile. *Agricultura Técnica* 48, 60-61
- Zieslin, N. y Ben-Zaken, R. (1991) Peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase and lignification in peduncles of rose flowers. *Plant Physiol. Biochem.* 29, 147-151
- Zucker, M. (1965) Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiol.* 40, 779-782
- Zúñiga, E. S. (1967) Lista preliminar de áfidos que atacan los cultivos en Chile, sus huéspedes y enemigos naturales. *Agricultura Técnica* 27, 165-167
- Zúñiga, G. E., Salgado, M. S. y Corcuera, L. J. (1985) Role of indole alkaloid in the resistance of barley seedlings to aphids. *Phytochemistry* 24, 945-947
- Zúñiga, G. E., Corcuera, L. J. (1986) Effect of gramine in the resistance of barley seedlings to the aphid *Rhopalosiphum padi*. *Entomol. exp. appl.* 40, 259-262
- Zúñiga, G. E., Varanda, E. M. y Corcuera, L. J. (1988) Effect of gramine on the feeding behavior of the aphids *Schizaphis graminum* and *Rhopalosiphum padi*. *Entomol. exp. appl.* 47, 161-168

Zúñiga, G. E., Argandoña, V. H. y Corcuera, L. J. (1989) Distribution of glycine-betaine and proline in water stressed and unstressed barley leaves. *Phytochemistry* 28, 419-420.