

WCH - FC

MAG - B

Z95

C.1

" PAPEL DE LOS ALCALOIDES INDOLICOS EN LA RESISTENCIA DE LA  
CEBADA A AFIDOS "

Tesis presentada a la Universidad de Chile en  
cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de Magister  
en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

Por

GUSTAVO EMILIO ZUNIGA NAVARRO

MARZO - 1987



Profesor Patrocinante: Luis J. Corcuera P.

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

IMFORME DE APOBACION  
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la comisión de postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato

**GUSTAVO E. ZUNIGA NAVARRO**

ha sido aprobada por la comisión informante de Tesis como requisito de Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención Botánica.

Director de Tesis:

Dr. Luis Corcuera P.



Comisión informante de Tesis:

Dra. Miren Alberdi

Dra. Mary T. Kalin Arroyo

Dra. Luz M. Pérez

Ing. Agr. Carlos Quiroz



## AGRADECIMIENTOS

Mis sinceros agradecimientos al Dr. Luis Corcuera P, por su constante ayuda, preocupación y enseñanzas durante el desarrollo de esta Tesis.

A mis amigos del Laboratorio de Fisiología Vegetal por su amistad y comprensión

A todas las personas que han cooperado en mi formación.



## INDICE

	Pag.
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE	iii
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCION	1
1.1. Daños a la planta	1
1.2. Mecanismos defensivos de la planta	3
i) Defensas estructurales	3
ii) Defensas bioquímicas	5
1.3. Defensas químicas en cebada	9
1.4. Bases indólicas simples en cebada	12
1.5. Acumulacion de compuestos bajo déficit hídrico	18
1.6. Objetivos	21
2. MATERIALES Y METODOS	22
2.1. Germinación de las semillas de cebada	22
2.2. Preparación de los extractos	22
2.3. Cuantificación de alcaloides	23
2.4. Espectro visible del complejo gramina- reactivo de Ehmann	23



2.5	Determinación del coeficiente de extinción molar del complejo gramina-reactivo de Ehmann	25
2.6	Recuperabilidad del método de extracción	25
2.7	Separación de alcaloides por TLC	28
2.8	Determinación de la concentración de gramina por espectroscopia UV.	28
2.9	Efecto de otros alcaloides en la absorbancia del complejo gramina-reactivo de Ehmann	31
2.10	Localización tisular de gramina	31
2.11	Análisis de prolina y glicina-betaina	32
2.12	Déficit hídrico	33
2.13	Ensayos de infestación	33
2.14	Mantenimiento de áfidos	35
2.15	Ensayos con dietas	35
2.16	Conducta alimenticia de áfidos	35
3.	RESULTADOS	38
3.1	Variación de gramina con la edad de la planta	38
3.2	Alcaloides indólicos en cebada	38
3.3	Contenido de gramina y susceptibilidad de cebada a áfidos	42
3.4	Efecto de gramina sobre la distribución de áfidos en cebada	45

3.5	Efecto de <i>gramina</i> incorporada en plantas de cebada y susceptibilidad a áfidos.	45
3.6	Tasas de crecimiento poblacional de áfidos en plantas mantenidas en tierra y medio hidropónico	48
3.7	Localización tisular de <i>gramina</i>	48
3.8	Efecto de <i>gramina</i> sobre áfidos alimentados con dietas artificiales	52
	i) Supervivencia	52
	ii) Cantidad de dieta ingerida	52
	iii) Índice de reproducción	55
3.9	Efecto de <i>gramina</i> sobre la mortalidad de áfidos	55
3.10	Conducta alimenticia de áfidos	58
3.11	Efecto de hordenina en la supervivencia de <i>S. graminum</i>	58
3.12	Efecto del déficit hídrico en la susceptibilidad de cebada <i>F. Union</i> a <i>S. graminum</i>	61
3.13	Efecto del déficit hídrico en la susceptibilidad de cultivares de cebada a áfidos	66
3.14	Efecto del déficit hídrico en el contenido de <i>gramina</i> , prolina y glicina-betaína	66
3.15	Efecto de prolina, colina y glicina-betaína incorporadas en plantas de cebada sobre la susceptibilidad a <i>S. graminum</i>	71

3.16	Efecto de prolina, colina y glicina- betaína sobre <i>S. graminum</i> alimentados con dietas artificiales	71
3.17	Efecto de gramina y betaína sobre áfidos alimentados con dietas artificiales	74
4.	DISCUSION	81
5.	REFERENCIAS	87

## LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Variación del contenido de gramina en diferentes organos de cebada	39
Tabla 2. Contenido de gramina en diferentes cultivares de cebada	41
Tabla 3. Distribución espacial de áfidos en cebada	46
Tabla 4. Distribución de <i>S. graminum</i> en la hoja mas nueva de cebada	47
Tabla 5. Tasas de crecimiento de poblaciones de áfidos mantenidos en suelo y medios hidropónicos	50
Tabla 6. Localización tisular de gramina	51
Tabla 7. Efecto de p-hidroxibenzaldehido incorporado por plantas de cebada sobre la susceptibilidad a áfidos	64
Tabla 8. Efecto de p-hidroxibenzaldehido sobre <i>S. graminum</i> alimentados con dietas artificiales	65
Tabla 9. Efecto del déficit hídrico sobre el contenido de gramina	69
Tabla 10. Efecto del déficit hídrico sobre el contenido de gramina, prolina y glicina-	



betaína 70

Tabla 11. Efecto de prolina, colina y glicina-betaína sobre *S.graminum* alimentados con dietas artificiales 76

Figura 32. Sobrevivencia de *S. graminum*  
en dietas con glicina-betaina y  
gramina

80

## LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Compuestos secundarios presentes en plantas que efectan el desarrollo de patógenos	7
Figura 2. Glucósidos inactivos que generan compuestos tóxicos	8
Figura 3. Compuestos presentes en cebada relacionados con resistencia a patógenos	10
Figura 4. Bases indólicas simples presentes en algunas Gramíneas y Leguminosas tóxicas para el ganado	13
Figura 5. Ruta biosintética de gramina en cebada	16
Figura 6. Método usado en la extracción de alcaloides indólicos y hordenina	24
Figura 7. Espectro visible del complejo gramina-reactivo de Ehmann	26
Figura 8. Determinación del coeficiente de extinción molar del complejo gramina reactivo de Ehmann	27
Figura 9. Recuperabilidad del método de extracción de gramina	29
Figura 10. Espectro de gramina en etanol al 95%	30

Figura 11. Sistema usado en la medición de potenciales hídricos	34
Figura 12. Sistema usado en la alimentación de áfidos	36
Figura 13. Diagram del sistema electrónico usado para medir conductancia alimenticia de áfidos con dietas artificiales	37
Figura 14. Variación del contenido de graminas con la edad de la planta	40
Figura 15. Tasas de crecimiento de las poblaciones de áfidos en diferentes cultivos de cebada	43
Figura 16. Tasas de crecimiento de las poblaciones de áfidos en cebada	44
Figura 17. Efecto de graminas incorporadas por cebada F. Union sobre la susceptibilidad a áfidos	49
Figura 18. Efecto de graminas sobre la sobrevivencia de áfidos alimentados con dietas artificiales	53
Figura 19. Efecto de graminas sobre la cantidad de dieta incorporada por áfidos	54
Figura 20. Efecto de graminas sobre el índice de reproducción de áfidos	56
Figura 21. Efecto de graminas sobre la mortalidad	

	dad de áfidos	57
Figura 22.	Conducta alimenticia de áfidos alimentados con dietas artificiales	59
Figura 23	Efecto de gramina sobre el tiempo de ingestión de dieta	60
Figura 24.	Efecto de hordenina sobre la sobrevivencia de áfidos alimentados con dietas artificiales	62
Figura 25.	Efecto de hordenina sobre la cantidad de dieta ingerida por <i>S.graminum</i>	63
Figura 26.	Efecto del déficit hídrico sobre la susceptibilidad a de cebada a <i>S.graminum</i>	67
Figura 27.	Efecto del déficit hídrico sobre la suceptibilidad de cebadas a áfidos	68
Figura 28.	Efecto del déficit hídrico en la acumulación de prolina y glicina betaína por plantas de cebada	72
Figura 29.	Efecto de prolina, colina y glicina-betaína incorporada por cebada sobre la susceptibilidad áfidos	73
Figura 30	Efecto de glicina-betaína sobre el índice de reproducción de áfidos	77
Figura 31	Efecto de glicina-betaína sobre la sobrevivencia de áfidos alimentados con gramina	78

## RESUMEN

Los alcaloides indólicos simples presentes en algunas Gramíneas y Leguminosas son tóxicos para el ganado. En esta tesis se postuló que los alcaloides indólicos y la acumulación de algunos metabolitos de estrés pueden afectar las interacciones entre la cebada y áfidos.

El único alcaloide indólico detectado en cebada fue gramina. Este compuesto alcanzó una concentración máxima a los 6 días de edad de la planta para luego decrecer. Se observó que las tasas de crecimiento de las poblaciones de áfidos *Schizaphis graminum*, *Rhopalosiphum padi*, *R. maidis* y *Metopolophium dirhodum* disminuyeron con el contenido de gramina en los diferentes cultivares. La susceptibilidad aumentó con la edad de la planta mientras que el contenido de gramina decreció. La distribución espacial de los áfidos *S. graminum* y *R. padi* en cebada se correlacionó con el contenido de gramina en la planta. Al incorporar gramina en el cultivar *Firlbecks Union*, las tasas de crecimiento poblacional de los áfidos *R. padi* y *S. graminum* disminuyeron respecto de las plantas no tratadas. Al alimentar áfidos con dietas artificiales con gramina hasta 6 mM, la sobrevivencia de todas las especies disminuyó con respecto al control con LD-50 de 0.8, 0.9, 1.8 y 3.4 mM para *S. graminum*, *R. padi*, *R. maidis* y *M. dirhodum* respectivamente. Además, disminuyeron la cantidad de dieta ingerida e índice de reproducción. Al alimentar áfidos de las especies *R. padi* y *M. dirhodum* en

dietas con gramina 0-6 mM por un lapso de 7 hrs y luego transferirlos a dietas sin gramina se pudo observar que gramina tiene un efecto repelente a altas concentraciones y toxico a concentraciones bajas. Esto fue confirmado al determinar electrónicamente la conducta alimenticia de los áfidos *R. padi* y *S. graminum*. Se observó que el tiempo de ingestión de dieta de ambos áfidos disminuyó con la cantidad de gramina en la dieta. Estos resultados apoyan la hipótesis que gramina es un factor de resistencia de la cebada a áfidos.

Ninguno de los cultivares analizados presentó hordenina, un alcaloide fenólico que tambien es tóxico para el ganado. En esta tesis se observó que este compuesto disminuyó la sobrevivencia y cantidad de dieta ingerida del afido *S. graminum* en un grado menor que gramina . Si hordenina es importante en la resistencia de otras plantas deberá ser estudiado posteriormente.

Plantas de cebada bajo déficit hídrico son más susceptibles a áfidos que las plantas bajo condiciones normales. En las plantas bajo déficit hídrico se acumula glicina-betaina. Este compuesto aumentó la tasa de reproducción de afidos alimentados en plantas o en dietas artificiales. Glicina-betaina también redujo el LD-50 de gramina. Luego es posible que la acumulación de glicina-betaina puede ser responsable del aumento de susceptibilidad de la cebada a áfidos.

En esta tesis se postula que entre los factores que afectan las interacciones entre cebada y áfidos, hay factores que aumentan la resistencia mientras otros factores pueden aumentar la susceptibilidad.



## ABSTRACT

The indole alkaloids present in several Gramineae and Leguminosae are toxic to cattle. In this thesis it is postulated that indole alkaloids and stress compounds may affect the interactions between aphids and barley.

Gramine was the only indole alkaloid detected in several barley cultivars. The content of this compound reached a maximum by the sixth day, after germination, decreasing afterwards. The Population growth rate of the aphids *Schizaphis graminum*, *Rhopalosiphum padi*, *R. maidis* and *Metopolophium dirhodum* was negatively correlated with gramine content in different barley cultivars. The distribution of *S. graminum* and *R. padi* in barley was also inversely correlated with gramine content. Moreover, gramine incorporation in barley free gramine, increased plant resistance to the aphids *S. graminum* and *R. padi*. In addition, gramine incorporated into artificial diets had deleterious effects on aphids. Survival of *S. graminum*, *R. padi*, *R. maidis* and *M. dirhodum* decreased with an LD-50 of 0.8, 0.9, 1.2, 3.4 mM, respectively. The amount of diet ingested, the reproduction rates also decreased with gramine concentrations similar to those found in plants. To determine if gramine acted as a toxicant or as a feeding deterrent *S. graminum* and *M. dirhodum* nymphs were exposed to diets with 0-6 mM for 7 hrs and then transferred to diets without gramine. Survival of aphids at 0 and 6 mM was highest, while

lowest survival was observed at intermediate concentrations. Thus, gramine had toxic effects and also caused feeding deterency. This was supported by electronically monitored experiments with *S. graminum* and *R. padi*. The presence of gramine decreased diet ingestion time. These results support the hypothesis that gramine act as resistance factor to aphids in barley.

Hordenine was absent from all barley cultivars analized. However this compound had deletereous effects on *S. graminum*, decreasing the survival and amount of diet ingested. If hordenine is important for other plants it remains to be shown.

Plants under water stress were more susceptible than normal ones. Stressed plants also accumulated glycine-betaine. This compound increased reproduction rate of aphids feeding in plants or holidic diets. Glycine-betaine also reduced the LD-50 of gramine. Thus, it is likely that glycine betaine is responsible for the observed increased susceptibility of water stressed barley to aphids.

In this thesis it is then concluded that among the factors that affect aphid-barley interactions, there are some that increase resistance while others increase susceptibility.

## 1.- INTRODUCCION

El rendimiento de los cultivos de cereales se ve afectado por la presencia de patógenos y pestes (Campos y Charlin, 1976 ). Los áfidos constituyen plagas importantes en los cereales, dado que presentan una alta capacidad reproductiva, multiplicación partenogenética vivípara, alta capacidad de dispersión y fases invernizas en huéspedes alternantes.

En Chile antes de 1950 los áfidos no constituían un problema grave (Caballero, 1972 ). A partir de 1968 con la introducción al país de *Metopolophium dirhodum* y *Sitobion avenae*, los pulgones han provocado importantes pérdidas en la producción (Castillo y Acevedo, 1976). Las especies más importantes en Chile son las siguientes:

*Metopolophium dirhodum* (W), pulgón verde pálido (Lara y Zúñiga, 1969 ), *Sitobion avenae* (F), pulgón verde oscuro (Zúñiga, 1967), *Rhopalosiphum padi*(L), pulgón verde de la avena, *Schizaphis graminum* (R), pulgón verde de los cereales y *Rhopalosiphum maidis* (F), pulgón del maíz (Apablaza y Tiska, 1973 ).

### 1.1.-Daños a la planta .

Los áfidos pueden producir disminuciones de rendimiento, medido como calidad y cantidad de granos y área foliar, que varían de acuerdo a la duración del tiempo de infestación, estado de crecimiento del cereal,

densidad de la peste, capacidad para transmitir enfermedades etc.( Lee y col,1981). Además, son vectores del virus del enanismo amarillo de la cebada (BYDV) (Tollenaar y Hepp, 1972 ). BYDV es un virus persistente, por lo cual un pulgón portador, puede infectar una planta durante toda su vida. La infestación de las plantas comienza con la llegada de los áfidos alados a partir de los cuales se originan por generaciones partenogénicas hembras ápteras que pueden constituir plaga ( van Emden, 1972). El ciclo de vida de un áfido varía entre 4 y 15 días con 4 o 5 estadios ( estados entre mudas), de acuerdo a las condiciones de la planta y la temperatura (Dean, 1974).

Existe una marcada diferencia entre especies de pulgones y sus sitios de alimentación en la planta, lo cual determina el tipo y magnitud del daño causado por el áfido. En trigo, *S. avenae* prefiere las hojas superiores cuando la espiga ha envejecido ( Dean, 1974 )y en variedades de primavera el 90 % de estos áfidos se ubica en la espiga (Vickerman y Wratten, 1979 ). Sin embargo, en cebada *S. avenae*, se sitúa preferentemente en la hoja, con pocos individuos en la espiga (George,1974). Por otra parte, *M. dirhodum* se encuentra sólo en la hojas de todos los cereales, comenzando su desarrollo en las hojas de más edad no senescentes (Latteur, 1971 ). *R. padi*, se alimenta preferentemente de

las hojas inferiores cerca de la base pero en avena, se alimenta algunas veces de la inflorescencia ( Vickerman y Wratten, 1979). En Chile las especies *S. avenae*, *M. dirhodum* y *R. padi* pueden causar en trigo pérdidas superiores al 30 % al alcanzar poblaciones elevadas (Herrera y Quiroz, 1980, 1983).

En las zonas productoras de trigo las poblaciones de áfidos aumentan a fines de Septiembre hasta un máximo en Octubre y Noviembre, para decrecer a un mínimo en los meses de invierno ( Carrillo y Mellado, 1975). En los meses de Enero y Febrero los áfidos migrarían hacia la región cordillerana de la zona central ( Quiroz, 1986), donde lograrían un máximo a fines de marzo, en que se produce un incremento del número de individuos alados, permitiéndoles migrar hacia el valle central. En esta zona encuentran ambientes favorables para su desarrollo, invernando en malezas y cultivos de la época.

## 1.2.-Mecanismos defensivos de la planta .

Una planta es atacada por un gran número de organismos diversos. Sin embargo, sólo unos pocos de estos agentes llegan a ser patogénicos en dicha planta; el resto no llega a serlo ya sea por características estructurales de la planta o por la presencia en ella de sustancias tóxicas o repelentes.

### i.-Defensas estructurales.-

Algunas plantas tienen barreras físicas para impedir

la penetración y/o establecimiento de patógenos y alimentación de fitófagos, tales como la forma, tamaño y localización de los estomas y lenticelas ( Mc Lean, 1921), grosor de las paredes celulares, ceras y cutículas de las células epidérmicas ( Martin, 1964). Además, en respuesta al ataque de patógenos se pueden producir modificaciones de la pared celular, tales como lignificación( Asada y Matsumoto, 1967 ) y suberificación ( Samuel, 1927). La pared puede actuar también como mecanismo de defensa engrosándose en las células epidérmicas y subepidérmicas para impedir la penetración de las hifas de algunos hongos ( Agrios,1978). En otras ocasiones la célula puede necrotizarse, deteniendo de esta manera el avance del patógeno, pues se impide su desarrollo por falta de alimento ( Agrios,1978).

Los tricomas también pueden constituir defensas morfológicas contra el ataque de insectos. Estos pueden interfeerir con la ovoposición, unión del insecto a la planta y con la alimentación. Las hojas de *Solanum berthaultii*, están cubiertas por dos tipos de pelos glandulares. Los pelos tipo A tienen un tronco corto y una cabeza con 4 lóbulos. Los pelos tipo B tienen un tronco más largo . Estos tricomas glandulares producen exudados densos que inmovilizan a los áfidos los que posteriormente mueren (Gibson y Pickett,1983). Sería la alta densidad de estos pelos glandulares en el follaje y

no la presencia de glicoalcaloides en los tejidos, la responsable de la resistencia de variedades silvestres de *Solanum* a áfidos ( Tingey y Sinden, 1982).

ii.-Defensas bioquímicas.

**Papel de los productos secundarios.** Los productos secundarios, pueden ser definidos como productos que tienen una distribución restringida en el reino vegetal, y a los cuales se les desconoce un papel importante en los procesos metabólicos primarios.

Los animales dependen de su movilidad para obtener su alimento y evadir a sus predadores. Las plantas por el contrario carecen de movilidad y deben tener algunas estrategias para sobrevivir. Dentro de estas estrategias está la síntesis de compuestos secundarios. Estos le permiten detener a potenciales herbívoros, atraer polinizadores y regular las interacciones con otras plantas ( Bell, 1981). Los pelos glandulares de muchas plantas producen y liberan compuestos insecticidas que son altamente efectivos contra áfidos. Los pelos glandulares tipo B de *S.berthaultii* liberan la feromona de alarma , (E)-B-farnesena, manteniendo una concentración alrededor del follaje suficiente para que los áfidos la capten y se mantengan alejados de la planta (Gibson y Picket, 1983). Algunos compuestos secundarios sirven como señal, a través de la cual un determinado tipo de áfido reconoce la planta hospedera (van Emden,

1978). Por ejemplo, el áfido *Brevicoryne brassicae* no detecta plantas sin sinigrina y no se alimenta de ellas. Sólo lo hace si las hojas han sido impregnadas previamente con este compuesto (Dixon, 1985). Por otra parte aunque la sinigrina no evita la colonización tiene un efecto negativo en el crecimiento del áfido *Myzus persicae* (van Emden, 1972). Este hecho muestra que un mismo compuesto puede tener efectos negativos o positivos en diferentes organismos.

Los catáfilos más externos de variedades de cebolla resistentes a *Colletotrichum circinans* (Berk), tienen grandes cantidades de catecol y ácido protocatéquico (Swain, 1977) (Fig. 1). Ciertos alcaloides producidos por algunas Solanáceas: tomatina, solanina y solanidina (Fig 1), inhiben el crecimiento de *Alternaria solani* (Swain, 1977). Se ha descrito en avena la presencia de avenacina, terpeno pentacíclico que otorgaría a esta planta, resistencia al hongo *Ophiobolus graminis* (Sacc) (Turner, 1960). Frecuentemente glicósidos inactivos producen por hidrólisis compuestos activos. Este es el caso de glucósidos cianogénicos que liberan por hidrólisis ácido cianhídrico (Millar y Higgins, 1970) y de floridzina, glucósido presente en hojas de manzano, que por hidrólisis produce floretina. Oxidación de la floretina genera compuestos fungitóxicos. (Fig. 2) (Noveroske y col., 1964).



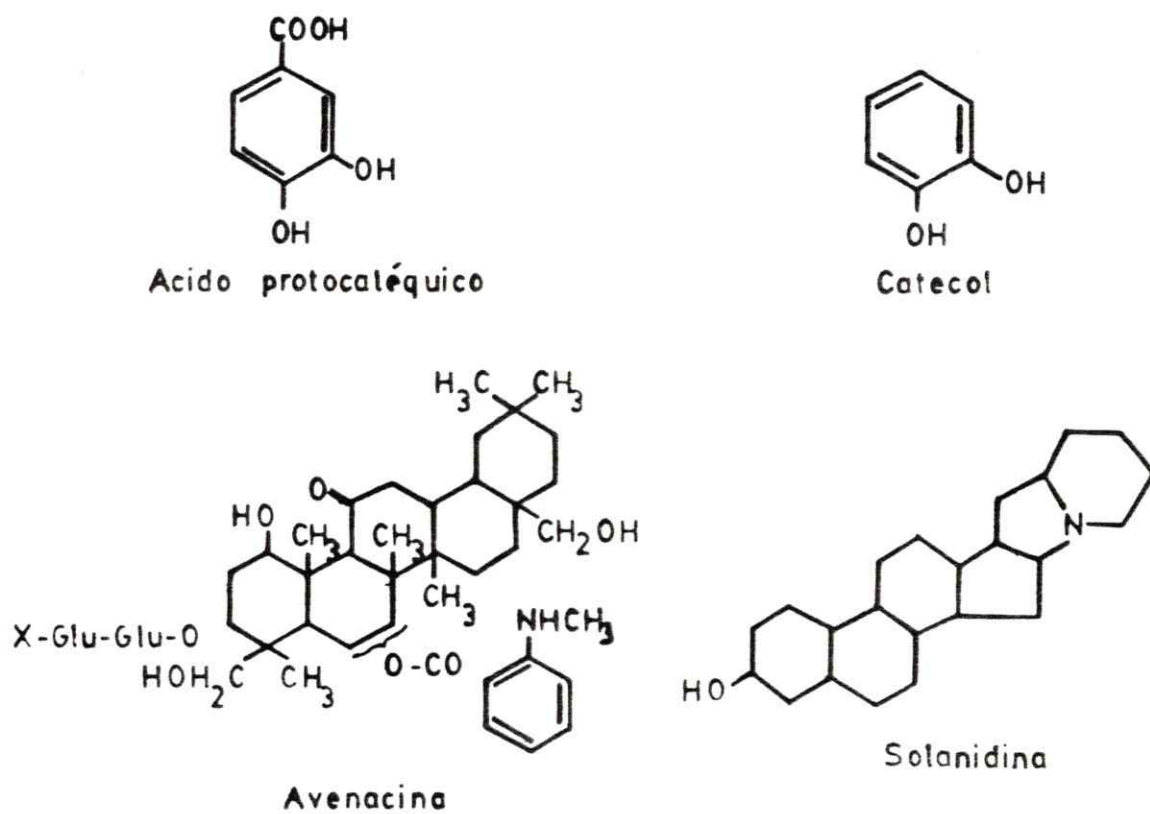


Figura 1 Metabolitos secundarios presentes en plantas que afectan el desarrollo de organismos patógenos

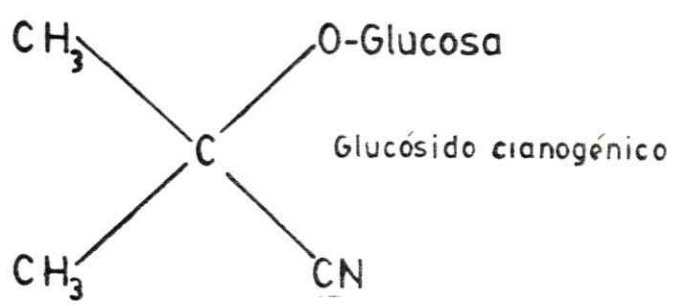
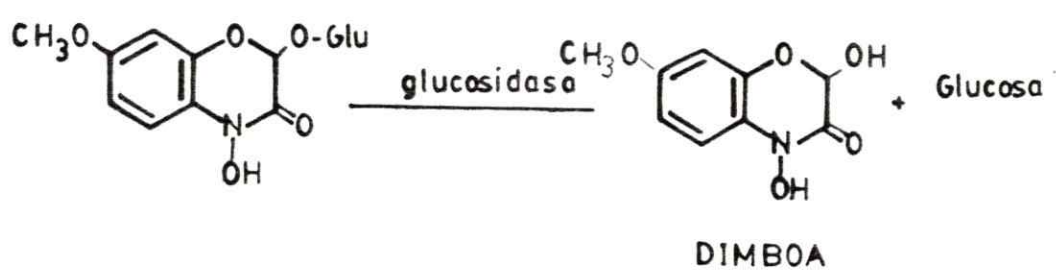
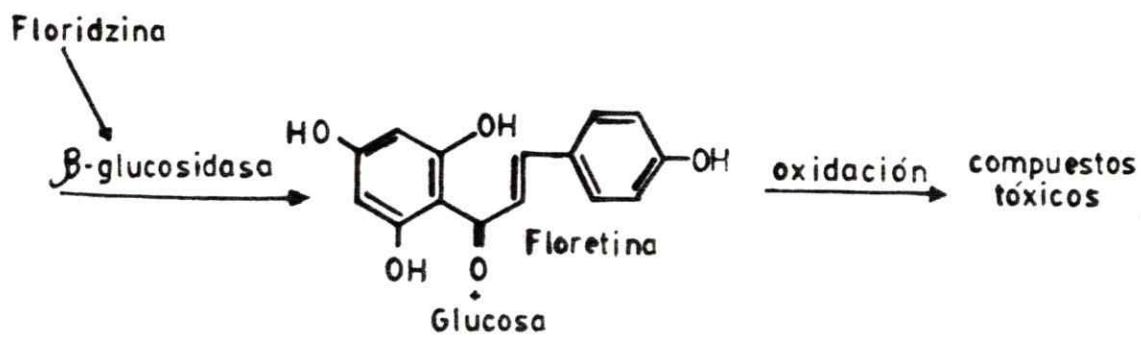


Figura 2. Glucósidos inactivos que por la acción de patógenos pueden generar compuestos tóxicos y/o repelentes

En extractos de **Gramíneas**, tales como trigo, maíz y centeno existen ácidos hidroxámicos ( Willard y Penner, 1976). (Fig. 2). Estos compuestos están en la planta como glucósidos e inhiben el crecimiento bacteriano ( Corcuera y col., 1978) y el desarrollo de hongos ( Elnaghy, 1962). Se ha postulado que estos compuestos serían un factor de resistencia al taladrador de los granos (Klun y col., 1967) y de algunos cereales tales como trigo, centeno, triticale y maíz a áfidos (Argandoña y col., 1980). El ácido hidroxámico más abundante en maíz y trigo es DIMBOA (Fig.2). Este compuesto inhibe reacciones de transferencia de energía en cloroplastos y mitocondrias (Queirolo y col., 1981, 1983). A esta propiedad podría deberse su toxicidad a una gama tan amplia de organismos.

### 1.3.- Defensas químicas en cebada.

Algunas variedades de cebada, **Hordeum vulgare**, contienen hordatinas A y B ( Fig.2 ), compuestos fenólicos que tendrían una función defensiva contra el hongo **Helminthosporium sativum** ( Smith y Best, 1978). En extractos de hojas de plantas de cebada, se han identificado numerosos compuestos secundarios activos (saponinas, ácido bencílico, salicílico, ferúlico y cinámico) (Fig.3). Estos compuestos otorgarían resistencia a la planta contra el áfido **S. graminum**, ya que disminuyen su reproducción en dietas artificiales



(Tood y col, 1971). Trabajos realizados con variedades de cebada Omugi y una línea isogénica R, resistentes al áfido *S.graminum* y Rogers y una línea isogénica S, ambas susceptibles al áfido, postularon que la resistencia estaba dada por la presencia de alcohol bencílico. Al incorporar este compuesto en las plantas susceptibles, éstas se volvían más resistentes al áfido *S.graminum* (Juneja y col, 1972). El alcohol bencílico se encuentra libre en plantas de cebada. Sin embargo, se han detectado otros compuestos de su metabolismo tales como  $\beta$ -bencil-glucopiranosido (Juneja y col, 1975) y O-bencil-L-málico y N-bencil-DL-aspartico. El glucósido y estos dos últimos compuestos no presentan un efecto negativo en la reproducción del áfido (Juneja y Gholson, 1976). Sin embargo, Salgado (1980) al intentar cuantificar por cromatografía de gases el contenido de alcohol bencílico en diferentes cultivares de cebada, entre las que se contaba la variedad Omugi, no pudo detectar la presencia de este compuesto (Límite de detección = 0.01 mmoles/kg.p.f.). Además, las variedades analizadas mostraron diferente susceptibilidad a los áfidos *S.graminum* y *M.dirhodum*. Es claro que de existir alcohol bencílico en estas plantas de cebada, en particular en la variedad Omugi, su contenido está bajo el límite de detección del método usado. Los resultados sugirieron que en cebada existirían otros compuestos con

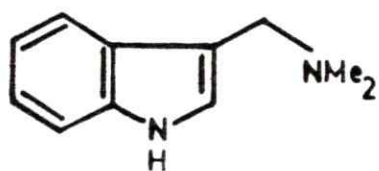
efectos deletéreos sobre los áfidos y que el alcohol bencílico no sería un factor de resistencia

#### 1.4.-Bases indólicas simples en gramíneas.

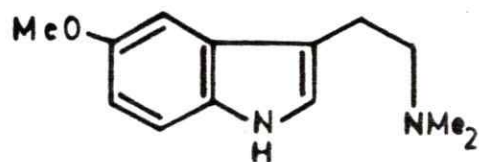
Las indolaminas derivadas del aminoácido triptofano, se encuentran en una gran variedad de plantas, pero son especialmente comunes en **Gramíneas y Leguminosas** (Culvenor, 1973, Smith, 1977)(Fig.5 ). Estas bases indólicas simples se clasifican de acuerdo al grupo cromóforo que presentan. Alrededor del 80% de éstas presentan como cromóforo al grupo indol o indolina (Grogger. 1980).

En Australia y América del Norte el uso de **Phalaris arundinacea** y **P.tuberosa**, en la alimentación del ganado puede provocar en estos animales diversos trastornos. Ambas especies de plantas contienen derivados indólicos. **P.tuberosa** contiene principalmente N,N dimetiltriptamina, 5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina y bufotenina; mientras que **P.arundinacea** contiene principalmente gramina y hordenina.

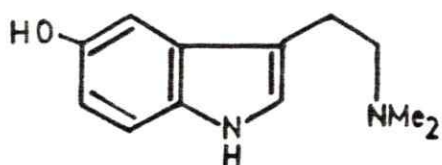
Simons y Marten (1971), evaluaron el contenido de alcaloides indólicos en 411 genotipos de **P.arundinacea** y lo correlacionaron con su palatabilidad en cordero. La palatabilidad disminuye en los cultivares con un mayor contenido de alcaloides. Posteriormente fue demostrado que en esta planta los alcaloides indólicos constituyen importantes factores anticalidad dado que son tóxicos al ganado y además producen pérdida de peso ( Marten y



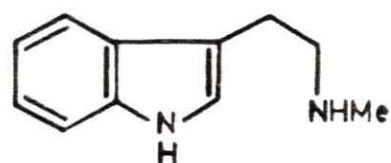
Gramina



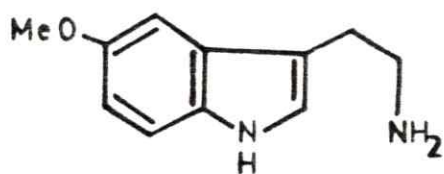
5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina



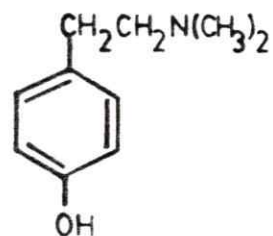
Bufotenina



N-metiltriptamina



5-metoxi-triptamina



Hordenina

Figura 4. Bases indólicas simples presentes en algunas Gramíneas y Leguminosas, tóxicas para el ganado

col,1981).

En *P.tuberosa*, estos compuestos serían responsables de su toxicidad a corderos (Gallagher y col,1964). Por otra parte, *gramina* tiene efectos fitotóxicos en pollos (Overland,1966). Kendall y Sherwood (1975), demostraron que *gramina* y otros compuestos relacionados inhiben la ingestión de dietas semisintéticas por ratas. En el mismo trabajo se observó que el LD-50 de hordenina era inferior al de *gramina* y la cantidad de dieta ingerida aumentaba 2 veces. Estos resultados sugieren que hordenina tiene una toxicidad baja, pero que contribuye a la toxicidad total de *P.arundinacea*.

En *P.arundinacea* se ha establecido que el nivel de *gramina* y otros compuestos relacionados está sujeto al control génico (Marten y col,1981) y ambiental (Majak y col,1979). El contenido de alcaloides en *P.arundinacea* está controlado por un sistema de genes epistáticos (Marum y col., 1979). La presencia de *gramina* requiere de ambos genes recesivos. Los factores ambientales que regulan el contenido de alcaloides son fertilización nitrogenada y tipo de suelo. Además, estos compuestos presentan una variación estacional (Woods y col,1979). Hagman y col.(1975), al determinar la distribución de alcaloides indólicos en hojas y tallos de *P.arundinacea*, en diferentes estados de desarrollo encontraron que: i) Las láminas de las hojas presentan el



doble contenido de alcaloides que la vaina de las hojas y el tallo en condiciones de campo e invernadero; ii) La concentración de alcaloides disminuye con la edad de la planta.

En tallos jóvenes de cebada, *Hordeum vulgare*(L), se encuentra gramina en una concentración aproximada de 8 mg/g.p.s. En esta especie el contenido de gramina está determinado por factores genéticos y ambientales ( Hanson y col., 1981; Hanson y col., 1983).

La biosíntesis de gramina involucra las etapas mostradas en la figura 5 . El núcleo indólico y la cadena metilénica son incorporados en el primer intermediario estable de la vía, aminometilindol (AMI) (Gower y Leete, 1963); AMI es entonces metilado en el nitrógeno amino para formar amino-2-N,metil-3-aminometilindol (MAMI), que por metilación produce gramina (Schneider y Wightman, 1974; Mudd, 1961). Estas metilaciones son catalizadas por una o varias enzimas N-metil transferasas (MNT)( Hanson y col, 1983), en las que S-Adenosil metionina (SAM), actúa como dador de grupos metilos (Leland y Hanson 1985); a pesar de no poder descartar la posibilidad de 2 enzimas NMT físicamente similares específicas para AMI y MAMI, indicaron que tres líneas de evidencias apoyarían la existencia de una única enzima: a ) Las actividades AMI y MAMI no fueron separadas por ninguno de los métodos de separación empleados. b) se encontró aproximadamente la

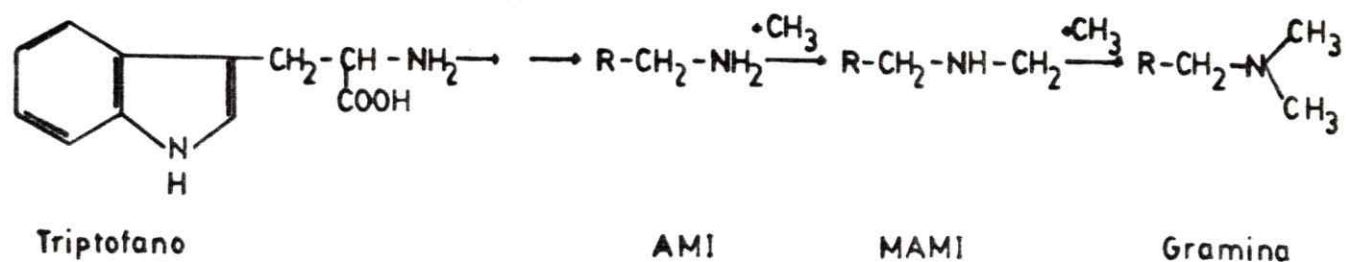


Figura 5. Posible ruta biosintética de gramina en cebada.

AMI=aminometilindol.

MAMI= N-metil-3-aminometilindol

misma razón (1:0.7, AMI:MAMI) para la actividad NMT en extractos crudos independientemente del genotipo, temperatura de crecimiento y posición de la hoja. c) las dos actividades muestran el mismo pH óptimo, igual sensibilidad a inhibidores por buffer y la misma estabilidad a 4 °C. Usando un criterio similar se ha establecido que hay 2 NMT que catalizan las metilaciones de tiramina en raíces de cebada ( Meyer, 1982) y de triptamina en hojas de *Phalaris* ( Mack y Slaytor, 1979). La enzima NMT de cebada es estimulada por la temperatura, produciéndose un incremento de su actividad sólo en las hojas con crecimiento activo (Leland y Hanson, 1985.)

Aunque gramina es degradada (Diogenis, 1969), su catabolismo es muy lento ( Hanson y col, 1983). Por esta razón su acumulación es controlada principalmente por su velocidad de síntesis. En el estudio de la biosíntesis de gramina en tallos de cebada a partir de (<sup>14</sup>C ) Triptofano, se ha concluído que el mayor sitio de síntesis es la región basal de la hoja de la plántula. Desde este lugar la gramina es translocada al ápice de la hoja donde se acumula ( Smith, 1975).

Previamente se ha propuesto que los alcaloides indólicos simples tienen efectos deletéreos sobre áfidos alimentados con dietas artificiales ( Corcuera, 1984). Igualmente se ha demostrado que gramina

afecta el metabolismo de mitocondrias de ratas y bovinos ( Niemeyer y Roveri, 1984). Altas concentraciones de gramina inhiben el transporte de electrones a nivel del complejo I de la cadena respiratoria . De forma similar es inhibida la oxidación acoplada de succinato e hidrólisis de ATP. Estos efectos sugieren que gramina puede comportarse como un inhibidor de la transferencia de energía. Por otra parte gramina también inhibe la fotofosforilación, gradiente protónica y aumenta el transporte de electrones en tilacoides de espinacas ( Andreo y col.1984).

#### 1.5 Acumulación de compuestos bajo déficit hídrico en cebada

La acumulación de prolina libre en hojas de plantas bajo condiciones de sequía fue primero descrita en centeno, pero ha sido observada en muchas especies tales como: cebada, trigo, arroz, sorgo, porotos, algodón y tabaco ( Stewart y Hanson, 1980). Singh y col.(1972) han señalado que diversos cultivares de cebada que acumulan prolina bajo déficit hídrico, mantienen un alto rendimiento de granos, a diferencia de lo que ocurre con los genotipos susceptibles a la sequía. Por esta razón se ha sugerido que la acumulación de prolina puede servir como un índice de resistencia a la sequía.( Singh y col., 1972). Sin embargo, Hanson y col. (1977) han postulado que la acumulación de prolina no puede ser usada como índice de resistencia al déficit hídrico

debido a que no todas las plantas acumulan este compuesto en forma proporcional

La acumulación de glicinabetaina (GB) en muchas especies de plantas en respuesta al déficit hídrico también ha sido descrita (Hanson, 1980). En gramíneas la acumulación de este compuesto ocurre sólo en algunas tribus. Por ejemplo GB se acumula en *Hordeae*, pero no se detecta en *Maydeae* y *Oryzae* (Hitz y Hanson, 1980). En los tejidos vegetales de quenopodiáceas y gramíneas existe un nivel basal de GB. Un incremento de este nivel puede ser inducido por estrés salino o hídrico. La acumulación de GB se correlaciona linealmente con la concentración de sal en el medio y el potencial de soluto del tejido. (Hanson y Wyse, 1982).

Aunque el papel preciso de GB no ha sido determinado, se ha postulado que este compuesto podría actuar como una sustancia osmótica en el citoplasma (Wyn Jones y col., 1981). Esta hipótesis es apoyada por el hecho que GB está localizada principalmente en el citoplasma celular (Hall y col., 1978). Prolina y GB protegen a diferentes enzimas contra los efectos inactivantes del calor *in vitro* (Paleg y col., 1981).

El nivel de nitrógeno soluble jugaría un importante papel en las interacciones entre plantas e insectos herbívoros. La concentración de prolina aumenta en hojas infectadas con virus (Stewart y Larher, 1980). Haglund

(1980), ha sugerido que plantas con un alto contenido de prolina serian mas susceptibles a insectos herbívoros. Sin embargo, Bright y col. (1982) mostraron que en cebada el contenido de prolina no afecta su susceptibilidad.

Los antecedentes antes expuestos sugieren que la acumulación de alcaloides indolicos en cebada, sería una situacion indeseable por la toxicidad de estos para el ganado. Por esta razon se ha propuesto disminuir su contenido traves de un programa de fitomejoramiento (Marten y col., 1981). Desafortunadamente, se desconoce el significado fisiológico y ecológico de su acumulación. En esta tesis se postula que los alcaloides indólicos y compuestos de estres pueden desempeñar un papel en las interacciones de la cebada y áfidos. Para comprobar estas hipótesis se han postulado los siguientes objetivos:

### 1.6.-OBJETIVOS

- 1.- Determinar el contenido de alcaloides indólicos y hordenina en diferentes cultivares de cebada.
- 2.- Determinar si existe relación entre el contenido de alcaloides indólicos y hordenina y la resistencia de variedades de cebada a los áfidos *Schizaphis graminum*, *Rhopalosiphum padi*, *R. maidis* y *Metopolophium dirhodum*.
- 3.- Determinar los efectos de alcaloides indólicos y hordenina en áfidos alimentados con dietas artificiales.
- 4.- Determinar si la acumulación de compuestos de estrés (GB y prolina) afectan la interacción de cebada y áfidos de los cereales

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1.-Germinación de las semillas de cebada.-

Las semillas de diferentes variedades de cebada *Hordeum vulgare* (L.) fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 5% por 10 minutos y luego lavadas con abundante agua corriente y finalmente con agua destilada. Posteriormente fueron colocadas en un papel filtro sobre bandejas en una estufa de cultivo a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  y fueron regadas todos los días con agua destilada. Las plantas fueron cosechadas a las edades requeridas. Otras semillas fueron colocadas directamente en tierra contenida en macetas de plástico en una cámara de cultivo a  $25^\circ\text{C}$  con un fotoperíodo 14/10 hrs. (luz/osc.) y regadas diariamente con agua potable. Las plantas fueron cosechadas a las edades requeridas.

### 2.2.-Preparación de los extractos.-

En la extracción de alcaloides indólicos se usó el método descrito por Barnes y col. (1971). Se pesaron entre 2 y 3 g. de la parte aérea de las plantas crecidas en oscuridad y luz. El tejido fue congelado y luego macerado en un mortero de porcelana con un volumen adecuado de metanol y amoníaco (100:1 v/v). El macerado fue filtrado a través de lana de vidrio y evaporado a sequedad. El residuo fue disuelto en 5 ml de HCl 0,1N y filtrado a



través de papel filtro Whatman No 1. El filtrado obtenido fue alcalinizado con amoníaco hasta pH 9,0 y lavado 2 veces con cloroformo en relación 1:2 v/v. La fase orgánica fue evaporada a sequedad. El residuo obtenido fue usado para la cuantificación y caracterización de los alcaloides indólicos presentes en el extracto (Fig.6).

### 2.3.-Cuantificación de alcaloides.

Para cuantificar alcaloides indólicos se utilizó el método descrito por Ehmann (1977) para la detección en placas, adaptado para la cuantificación colorimétrica como se indica a continuación. El reactivo de Ehmann fue preparado en base a los reactivos de Urk y Salkowski (1:3 v/v):

a) Reactivo de Urk . Se disolvió 1 g de p-Dimetilaminobenzaldehído en 50 ml de HCl y en 50 ml de etanol absoluto.

b) Reactivo de Salkowski. Se disolvió 2,03 g de Cloruro férrico hexahidratado en 500 ml de HCl y 300 ml de ácido sulfúrico ( d=1,8 g/ml ).

### 2.4.-Espectro visible del complejo gramina-reactivo de Ehmann.

Se preparó una solución de gramina de concentración igual a 7,8 mM. De esta solución se tomó una alícuota de 50  $\mu$ l y se puso en un tubo de ensayo . Se evaporó el solvente a sequedad y se agregaron 2 ml de reactivo de

## TEJIDO CONGELADO

macerar

agregar MeOH:NH<sub>4</sub>OH(100:1 v/v)

filtrar

## FILTRADO

evaporar a sequedad

## RESIDUO

agregar HCl 0,1 N

ajustar a pH 9

## SOLUCION BASICA

lavar con CHCl<sub>3</sub> (1:2 v/v)

## FASE ORGANICA

evaporar a sequedad

## RESIDUO

TLC  
(MeOH:NH<sub>4</sub>OH=7:1 v/v)CUANTIFICACION  
COLORIMETRICA

Figura 6. Método de preparación de extractos de plantas de cebada para cuantificar alcaloides indólicos y hordenina.

Ehmann. La mezcla fue puesta a baño maría durante 30 minutos. Luego se diluyó con agua hasta un volumen final de 5 ml. En un Spectronic 20 se determinó la absorbancia de este complejo entre 400 y 600 nm. Como blanco se usó el reactivo diluido con agua (Fig. 7).

#### 2.5.-Determinación del coeficiente de extinción molar del complejo gramina-reactivo de Ehmann.

A partir de una solución de gramina de concentración igual a 7,8 mM, se tomaron alícuotas de diferentes volúmenes. El solvente se evaporó a sequedad y se agregaron a cada tubo 2 ml de reactivo de Ehmann. Las muestras se calentaron a baño maría por 30 minutos y se diluyeron a 5 ml con agua. Se midió la absorbancia a 550 nm. Por análisis de regresión lineal se determinaron los parámetros  $r=0,998$ ;  $a=4207$  y  $b=-0,022$  que corresponde a la mejor recta de tres repeticiones (Fig.8 ).

#### 2.6.-Recuperabilidad del método de extracción.

Con el fin de determinar la eficacia del método de extracción de compuestos se tomaron muestras de cebada F. Union( 1,5 g ) y se les agregaron alícuotas de una solución de gramina de concentración 7,8 mM . Se realizó el proceso de extracción descrito y se cuantificó la gramina usando el reactivo de Ehmann. Por análisis de regresión lineal se determinaron los parámetros  $r= 0,997$ ,  $b= 92,1$  y  $a=2,6 \times 10^{-8}$  .

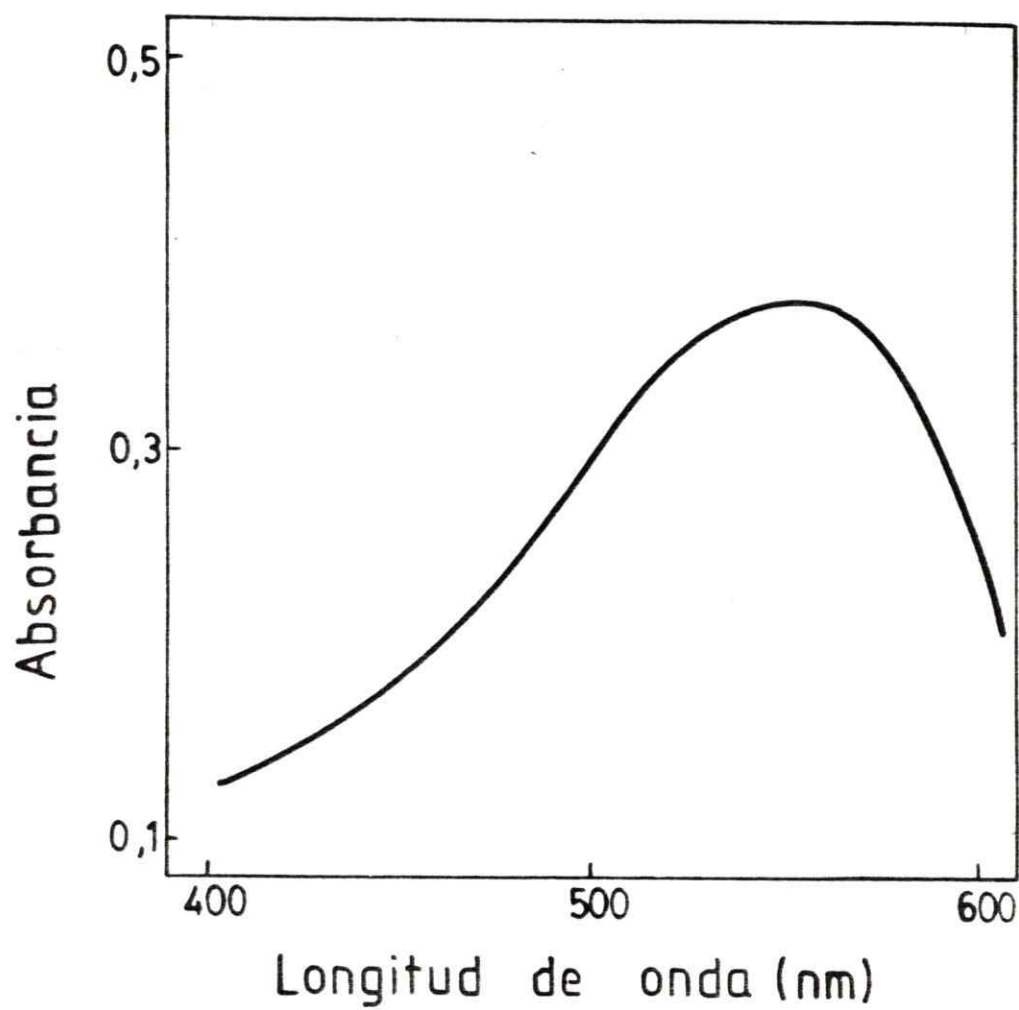


Figura 7 Espectro visible de complejo gramina-reactivo de Ehmann.

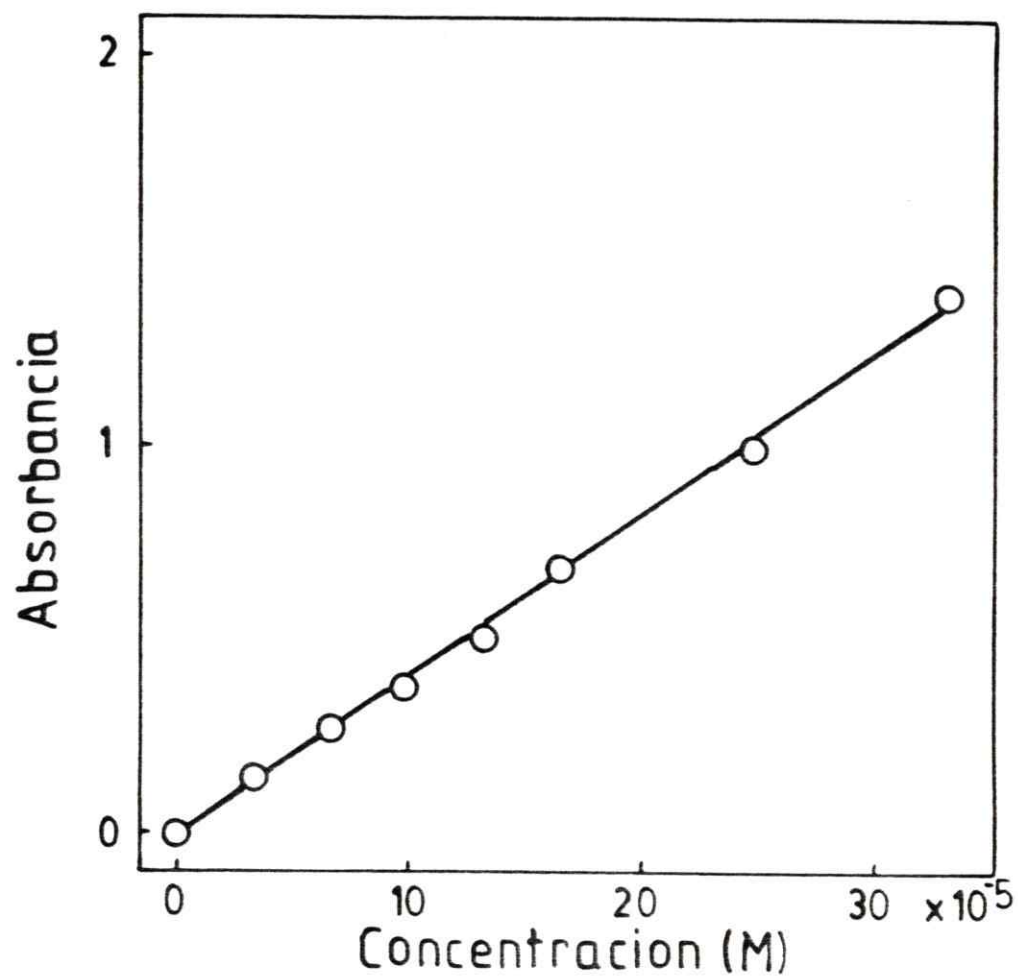


Figura 8 Gráfica de la determinación del coeficiente de extinción molar del complejo gramina-reactivo de Ehmann

El valor de **a**, muestra que en el extracto no existe otra sustancia en cantidades significativas que de reacción positiva con el reactivo. El valor de **b**, indica que la recuperabilidad del método es aceptable, dado que es superior al 90 % (Fig. 9).

#### 2.7. -Separación de alcaloides por TLC.

Con el propósito de determinar el tipo de alcaloide indólico presente en cada variedad analizada, se realizó una separación cromatográfica en capa fina de cada una de las muestras, usando como patrones muestras puras de gramina, 5-metoxitriptamina, 5-metoxi-dimetiltriptamina y hordenina.

La mezcla de elución usada fue MeOH:NH<sub>4</sub>OH (7:1 v/v). Los *r<sub>f</sub>* de los compuestos concordaron con los reportados en bibliografía. (Barnes y col., 1971.).

#### 2.8. -Determinación de la concentración de gramina por espectroscopía UV.

Se preparó una solución disolviendo 10 mg de gramina en 10 ml de etanol al 95 %. De esta solución se tomaron diferentes alícuotas a cada una de las cuales se determinó su absorbancia entre 350 y 200 nm. Se observó un pico máximo a los 278 nm y uno menor a 287 nm (Fig. 10). Se determinó el coeficiente de extinción para ambas longitudes de onda, obteniéndose los valores siguientes  $\epsilon_{287} = 9318$  y  $\epsilon_{278} = 6396$ . Con los valores de extinción

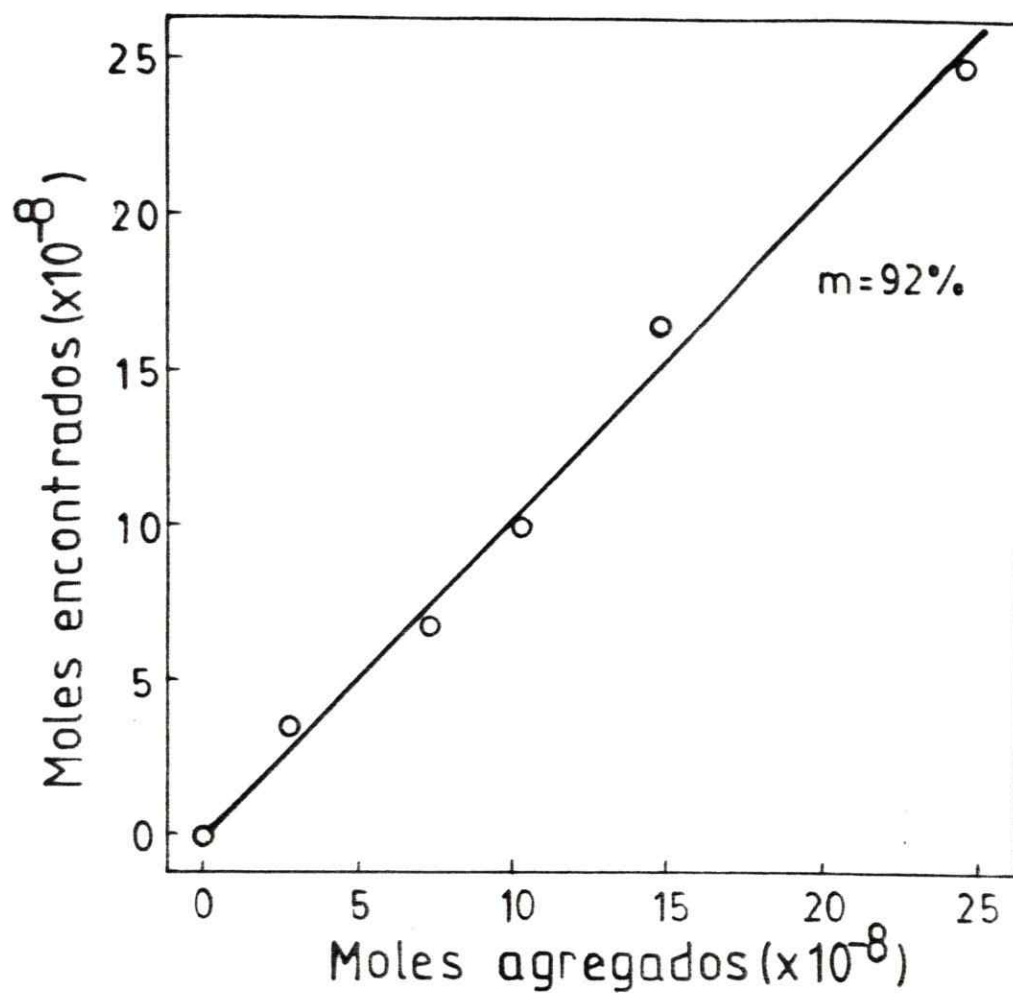


Figura 9. Determinación gráfica del grado de recuperabilidad del método de extracción de gramina

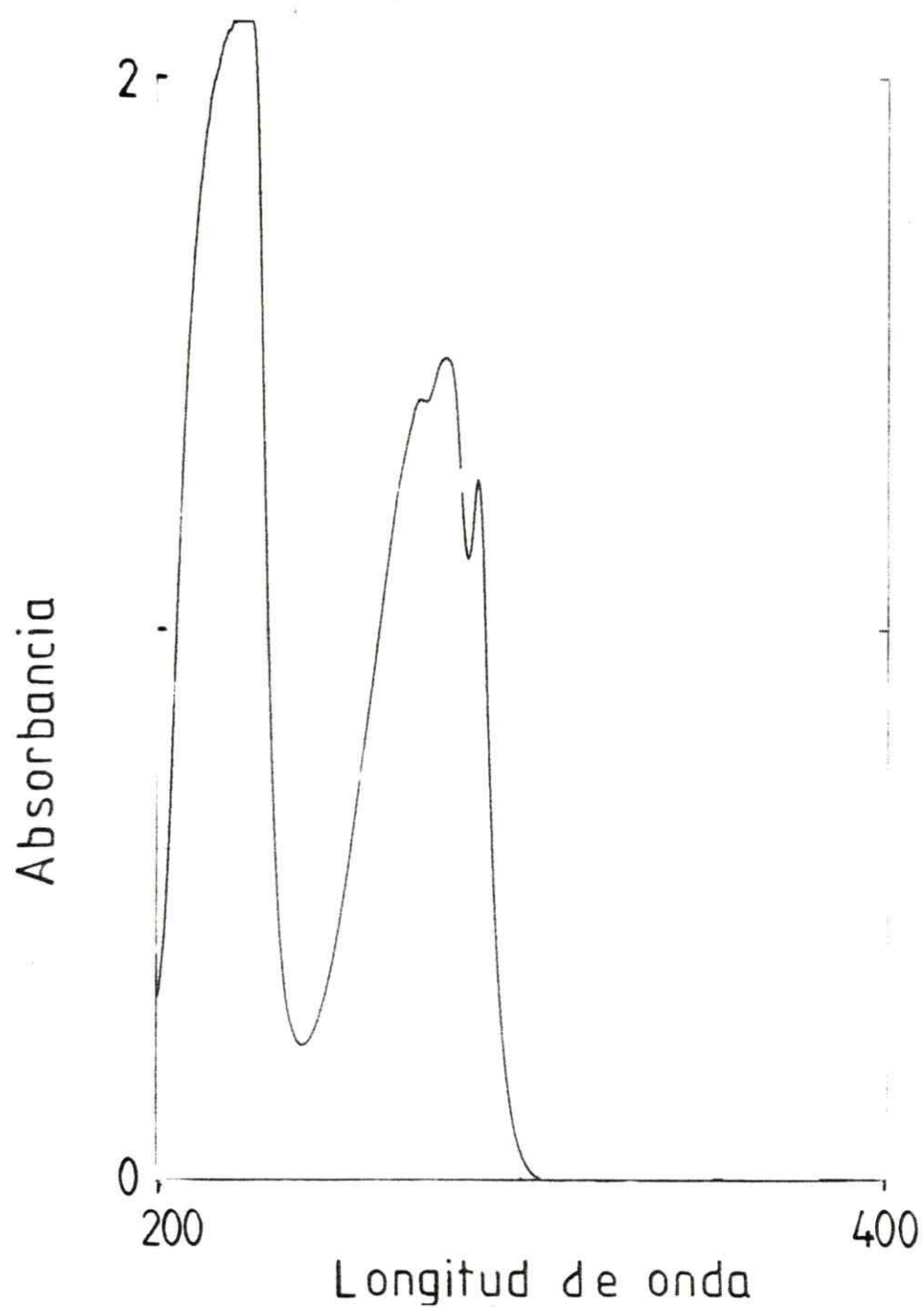


Figura 10. Espectro U.V. de gramina en etanol  
95%



molar se determinó la concentración de gramina a partir de extractos.

#### 2.9.-Efecto de otros alcaloides en la absorbancia del complejo gramina-reactivo de Ehmann.

Se tomaron alícuotas de diferentes volúmenes de una solución de gramina a las que se agregaron, cantidades crecientes de 5 metoxi-triptamina hasta un máximo de un 20% en relación de la concentración de gramina. Se evaporó el solvente a sequedad, se agregó 2 ml de reactivo de Ehmann y se hizo reaccionar en las condiciones antes descritas. Luego se midió la absorbancia del complejo a 550 nm. 5-metoxi-triptamina no afectó la detección de gramina hasta una concentración equivalente al 10% de la concentración total de gramina. Por otro lado triptofano dio una reacción de color verde con el reactivo, lo cual tampoco representaría una interferencia.

#### 2.10.-Localización tisular de gramina

i) Separación mecánica de tejidos. Se analizaron hojas provenientes de plantas mantenidas a 25 °C con un fotoperíodo 14/10 h. Los haces vasculares fueron separados de acuerdo a la metodología descrita (Argandoña y Corcuera, 1985.). La epidermis inferior fue obtenida luego de almacenar las hojas a -15 °C por 5 minutos 2 veces con un intervalo de 3 minutos. Luego las

hojas fueron puestas en un portaobjetos con agua y se eliminó la epidermis mecánicamente. La epidermis superior quedó en el portaobjetos luego de remover la epidermis inferior y mesófilo.

ii) **Aislamiento de protoplastos.** Los protoplastos fueron aislados a partir del mesófilo de hojas primarias de cebada cultivar X81-T-1027. Las hojas fueron esterilizadas superficialmente y cortadas en trozos de 1 mm, y entonces incubadas en un medio con celulasa 1,5%, manitol 0,6M (pH 5,6) por tres horas con agitación suave. Los residuos de hojas fueron eliminados por filtración. Los protoplastos fueron purificados por centrifugación en una solución de ficol al 10% y sacarosa 0,4 M (Martinoia y col., 1982)

#### 2.11.-Análisis de prolina y glicina-betaína..

Prolina fue analizada de acuerdo a la técnica descrita por Bates y col. (1973), macerando 0,5 g de hojas en un mortero con 10 ml de ácido sulfosalicílico al 3 %. El macerado fue filtrado, tomando una alícuota de 3 ml, que se mezcló con 2 ml de ácido acético y 2 ml de ninhidrina ácida. La mezcla fue incubada a 100 °C por 1 hr. La reacción se detuvo en hielo y se extrajo con 4 ml de tolueno. Se midió la absorbancia a 520 nm.

El contenido de glicina-betaína fue analizado de acuerdo a la metodología descrita (Grieve y Grattan,

1983). 2 a 3 g de cada muestra fueron secados a 100 °C por 48 h. El tejido seco fue incubado en 10 ml de agua desionizada por 24 h. La mezcla fue filtrada y el filtrado fue diluido con un volumen igual de  $H_2SO_4$  2N. Se tomó una alícuota de 0,5 ml y se agregaron 0,2 ml de  $KI-I_2$  y se dejó reposar la mezcla durante 12 hrs a 4 °C. Se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. El precipitado fue disuelto en 5 ml de 1,2 dicloroetano y se midió la absorbancia a 365 nm.

#### 2.12. -Déficit hídrico. -

Plantas de cebada de la variedad **F.Union**, de 4 días de edad sembradas en macetas con tierra a una temperatura de  $25 \pm 3$  °C, fueron sometidas a diferentes condiciones de riego diario. A los 10 días de edad se determinó el potencial hídrico de cada grupo de plantas usando la metodología descrita por Scholander y col. (1964) (Fig. 11)

#### 2.13. -Ensayos de infestación.

Diferentes cultivares de cebada, mantenidas en las condiciones antes descritas, fueron infestadas a los 10 y 22 días de edad con áfidos adultos de una especie determinada. Al cabo de 6 días se determinó el crecimiento poblacional de los áfidos. Se correlacionó dicho crecimiento con la concentración de gramina en cada cultivar usado.

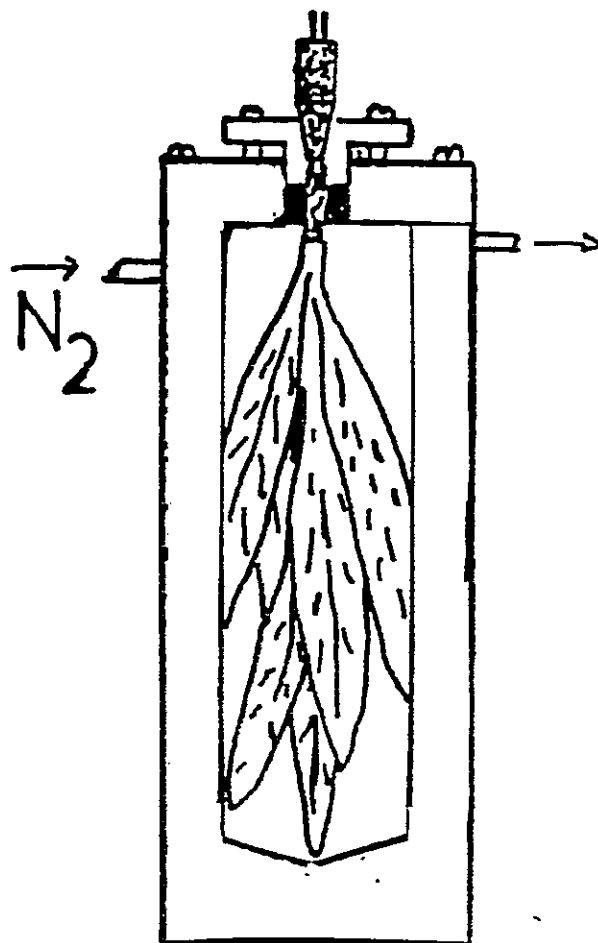


Figura 11. Bomba de presión usada para medir potenciales hídricos en plántulas de cebada.

#### 2.14.-Mantenición de áfidos .

Los áfidos fueron mantenidos en plantas de cebada cv.F.Union, colocadas en un sistema cubierto con una malla transparente e iluminada con luz fluorescente. Los maceteros fueron reemplazados cada 5 días con plantas de 10 días de edad.

#### 2.15.-Ensayos con dietas.

La preparación de la dieta se hizo según una técnica descrita ( Auclair,1965) y modificada por Argandoña y col (1982). Esta dieta es una solución acuosa (pH 6.0) de 30 % sacarosa, aminoácidos, vitaminas y sales minerales. El sistema usado se muestra en la figura 12. En este sistema los áfidos sobreviven más de 72 h.

#### 2.16.-Conducta alimenticia de afidos en dietas artificiales.

Para determinar la conducta alimenticia de los áfidos se usó la metodología descrita por Campbell y col. (1982) con algunas modificaciones. La dieta (300 ul) fue ubicada entre 2 láminas de Parafilm M junto con un alambre de cobre de un diámetro aproximado a 40 micrones. Otro alambre de características similares fue ubicado en el dorso de un áfido adulto mantenido en ayuno por un período de 2 hrs. La asignación de las ondas se realizó por comparación con las ondas descritas por Mc Lean y Kinsey (1964), Mc Lean (1970) y Argandoña y col. (1983) (Fig 13).

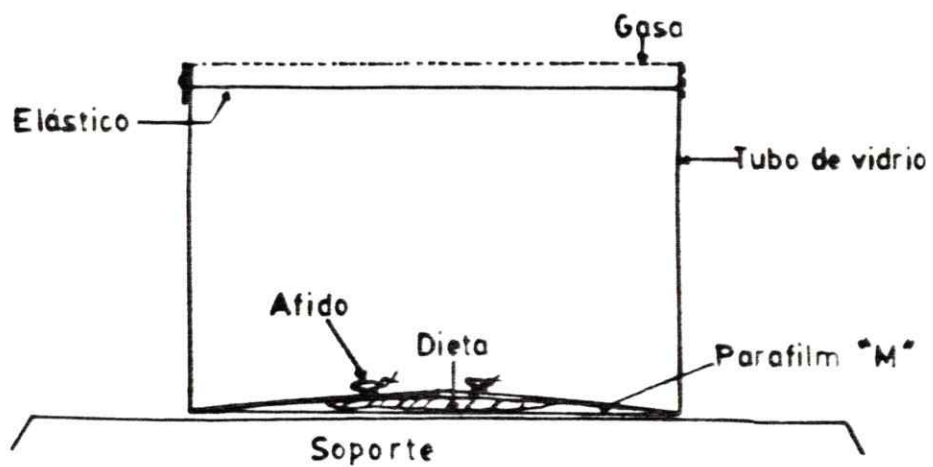


Figura 12. Sistema usado en la alimentación de áfidos con dietas artificiales

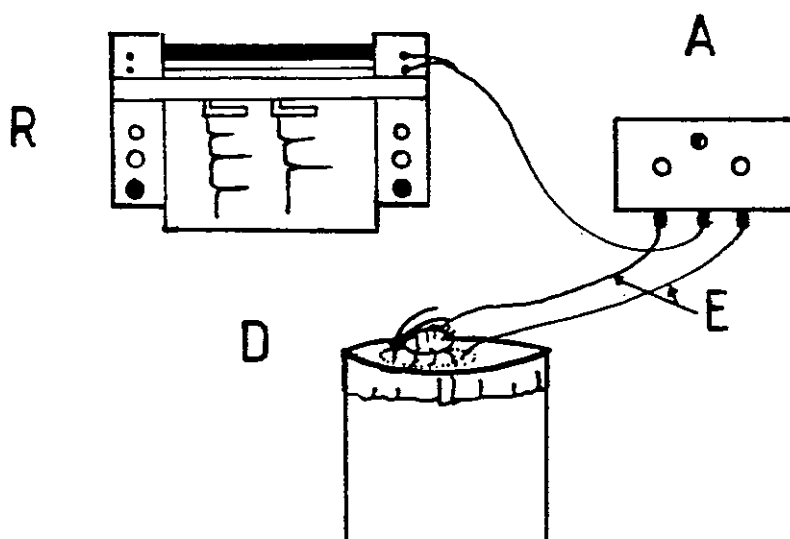


Figura 13. Diagrama del sistema electrónico usado para medir conducta alimenticia de áfidos.

R= registrador, A= amplificador, E= electrodos  
D= áfido sobre la dieta.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1.-Variación de gramina con la edad y órgano de la planta

Gramina no se detectó en el fruto de *Hordeum vulgare* aún después de 12 hrs de imbibición. Se detectó gramina a los 2 días de iniciada la imbibición en la parte aérea y en la raíz (Tabla 1 ). La concentración en las raíces fue siempre inferior a la de las hojas, alcanzando un máximo a los 6 días de edad, para posteriormente decrecer (Tabla 1 ). La tasa de acumulación de gramina entre el 4 y 6 día fue de 0,99 mmoles/kg.p.f. Resultados similares se obtuvieron en otras variedades analizadas (Fig.14 ). Los valores encontrados a los 2, 4, 14 y 20 días de edad son significativamente diferentes por el método T ( MSD/2 =0,527,  $\alpha$  =0.05). En plantas germinadas en presencia de luz la concentración de gramina fue superior en aproximadamente un 10 % (Datos no mostrados).

#### 3.2.-Alcaloides indólicos en cebada

Se observó una gran variabilidad en el contenido de gramina en los diferentes cultivares. En algunos no se detectaron estos compuestos( cv.F.Union.) y en otros se encontró hasta sobre 4,8 mmoles/kg.p.f. (Límite de detección 0.01 mmoles/kg.p.f.) (Tabla 2).

Análisis cromatográficos (TLC) revelaron que en los extractos analizados el único alcaloide indólico presente



**Tabla 1. Variación del contenido de gramina en plantas de cebada.**

Gramina (mmol/kg. p. f.)			
Edad de la planta (días)	Coleoptilo	Epicotilo	Raíces
0	Nd	Nd	Nd
2	--	0,32±0,02	0,13±0,01
4	0,15±0,01	1,14±0,02	0,16±0,02
6	--	4,28±0,32	0,24±0,01
8	--	4,02±0,24	0,16±0,02
10	--	3,43±0,26	0,10±0,02

Frutos de cebada de la variedad **Abyssinian 5**, fueron sembrados en bandejas con papel filtro y mantenidas en una estufa de cultivo a 28± 2 °C. Los resultados corresponden al promedio de tres repeticiones, con su error estándar. Gramina fue cuantificada por el método de Ehmann. ND= no detectado

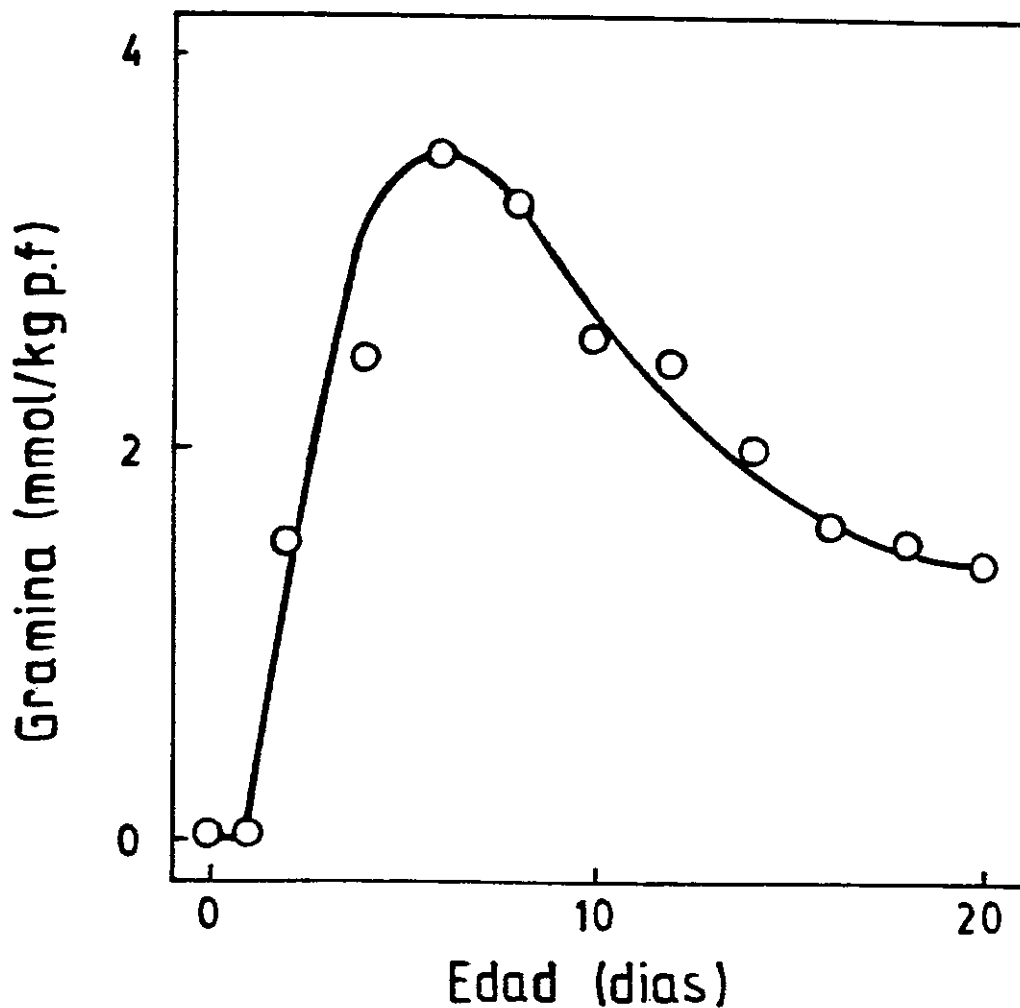


Figura 14 Variación del contenido de gramina con la edad de la plántula en la variedad Abyssinian 5

Semillas de cebada de la cv Abyssinian 5, fueron sembradas en oscuridad a  $28 \pm 2^\circ$ . Gramina fue analizada por el reactivo de Ehmann. Cada valor corresponde al promedio de tres muestras. Los errores estándar fueron inferiores al 10%.

Tabla 2. Contenido de gramina en diferentes cultivares de  
cebada.

Variedad	Concentración (mmol/kg.p.f)
F.Unión	N. D.
246-4	0,51 ±0,05
CM-67 Galt	0,20 ±0,02
Omugi	1,15 ±0,08
Abyssinian 5	4,24 ±0,39
Atlas 57	2,43 ±0,19
Atlas 68	0,93 ±0,08
Benton	4,00 ±0,30
Compound 1420	3,78 ±0,30
H 251	2,70 ±0,20
IAR H136	3,34 ±0,30
IAR H485	2,87 ±0,26
Cyprus Barley F5B121	4,06 ±0,32
UNA 206	3,09 ±0,28
WEIDER	2,44 ±0,23
79 ANMN	2,45 ±0,19
383059	2,47 ±0,18
7028-2759	2,27 ±0,22
CI 14032	1,97 ±0,18
EH 11F3 A.1.B.L.	4,49 ±0,34
GAW.12.1 22K NAA	2,27 ±0,20
42.1 14K N GONDAR	4,83 ±0,46
75.1 36K S.ADIGRAT	4,46 ±0,42
75.5 36K S.ADIGRAT	4,21 ±0,4
BREA "S" Celaya	1,52 ±0,14
Comun	1,67 ±0,13
X 81-T-1027	2,21 ±0,2
X 80-T-1023	N. D.
Cruzat	2,23 ±0,17

a) Las plantas fueron cultivadas en bandejas con papel filtro humedecido con agua y mantenidas en oscuridad en una estufa a  $28 \pm 2$  °C. Los valores corresponden al promedio de tres muestras de 6 días de edad. N.D= no detectado. ( Límite de detección=0,01 mmol/kg.p.f.). Gramina fue cuantificada por el método de Ehmman.

fue gramina. Hordenina no fue detectada en las hojas de ninguno de los cultivares analizados. La cuantificación de gramina usando espectroscopía UV entrega un contenido de gramina de alrededor de un 10 % más bajo. Este hecho es razonable si se considera que una reacción colorimétrica es más sensible a interferencias que puedan afectar la absorbancia

### 3.3.-Contenido de gramina y susceptibilidad de diferentes cultivares de cebada a áfidos.

La mayor tasa de crecimiento poblacional se obtuvo en la variedad **F. Union** (Fig 15), que no contiene gramina. En la variedad **Abyssinian 5** con un mayor contenido de gramina la tasa de crecimiento fue la menor, siendo las especies más afectadas **R. padi** y **R. maidis**. La especie menos afectada fue **M. dirhodum**, que además presenta una mayor tasa de crecimiento en la variedad control. Con el fin de determinar como variaba la susceptibilidad con la edad. Plantas de los mismos cultivares de 22 días de edad fueron infestados con áfidos. Se observó que respecto a plantas de 10 días de edad la tasa de crecimiento poblacional de los áfidos aumentó (Fig 16). El contenido de gramina en estas condiciones fue menor.

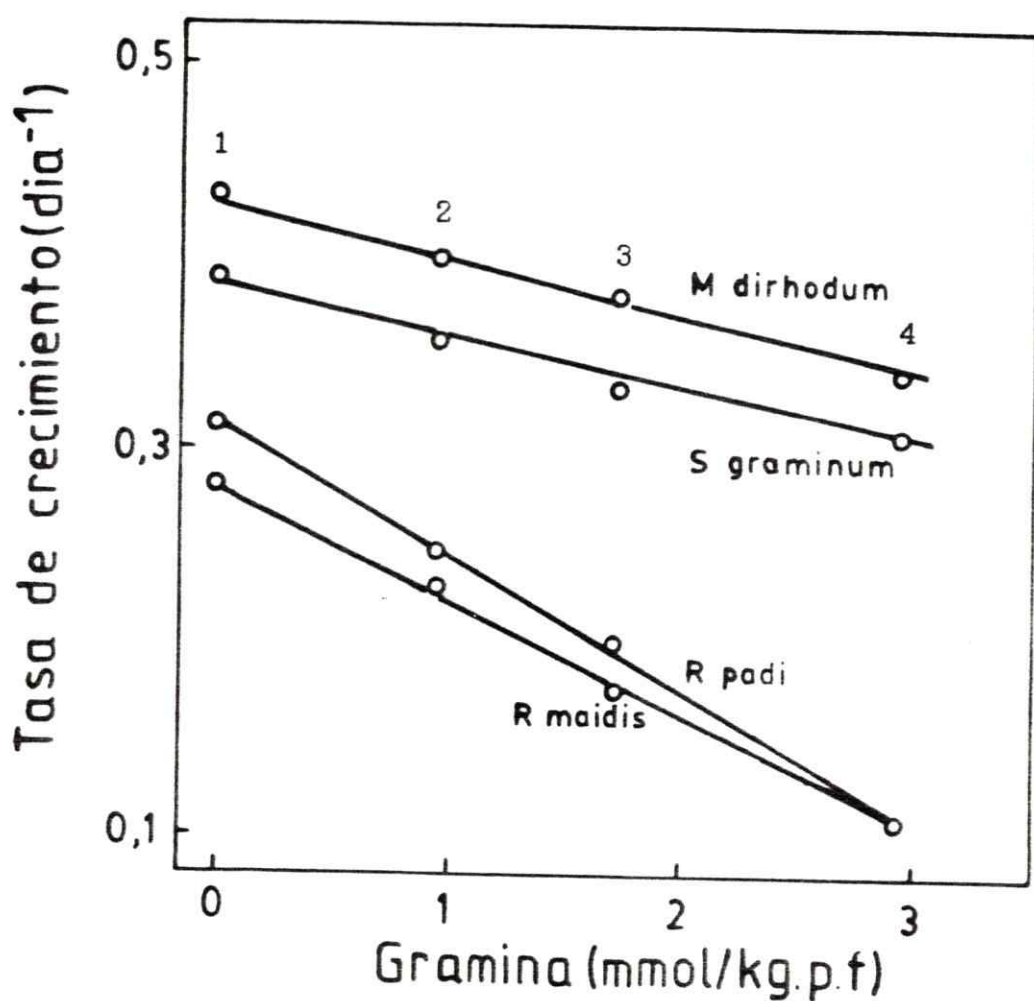


Figura 15. Contenido de gramina y susceptibilidad a áfidos en cultivares de cebada. Plántulas de cebada de 10 días de edad fueron infestadas con 2 áfido ápteros adultos. Las tasas de crecimiento de las poblaciones fueron determinadas 6 días más tarde. Cada valor corresponde al promedio de tres repeticiones. 1=F.Union, 2=CM67-Galt, 3=BREA "S"- Celaya, 4=Abyssinian 5. Tasa de crecimiento poblacional de áfidos=  $\ln(N_f/N_i)/\Delta t$

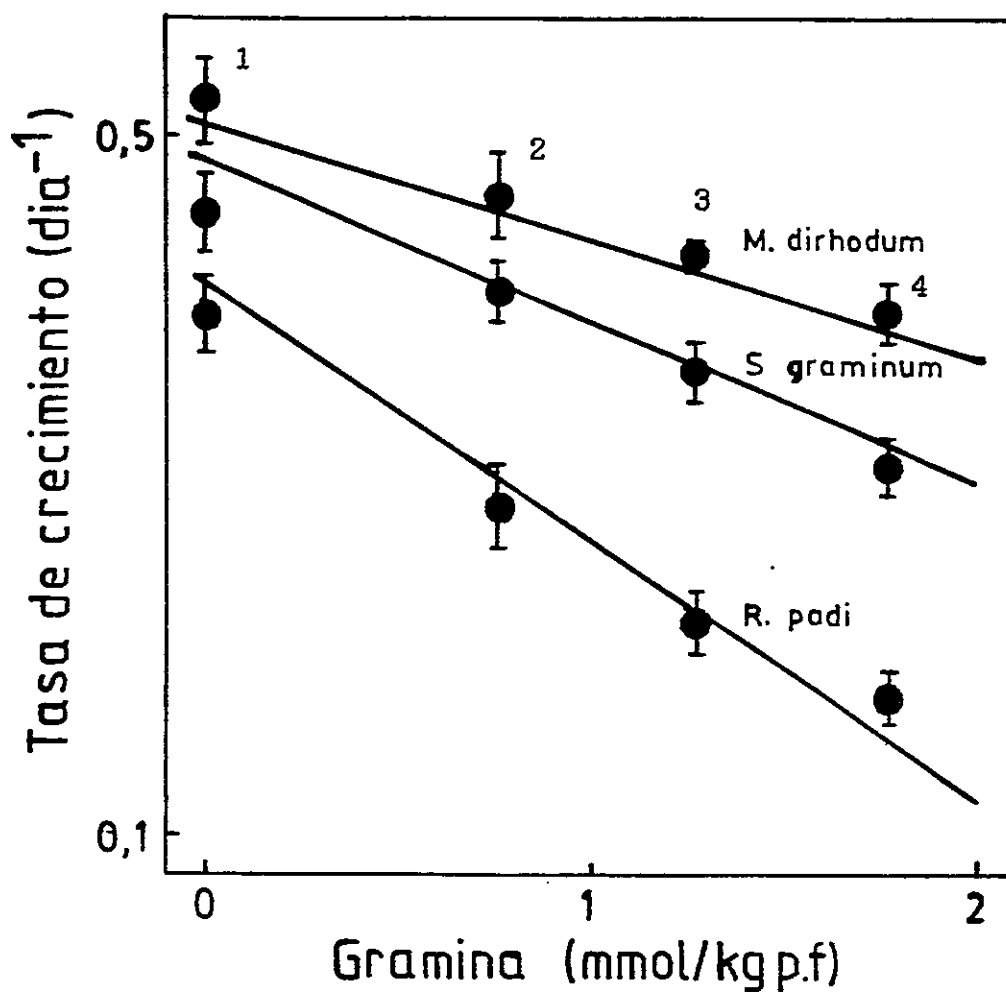


Figura 16. Contenido de gramina y susceptibilidad a áfidos en cebada. Se utilizaron plantas de cebada de 22 días de edad. Las condiciones fueron semejantes a la de la figura 16. 1=F.Union, 2=CM67-Galt, 3=BREA "S" Celaya, 4=Abyssinian 5. Las barras verticales corresponden a  $\pm 1$  e. e.

### 3.4.-Efecto de gramina sobre la localización de áfidos en cebada

El contenido de gramina en la variedad de cebada MCU-34, a los 22 días de edad presentó diferencias. La hoja más joven presentó la concentración más alta (Tabla 3). En el tallo fue la más baja. ( $P < 0.05$  por el test-t). *R. padi*, se localizó preferentemente en el tallo con pocos individuos en las hojas (diferencias significativas a  $P < 0.05$  por el test-t). *S. graminum* se localizó en las hojas, pero siempre en las zonas de menor concentración de gramina (Tabla 4) ( $P < 0.05$ , test-t).

### 3.5.-Efecto de gramina incorporada en plantas de cebada y la susceptibilidad a áfidos.

Plantas de cebada de 8 días de edad de la cv. F. Union, recién cortadas fueron sumergidas parcialmente en soluciones que contenían Cinetina ( $10^{-6}$  M) y gramina en diferentes concentraciones. A los 10 días de edad cada grupo fue infestado con hembras ápteras adultas de los áfidos *S. graminum* y *R. padi*. Seis días después se determinó el número de áfidos y la cantidad de gramina incorporada por las plantas. La Cinetina en la concentración usada impide la rápida senescencia de las hojas y no provoca en los áfidos efectos detectables. Se observó que la tasa de crecimiento poblacional de ambas especies de áfidos fue menor en el grupo de plantas que

Tabla 3 Distribución de áfidos en cebada

Organo	F.Union			MCU-34		
	Gram. (mmoles/kg.pf)	S.g (%)	R.p (%)	Gram. (mmoles/kg.pf)	S.g (%)	R.p (%)
tallo	N.D	7±2	51±4	0.49	23±3	81±5
H-1	N.D	60±7	35±4	2.3	55±4	14±5
H-2	N.D	33±2	14±4	2.7	22±2	5±3

Plantas de cebada de 22 días de edad, fueron puestas alrededor de plantas infestadas con áfidos ápteros. 24 hrs después se determinó el número de áfidos en cada planta. El porcentaje de áfidos en cada estructura fue determinado del total de áfidos presente en cada planta. Cada valor corresponde al promedio de 25 plantas ± 1 e. e. H-1= Hoja más senescente, H-2= Hoja más joven. S.g =S.graminum, R.p=R.padi. El número total de áfidos en cada cultivar fue: F. Union 36 S.g y 17 R.p, MCU-34 15 S.g y 8 R.p. Gram=gramina.



Tabla 4. Distribución de *S. graminum* en la hoja más nueva de cebada

Parte de la hoja	F.Union		MCU-34	
	Gramina (mmoles/kg pf)	S.g (%)	Gramina (mmoles/kg.pf)	S.g (%)
Base	N.D	46	1,7±0.2	74
Medio	N.D	26	2,5±0.2	17
Apice	N.D	28	3,2±0.2	9

El porcentaje de áfidos dentro de la hoja fue determinado a partir del número total de áfidos en esta hoja (Tabla 3). Cada valor corresponde al valor promedio de 25 plantas ± 1 e.e. S.g = *S. graminum*, R.p= *R. padi*

incorporó una mayor cantidad de gramina (Fig. 17). *S. graminum*, fue más afectado que *R. padi*. Estos resultados sugieren que en estas condiciones la gramina está en el sitio preferente de ingestión de *S. graminum* en una concentración mayor que la presente en el sitio de ingestión de plantas con contenido natural de gramina.

### 3.6.-Tasas de crecimiento poblacional de áfidos en plantas mantenidas en tierra y en medios hidropónicos.

Se mantuvo un macetero con tierra y el otro con un medio hidropónico suplementado con cinetina. Se observó que el incremento en el número de áfidos en ambos sistemas fue semejante (Tabla 5) (sin diferencias significativas,  $P > 0,05$  test-t). Además, la concentración de gramina no presentó diferencias significativas en ambos tratamientos (test-t). Esto es importante dado que valida los resultados obtenidos al medir efecto de gramina incorporada y, además, indica que la planta no sufre un daño fisiológico que repercuta sobre los áfidos.

### 3.7.-Localización tisular de gramina.

Se separó mecánicamente tejidos de cebada de la variedad X81-T-1031, que presenta gramina en forma natural y de la variedad F.Union, con gramina incorporada. En la Tabla 6 se observa que en la variedad X81-T-1031, la mayor concentración de gramina está en las células del mesófilo y en la epidermis, no detectándose en los haces vasculares.

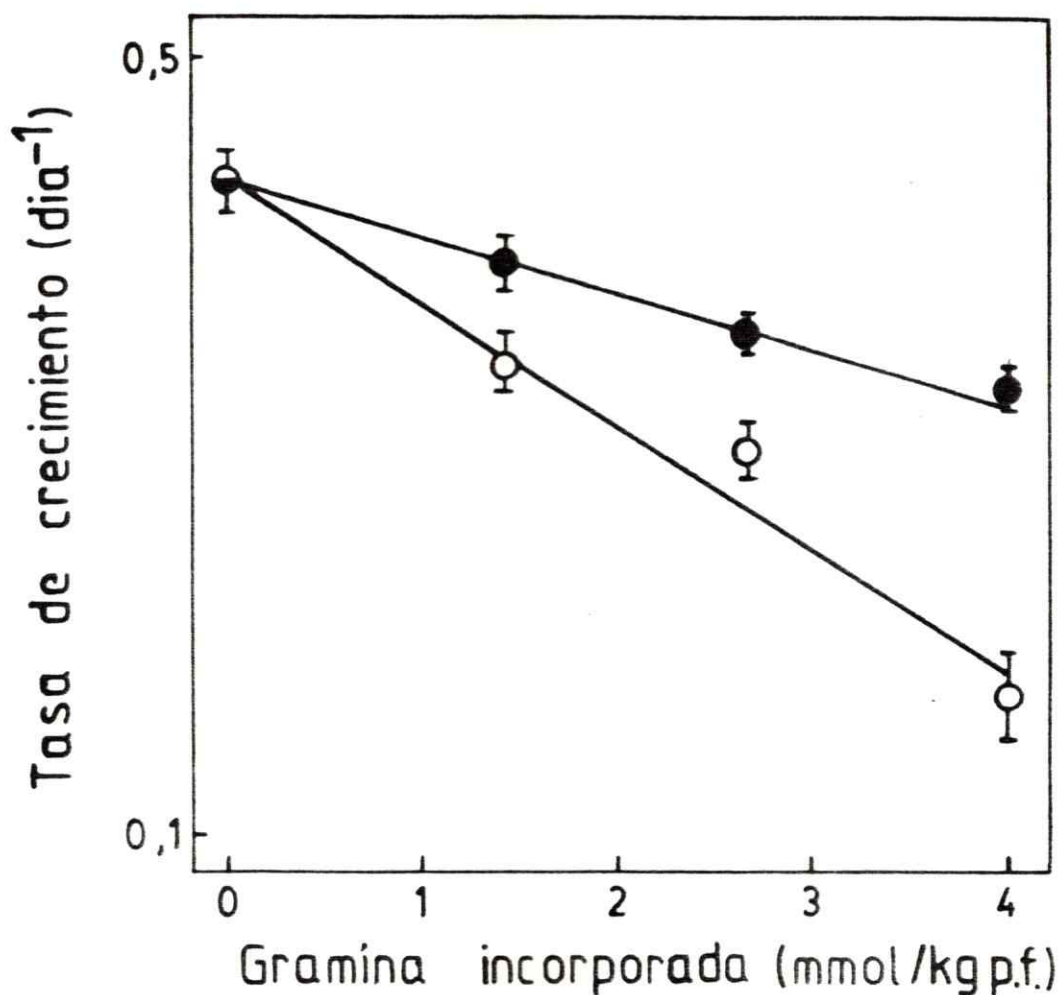


Figura 17. Efecto de la incorporación de gramina en plántulas de cebada sobre la susceptibilidad áfidis. Plántulas de cebada de 8 días de edad fueron sumergidas en soluciones que contenían cinetina  $10^{-6}$  M y diferentes concentraciones de gramina. Las hojas fueron infestadas con áfidis adultos de las especies *S. graminum* y *R. padi*. Cada valor corresponde al promedio de tres repeticiones de 5 plántulas cada una. ● = *R. padi*, ○ = *S. graminum*.

Tabla 5. Comparación entre las tasas de crecimiento de *S. graminum*, en plantas de cebada mantenidas en suelo y en medio hidropónico

		Suelo		Solución	
		Gramina	Tasa de Crec.	Gramina	Tasa de Crec.
F.Unión	ND.		0,42±0,01	ND	0,40±0,01
Atlas 57	0,66		0,34±0,01	0,72	0,35±0,01
Abyss. 5	2,75		0,30±0,01	2,81	0,31±0,01

Plantas de cebada de 10 días de edad mantenidas en suelo o en soluciones hidropónicas fueron infestadas con áfidos adultos de la especie *S. graminum*. Al final del experimento se determinó el contenido de gramina en cada sistema. No se observaron diferencias significativas. Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones ± 1 error estándar. Los valores de ambos tratamientos no mostraron diferencias significativas (test-t)

Tabla 6. Localización tisular de gramina en plantas de cebada.

	Natural	Incorporada
	mmoles/kg. p. f.	
Hoja completa	1,23±0,02	1,38±0,09
Epidermis inf.	2,23±0,04	ND
Epidermis sup.	1,96±0,04	ND
Haces vasculares	ND	2,83±0,01
Mesófilo	3,08±0,01	ND

Plantas de cebada de 12 días de edad del cultivar GAW 131.1 94K.E. AMBO. fueron usadas en la determinación de gramina localizada en forma natural. Plantas de cebada de la variedad F. Union de la misma edad mantenida durante 6 días en una solución con gramina 3 mM, fueron usadas para medir gramina incorporada. Los valores corresponden al promedio de 3 repeticiones ± 1 e.e

En la variedad **F. Union**, que incorporó gramina, el mayor contenido está en los haces vasculares, encontrándose en la epidermis un contenido muy bajo que puede corresponder a contaminación (Tabla 6). Debido a que la incorporación de gramina afecta más a **S. graminum** que a **R. padi** (Fig. 17), es posible que **S. graminum** se alimente preferentemente de los haces vasculares de la planta, mientras que **R. padi**, se alimentaría en células del mesófilo de la hoja.

### 3.8.-Efecto de gramina sobre áfidos alimentados con dietas artificiales.

#### i) Sobrevivencia.

Áfidos adultos de las especies: **S. graminum**, **R. padi**, **M. dirhodum** y **R. maidis**, fueron alimentados con dietas artificiales con diferentes concentraciones de gramina. El porcentaje de sobrevivencia de los áfidos disminuyó con la cantidad de gramina incorporada en la dieta (Fig 18). La especie más susceptible fue **S. graminum**, cuyo LD50 = 0,9 mM. La especie **M. dirhodum** es la menos afectada con un LD50 mayor (3.4 mM).

#### ii) Cantidad de dieta ingerida

Se determinó la cantidad de dieta ingerida por 10 áfidos pesando los sacos formados por las 2 láminas de parafilm M antes y después de 7 hrs de alimentación de los áfidos. La cantidad de dieta ingerida por los áfidos disminuyó con la cantidad de gramina incorporada en la dieta (Fig. 19). **R.**

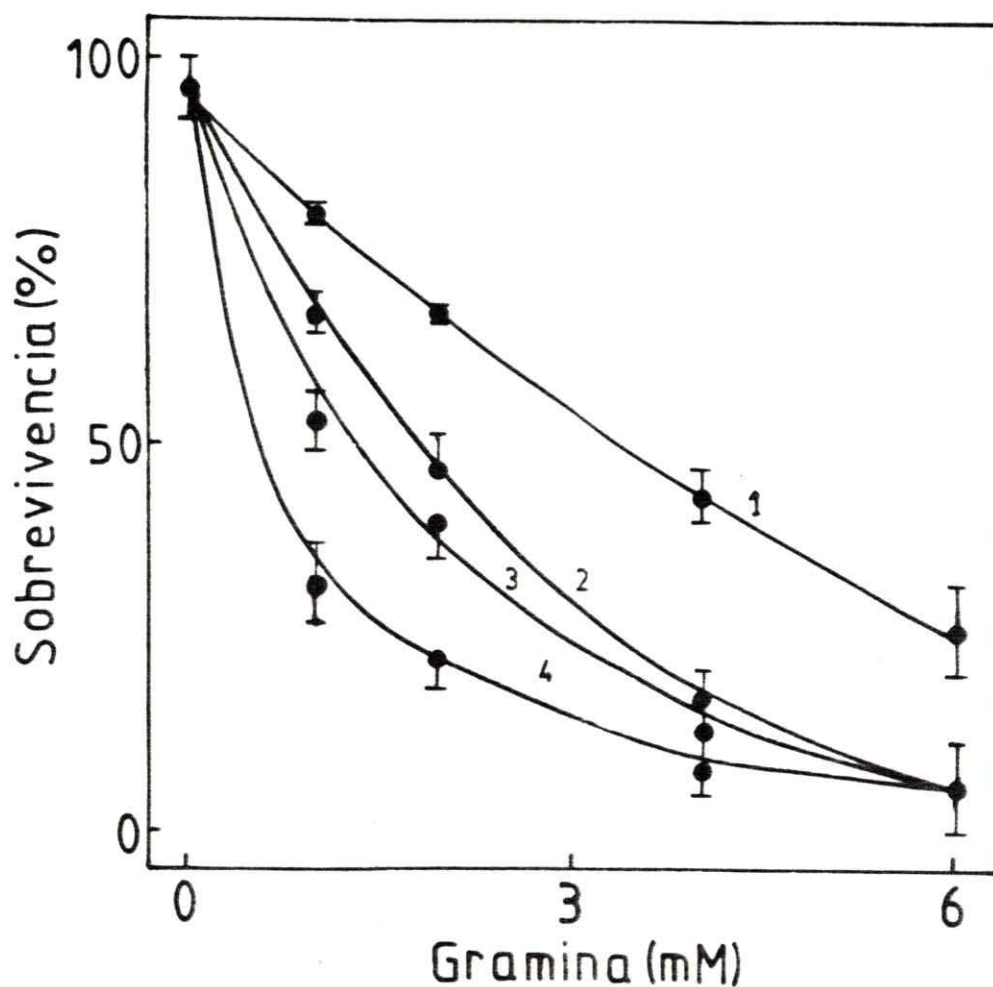


Figura 18. Efecto de gramina sobre la sobrevivencia de áfidos alimentados con dietas artificiales. La sobrevivencia fue determinada a las 48 hrs. Cada valor corresponde al promedio de tres muestras de 10 áfidos cada una. Las barras verticales representan 1 e.e. 1=*M. dirhodum* 2=*R. maidis*, 3=*R. padi*, 4=*S. graminum*.

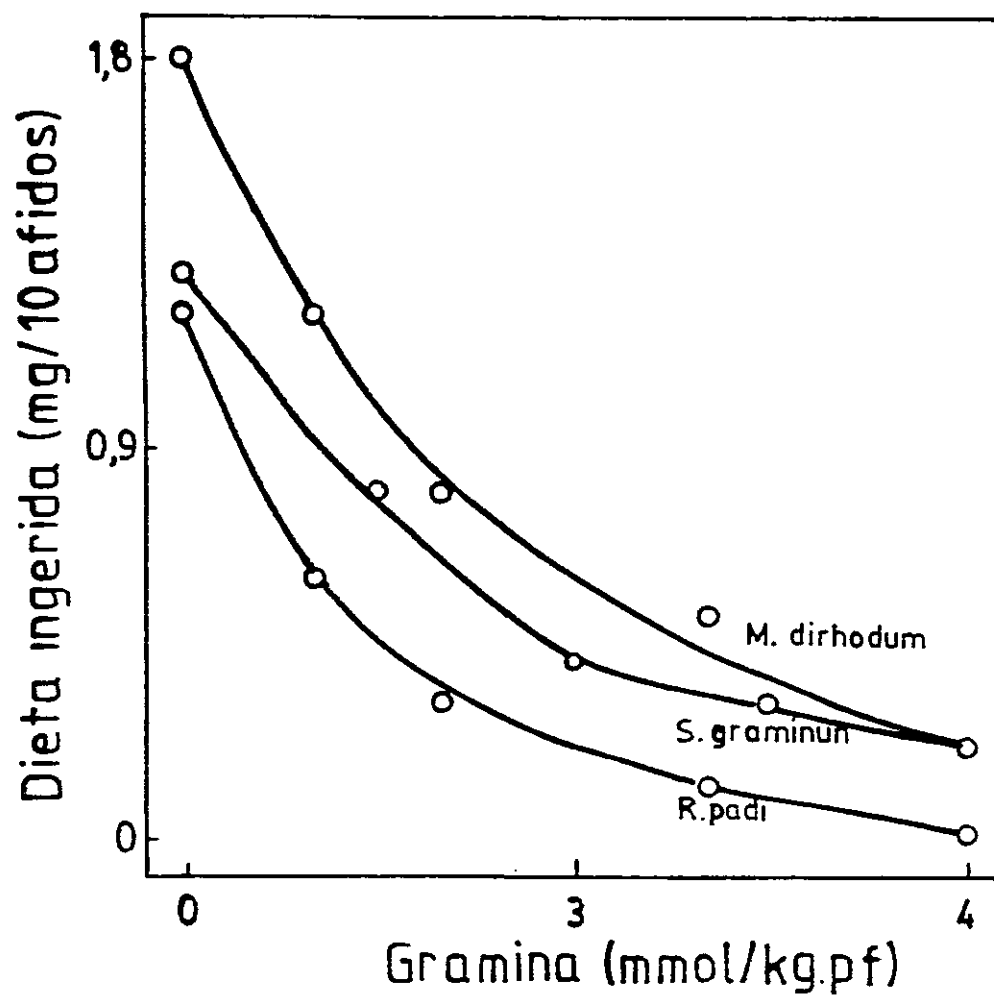


Figura 19. Efecto de gramina sobre la cantidad de dieta ingerida por áfidos La cantidad de dieta ingerida fue determinada pesando las láminas de Parafilm M con la dieta a las 7 hrs. Cada valor corresponde al promedio de tres muestras de 10 áfidos cada una. Los errores estándar fueron inferiores al 10 %.



**padi**, incorporó una menor cantidad de dieta a concentraciones de **gramina** más bajas que el resto de los áfidos.

### iii) Índice de reproducción

**Gramina** en las concentraciones a las cuales es ingerida, disminuyó el índice de reproducción de todas las especies de áfidos (Fig.20). El efecto sobre **S. graminum**, **R. padi** y **R. maidis** no presenta diferencias significativas ( $t_{test-tP} > 0,05$ ). Para **M. dirhodum** a las mismas concentraciones de **gramina** el efecto es menor.

### 3.9.-Efecto de **gramina** sobre la mortalidad de áfidos.

Para determinar si **gramina** tiene un efecto tóxico y/o repelente, se alimentaron áfidos de las especies **R. padi** y **M. dirhodum** en dietas con diferentes concentraciones del compuesto por 7 h. y luego fueron transferidos a dietas control determinándose la sobrevivencia 48 h después. La mayor sobrevivencia para ambas especies se observó a concentraciones 0 y 6 mM de **gramina** (Fig.21). La menor sobrevivencia se obtuvo a concentraciones bajas del compuesto. Para **R. padi**, la concentración tóxica fue más baja que para **M. dirhodum**. La disminución del porcentaje de sobrevivencia observada fue estadísticamente significativa (método T,  $MSD/2 = 14,5$  y  $13,85$  para **R. padi** y **M. dirhodum** respectivamente). Estos resultados sugieren que la alta mortalidad observada a concentraciones sobre 3 mM de

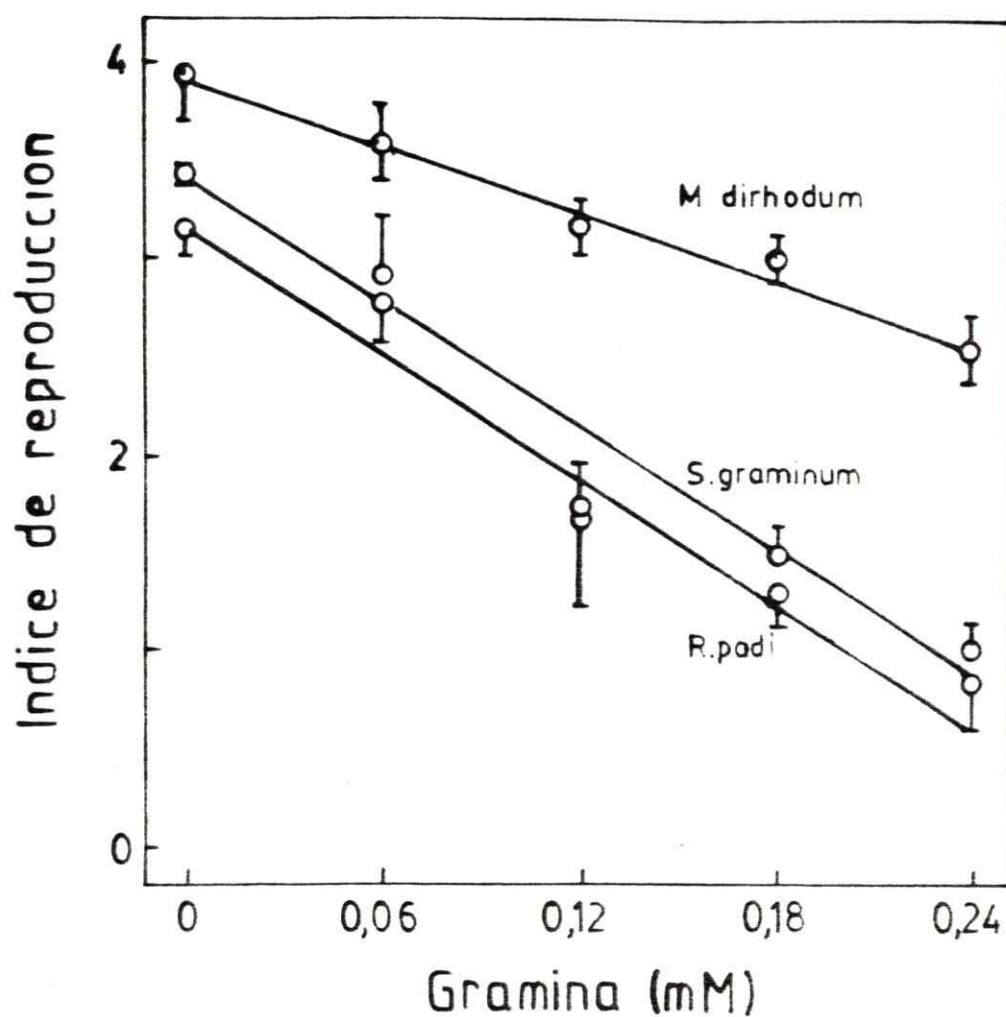


Figura 20. Efecto de gramina sobre el índice de reproducción de áfidos. Los áfidos fueron mantenidos en dietas por un lapso de 72 hrs. Cada valor corresponde al promedio de tres repeticiones de 10 áfidos cada uno. Índice de reproducción =  $\sum \text{ninfas} / \bar{x}$  adultos

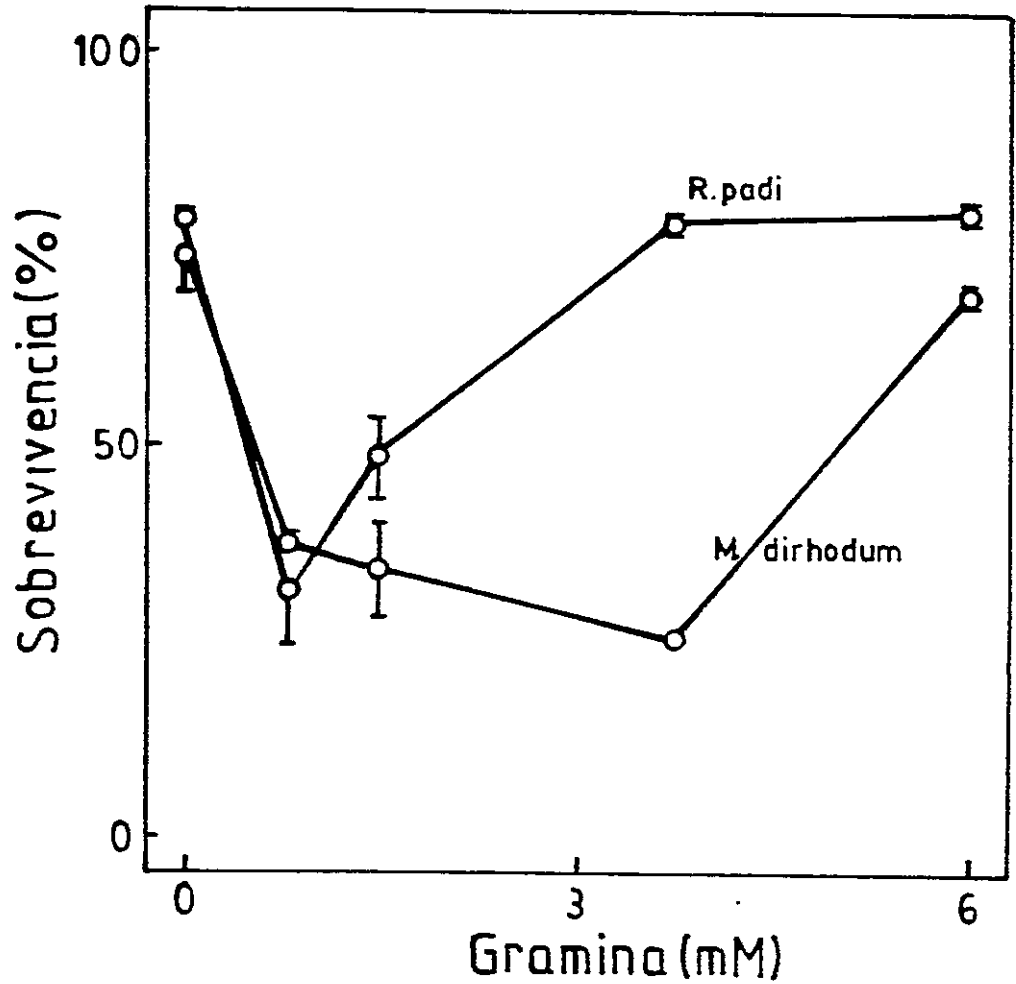


Figura 21. Efecto de gramina sobre la mortalidad de áfidos. Los áfidos fueron alimentados por 6 hrs en dietas con diferentes concentraciones de gramina y luego transferidas al dietas control. Se determinó la sobrevivencia a las 48 hrs. cada valor corresponde al promedio de tres repeticiones  $\pm$  1 e. e.

gramina podría ser producto de inanición.

### 3.10.-Conducta alimenticia de áfidos.

Los resultados muestran que cuando los áfidos son alimentados en dietas que contienen gramina 1 mM, se produce varios periodos de salivación y prueba de la dieta para finalmente ingerir durante un corto tiempo (Fig. 22 B). Al alimentar los áfidos con gramina 3 mM, se registran solo señales de salivación, sin que se produzca ingestión durante el lapso de estudio (2 hrs) (Fig 22 C). Estos resultados sugieren que gramina tiene un efecto repelente para los áfidos. El tiempo de ingestión de dieta también disminuyó con el contenido de gramina. *R.padi* se alimentó en la dieta control un período de tiempo inferior a *S. graminum* (Fig. 23 ). Estos resultados concuerdan con los obtenidos al determinar la cantidad de dieta ingerida pesando las laminas de Parafilm M.

### 3.11.-Efecto de hordenina en la sobrevivencia de *S.graminum*

Entre los objetivos planteados en esta tesis, estaba el determinar el papel de hordenina en las interacciones cebada-áfidos. Si bien este metabolito no fue detectado en ninguno de los cultivares analizados y considerando que este compuesto puede ser degradado en raíces de cebada a p-hidroxibenzaldehido (Russo y Gros, 1982), se estudiaron los efectos de ambos compuestos sobre áfidos alimentados con dietas artificiales.

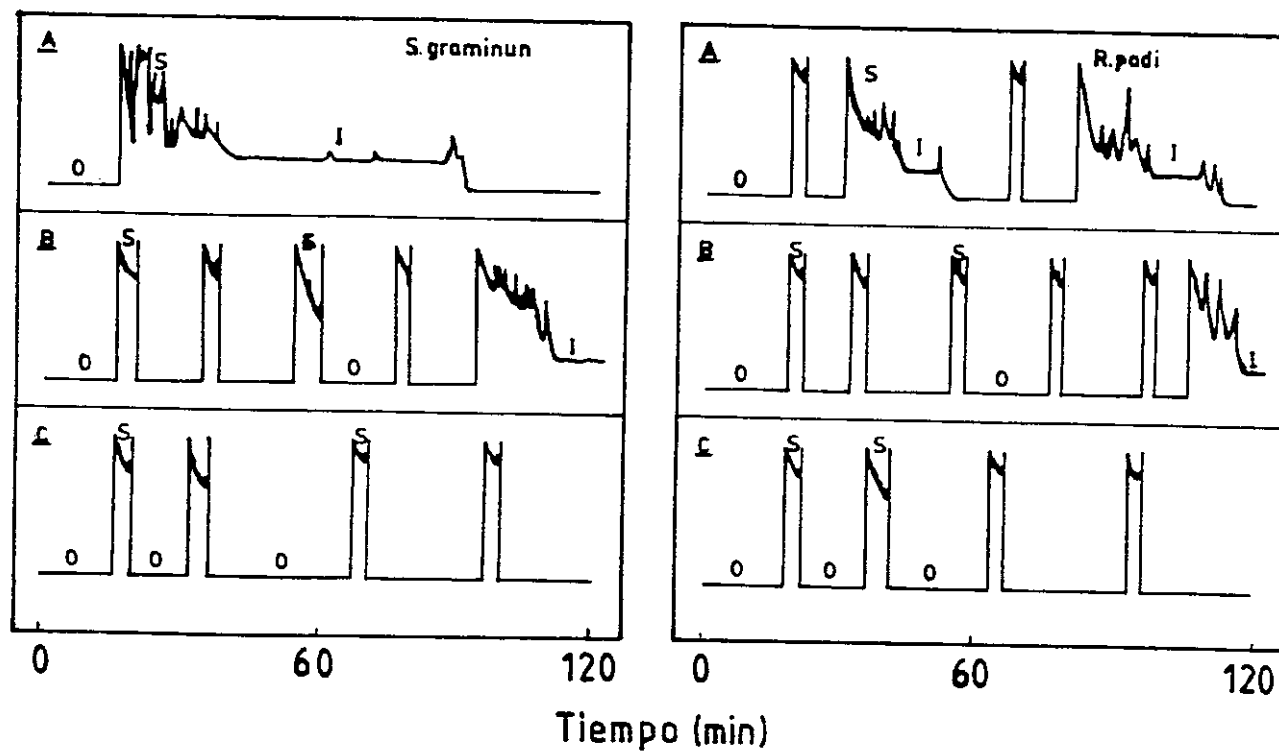


Figura 22. Determinación electrónica de la conducta alimenticia de áfidos en dietas artificiales  
 A= dieta control, B= 1 mM Gramina C= 3 mM Gramina  
 O= Línea base, S= Salivación, I=Ingestión  
 En cada ensayo se utilizó 6 áfidos adultos.

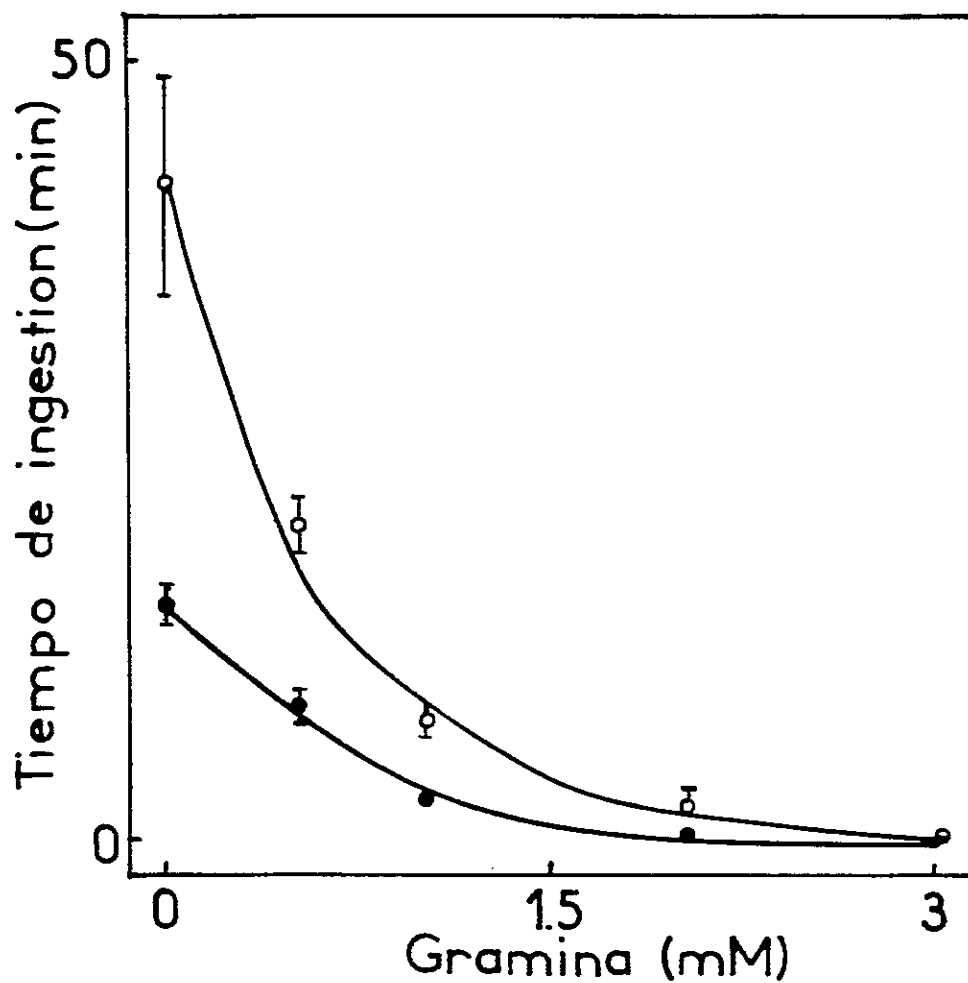


Figura 23. Tiempo de ingestión de dieta con distintas concentraciones de gramina por áfidos. Cada áfido fue alimentado por un período de 2 hrs. Cada valor corresponde al promedio de 6 mediciones  $\pm$  1 e.e. (O)=*S. graminum* (●)=*R. padi*.

Hordenina disminuyó la sobrevivencia de *S. graminum*, alimentado con dietas artificiales (Fig.24). Sin embargo, el efecto es inferior al observado con gramina (LD50= 2.2 mM). La cantidad de dieta ingerida por *S. graminum*, disminuyó con la concentración de hordenina en la dieta (Fig.25 ).

De la misma manera se determinó el efecto de p-hidroxibenzaldehído. No se observó ningún efecto sobre la tasa de crecimiento poblacional de *S. graminum* (Tabla 7). Además, p-Hidroxibenzaldehído no tuvo ningún efecto sobre la sobrevivencia de *S. graminum*, en concentraciones hasta 6 mM (Tabla 8).

Debido a que no se detectó hordenina en los cultivares analizados no fue posible proseguir el estudio del posible papel de este compuesto. A pesar que hordenina produce efectos deletéreos sobre los áfidos, no es posible aún involucrarla en la resistencia a insectos.

### 3.12.-Efecto del déficit hídrico sobre la susceptibilidad de cebada cv.F. Union a *S. graminum*.

Durante el desarrollo de la parte experimental de este trabajo se pudo observar que las poblaciones de áfidos aumentaban cuando las plantas sufrían períodos de sequía en el laboratorio. Por esta razón se decidió estudiar el efecto del déficit hídrico sobre la susceptibilidad de la cebada a áfidos.

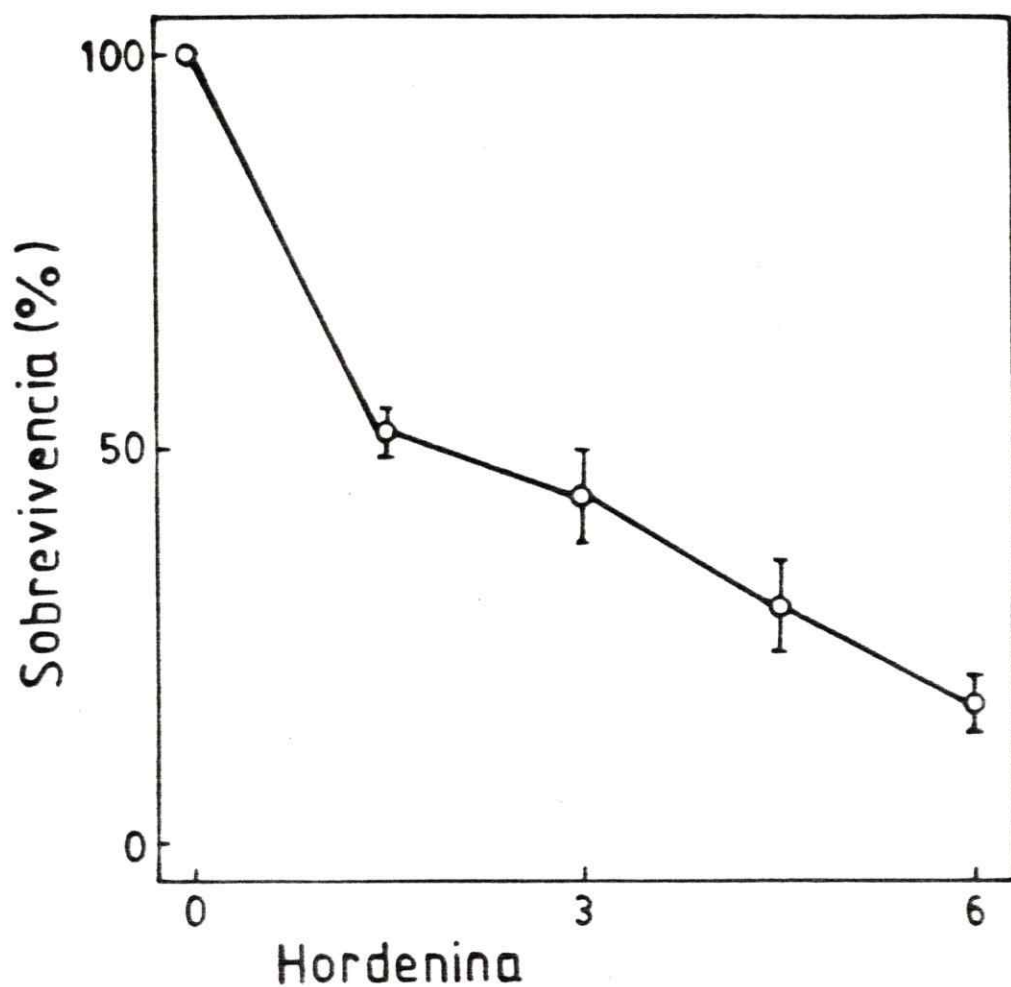


Figura 24. Efecto de hordenina sobre la sobrevivencia de *S. graminum*. Ninfas de *S. graminum* fueron alimentadas con dietas conteniendo hordenina en diferentes concentraciones. La sobrevivencia fue determinada a las 48 hrs. Cada valor representa el promedio de tres muestras de 10 áfidos cada una. Las barras verticales representan 1 e.e.



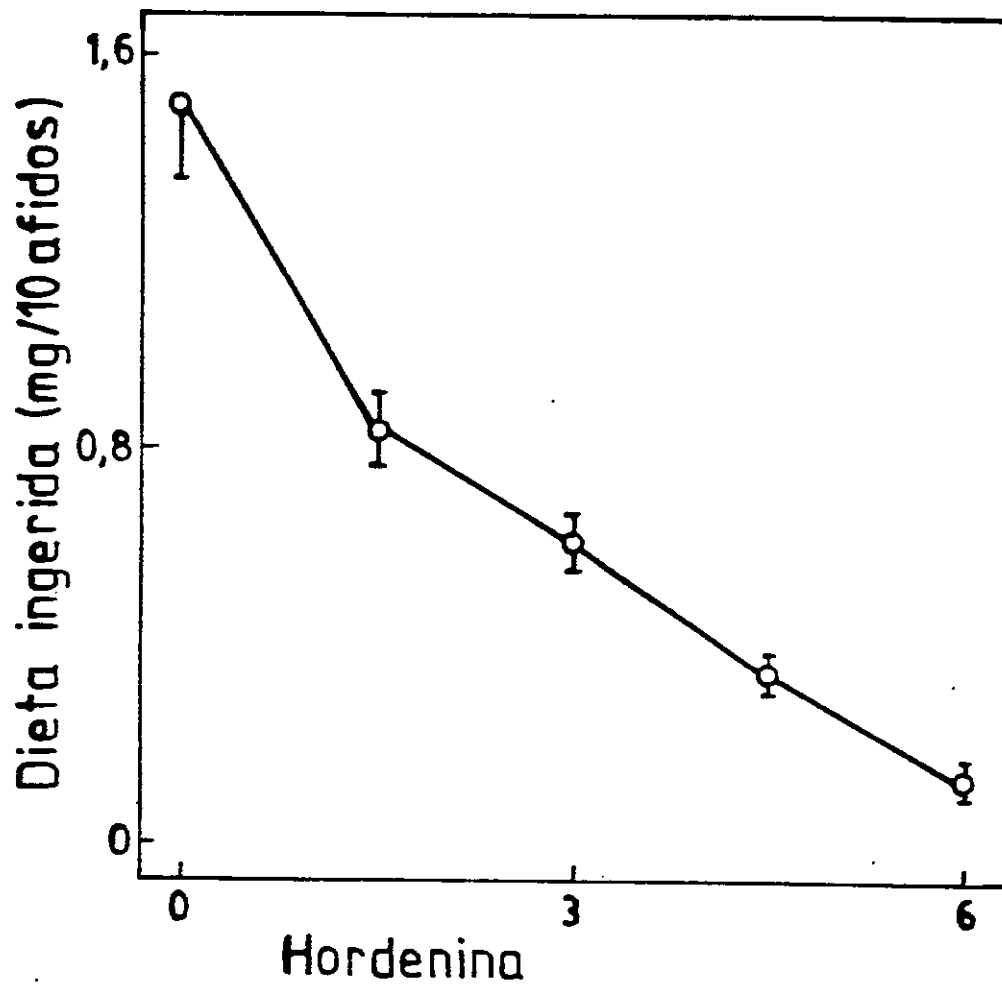


Figura 25. Efecto de hordenina sobre la cantidad de dieta ingerida por *S. graminum*. La cantidad de dieta ingerida fue determinada luego de alimentar a los áfidos por 7 hrs.

Tabla 7. Efecto de la incorporación de p-hidroxibenzaldehído en cebada sobre *S. graminum*

p-Hidroxibenzaldehído (mM)	Tasa de crecimiento ( $\text{día}^{-1}$ )
0,0	0,37±0,03
1,5	0,40±0,06
3,0	0,39±0,06
6,0	0,39±0,06

Plántulas de cebada cv F.Union de 8 días de edad fueron sumergidas en soluciones de cinetina ( $10^{-6}$  M ) y p-hidrobenzaldehído. A los 10 días de edad las plantas de cada tratamiento fueron infestadas con áfidos ápteros adultos de la especie *S.graminum*. La tasa de crecimiento poblacional fue determinada seis días después. Cada valor corresponde al promedio de tres muestras de 10 plantas cada una  $\pm$  1 e.e. No hubo diferencias significativas entre el control y los tratamientos (test-t  $P>0.05$ )

Tabla 8. Efecto de p-hidroxibenzaldehído sobre *S. graminum* alimentados con dietas artificiales

p-Hidroxibenzaldehído (mM)	Sobrevivencia (%)
0,0	94±5
1,5	93±5
3,0	98±2
4,5	94±5
6,0	93±5

La sobrevivencia fue determinada al cabo de 48 hrs. cada valor corresponde al promedio de tres muestras de 10 áfidos cada una ± 1 e.e

La tasa de crecimiento poblacional de los áfidos aumentó con la disminución del potencial hídrico de las plantas (Fig.26). Esto sugiere que el déficit hídrico induce cambios en la concentración de algunas sustancias que incrementarían la susceptibilidad de la planta al ataque de áfidos.

### 3.13. Efecto del déficit hídrico en la susceptibilidad de cultivares de cebada a áfidos.

Al estudiar el efecto del déficit hídrico en los cultivares de cebada F. Union, Cruzat y MCU-34. Se observó (Fig. 27) que la tasa de crecimiento de las poblaciones de ambas especies de áfidos fue mayor en las plantas con un mayor grado de estrés. Estos resultados permiten postular entonces que el estrés hídrico incrementa la susceptibilidad de cebada a áfidos.

### 3.14. Efecto del déficit hídrico en el contenido de gramina, prolina y glicina-betaína.

Se determinó el potencial hídrico de los cultivares F. Union, Cruzat y MCU-34 y se cuantificó el contenido de gramina, prolina y glicina-betaína. Se observó que el contenido de gramina varía muy poco en las hojas con potenciales hídricos diferentes (Tablas 9,10). Sin embargo, el contenido de prolina y glicina betaína incrementó con la disminución del potencial hídrico de las hojas (tabla 10). En el cultivar F. Union prolina incrementó aproximadamente

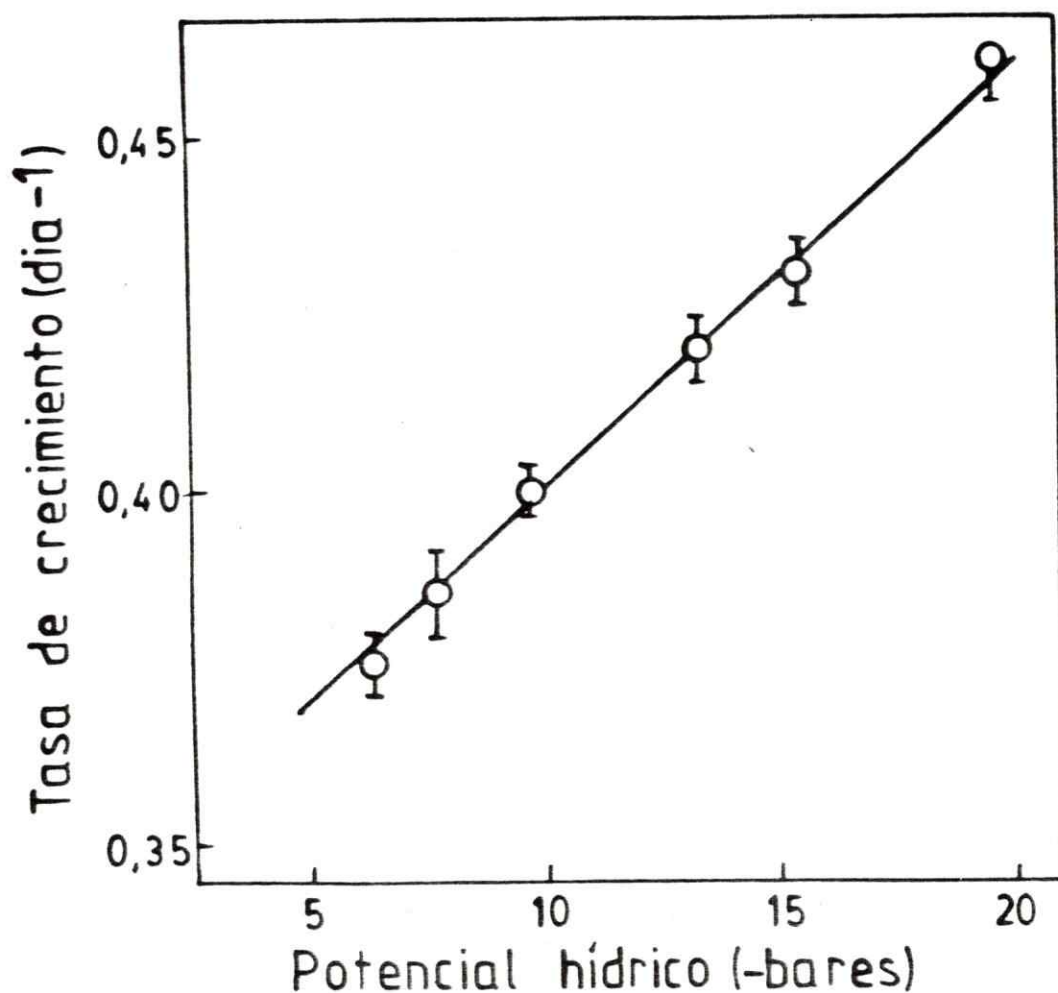
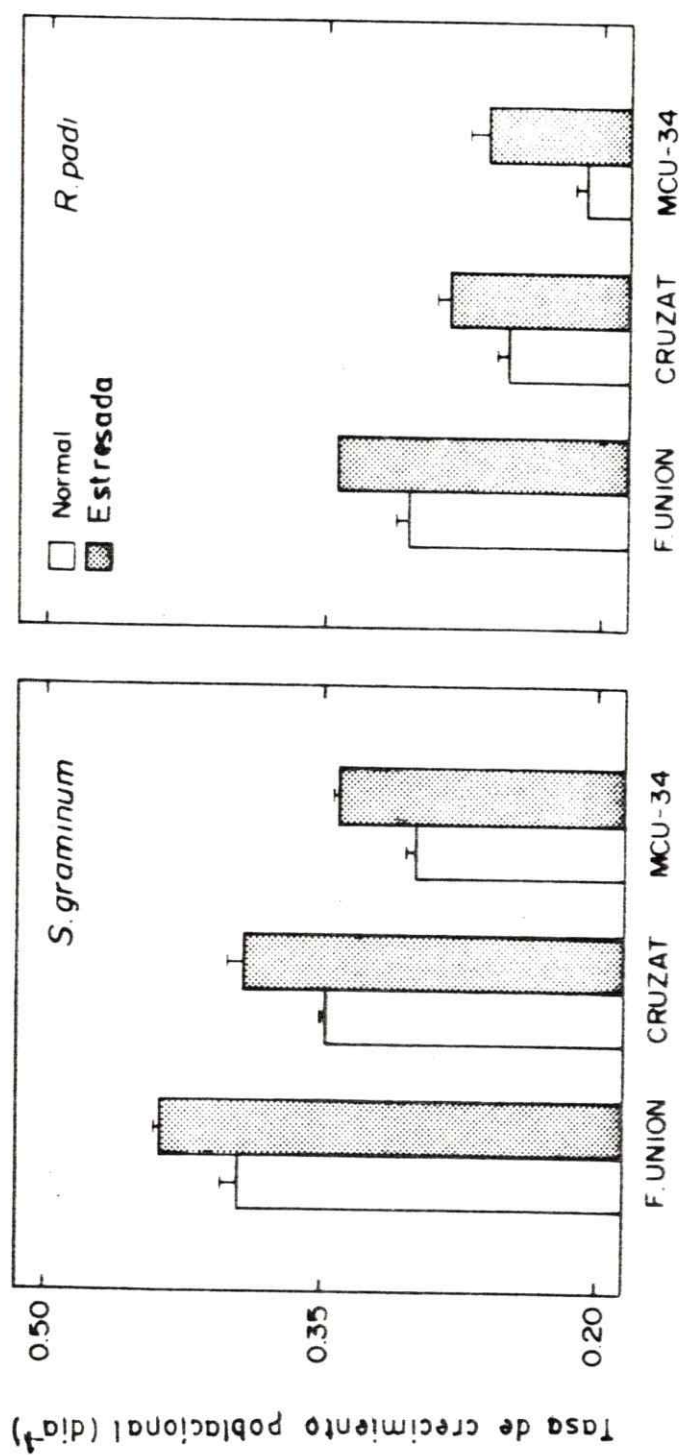


Figura 26. Efecto del déficit hídrico sobre la susceptibilidad de cebada a *S. graminum*. Plantas de cebada cv. **F Union** de 4 días de edad, fueron sometidas a diferentes condiciones de riego. A los 10 días cada grupo fue infestado con 2 áfidos ápteros adultos por planta. La tasa de crecimiento poblacional fue determinada seis días mas tarde. Cada valor representa el promedio de 3 muestras de 10 plántulas cada una  $\pm 1$  e. e.



Cultivar

Figura 27. Efecto del déficit hídrico sobre la susceptibilidad de la cebada a áfidos. Grupos de plantas de 10 días de cada cultivar sometidas a déficit hídrico, fueron infestadas con áfidos adultos de ambas especies. Las tasas de crecimiento poblacional fueron determinadas seis días después. Cada valor corresponde al promedio de tres repeticiones

± 1 e. e.

5 veces mientras mientras que glicina-betaína aproximadamente 2 veces (Fig. 28 ).

**3.15. Efecto de prolina, colina y glicina-betaína, incorporada en plantas de cebada, sobre la susceptibilidad a *S. graminum***

Grupos de plantas de cebada de la variedad F. Union , de 8 días de edad recién cortadas, fueron puestas en soluciones que contenían, cinetina ( $10^{-6}$  M ) y colina, prolina y glicina-betaína en concentraciones semejantes a las presentes en plantas bajo déficit hídrico. A los 10 días de edad cada grupo se infestó con hembras ápteras adultas del áfido *S. graminum* . Seis días después se determinó el incremento en el número de áfidos y la cantidad de cada compuesto incorporado por las plantas. Los resultados mostraron que sólo en el ensayo con glicina-betaína se produjo un incremento en la población de áfidos (Fig 29). Con colina a concentraciones altas hay una disminución en la tasa de crecimiento (Fig 29)

**3.16. -Efecto de prolina, colina y glicina-betaína sobre *S. graminum* , alimentados con dietas artificiales**

Se alimentaron ninfas de *S. graminum* , con dietas artificiales a las cuales se agregó prolina, colina y glicina-betaína en concentraciones semejantes a las encontradas en plantas bajo déficit hídrico.

Los resultados demostraron que prolina y

**Tabla 9. Efecto del déficit hídrico sobre el contenido de gramina en la variedad GAW.131.1 94K.E.AMBO.**

Potencial hídrico ( - bares)	Gramina (mmol/kg.p.s.)
4,7	29 ±0,22
8,3	27 ±0,4
11,8	32 ±0,8

Grupos de plantas de 4 días de edad mantenidas en una cámara de cultivo, fueron sometidas a diferentes condiciones de riego diario. A los 10 días de edad se determinó el potencial hídrico usando la técnica de la bomba de presión. Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones ± 1 e.e.

Sin diferencias significativas (test-t, P=0.05)



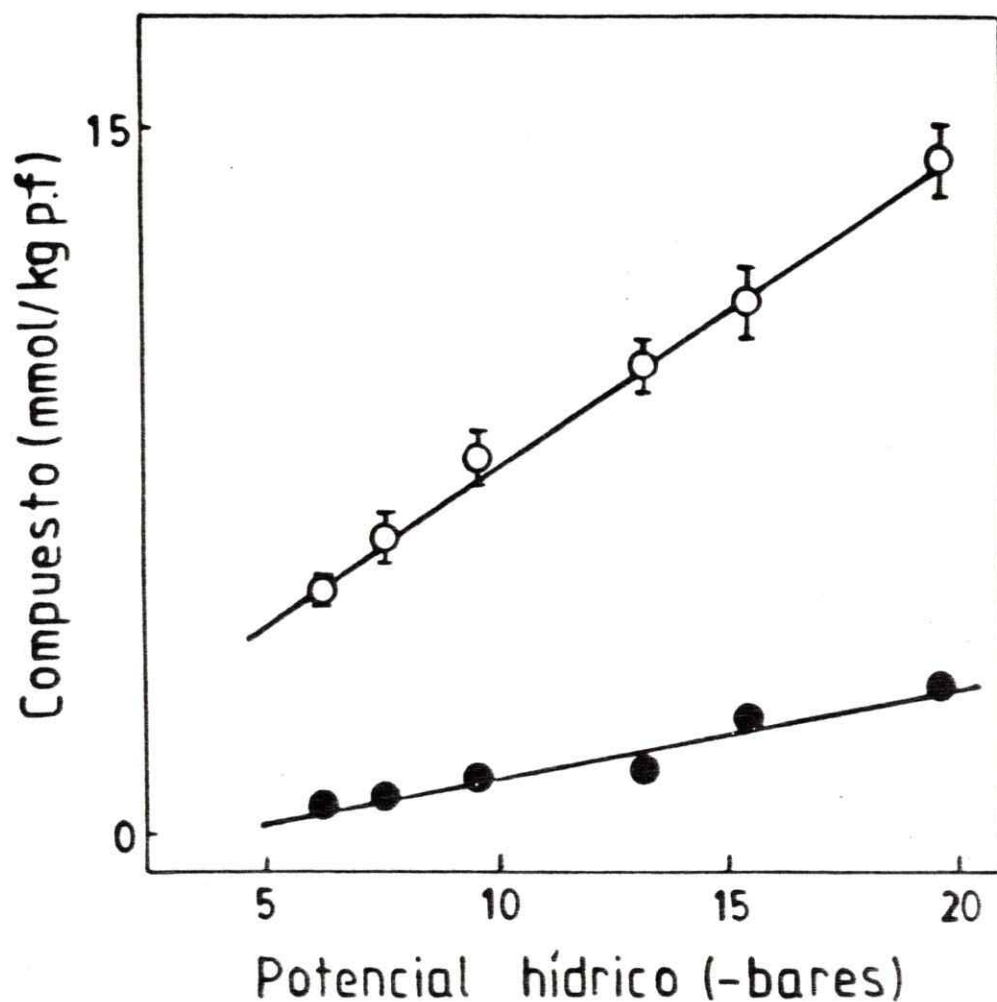


Figura 28. Efecto del déficit hídrico sobre el contenido de prolina y glicina-betaína en cebada. El contenido de prolina y GB, fue determinado en plantas de 10 días de edad. Cada valor corresponde al promedio de tres muestras  $\pm$  1 e.e. O= GB, ●=Prolina.

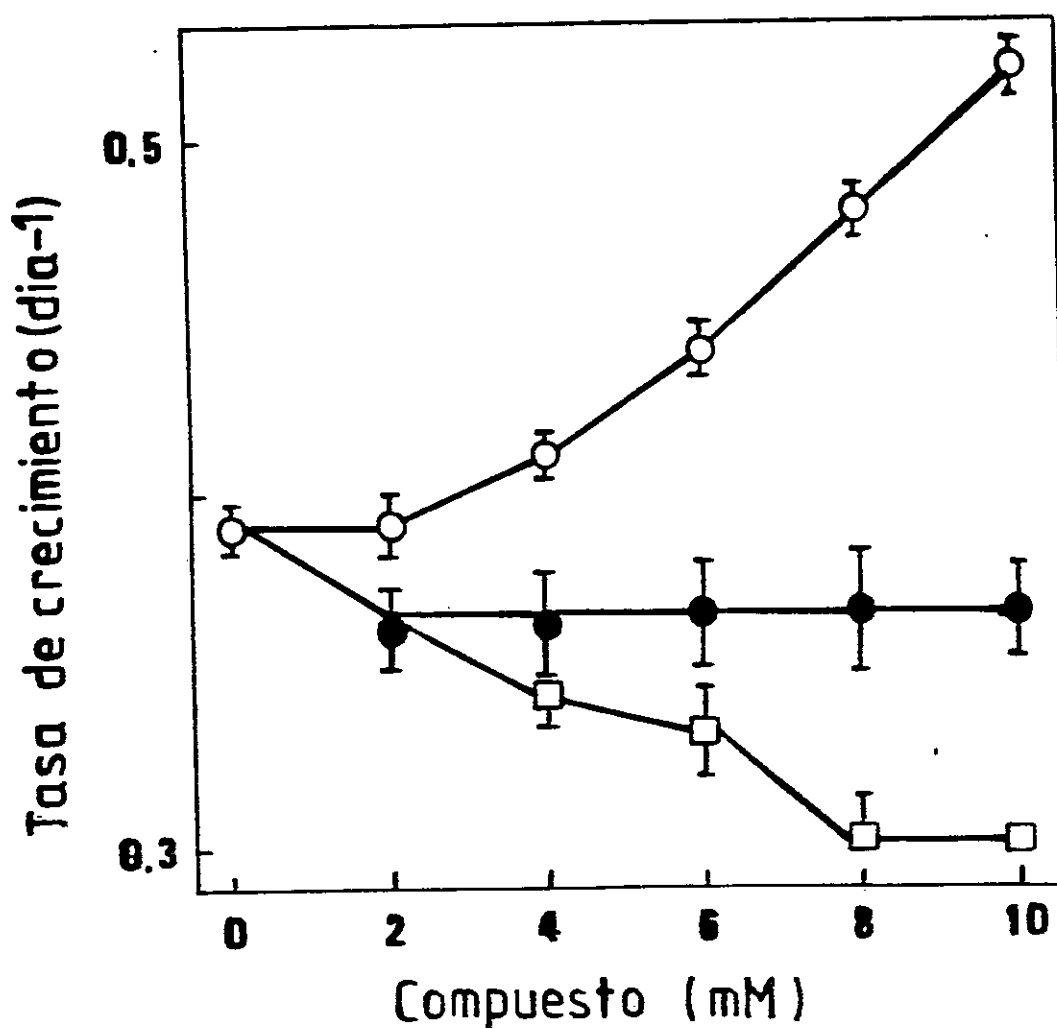


Figura 29. Efecto de la incorporación de metabolitos acumulados bajo estrés sobre la susceptibilidad de cebada a *S. graminum*. Plántulas de cebada de 8 días de edad, fueron sumergidas en soluciones que contenían cinetina  $10^{-6}$  M, GB (o), prolina (●) y colina (□). Los valores entre el control y 10mM son diferentes para GB y Colina (test-t,  $P=0.05$ ).

glicina-betaína no afectaron la sobrevivencia de los áfidos (Tabla 11). Colina, en cambio produjo una leve disminución de la tasa de sobrevivencia de *S. graminum* a la concentración 6 mM. La cantidad de dieta ingerida por los áfidos no sufre variación respecto del contenido de prolina y glicina-betaína. Colina a concentraciones altas disminuyó la cantidad de dieta ingerida. Esto sugiere que colina tiene un efecto repelente a concentraciones altas, debido a lo cual los áfidos no ingieren dieta.

El índice de reproducción, no varía con prolina y colina (Tabla 11). Sin embargo, con glicina-betaína a concentraciones semejantes a las presentes en plantas se produjo un incremento considerable (Fig.30). Estos resultados sugieren que el incremento en la susceptibilidad de las plantas de cebada bajo déficit hídrico, se debería a lo menos en parte a la acumulación de glicina-betaína.

### 3.17. -Efecto de gramina y glicina betaína sobre áfidos alimentados con dietas artificiales

Se alimentaron áfidos de las especies *S. graminum* y *R. padi* en dietas con una concentración de gramina dada y diferentes concentraciones de glicina betaína. Se observó que a diferencia de lo que ocurre en dietas solamente con gramina, la sobrevivencia de ambas especies de áfidos aumentó (Fig.31). Al alimentar ahora áfidos *S. graminu* en dietas con una concentración de glicina-betaína dada y

Tabla 10. Efectos del déficit hídrico sobre el contenido de  
gramina, prolina y glicina-betaina en plántulas  
de cebada

Cultivar	Potencial hídrico ( -bares)	Compuesto (mmoles/kg p.s.)		
		Gramina	Prolina	GB
F. Union	5,3	N.D.	8±1	18±2
	12,0	N.D.	30±3	90±8
Cruzat	5,6	20±2	20±2	54±4
	12,0	19±2	31±3	94±8
MCU-34	5,6	37±3	7±1	31±2
	12,0	30±3	37±3	50±4

Las plántulas de cebada mantenidas en una cámara de cultivo a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Dos grupos de plántulas de 6 días de edad fueron regadas diariamente con diferentes cantidades de agua por seis días. El potencial hídrico fue determinado a los 12 días de edad de las plántulas usando la metodología descrita. Cada valor es el promedio de 3 muestras  $\pm 1$  e.e.

Tabla 11. Efecto de productos de acumulados en cebada en condiciones déficit hídrico sobre *S. graminum*

Compuesto	Sobrevivencia (%)	Dieta ingerida (mg/10 áfidos)	Índice de reproducción
Dieta	93 + 3	0,9	2,51 ± 0,1
Dieta+Prolina	96 + 6	0,9	2,30 ± 0,21
Dieta+Colina	72 + 5 *	0,7	2,03 ± 0,2
Dieta+ GB	98 + 3	0,9	3,3 ± 0,21 *

Los ensayos fueron realizados alimentando áfidos adultos con dietas artificiales. La concentración de cada compuesto fue 6 mM. Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones con un error estándar

(\*) Significativamente diferentes a  $P = 0.05$  (test-t)

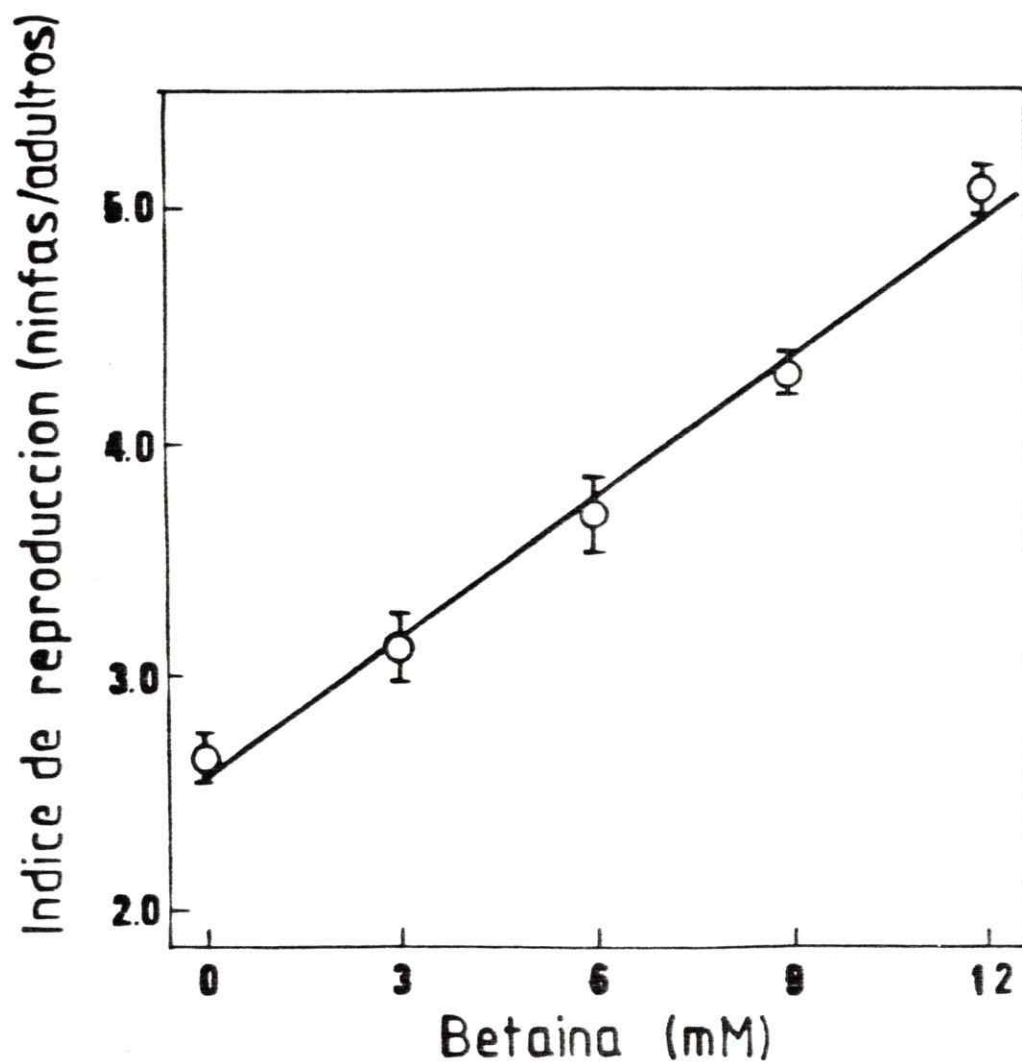


Figura 30. Efecto de Glicina-betaina sobre el índice de reproducción de *S. graminum*. Afidos adultos fueron alimentados en dietas por 72 hrs. El índice de reproducción= ninfas/ x adultos

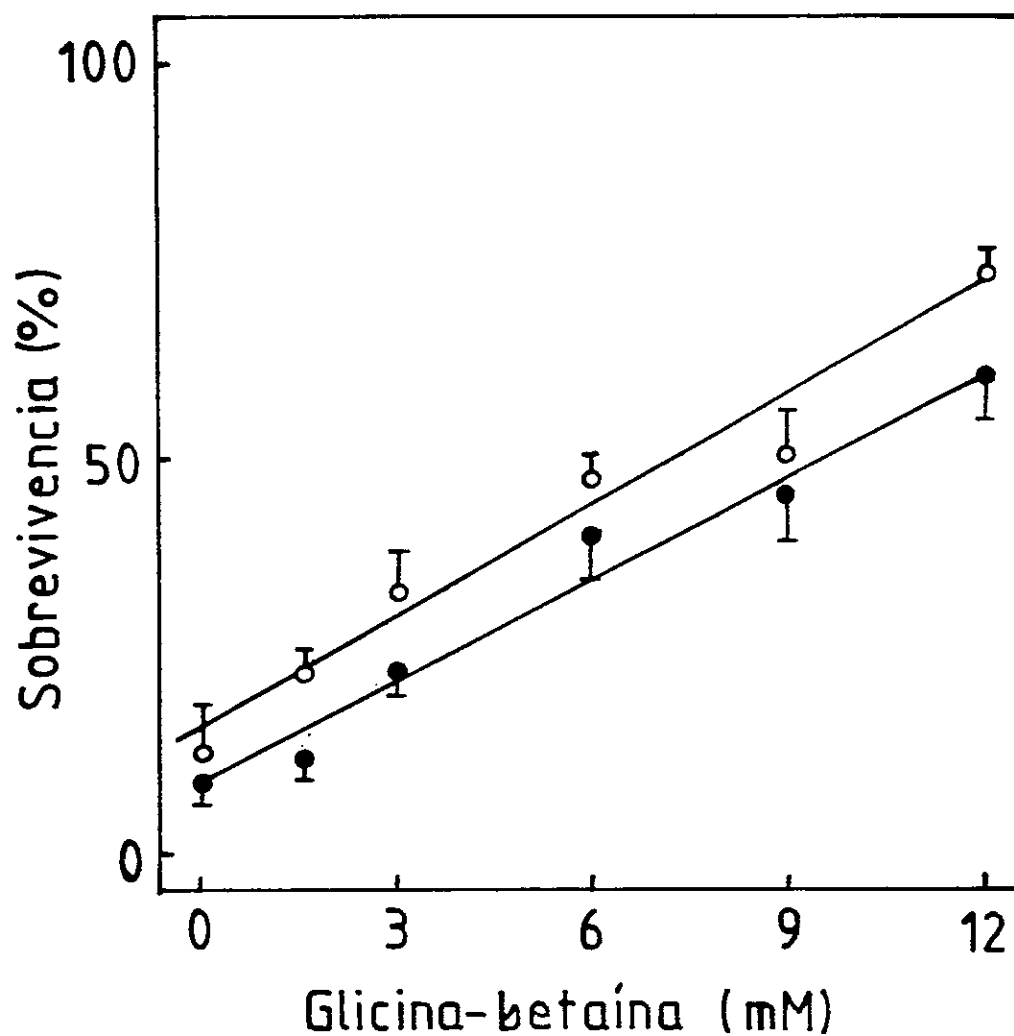


Figura 31. Efecto de Glicina-betaina sobre la sobrevivencia de áfidos alimentados con gramina. Los áfidos adultos fueron alimentados en dietas artificiales con gramina 3 mM y varias concentraciones de GB. La sobrevivencia fue medida a las 48 hrs. O= *S. graminum*, ●= *R. padi*

diferentes concentraciones de gramina se observó que el LD50 de gramina para este áfido aumentó en proporción a contenido de glicina-betaína en la dieta (Fig 32 A y B). Estos resultados permiten sugerir que glicina-betaína es capaz de reducir los efectos deletéreos de la gramina sobre áfidos.



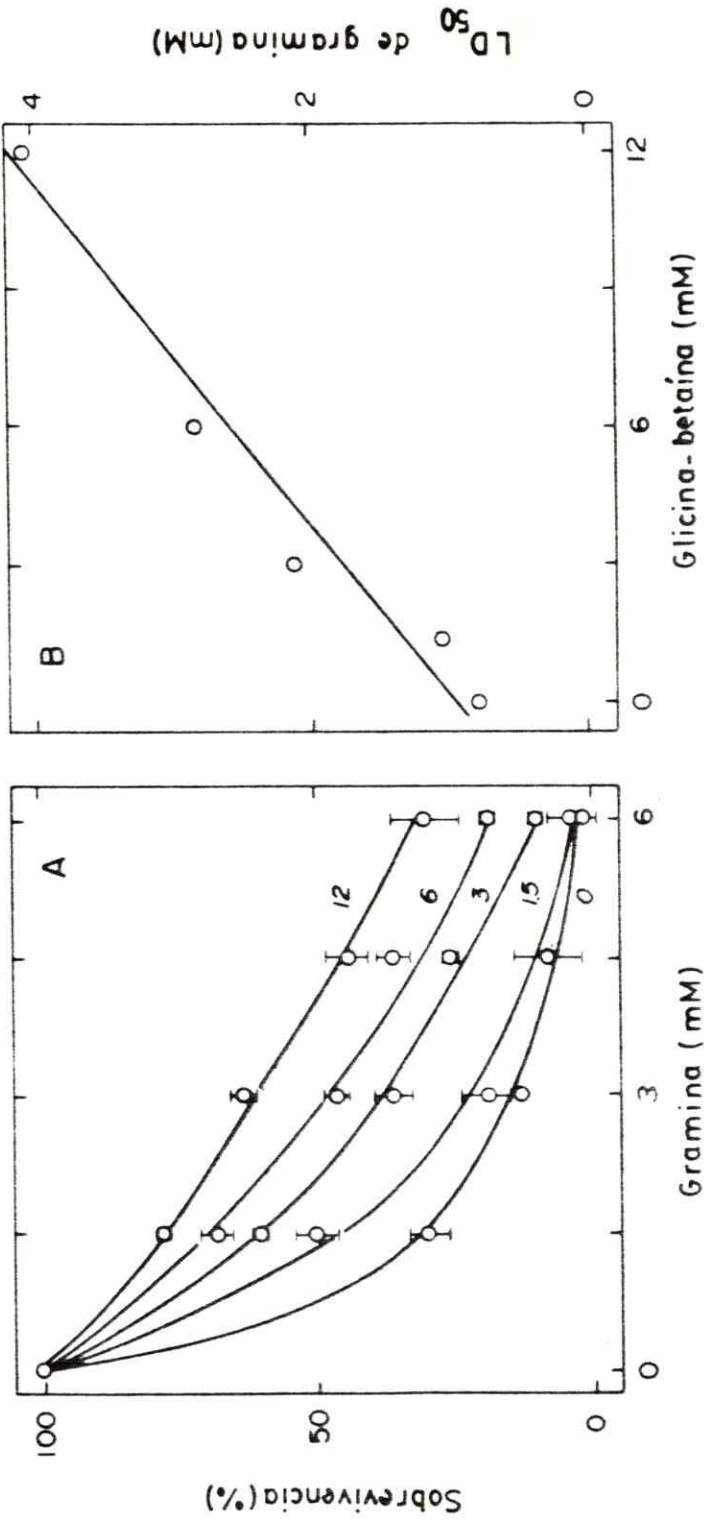


Figura 32. Supervivencia de *S. graminum* en dietas con Glicina-betaína gramina. Se alimentaron áfidos adultos con dietas artificiales con diferentes cantidades de gramina y GB.

La supervivencia se determinó a las 48 hrs (A). El número sobre cada curva indica la concentración de GB (mM).

La dosis letal de gramina en función de la concentración de GB fue calculada a partir de 33 A.

#### 4. DISCUSION

Los alcaloides indólicos simples presentes en Gramineas y Leguminosas son responsables de la toxicidad de algunas de estas plantas al ganado. El principal alcaloide presente en cebada es gramina. Dado que la cebada es usada como una planta forrajera alternativa en zonas áridas y semi-áridas, se ha propuesto eliminar estos compuestos de ellas para reducir su toxicidad (Marten y col. 1981). Los resultados encontrados en esta tesis, permiten postular que gramina juega un papel importante en la defensa de la cebada contra áfidos, por lo tanto, su eliminación sería aconsejable sólo en el caso de existir mecanismos alternativos de resistencia al ataque de insectos.

Por otra parte, en la mayoría de los trabajos en los cuales se estudia las interacciones planta- insectos se describe el papel de un determinado compuesto sólo en base a correlaciones, sin describir si el compuesto está en el sitio de ataque en concentraciones adecuadas. El hecho de haber determinado la localización tisular de gramina y su concentración constituye un elemento importante que permite una mejor comprensión de los resultados obtenidos con las diferentes especies de áfidos estudiadas.

El que un áfido sea poco afectado por gramina puede

significar que el insecto es más tolerante al compuesto o que se alimenta de un sitio donde la concentración de gramina es muy baja. La primera de estas posibilidades puede ser descartada con el sistema de dietas artificiales. En este caso *S. graminum* fue el más afectado de los áfidos. Esto sugiere entonces que *S. graminum* no se alimentaría preferentemente de un sitio donde exista gramina. En *sorghum* *S. graminum* se alimenta preferentemente de los tejidos floemáticos (Campbell et al, 1982). Cabe destacar que gramina no se localiza en los haces vasculares de cebada. Sin embargo, cuando se incorpora artificialmente dicho compuesto en los haces vasculares, *S. graminum* es más afectado. Siguiendo un razonamiento análogo se puede postular que *R. padi* y *R. maidis* se alimentarían preferentemente de tejidos no floemáticos (mesófilo). *M. dirhodum* es el menos afectado de los áfidos, su LD-50 en dietas artificiales es superior a la concentración de gramina encontrada en la mayoría de los cultivares analizados. Por esta razón *M. dirhodum* sería capaz de vivir en las hojas de cebada. Sería interesante determinar la conducta alimenticia de este áfido en cultivares con y sin gramina y con gramina incorporada en forma artificial, de manera de poder establecer el sitio de ingestión preferente en la planta. Estos resultados conjuntamente con aquellos de la distribución tisular de gramina, probablemente

confirmarían que el grado de protección conferido es una componente de la actividad biológica del compuesto, conducta alimenticia del áfido y localización del compuesto.

Hordenina, un alcaloide fenólico, también sería uno de los responsables de la toxicidad de *Phalaris* al ganado (Kendall y Sherwood, 1975). Russo y Gros (1982), han reportado que hordenina es metabolizada en plantas de cebada a unidades  $C_6 - C_1$  antes de ser incorporadas a lignina, originándose p-hidroxibenzaldehído y ácido p-hidroxibenzoico como intermediarios. Aquí se observó que al colocar plantas de cebada en soluciones conteniendo hordenina entre 1 y 6 mM, la cantidad de hordenina incorporada fue inferior a 1 mmoles/kg.p.f., de igual modo no se produjo ningún efecto sobre el áfido *S. graminum*. Esto sugiere que hordenina puede ser degradada rápidamente en estas condiciones. Si esto es cierto, sus productos de degradación no tendrían ningún efecto observable sobre el áfido, lo cual fue corroborado con los resultados de p-hidroxibenzaldehído en dietas artificiales. Dado que en ninguno de los cultivares analizados se pudo detectar hordenina, se puede señalar que este compuesto no es importante en la resistencia de la cebada a áfidos. Se desconoce si hordenina es importante en la protección de otras plantas contra otros insectos.

La cebada es uno de los cultivos forrajeros importantes utilizados en zonas áridas y semi áridas (Marten et al, 1981) . En estas condiciones las plantas están expuestas a períodos de déficit hídrico. Se observó que el déficit hídrico produjo un incremento en la susceptibilidad al ataque de *S.graminum* y *R.padi*. Dicho efecto se correlacionó positivamente con el aumento de glicina-betaina. Igualmente, al incorporar glicina-betaina en plantas de cebada, se produjo un aumento en la tasa de crecimiento poblacional de *S. graminum*. Al alimentar áfidos con dietas artificiales más glicina-betaina se produjo un aumento del índice de reproducción. Esto podría deberse a que glicina-betaina sirve como fuente de nitrógeno con lo cual acelera la actividad metabólica de las hembras ápteras produciéndose un aumento de la reproducción. Del mismo modo, el déficit hídrico indujo una mayor susceptibilidad a áfidos en cultivares que contienen gramina. En ensayos con dietas artificiales glicina-betaina redujo los efectos deletéreos de gramina. Los resultados mostrados sugieren que la acumulación de glicina-betaina en plantas resistentes a la sequía puede inducir un incremento en su susceptibilidad, a pesar de presentar gramina en sus tejidos. Este hecho es de particular importancia, pues se ha propuesto seleccionar plantas que acumulen glicina-betaina para obtener una mayor productividad en

condiciones de déficit hídrico (Hanson, 1980). Los resultados aquí mostrados sugieren que la acumulación de glicina-betaina, aparte de aumentar la reproducción de los áfidos, es capaz de reducir los efectos deletéreos de gramina. Sería aconsejable entonces, seleccionar cultivares que resistan al déficit hídrico sin que acumulen glicina-betaina.

Los modos de acción de gramina y glicina-betaina no han sido demostrados con claridad. Se ha señalado que gramina actuaría a nivel del transporte electrónico en mitocondrias de ratas y cloroplastos de espinacas (Niemeyer y Roveri, 1984; Andreo y col., 1984). Como ya se señaló, glicina-betaina podría servir como fuente de nitrógeno. Sin embargo, esto no explica porqué es capaz de reducir los efectos de gramina. Se ha postulado que glicina-betaina podría también actuar a nivel del transporte de electrones de la cadena respiratoria de la bacteria *Pseudomonas syringae* donde también reduce los efectos de gramina (Zuñiga y col., 1986). Esto sugiere que glicina-betaina debería actuar en algún sitio común con gramina en la cadena respiratoria. Por otra parte, en los resultados se demostró que gramina tiene efectos tóxicos y repelentes a los áfidos. Entonces al estudiar la conducta alimenticia de áfidos en dietas con gramina y glicina-betaina se podría determinar si glicina-betaina reduce, además, los efectos repelentes de gramina.

La proposición de eliminar a los alcaloides indólicos como una forma de reducir la toxicidad de la planta contra el ganado motivó este trabajo de Tesis. Los resultados aquí mostrados sugieren que gramínea puede regular las poblaciones de áfidos en plantas. Además, se demostró que las interacciones entre cebada y áfidos pueden estar afectadas por la acumulación de glicina-betaina. Dado que los estreses hídrico y salino determinan que la concentración de glicina-betaina aumente en cebada ( Steward y Larher, 1980), es probable que estos factores afecten en forma similar la susceptibilidad de la cebada a los áfidos.

Sugerencias de eliminar o aumentar el contenido de compuestos en plantas se hacen a menudo sobre la base de estudios parciales. La eliminación de compuestos involucrados en la resistencia de plantas cultivadas solo se debería sugerir después de encontrar mecanismos alternativos de resistencia. Por otro lado, fitomejoradores deberían considerar que la resistencia de las variedades seleccionadas podría deberse a la acumulación de compuestos con efectos deletéreos, no sólo para las plagas y enfermedades, sino que también para los herbívoros y el hombre. Por ello es importante continuar los estudios sobre los diferentes mecanismos de resistencia de plantas a plagas.

## REFERENCIAS

- 1.- Agrios, G.N., 1978. "Plant Pathology". 2 ed. Academic Press. New York-London
- 2.- Andreo, C.S., Orellano, E.G., y Niemeyer, H.M., 1984. "Uncoupling of spinach thylakoids by gramine." *Z. Naturforsch* 39:746-74.
- 3.- Apablaza, J., y Tiska, W., 1973. "Poblaciones de áfidos (Homóptera, Aphididae) en trigo de la zona central chilena" *Revista Chilena de Entomología* 7: 173-181
- 4.- Argandoña, V.H. y Corcuera, L.J., 1985. "Distribution of hydroxamic acids in *Zea mays* tissues". *Phytochemistry* 24:117-118
- 5.- Argandoña, V.H., Corcuera, L.J., Niemeyer, H.M y Campbell, B.C., 1983. "Toxicity and feeding deterrence of hydroxamic acids from Gramineae in synthetic diets against the greenbug *Schizaphis graminum*". *Ent. exp. appl.* 24:134-138
- 6.- Argandoña, V.H., Luza, J.C., Niemeyer, H.M., y Corcuera, L.J., 1980. "Role of hydroxamic acids in the resistance of cereal to aphids". *Phytochemistry* 19: 1665-1668
- 7.- Argandoña, V. H., Peña, G.F., Niemeyer, H.M y Corcuera, L.J., 1982. "Effect of cysteine on stability and toxicity to aphids of cyclic hydroxamic acid from Gramineae". *Phytochemistry* 1:1573-1574.



- 8.- Asada, Y., y Matsumoto, I., 1967. " Formation of lignin in the root tissue of Japanese radish affected by *Alternaria japonica*". *Phytopathology* 51:1339-1343
- 9.- Auclair, J.L., 1965. " Feeding and nutrition of pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Homóptera:Aphidee), on chemically defined diets of various pH and nutrient levels". *Ann Entomol.Soc.Amer.* 58:865-875.
- 10.- Barnes, R.F., Simonds, A.B., y Marten, G.C., 1971. "Evaluation of selected clones of *Phalaris arundinacea* II. Indole alkaloid derivatives." *Agronomy J.* 63:507-509
- 11.- Bates, L.S., Waldren, R.T., y Teare, I.D., 1973. "Rapid determination of free proline for water stress studies" *Plant and Soil* 39:205-207
- 12.- Bell, E.A., 1981. " The Physiological Role(s) of Secondary (Natural) Products ". en *The Biochemistry of Plants Vol 7* ( Stumpf, P.K y Conn, E.E, eds) Academic-Press, New York. cap 1
- 13.- Bright, S.W. J., Lea, P.J., Kuek, J. S. H., Woodcock, C., Hollomon, D.W. y Scott, G. C., 1982. " Proline content does not influence pest and disease susceptibility of barley". *Nature* 295:592-593.
- 14.- Caballero, C., 1972. "Incidencia del ataque del pulgón de los cereales *Metopolophium dirhodum* en los redimientos de trigo". *Revista Peruana de Entomologia* 15:195-200

- 15.- Campos, L., y Charlin, R., 1976. " Los pulgones de los cereales y su control" **Boletín Agrícola Shell** 3:1-11
- 16.- Campbell, B. C., McLean, D. L., Kinsey, M.G., Jones, K. C y Dreyer, D. L., 1892. "Probing behavior of the greenbug (*Schizaphis graminum* biotype C) on resistant and susceptible varieties of sorghum". **Ent.exp & appl.** 31:140-146.
- 17.- Carrillo, R., y Mellado, M.Z., 1975. "Efecto de la época de siembra y del áfido *Metopolophium dirhodum* (Walker) en el rendimiento de cultivos de trigo de primavera (*Triticum aestivum* L ) ". **Agricultura Técnica** 190-204
- 18.- Castillo, D., y Acevedo, J., 1976 "Protección con aficidas durante varios períodos fisiológicos de trigo de invierno (*Triticum aestivum* L ) cultivar Melifen ". **Agricultura Técnica** 36: 93-98
- 19.- Corcuera L.J., 1984. " Effects of indole alkaloids from Gramineae on aphids". **Phytochemistry** 23: 539-541
- 20.- Corcuera, L.J., Woodward, M.D., Helgeson, J.P., Kelman, A. y Upper, C.D., 1978. "2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4, benzoxazin-3(4H)-one, an inhibitor from *Zea mays* with differential activity against soft rotting *Erwinia* species ". **Plant. Physiol** 61:791-795

- 21.- Culvenor, C.C., 1973. "Chemistry and Biochemistry of Herbage" Vol 1. pp 375. Academic Press. London.
- 22.- Diogenes, G.A., 1969. "Metabolic fates of gramine in barley II. Biotransformation of gramine into indole-3-carbinol and indole-3-carboxylic acid". *J. Phar. Sci.* 58:42-44
- 23.- Dean, G.J., 1974. "Effects of temperature on the cereal aphids *Metopolophium dirhodum* (Walker) and *Rhopalosiphum padi* (L) (Hem, aphidae)". *Bull ent Res.* 63: 401-409
- 24.- Dixon., A.F.G., 1985. "Aphid Ecology". Blackie y Son Ltd, Glasgow y London.
- 25.- Ehmann, A., 1977., "The van Urk-Salkowsky reagent. A sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin layer chromatographic detection and identification of indole derivatives ". *Journal of Chromatography* 132:267-76
- 26.- Elnaghy, M.A., y Linko, P., 1962. "The role of 4-O-glycosyl 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzaxazin-3-one in resistance of wheat to stem rust". *Physiol. Plant* 15:764-771
- 27.- Emden, H.F. van., 1972. "Aphids as phytochemists ". *En Phytochemical Ecology* (Harborne. J.B., ed). 25-44. Academic Press. London.

- 28.- Emden, H.F van., 1978., " Insect and secondary plant substances an alternative viewpoint with special reference to aphids" In Biochemical aspects of Plant and Animal Coevolution (Harborne, J.B. ed) 309-322. Academic Press. London
- 29.- Gallagher, C.H., Koch, J.B., Moore, R.M., y Stell, J.D., 1964. "Toxicity of *Phalaris tuberosa* for sheeps". *Nature* 204: 542-545.
- 30.- George, K.S., 1974., "Damage assessment aspects of cereal aphid attack in autum and spring-sown cereals " *Ann. appl. Biol.* 77:67-74.
- 31.- Gibson, R.W., y Pickett, J.A., 1983., " Wild potato repels aphids by release of aphid alarm pheromone ". *Nature* 320:608-609.
- 32.- Gower, B.G., y Leete, E., 1963., "Biosynthesis of gramine : The immediate precursors of the alkaloid ". *J. Am. Chem. Soc.* 85:3683-3685
- 33.- Grieve, C.M., y Grattan, S.R., 1983. "Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds". *Plant and Soil* 70:303-307
- 34.- Groger, A., 1980. "Alkaloids derived from tryptophan and anthranilic acid". En *Plant Physiology*. new series. Vol 8 *Secondary Plant Products*. (Bell, E.A y Charlwood, B.V., eds). Springer-Verlag. Berlin

- 35.- Haglund, B.M., 1980., " Proline and valine-cues wich stimulate grasshopper herbivory during drought stress" **Nature** 228:697-698
- 36.- Hagmann, J.L., Marten, G.C., y Hovin, A.W., 1975.  
" Alkaloid concentration in plant parts of Reed canarygrass of varing maturiry". **Crop Sci.** 15:41-43
- 37.- Hall, J.L., Harvey, D.M.R., y Flowers, T.J. 1978.,  
"Evidence for the cytoplasmatic localization of betaine in leaf cells of *Suaeda maritima* ".  
**Planta** 140:59-62
- 38.- Hanson, A.D., 1980. " Interpreting the metabolic responses of plants to water stress". **HortScience** 15: 623-629.
- 39.- Hanson, A.D., Ditz, K.M., Singletary, G.W. y Leland, T.J., 1983. "Gramine accumulation in leaves of barley grown under high-temperatures stress".  
**Plant Physiol.** 71:894-904
- 40.- Hanson, A.D., Nelsen, Ch.E., y Eversen, E.H., 1977.  
" Evaluation of free proline accumulation as an index of drought resistance using two contrasting barley cultivars ". **Crop.Sci** 17:720-726
- 41.- Hanson, A.D., Traynor, P.R., Ditz, K.M., y Reicosky, D.A., 1981 " Gramine in barley forage-effects of genotype and environment" **Crop.Sci.** 21:726-730
- 42.- Hanson, A.H., y Wyse, R., 1982. "Biosynthesis, translocation and accumulation of betaine in sugar beet and its progenitor in relation to salinity". **Plant Physiol.** 70: 1181-1193

- 43.- Herrera, G. Y Quiroz, C., 1980. "Efecto del Virus del enanismo amarillo de la cebada (Barley Yellow Dwarf Virus) y del áfido *Metopolophium dirhodum* (Walker) en trigo (*Triticum aestivum* L.) Agricultura Técnica (Chile) 40:12-17
- 44.- Herrera, G. y Quiroz, C., 1983. "Nuevos antecedentes sobre el virus del enanismo amarillo de la cebada". IPA- La Platina 17: 23-24
- 45.- Hitz, W.D., y Hanson, A.D., 1980. "Determination of glycinebetaine by pyrolysis-gas chromatography in cereals and grasses". *Phytochemistry* 19:2371-2374.
- 46.- Juneja, P.S y Gholson, R.K., 1976. "Acidic metabolites of benzyl alcohol in greenbug resistant barley". *Phytochemistry* 15: 647-649
- 47.- Juneja, P.S., Gholson, R.K., Burton, R.L., y Starks, K.J., 1972 "The chemical basis for greenbug resistance in small grains. I. Benzil alcohol as a possible resistance factor" *Ann. Entomol. Soc. Am.* 65: 961:964
- 48.- Juneja, P.S., Pearcy, S.C., y Gholson, R.K., 1975. "Chemical basis for greenbug resistance in small grains. II. Identification of the mayor neutral metabolite of benzil alcohol in barley " *Plant Physiol* 56:385-389

- 49.- Kendall, W.A., y Sherwood, R.T., 1975. "Palatability of leaves of tall Fescue and Reed canarygrass and of some of their alkaloids to Meadow Voles". **Agronomy Journal** 67:667-671
- 50.- Klun, J.A., Tipton, C.L., y Brindley, T.A., 1967. "2,4-dihydroxy-7-methoxy 1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA), an active agent in the resistance of maize to the European Corn Borer". **J. Econ. Entomol.** 60:1529-1533.
- 51.- Lara de Z, S., y Zúniga, E., 1969. "Metopolophium dirhodum (Walker) (Homoptera, aphididae). **Soc. Agr. de Chile, Simiente** 39:34-36
- 52.- Latteur, G., 1971. "Evolution des populations aphidiannes sur froments d'hiber (Gembloux, 1970). **Rev. d' Agriculture** 24:928-939
- 53.- Lee, G., Stevens, D.J., Stokes, S., y Wratten, S.D., 1981. "Duration of cereal aphid population and their effects on wheat yield and breadmaking quality" **Ann. appl. Biol.** 98:169-178
- 54.- Leland, T.J., y Hanson, A.D., 1985. "Induction of a specific N-Methyltransferase enzyme by long term heat stress during barley leaf growth." **Plant. Physiol.** 79:451-457
- 55.- Mack, J.P.G., y Slaytor, M., 1979., "Indolethylamine N-methyltransferase of *Phalaris tuberosa*, purification and properties." **Phytochemistry** 18:1921-1925

- 56.- Majak, W., Diarmid, R.E., Powell., T.W. Rywyk, A.L van., Stout, D.G., Williams, R.G., y Tucker, R.E., 1979. "Relationships between alkaloids in Reed Canarygrass ( *Phalaris arundinacea*), soil moisture and nitrogen fertility." *Plant Cell Environ.* 2:335-340
- 57.- Marten, G.C., Jordan, R.M., y Hovin, A.W., 1981. "Improved lamb performance associated with breeding for alkaloid reduction in Reed Canarygrass". *Crop.Sci.* 21:295-298
- 58.- Martin, T.J., 1964. " Role of cuticle in the defense against plant disease " *Ann.Rev.Phytopath.* 2:81-100
- 59.- Martinoia, E., Heck, U., y Wiemken, A., 1981., " Vacuoles as storage compartments for nitrate in barley leaves ". *Nature.* 289:292-293
- 60.- Marum, P., Hovin, A.W., y Marten, G.C., 1979. " Inheritance of three groups of indole alkaloids in Reed Canarygras. *Crop.Sci.* 19:539-544.
- 61.- Mc.Clean, F.T., 1921. " A study of the structure of the stomata of two species of Citrus) in relation to Citrus Canker " *Bull Torrey Bot.Club.* 48:101-106
- 62.- McLean, D.L., 1970. "Probing behavior of the pea aphid V. The comparison of *Vicia faba*, *Pisum sativum* and chemically defined diets as food sources" *Ann. Entomol. Soc.Amer.* 64:499-503



- 63.- McLean, D. L y Kinsey, M. G., 1964. "A technique for electronically recording aphids feeding and salivation". **Nature** 202: 1358-1369
- 64.- Meyer, E., 1982., " Separation of two distinct S-adenosylmethionine dependent N-methyltransferases involved in hordenine biosynthesis in **Hordeum vulgare** Plant Cell Rep.1:236-239
- 65.- Millar, R., y Higgins, V., 1970. "Association of Cyanide with infection of Sudsfoot trefoil by **Stenophyllum lati**". **Phytopathology** 60:104-110
- 66.- Mudd, S.H., 1961. " 3-aminomethylindole and 3-methyl- indole new constituents of barley " **Nature** 189:489-
- 67.- Niemeyer, H.M., y Roveri, O.A., 1984. " Effects of gramine on energy metabolism of rat and bobine mitochondria". **Biochemical Pharmacology** 33:2973-2978
- 68.- Noveroske, R. L., Kuc, J., y Williams, E.B., 1964. "Oxidation of phloridzin and phloretin related to resistance of **Malus** to **Venturia inaequalis** ". **Phytopathology** 54: 92-97
- 69.- Overland, L., 1966. " The role of allelopathic substances in the smother crop barley ". **Ame. J. Bot.** 53 :423-432

- 70.- Paleg, L.J., Douglas, T.J., Dall van A., y Keech, A.B., 1981. " Proline, Betaine and other organic solutes protect enzymes against heat inactivation " **Aust. J. Plant Physiol** 8:107-114
- 71.- Queirolo, C.B., Andreo, C.S., Vallejos, R.H., Niemeyer, H.M., y Corcuera, L.J., 1981. " Effects of hydroxamic acids isolated from *gramineae* on adenosine 5' triphosphate synthesis in chloroplast". **Plant Physiol.** 68:941-943
- 72.- Queirolo, C.B., Andreo, C.S., Niemeyer, H.M., y Corcuera, L.J., 1983. "Inhibition of ATPase from chloroplasts by a hydroxamic acid from *gramineae*." **Phytochemistry** 22: 2455-2458
- 73.- Quiroz, C., Zúñiga, E. y Ramírez, A., 1986. " Vegetación cordillerana costera y andina como fuente de áfidos (Hom:Aphididae) que afectan la producción de trigo". **Agricultura Técnica (Chile)** 46:271-276.
- 74.- Russo, C.A. y Gros, E.G., 1982. "Degradation of [ $\beta$ - $^{14}$ C] hordenine in *Hordeum vulgare* plants". **Phytochemistry** 21:609-610
- 75.- Salgado, P.M.S., 1980. "Alcohol bencílico en cebada y su efecto sobre áfidos". Tesis de Magister. Facultad de Agronomía. Universidad de Chile.

- 76.- Samuel, G., 1927. " On the shot-hole disease caused by *Clasterosporium carpophilum* and on the shot-hole effect ". *Ann Bot.* 41:375-404
- 77.- Scholander, P.F., Hammel, H.T., Hemmingsen, E.A., y Brandstret, E.D., 1964. "Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and some other plants". *Proc.Nat.Acad.Sci., U.S.A.* 52:119-125
- 78.- Schneider, E.A., y Wightman, F., 1974. "Amino acids metabolism in plants.V.Changes in basic indole compounds and the development of tryptophan decarboxylase in barley (*Hordeum vulgare*) during germination and seedling growth ". *Can.J.Biochem.* 52: 698-705.
- 79.- Simons, A.B., y Marten, G.C., 1971. " Relationships of indole alkaloids to palatability of *Phalaris arundinacea*". *Agronomy Journal* 63 :915-919.
- 80.- Singh, T.N., Aspinall, D., y Paleg, L.G., 1972. " Proline accumulation and varietal adaptation to drought in barley:A potential metabolic measure of drought resistance". *Nature New Biol.* 236:188-190.
- 81.- Smith, T.A., 1975. "Recent advances in the biochemistry of plant amines." *Phytochemistry* 14:865-890
- 82.- Smith, T.A., 1977. "Tryptamine and related compounds in plants." *Phytochemistry* 16:171-175
- 83.- Smith, T.A., y Best, G.R., 1978. " Distribution of hordatines in barley ". *Phytochemistry* 17:1093-1098

- 84.- Stewart, G.R., y Larher, I., 1980. "Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress". En *The Biochemistry of Plants*. vol 5 (Miflin, B.J. ed). Academic Press. New-York-London
- 85.- Stewart, G.R., y Hanson. A.D., 1980. "Proline accumulation as Metabolic Response to Water Stress." In *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress.* (Turner, N. C., y Kramer, P. J., eds). pag. 173-179. John Wiley and Sons Inc. New-York.
- 86.- Swain, T., 1977. "Secondary Compounds as protective agents ". *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28:479-501
- 87.- Tingey, W.M y Sinden, S.L., 1982. "Glandular pubescence glycoalkaloids composition and resistance to the green peach aphid, potato leafhopper, and potato fleabeetle in *Solanum berthaultii*. *American Potato Journal* 59:95-106
- 88.- Tollenar, H., y Hepp, R., 1972. "Presencia del virus causante del enanismo amarillo de la cebada ( Barley Yellow dwarf virus ) en Chile " *Agricultura Tecnica ( Chile )* 32: 137-142
- 89.- Tood, G., Getahum, A., y Cress, D.C., 1971. "Resistance in barley to the greenbug *Schizaphis graminum* .1. Toxicity of Phenolic and flavonoid compounds and related substances ". *Ann. Entomol. Soc. Am.* 64:718-722

- 80.- Turner, E., 1960." The nature of the resistance of oats on the take-all fungus.III.Distribution of the inhibitor in oat seedlings ".*J.Exp.Bot.*11:403-412
- 81.- Vicherman, G.P., y Wratten, S.D., 1979." The biology and pest status of cereal aphids ( Hemiptera: aphididae). in Europe: a review."*Bull.ent Res.* 69:1-32
- 82.- Willard, T.J., y Penner, D., 1976." Benzoxazinones: cyclic hydroxamic acids found in plants." *Residue Rev.* 64: 67-76
- 83.- Wyn Jones, R.G. y Storey, R., 1981. Betaines. En *Physiology and biochemistry of drought resistance in plants.* ( Paleg, L.G y Aspinall,D., eds) Academic Press, New York. pp 140-204
- 84.- Woods, D.L., Hovin, A.W. y Marten, G.C., 1979. " Seasonal variation of Hordenine and Gramine concentration and their heritability in Reed Canarygrass "*Crop.Sci.*19: 853-857
- 85.- Zúñiga, E.,1967." Lista preliminar de áfidos que atacan cultivos en Chile,sus huespedes y sus enemigos naturales."*Agricultura Técnica (Chile)* 27:165-167
- 86.- Zúñiga, G.E., Sepúlveda, B.A. y Corcuera,L.J.,1986. "Inhibición de los efectos de gramina por glicina-betaina en *Pseudomonas syringae*.VI. Reunión Nacional de Botánica,Valdivia-Chile