

UCH-FC
MAG-B
V443c
C.1

**CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD DE PAL Y SU EFECTO SOBRE EL
CONTENIDO DE FLAVONOIDEOS Y FENOLES DE PARED EN CEBADA
INFESTADA POR AFIDOS**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magister en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

Juan Aníbal Velozo Soto

Abril, 1999

Director de Tesis: Dr. Luis J. Corcuera Pérez.



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGISTER

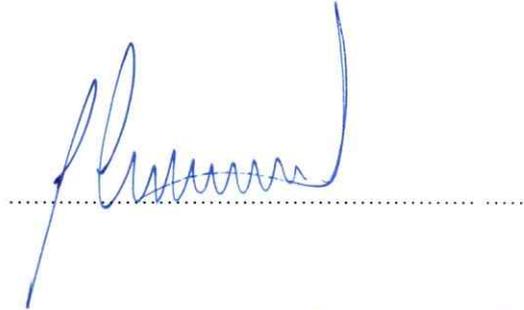
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato :

JUAN ANIBAL VELOZO SOTO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 27, de Enero de 1999.

Director de Tesis :

Dr. Luis J. Corcuera Pérez

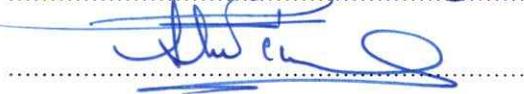


Comisión de Evaluación de la Tesis :

Dra. Liliana Cardemil (Presidente)



Dra. Luz María Pérez



Dra. M. Cecilia Rojas



**A mis hijos, Renato y Aníbal,
por su amor y su alegría.**

AGRADECIMIENTOS

Mis sinceros agradecimientos al Dr. Luis Corcuera por su valiosa ayuda durante mis estudios, además, por darme el espacio y oportunidad para desarrollarme como investigador. A la Dra. Liliana Cardemil por su apoyo y preocupación, no sólo por mi trabajo, sino también por mi persona. A todos mis compañeros en el laboratorio, por su generosa colaboración en el desarrollo de esta tesis. También, quisiera agradecer a la Dra. Gloria Montenegro y al Dr. Manuel Arroyo, por su gestión para realizar parte de esta tesis en la Universidad de Arizona, así mismo, a la Dra. Barbara Timmermann y Gerald Wächter por acogerme en su laboratorio y brindarme todo el apoyo que fue necesario.

En especial quiero agradecer a Isabel por su incondicional respaldo y confianza durante los buenos y malos tiempos. A mi madre por su permanente preocupación y cariño.

Finalmente, mis agradecimientos por el financiamiento de esta tesis son para Conicyt a través del proyecto Fondecyt 1950302, a USAID UDPL Grant 8CE-5063-A-00-3033-00 y para la Vicerrectoría Académica, Departamento de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile.

INDICE DE MATERIAS

Título	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Índice de materias	iv
Lista de figuras	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xiv
1.0 INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>La cebada y los áfidos</i>	1
1.2 <i>La actividad PAL y la vía metabólica fenil propanoide</i>	3
1.3 <i>Regulación de la actividad PAL por factores abióticos</i>	5
1.4 <i>Efecto de agentes de estrés biótico en la actividad PAL</i>	6
1.4.1 <i>Participación de PAL y la vía fenilpropanoide en la relación hongo-planta</i>	6
1.4.2 <i>La vía fenilpropanoide en la interacción insecto-planta</i>	8
1.5 <i>Importancia de la actividad PAL y la vía fenil propanoide en las estrategias defensivas de la cebada al ataque de áfidos</i>	10

2.0 MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1 <i>Material vegetal</i>	13
2.2 <i>Obtención de los áfidos e infestación</i>	13
2.3 <i>Ensayo de actividad PAL</i>	14
2.4 <i>Purificación y determinación de flavonoides</i>	15
2.5 <i>Cuantificación de saponarina mediante HPLC</i>	16
2.6 <i>Obtención de paredes celulares para la determinación de fenoles y lignina</i>	17
2.7 <i>Determinación del contenido relativo de fenoles unidos a paredes celulares</i>	17
2.8 <i>Determinación de lignina</i>	18
2.9 <i>Ensayo de dietas artificiales</i>	18
2.10 <i>Determinación de proteínas solubles</i>	19
2.11 <i>Peso seco de las plantas</i>	19
3.0 RESULTADOS	20
3.1 <i>Actividad PAL en cultivares de cebada bajo condiciones de infestación por áfidos</i>	20
3.1.a <i>Determinación de la actividad PAL en distintos órganos de cultivares de cebada</i>	20
3.1.b <i>Cinética de actividad PAL durante 48 h de infestación bajo fotoperíodo normal o en luz continua</i>	22
3.1.c <i>Cinética de actividad PAL en tiempos largos de infestación</i>	26

3.1.d <i>Efecto de la densidad de infestación en el aumento de actividad</i> <i>PAL</i>	28
3.1.f <i>Efecto de la edad de las plantas en la variación de la actividad</i> <i>PAL bajo infestación</i>	34
3.2 <i>Variación en el contenido de materia seca en las hojas de cebada</i> <i>bajo infestación</i>	36
3.3 <i>Efecto de la infestación en la composición de los flavonoides</i> <i>presentes en la cebada</i>	38
3.3.1 <i>Flavonoides aislados en cebada</i>	38
3.3.2 <i>Efecto de la infestación por áfidos en el contenido de</i> <i>saponarina</i>	42
3.3.3 <i>Efecto de la densidad de infestación sobre el contenido de</i> <i>saponarina en cebada</i>	45
3.3.4 <i>Evaluación de la toxicidad de la saponarina en ensayos de</i> <i>sobrevivencia de áfidos alimentados con dietas artificiales</i>	47
3.4 <i>Contenido relativo de fenoles esterificados a la pared celular y de</i> <i>lignina</i>	49
3.4.1 <i>Acumulación de fenoles esterificados a paredes celulares en</i> <i>cebada infestada</i>	49
3.4.2 <i>Acumulación de lignina en paredes celulares de plantas</i> <i>infestadas</i>	53

4.0 DISCUSIÓN	58
4.1 <i>Aumento de actividad PAL bajo infestación.</i>	58
4.2 <i>Acumulación de flavonoides durante la infestación y su toxicidad para el áfido</i>	64
4.3 <i>Función de los fenoles de la pared celular en la susceptibilidad diferencial a los áfidos</i>	66
4.4 <i>Regulación de la vía fenil propanoide y proyecciones del estudio</i>	70
5.0 CONCLUSIONES	74
6.0 REFERENCIAS	76

Lista de Figuras

Figura 1 :	Actividad PAL presente en distintos órganos aéreos de cebada	21
Figura 2 :	Cinética de actividad PAL durante 48 h en plantas infestadas y sanas de cebada.	24
Figura 3 :	Actividad PAL en plantas infestadas y sanas del cultivar Frontera mantenidas 48 h en un régimen de luz continua.	25
Figura 4 :	Cinética de actividad PAL durante 228 h de infestación en cebada.	29
Figura 5 :	Aumento de la actividad PAL en plantas de cebada infestadas durante 228 h por el áfido <i>S. graminum</i> .	30
Figura 6 :	Efecto de la densidad de infestación en la cinética de actividad PAL en el cultivar Frontera.	32
Figura 7 :	Variación del contenido de proteínas solubles en el cultivar Frontera en función de la densidad de infestación.	33
Figura 8 :	Efecto de la edad de las plantas en el cambio de actividad PAL en hojas producido por infestación con áfidos.	35
Figure 9 :	Contenido de materia seca en plantas sanas e infestadas por áfidos en cebada.	37
Figura 10 :	Espectro de masas de la saponarina purificada desde extractos matanólicos.	40

Figura 11 :	Separación de saponarina mediante HPLC usando una elución isocrática.	41
Figura 12 :	Efecto de la infestación por áfidos en el contenido de saponarina en cebada.	43
Figura 13 :	Aumento del contenido de saponarina en plantas de cebada infestadas por <i>S. graminum</i> ..	44
Figura 14 :	Efecto de la densidad de infestación en el contenido de saponarina.	46
Figura 15 :	Efecto del flavonoide saponarina en la sobrevivencia de áfidos crecidos en dietas artificiales.	48
Figura 16 :	Cinética de acumulación de fenoles esterificados a pared celular, bajo infestación de áfidos.	51
Figura 17 :	Porcentaje de acumulación de fenoles esterificados a pared en condiciones de infestación por áfidos.	52
Figura 18 :	Cinética de acumulación de lignina en plantas y no infestadas con áfidos.	54
Figura 19 :	Porcentaje de aumento del contenido de lignina en plantas infestadas por áfidos.	55
Figura 20 :	Efecto de la densidad de infestación en el contenido de fenoles de pared y lignina.	57

RESUMEN

La infestación de la cebada por áfidos, produce graves alteraciones fisiológicas que resultan en una significativa pérdida de productividad de los cultivos. Frente a este daño, las plantas generan respuestas defensivas. El ataque de las plantas por insectos y patógenos conduce al aumento de actividad de la enzima fenil alanina amonio liasa (PAL) y la síntesis de compuestos fenólicos solubles altamente tóxicos, así como la síntesis de fenoles de la pared celular y de lignina. En la interacción planta-áfido no se ha caracterizado completamente éste tipo de respuesta defensiva. En esta tesis se ha postulado que bajo infestación por áfidos aumentaría la actividad de PAL, lo que resultaría en un aumento del contenido de flavonoides, fenoles de pared y lignina. Estos cambios en la vía fenil propanoide serían una respuesta defensiva de las plantas ante los áfidos. Así se esperaría encontrar una correlación entre los cambios de actividad de PAL, y el contenido de flavonoides, fenoles de pared y lignina, bajo condiciones de infestación. Por el contrario, el aumento de la actividad PAL, contenido flavonoides, fenoles de pared y lignina debieran presentar un correlación negativa con el grado de susceptibilidad de los cultivares a los áfidos. Para probar estas hipótesis se decidió caracterizar la actividad PAL inducida bajo infestación y medir simultáneamente los cambios en el contenido de flavonoides, fenoles de pared y lignina. Estos parámetros fueron medidos en el tiempo de infestación y con diferentes densidades de áfidos. Se utilizaron tres cultivares de cebada, Frontera, Acuario y Libra, los cuales previamente han sido evaluados en su

susceptibilidad al áfido *Schizaphis graminum* R., siendo Frontera el cultivar menos susceptible, seguido de Libra y Acuario.

La actividad PAL aumentó significativamente con la infestación, presentando una cinética bimodal. El cultivar Frontera presentó el mayor aumento de actividad PAL con un primer pico de actividad alrededor de las 36 h. Esto significó un aumento de casi cuatro veces comparado con la actividad presente en las plantas sanas. EL segundo pico de actividad PAL, fue bastante similar en magnitud entre los cultivares. El aumento de actividad PAL a las 36 h, en el cultivar Libra no se correlacionó con su nivel de susceptibilidad intermedia, presentando un menor aumento de actividad PAL que el cultivar Acuario, el más susceptible, solo 1,5 veces respecto al control sano. Dado que el cultivar Frontera presentó el mayor aumento de actividad PAL, éste fue utilizado para caracterizar algunos aspectos del efecto de los áfidos en la actividad de la enzima. Se encontró que existe una correlación positiva entre el nivel de actividad PAL y la densidad de infestación. También, se encontró que en plantas infestadas y mantenidas con un fotoperíodo de luz continua, ocurrió un mayor aumento de la actividad PAL comparado con la actividad PAL medida en plantas sanas e infestadas bajo un ciclo fotoperiódico normal (luz/oscuridad, 14:10). Existió un efecto aditivo de la extensión del fotoperíodo en el aumento de la actividad PAL producida por el áfido. Cuando se analizó el efecto de la edad de las plantas en la actividad PAL bajo infestación, se encontró que ocurre una disminución importante en la actividad basal con la edad, pero que esta disminución no incide en el aumento de actividad PAL causado por los áfidos. Sin embargo, plantas de 10 y 16 días presentaron una mayor respuesta de actividad provocada por el insecto.

Al analizar el contenido de flavonoides, se encontró sólo un compuesto mayoritario, tanto en plantas sanas como infestadas, saponarina una C-glicosil flavona. El contenido de saponarina aumentó con la infestación, siendo su acumulación posterior al incremento de actividad PAL (60 h). El cv. Libra presentó el mayor contenido de saponarina ($105 \text{ mmol g}^{-1} \text{ p.s.}$), 3 veces el contenido observado en el cultivar Frontera (menos susceptible). Cuando se analizó el porcentaje de aumento del flavonoide respecto al control, el cv. Frontera presentó el mayor porcentaje de acumulación (35,2% a las 60 h de infestación), seguido de Libra (21,5%) y Acuario (24,1%). El cultivar Libra mostró además, un retraso de 48 h en el aumento de saponarina con respecto a los cultivares Frontera y Acuario, bajo infestación. En los experimentos de densidad de infestación, la acumulación del flavonoide se correlacionó positivamente con la densidad inicial de los áfidos. En los ensayos de dietas artificiales, la saponarina mostró ser tóxica para los áfidos. La sobrevivencia se redujo en un 50% al alimentar los áfidos con 3mM de saponarina por 24 h. Estas evidencias sugieren que la saponarina podría participar dentro de la estrategia defensiva de la cebada ante los áfidos.

El contenido total de fenoles esterificados de pared aumentó con la infestación y este aumento fue posterior al aumento de la actividad PAL. El cultivar Frontera presentó la mayor acumulación de fenoles de pared (alrededor de un 40%, a las 60 h de infestación), mientras que los cultivares Libra y Acuario alcanzaron un 23 y 20%, respectivamente. Al estudiar el efecto de la densidad de infestación sobre el contenido de fenoles de pared, se encontró que éstos aumentan como resultado de un mayor densidad de áfidos. También, se estudió el efecto de los áfidos sobre el contenido de lignina. El

nivel basal de lignina en el cultivar. Frontera fue el doble del contenido presente en el cultivar Libra y un 25% mayor que en Acuario. Se observaron dos fases de acumulación de lignina, ambas posteriores al aumento de actividad PAL por los áfidos. En la primera fase de acumulación (desde las 60 a 132 h de infestación), el cultivar Frontera presentó sólo 7% de aumento de lignina, mientras que en el cultivar Acuario fue del 12%. En este experimento el cultivar Libra presentó un retraso de 48h en la acumulación de lignina. La segunda fase de aumento de lignina, ocurrió al final del experimento y se correlacionó negativamente con la susceptibilidad de los cultivares. Además, el contenido de lignina se incrementó en función directa al nivel de infestación.

En síntesis, bajo condiciones de infestación ocurre un aumento de actividad PAL que se correlacionó en parte con el nivel de susceptibilidad de los cultivares de cebada y cuyo aumento resulta en un mayor contenido de flavonoides, fenoles esterificados de pared celular y lignina. En todos los casos, el aumento de los compuestos señalados fue posterior al aumento de actividad PAL y dependiente del nivel de infestación. Estas evidencias, sugieren que la acumulación de los fenoles de pared, lignina y el flavonoide saponarina, podrían ser importantes en la resistencia a los áfidos.

ABSTRACT

Infestation of barley by aphids causes serious physiological alterations, resulting in a significant loss of productivity in crops. In response to this attack, the plants generate defense mechanisms. The attack of plants by insects and pathogens causes an increase in the activity of the enzyme phenyl alanine ammonia liase (PAL) and the synthesis of toxic phenolic compounds and the addition of phenols to the cell wall, and of lignin. This type of defensive response in the plant-aphid interaction has not been yet characterized. This thesis postulates that under aphid infestation the PAL activity would increase, and this would result in an increase of the flavonoids, wall phenols and lignin content. These changes in the phenyl propanoid circuit would be a defensive response of the plants faced with aphids. Then, a correlation would be expected between the changes of PAL activity and the content of flavonoids, wall phenols and lignin, under infestation conditions. On the other hand, the increase in PAL activity and of flavonoids, wall phenols and lignin contents should evidence a negative correlation with the degree of susceptibility of cultivars to aphids. To test this hypothesis it was decided to characterize the PAL activity induced under infestation, and to measure simultaneously the changes in flavonoids, wall phenols and lignin contents. These parameters were measured during the infestation period, with different aphid densities. Three barley cultivars were used, Frontera, Acuario and Libra, which had previously been tested for susceptibility to the

aphid *Schizaphis graminum* R.. Frontera is the least susceptible cultivar, followed by Libra and Acuario.

PAL activity increases significantly with infest, showing bimodal kinetics. The Frontera cultivar showed the largest increase in PAL activity, with the first PAL activity peak at around 36 h. This peak represented an increase of nearly four times the activity present in healthy plants. The second PAL activity peak was similar in magnitude for all cultivars. The increase of PAL activity at 36 h in the Libra cultivar was not in accordance with its level of intermediate susceptibility, showing a lower increase in PAL activity than the cultivar Acuario the most susceptible (only 1,5 times as compared with the healthy cultivar control). Since cv. Frontera showed the greatest increase in PAL activity, it was used to characterize some aspects of the effect of aphids on the activity of the enzyme. There was a positive correlation between the PAL activity level, and the infestation density. It was also found that in infested plants, kept under continuous light photoperiod, there was a higher increase in PAL activity compared with healthy plants and infested plants kept under a normal photoperiod cycle (light/darkness, 14:10). This result shows that there was an additive effect of the extension of the photoperiod on PAL activity induced by aphids. When analyzing the effect of age on the capacity of PAL induction under infestation it was found that there was an important decrease in basal activity with age, but that this decrease did not affect directly the PAL increase capacity. However, 10 to 16 days old plants showed a greater response of activity by aphids.

When analyzing the flavonoids contents, only one major component was found, in both healthy and infested plants: saponarin, a C-glycosil flavone. The saponarin content

increased significantly as a result of infestation. Its accumulation occurred after the increase in PAL activity (60 h). The cv. *Libra* showed the largest saponarin content (105 μ moles/g p.s.), three times that observed in the *Frontera* cultivar (less susceptible). When analyzing the percentages of increase of the flavonoid as compared with the control, the cv. *Frontera* showed the largest accumulation percentage (35,2% at 60 h from infestation), followed by *Libra* (21,5%) and *Acuario* (24,1%). The cv. *Libra* showed also a delay of 48 h in the increase of saponarin under infestation, as compared with *Frontera* and *Acuario*. In the infestation density experiments the accumulation of flavonoid correlated positively with the initial density of aphids. In artificial diet experiments, saponarin showed a toxicity to the insect. The survival was reduced by 50% by 3mM of saponarin after 24 h. This evidence suggests that saponarin could participate in the defense strategy of barley against aphids.

The total content of sterified wall phenols increased under infestation, and this increase occurred later than that of PAL activity. The *Frontera* cultivar showed the largest accumulation of wall phenols (around 40% at 60 h after infestation), while *Libra* and *Acuario* reached 23 and 20% respectively. When studying the effect of infestation density on wall phenols content, it was found that these increase as a result of a greater aphid density. The effect of the aphids on lignin content was also studied. We found that the basal level of lignin in the *Frontera* cv. was twice that of the content in *Libra*, and 25% higher than in *Acuario*. Two phases of lignin accumulation were observed, both occurring after the increase in PAL activity caused by the aphids. In the first accumulation phase (from 60 to 132 h after infestation), *Frontera* showed a lignin

increase of only 7%, while that of Acuario was 12%. In this experiment, the Libra showed again a delay of 48 h in accumulation, of lignin. The second lignin increase phase occurred at the end of the experiment, and the density of infestation was related to the susceptibility of the cultivars. Lignin content, also increased as a direct function of infestation level of the plants.

In synthesis, under infestation conditions there was an increase of the PAL activity which correlates partly with the susceptibility level of the barley cultivars. This increment results in an increase in flavonoids, cell wall sterified phenols and lignin. In all cases, the increase in these compounds occurred after the increase PAL activity under infestation, and depended on the infestation level. This evidence suggests that the accumulation of wall phenols, lignin and the flavonoid saponarin could be involved in the resistance of barley to aphids.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *La cebada y los áfidos*

La infestación de los cereales con áfidos produce graves alteraciones fisiológicas que resultan en una significativa pérdida de productividad, debido a la detención del crecimiento e incluso la muerte de las plantas en estadios tempranos del desarrollo (Miller y Haile, 1998; Zerené y Quiroz, 1993; Noranbuena, 1992). Estos insectos, además, actúan como vectores de partículas virales, como es el caso del virus del enanismo amarillo de la cebada, VEAC (Noranbuena, 1992). La cebada es uno de los principales cultivos de cereales en el mundo (Poehlman, 1985). En Chile, su cultivo abarca la zona central y es poco importante con respecto a otros cereales, siendo atacada por distintas especies de áfidos, entre ellos, *Schizaphis graminum* Rondani. Este áfido, también llamado pulgón verde, es una de las plagas más agresivas en los cultivos de Norteamérica (Starks y Webster, 1985). En Chile, las plagas de áfidos fueron muy importantes en la década de 1970, proliferando el uso de pesticidas; sin embargo, en esa misma época comienza la introducción de enemigos naturales como coccinélidos y parasitoides (1975), los cuales se establecieron y redujeron notablemente la incidencia de algunas especies de áfidos en los cultivos (Gerding, 1992). El control integrado ha sido la mejor estrategia para mantener poblaciones bajas de áfidos, además del mejoramiento genético de los cultivos para encontrar variedades resistentes (Quiroz y Zerené, 1992).

Entre los daños causados por los áfidos en la cebada, están la disminución del contenido de clorofila, azúcares totales y proteínas solubles, reducción de la eficiencia fotosintética y del crecimiento (Cabrera, 1994). Uno de los cambios significativos, es la reducción del potencial hídrico de las hojas, lo que se manifiesta como síntomas de marchitez. Ello es causado por la caída del contenido de ácido abscísico (ABA), hormona que regula la respuesta de cierre de los estomas en respuesta al estrés hídrico (Trejos y col., 1993). Paralelamente, en la cebada se genera una serie de respuestas defensivas como son el aumento de actividad de peroxidasas de pared (Indarte, 1995; Chaman, 1997), contenido de inhibidores de proteinasas (Casaretto, 1996) y aumento del ácido ferúlico soluble (Cabrera, y col. 1995). Además de estos cambios metabólicos, se ha encontrado que la cebada contiene un protoalcaloide indólico, gramina, el cual es altamente tóxico para los áfidos y su contenido se correlaciona negativamente con la susceptibilidad de los cultivares (Corcuera, 1993).

La participación de compuestos de la vía metabólica fenilpropanoide en los estudios de la interacción insecto-planta y patógeno-planta, ha sido particularmente importante. Entre los metabolitos estudiados, se han encontrado compuestos disuasivos para la actividad de insectos y otros altamente tóxicos (Dixon y Paiva, 1995). También, se ha demostrado que durante el ataque de insectos masticadores o producto de un daño mecánico ocurren significativos aumentos en la composición de lignina y fenoles de pared celular (Dixon y Paiva, 1995). El estudio de la enzima fenil alanina amonio liasa (PAL) ha despertado gran interés, pues ella es clave en la vía fenilpropanoide y es regulada por una variedad de factores de estrés biótico y abiótico (Hahlbrock & Scheel, 1989)

1.2 La actividad PAL y la vía metabólica fenil propanoide

Muchos metabolitos secundarios denominados fenoles o fenilpropanos en plantas derivan de la fenilalanina y/o tirosina. En la mayor parte de las especies el paso clave en su biosíntesis es la conversión de L-fenilalanina a ácido *t*-cinámico, reacción catalizada por la enzima PAL (EC 4.3.1.5.). Esta es la primera reacción que da origen a la vía de síntesis de los fenilpropanos (Harborne, 1982). Entre los compuestos denominados fenilpropanos están los ácidos fenólicos, ésteres solubles, cumarinas, flavonoides, isoflavonoides, suberina y lignina. Algunos de ellos pueden ser pigmentos florales que actúan como atractores de insectos polinizadores, antibióticos (fitoalexinas), protectores contra la luz UV, repelentes a insectos (disuasivos) y moléculas señalizadoras en interacciones microorganismo-planta. También pueden formar estructuras poliméricas complejas, como la lignina y suberina, compuestos que participan en la estructuración de la pared celular (Hahlbrock & Scheel, 1989). La PAL fue descubierta en plántulas de cebada por Koukol y Conn (1961), y ha sido la enzima más estudiada con relación a la síntesis de metabolitos secundarios en plantas. La apoproteína es un tetrámero cuya masa molecular es cercana a los 330 kDa. La actividad de la enzima es sensible a inhibición por su producto *in vitro* (ácido *t*-cinámico); además, se ha demostrado que el ácido *t*-cinámico inhibe la transcripción de los genes PAL, por lo que se ha postulado como regulador endógeno de su síntesis y actividad (Dixon y Paiva, 1995; Bolwell y col., 1988). PAL presenta cooperatividad negativa con su sustrato, observándose dos aparentes constantes de Michaelis (Jones, 1984). Los genes de la enzima han sido estudiados en especies de dicotiledóneas y monocotiledóneas, como tabaco, cebada, apio,

arveja, papa, zanahoria, remolacha, poroto, trigo y arroz, encontrándose que corresponden a una pequeña familia multigénica (Hahlbrock & Scheel, 1989; Kervine y col., 1997; Fukasawa - Akada y col., 1996; Yamada y col., 1994; Tanaka y col., 1989). En cebada, se han encontrado al menos 5 genes *pal* (*hpal 2*, *hpal 3*, *hpal 4*, *hpal 6* y *hpal 7*). La expresión de los transcritos de *hpal2* en cebada disminuye con la edad de los órganos, encontrándose la mayor acumulación en las raíces (Kervine y col., 1997). Los genes de PAL son expresados diferencialmente en distintos tejidos y estados de desarrollo (Liang y col., 1989; Bevam y col., 1989). Concomitantemente con el cambio de expresión de los genes, los niveles de actividad también cambian con la edad de las hojas, frutos y en los tallos de especies herbáceas (Knogge y Weissenböck, 1986; Lister y Lancaster, 1996; Cheng y Breen, 1991; Morrison y Buxton 1993; Fünfgelder y col., 1994).

PAL ha sido caracterizada como una proteína citosólica, pero también ha sido encontrada en fracciones enriquecidas con cloroplastos de cebada (Souders y McClure, 1975). Recientemente, mediante estudios de inmunocitoquímica y fraccionamiento celular en glándulas de *Primula kiewensis* y en elementos de traqueas en diferenciación en *Zimia*, se ha encontrado que PAL se encuentra asociada a regiones densas de retículo endoplásmico, vesículas del dictiosoma, plasmalemma y apoplasto (Nakashima y col., 1997; Schöpker y col., 1995). Estos resultados sugieren que hay dos tipos de PAL en la célula, uno asociado al citoplasma para la síntesis de compuestos solubles (flavonoides, ésteres solubles, etc.) y otro que sería secretado por el Golgi a la pared celular,

probablemente involucrado en la síntesis de los fenoles estructurales, como son lignina y ácido diferúlico (Whetten y Sederoff, 1995).

1.3 Regulación de la actividad PAL por factores abióticos

La luz produce un aumento de la actividad PAL en cultivos celulares (Zimmermann y Hahlbrock, 1975). Este aumento de actividad es regulado por el espectro de luz roja, respuesta que es mediada por fitocromo (Souders y McClure, 1975; Reddy y col., 1994). El aumento de actividad PAL durante el día presenta un máximo de actividad a las cuatro h, el cual es dependiente de luz roja y mediado por la activación fitocromo, luego se produce otro pico de actividad a las 12 h, el que no es revertido por luz roja lejana. Este segundo aumento de actividad está regulado por luz UV-B. El aumento de actividad PAL mediado por luz UV-B se acopla a la síntesis de antocianinas, compuestos que actuarían como filtros para estas longitudes de onda (Reddy y col., 1994). En zanahoria, se ha determinado que existe una relación directa entre los espectros de luz con el espectro de acción de la expresión de PAL y de la enzima chalcona sintetasa (CHS). Ambas enzimas tienen un máximo de expresión en el espectro del UV-B, coincidente con la radiación que estimula la síntesis de las antocianinas (Takeda y col., 1994; Hahlbrock & Scheel, 1989). La enzima chalcona sintetasa cataliza la formación de naringenina a partir de 4-coumaroil-CoA y malonil-CoA. Esta reacción es el paso esencial para la biosíntesis de flavonoides (Kreuzaler y Hahlbrock 1975; Schröder y col., 1979; Lewisstsohn y col., 1989; Beggs y col., 1987). La importancia de la síntesis de flavonoides para prevenir los efectos de la luz UV ha sido puesta de

manifiesto en mutantes de síntesis de flavonoides en *Arabidopsis thaliana*, los que resultan ser hipersensibles a este tipo de radiación (Li y col., 1993).

La actividad PAL puede ser inducida por otros factores abióticos, en ausencia de luz y sin inducción concomitante de la CHS (Schröder y col., 1979). Así la actividad de PAL aumenta frente a la disminución de la temperatura, con el aumento de la intensidad de la radiación de luz y bajo déficit nutricional de las plantas, especialmente cuando el contenido de nitrógeno y fósforo en el suelo son deficientes (Hirai y col., 1994; 1995, Leyva y col., 1995; Solecka y Kacperska, 1995; Shinozaki y col., 1994). Otro factor que afecta la actividad de la enzima es el daño mecánico, por ejemplo el producido por el viento excesivo. Experimentalmente, se ha visto que el daño mecánico aumenta la actividad PAL y que ello se debe a síntesis *de novo* de la enzima y a la expresión de varias isoformas (Ishizuka y col., 1991; Tanaka y col., 1989). En papa, la actividad PAL inducida por daño mecánico alcanza sus valores máximos a las 72 h (Oosterhaven y col., 1995).

1.4 *Efecto de agentes de estrés biótico en la actividad PAL*

1.4.1 *Participación de PAL y la vía fenilpropanoide en la relación hongo-planta*

La actividad PAL aumenta rápidamente como respuesta al ataque de hongos, virus y bacterias (Dixon y Paiva, 1995). En estos casos, el aumento de actividad PAL resulta en la acumulación de una serie de compuestos fenólicos como los isoflavonoides, las cumarinas y los flavonoles, entre otros (Dixon y Paiva, 1995; Börner y Grisebach, 1982; Orr y col., 1993). Entre los patógenos, los hongos son de gran interés dado su alta

patogenicidad y los niveles de daños que causan en las plantas. Cuando se inoculan órganos o suspensiones celulares de plantas resistentes, con esporas o micelio de hongos patógenos se produce un rápido incremento de actividad y síntesis de PAL y CHS, en comparación con los cultivos susceptibles (Miklas, y col., 1993; Corchete, y col., 1993; Cui, y col., 1996). Similar respuesta ha sido obtenida en hipocótilos de poroto soya inoculados con cepas incompatibles de *Phytophthora megaspora*, en comparación a cepas compatibles (Börner y Grisebach, 1982). El aumento de actividad PAL en estos casos es mediada por la acción de compuestos elicitors de pared celular del hongo, como los glicanos (Dalkin y col., 1990; Bolwell y col., 1985; Lawton y col., 1983; Jorin y Dixon, 1990). Así, tratamientos con elicitors fúngicos producen un rápido aumento de la actividad PAL y CHS, presentando una cinética similar con un máximo de actividad a las 12 h, para luego decaer a un nivel de actividad superior al basal (Dalkin y col., 1990). En poroto, la aplicación de elicitors más ácido *t*-cinámico (inhibidor de PAL), produce una disminución de la actividad de CHS. Igual resultado se ha observado al aplicar el ácido L- α -Amino-oxy- β -fenilpropanoico (AOPP), un inhibidor de la reacción de PAL (Bolwel y col., 1988). Los resultados sugieren una función reguladora de la PAL y CHS en la vía de síntesis de flavonoides bajo condiciones de infección por hongos. En este sistema, la actividad PAL estaría acoplada a la actividad de la CHS para la síntesis de isoflavonoides (fitoalexinas), compuestos tóxicos para el hongo. Por otro lado, el aumento de actividad PAL resultaría en un incremento de la síntesis de lignina, compuesto que limitaría el acceso del patógeno a la planta (Notsu, y col., 1994).

En un estudio de interacciones patogénicas entre plantas transgénicas de *A. thaliana* con el promotor *PAL1* fusionado a GUS y el hongo *Peronospora parasitica*, se encontró la acumulación de ácido salicílico es necesaria para la significación durante la reacción de hipersensibilidad (HR). Este resultado fue encontrado en presencia de inhibidos de PAL y cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD), enzima que participa en la formación de los residuos alcohólicos de la lignina (Mauch-Mani y Slusarenko, 1996; Whetten, y col., 1998). Las mismas evidencias han sido encontradas en cebada infectada con el hongo *Erysiphe graminis* (patogénico) y *Erysiphe pisis* (no patogénico) en estudios de interacciones compatibles e incompatibles (Zeyen y col., 1995, Shiraishi y col., 1989). En cebada, el hongo produce una respuesta bimodal en la acumulación de transcritos y actividad PAL. Tanto en interacciones compatibles como incompatibles con el patógeno, el aumento de actividad PAL es rápido, observándose un pico de actividad a las seis h asociado a la penetración del hongo y estaría relacionado con la respuesta HR (Clark y col., 1994).

1.4.2 *La vía fenilpropanoide en la interacción insecto-planta*

Horber (1980) definió tres categorías de efectos que las plantas resistentes producen en los insectos: antibiosis, en la cual la biología del insecto se ve negativamente afectada; antixenosis, en la que la planta actúa como un hospedante pobre; y tolerancia. En esta última categoría, las plantas tienen la capacidad de disminuir el daño causado por el insecto y recuperarse parcialmente. Los compuestos fenólicos pueden participar en una o varias de estas categorías.

En los estudios de la interacción insecto-planta, las evidencias sugieren la participación de compuestos fenilpropanoides en los mecanismos de defensa (Dixon y Paiva, 1995). Entre los cereales el trigo ha sido la especie más estudiada en estos aspectos. Leszczynski y col. (1985), encontraron que para el áfido *Rhopalosiphum padi* la preferencia alimentaria por un cultivar de trigo estaba asociada al nivel de compuestos fenólicos en la planta, y además, que la alimentación de este áfido con dihidroxifenoles resulta en una inhibición de su desarrollo. Junto a lo anterior, se ha encontrado que la infestación en trigo produce un aumento del contenido de fenoles, de actividad PAL y de la enzima tirosina amonio liasa (TAL), enzima que se encuentra en monocotiledóneas y también da lugar a la síntesis de ácidos cinámicos (Leszczynski, 1985; Ciepiela, 1989). Entre los compuestos fenólicos presentes en trigo, se ha observado que existe una correlación inversa entre el contenido de flavonoides y la preferencia alimentaria de los áfidos por los cultivares (Nariz y col., 1985). Los flavonoles, como por ejemplo quercetina, d-catequina y naringina disminuyen la sobrevivencia de los áfidos *Schizaphis graminum* y *Myzus persicae*, alimentados con dietas artificiales (Jördens-Röttger 1979; Dreyer y col., 1981; Todd y col., 1971).

En cebada, el metabolismo fenil propanoide bajo infestación por áfidos ha sido muy poco estudiado. Cabrera y col. (1995), determinaron un aumento del ácido ferúlico soluble en plantas de cebada infestadas con *S. graminum*. También encontraron que el ácido ferúlico aplicado en dietas artificiales a *S. graminum*, resulta ser tóxico para el áfido. Además de los cambios en los fenoles solubles, otros autores han estimado que ocurre un aumento del contenido de fenoles de pared, observado como un incremento de

autofluorescencia inducida por luz UV, en las zonas de infestación (Belefant- Miller y col. 1994). Estudios en nuestro laboratorio, han permitido determinar que los áfidos producen un importante aumento de la actividad de peroxidasas de pared celular (Chaman, 1998; Indarte, 1995). El aumento de este tipo de peroxidasas contribuiría a la reparación de la pared celular mediante la síntesis de lignina, el entrecruzamiento entre polímeros de carbohidratos (González, 1998), y además, el entrecruzamiento de estos dos tipos de polímeros con proteínas estructurales de pared celular (Cassab, 1998).

Así como en trigo, en la cebada se encuentra un grupo diverso de flavonoides. Mediante análisis de cromatografía en placa (TLC), se han identificado 26 flavonoides en las hojas de cebada, en distintos cultivares (Fröst y col., 1977). Cinco son flavonas O-glicósidos, nueve son derivados de la flavanona vitexina y un grupo mayoritario derivado de la flavona iso-orientina. En muchos cultivares, se encuentran principalmente tres C-glicosil-flavonas, siendo saponarina y lutonarina los más frecuentes (Seikel y Bushnell, 1959; Seikel y col., 1962). En el caso de estos flavonoides no se conoce su efecto sobre los áfidos, pero se sabe que se encuentran preferentemente en la epidermis (Dietz y col., 1994), y que su síntesis es controlada por luz roja y radiación UV-B (McClure y Wilson, 1970; Liu y col., 1995).

1.5 Importancia de la actividad PAL y la vía fenil propanoide en las estrategias defensivas de la cebada al ataque de áfidos.

Los áfidos generan un daño particular y especializado, que les permite sobrepasar muchas de las barreras ofrecidas por metabolitos secundarios. Como consecuencia de lo

anterior, la infestación por áfidos en cereales produce significativas pérdidas de productividad (Miller y Haile, 1998, Zerené y Quiroz, 1993, Noranbuena, 1992). Existen muchas evidencias de la importancia del metabolismo fenil propanoide como mecanismo de defensa al ataque de patógenos y pestes (Dixon y Paiva, 1995). En cereales, la participación de compuestos fenólicos en la tolerancia a los áfidos, ha sido estudiada principalmente en trigo, mientras que en cebada se tiene poca información. En cultivares de trigo bajo infestación, ocurre un aumento de la actividad PAL como del contenido de fenoles solubles y la acumulación de éstos compuestos se correlaciona inversamente con el nivel de susceptibilidad al áfido (Leszczynki, 1985; Leszczynki, y col., 1985; Cipiela, 1989; Nariz y col., 1985).

En cebada, los cultivos comerciales son en general susceptible al ataque de áfidos, sin embargo, es posible encontrar cultivares con distintos grados de susceptibilidad (Casaretto, 1996), lo que ha sido correlacionado a la presencia del protoalcaloide gramina (Corcuera, 1993). Durante la infestación, se ha determinado un significativo aumento de ácido ferúlico soluble, mientras que el contenido de fenoles solubles no se modifica significativamente (Cabrera, 1994). Este fenómeno podría ser explicado por la insolubilización de estos compuestos en la estructura de la pared celular, al formar parte de la lignina o ácido diferúlico, el cual participa en el entrecruzamiento de polímeros de pared celular (Ikegawa y col., 1996). Tanto en trigo como en cebada, no existen estudios cinéticos de la variación de la actividad PAL y acumulación de compuestos fenólicos bajo infestación de áfidos. Este tipo de trabajo permitiría caracterizar de mejor forma las respuestas defensivas de las plantas al insecto y también la temporalidad de los cambios metabólicos de la vía fenilpropanoide que están asociados. Los antecedentes expuestos hacen de la cebada un excelente material de estudio para comprender la participación del metabolismo fenilpropanoide, en la estrategia defensiva de los cereales al ataque de áfidos.

En esta tesis se postula la siguiente hipótesis:

En la cebada se modificaría la actividad PAL en respuesta a la infestación por áfidos. Estos cambios de actividad se reflejarían en variaciones en el contenido de compuestos fenólicos en la planta y serían importantes en la defensa de la planta contra el ataque de los áfidos.

El objetivo general de esta tesis es caracterizar los cambios de actividad PAL producida por la infestación de áfidos en cebada, en el contenido de flavonoides, fenoles esterificados de pared y lignina y relacionarlos con la susceptibilidad de los cultivares de cebada a los áfidos.

Los objetivos específicos planteados son:

- 1.- Evaluar los cambios de actividad PAL bajo condiciones de infestación en tres variedades de cebada, que presentan diferente susceptibilidad al áfido *Schizaphis graminum*.
- 2.- Caracterizar los cambios en el contenido de flavonoides bajo condiciones de infestación.
- 3.- Determinar si los flavonoides presentes en cebada son tóxicos para los áfidos.
- 4.- Caracterizar los cambios en el tiempo del contenido de fenoles de pared y lignina en cebada bajo infestación.
- 5.- Determinar si los cambios en el contenido de fenoles de pared y lignina se correlacionan con el aumento de actividad PAL y con el nivel de daño causado por los áfidos.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 *Material vegetal*

Se usaron Plantas de cebada (*Hordeum vulgare* L.), de los cultivares Acuario, Libra y Frontera, que presentan distinto grado de susceptibilidad al áfido *Schizaphis graminum* Rondani. El cv. Frontera presenta la menor susceptibilidad al ataque de los áfidos, mientras los cvs. Libra y Acuario son los más susceptibles (Casaretto, 1996). Los cultivares fueron sembrados en potes con vermiculita e incubados en una cámara de cultivo a 25°C bajo un fotoperíodo de 14/10 h (luz / oscuridad) y con una radiación de 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$. Las plantas se mantuvieron en un sistema de cultivo hidropónico con solución nutritiva Hoagland, el cual fue suplementado tres veces por semana.

2.2 *Obtención de los áfidos e infestación:*

Los áfidos de la especie *Schizaphis graminum* Rondani fueron crecidos sobre plantas de cebada del cv. Frontera, mantenidas de acuerdo a las condiciones descritas en el párrafo anterior. Plantas de cebada de 10 días de edad se infestaron con 20, 40 ó 60 áfidos ápteros iniciales por planta. Además, se realizaron experimentos de infestación con plantas de distinta edad con el cv, Frontera. Este fue infestado con 40 áfidos iniciales en plantas de 8, 10, 12, 14, 16 y 20 días de edad. En cada caso el tiempo cero fue fijado al inicio del fotoperíodo. Las infestaciones se realizaron usando macetas con aproximadamente 100 plantas de cada cultivar. Los áfidos fueron colectados desde la colonia en hojas previamente cuadrículadas, sobre las cuales se muestrearon 10

cuadrantes para estimar la densidad de los áfidos. Los áfidos previamente contados se depositaron homogéneamente en la maceta con un pincel, esta operación se repitió con tres a cinco macetas en cada experimento. Para todas las mediciones, cada muestra fue obtenida por triplicado con cada réplica tomada desde una maceta diferente, tanto para el grupo control (plantas sanas) como para el grupo experimental (plantas infestadas). Cada réplica de un g de peso fresco, correspondiendo de cinco a 10 individuos dependiendo del cultivar y edad de las plantas.

2.3 Ensayo de actividad PAL

Se midió la actividad PAL en hojas de plantas infestadas y sanas, manteniendo las plantas en las condiciones de crecimiento. La actividad PAL fue evaluada según la metodología de Zucker (1965), cuantificando la formación de ácido trans-cinámico en un extracto crudo de proteínas. Se realizó una extracción de proteínas a partir de 1g de tejido fresco usando 3 ml de un amortiguador borato (0,1 M, pH 8,8), conteniendo β -Mercaptoetanol (0,01 M) y PMSF (3 mM). El tejido se homogeneizó en un mortero frío (4°C) con el amortiguador de extracción más 150 mg de PVPP y 0,5 g de arena de cuarzo lavada; el extracto se diluyó con 3 ml del amortiguador de extracción y se centrifugó a 10.000 g x 10 min. a 4°C. La actividad PAL se ensayó con una alícuota del sobrenadante obtenido (100 μ l), L-fenilalanina 10 mM y el amortiguador de extracción en un volumen final de 3 ml. La muestra de sobrenadante contenía entre 100 a 150 μ g de proteína, donde la actividad de la enzima es lineal en el tiempo y proporcional a la concentración de proteínas. El blanco consistió en los componentes del ensayo sin L-

fenilalanina. El producto de la reacción se midió a 290 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-240, durante una h. La actividad enzimática se expresó en pKat (pico moles de ácido cinámico formado por segundo), como actividad específica (por mg de proteína) y total (por gramo de peso fresco), utilizando el coeficiente de extinción molar del ácido cinámico (10.000 l/mol).

2.4. Purificación y determinación de flavonoides

Se colectaron 500 g de hojas de plantas sanas e infestadas con 40 áfidos durante seis días, de los cultivares Frontera y Libra. Las hojas fueron finamente picadas y extraídas exhaustivamente en metanol, (tres veces por 24 h). Los extractos metanólicos fueron evaporados a presión reducida y llevados a sequedad. Se tomaron cinco g de cada uno de los extractos crudos (F001) y fueron fraccionados en 100 ml de agua destilada. Se separó la fracción hidrosoluble mediante filtración y fue evaporada. Este purificado (F002), fue nuevamente fraccionado, esta vez con acetona, recuperándose la fracción insoluble (F005). Esta fracción fue primero purificada en una columna de fase reversa en un sistema de presión media (MPLC), eluída con agua para eliminar sales y azúcares. Posteriormente, se eluyó con acetonitrilo 50%; de esta manera, se obtuvo la fracción F007. Esta fracción estaba enriquecida en flavonoides, los cuales fueron purificados nuevamente en una columna de Sephadex LH20 / MeOH, y cristalizados. Los cristales así obtenidos fueron analizados. El flavonoide purificado fue analizado por espectrometría de masas APCI, MS-MS y espectro UV. Para verificar la presencia de flavonoides en los distintos pasos de purificación, las fracciones fueron analizadas

mediante TLC en placas de celulosa (1D), usando como solvente de elución la mezcla n-BuOH: ácido acético: agua (40:10:50). Las placas fueron reveladas por exposición a la luz ultravioleta (UV) y con 2-aminoetil difenilborato (NA). Los compuestos purificados fueron analizados en HPLC, con una columna RP 18 Lycrosphere (5 μ m, 250 ID 4.6 mm), con la finalidad de establecer su grado de pureza.

2.5 Cuantificación de saponarina mediante HPLC

Se obtuvieron extractos metanólicos, a partir de 2 g de hojas, como se indicara previamente. Cada extracto metanólico fue resuspendido en el solvente de elución usado para la cuantificación de saponarina por HPLC. Las muestras resuspendidas fueron centrifugadas en una microcentrifuga a 12000 rpm por cinco minutos y fue recuperado el sobrenadante. El análisis mediante HPLC se realizó en un equipo Knauer con un detector de longitud de onda variable y una columna RP 18 (Superspherer, Merck, 4 μ m, 119*4mm, DI). El pico de saponarina fue detectado en una elución isocrática con H₂O: aceto nitrilo (97:3) y acetato de etilo 2,5% y H₃PO₄ 1,5%, a un flujo de 1,5 ml/min. La detección se realizó a 275 nm. El tiempo de retención de la saponarina bajo estas condiciones fue de 9 min. La curva de calibración fue realizada con el estándar obtenido de la purificación. Cada determinación se realizó con tres muestras independientes y cada muestra fue inyectada dos veces.

2.6 Obtención de paredes celulares para la determinación de fenoles y lignina

Se colectaron 2 gramos de hojas de plantas sometidas a los distintos tratamientos. Las muestras fueron picadas y extraídas en metanol (tres veces por 24 h), los residuos fueron secados a 40 °C y pesados. Muestras de 20 mg, fueron maceradas e incubadas con Pronasa E (0,5 mg/ml) en amortiguador Tris-HCl (50 mM, pH 7,0), durante 12 h a temperatura ambiente y agitación continúa. Se recuperaron los residuos y las paredes fueron lavadas tres veces con H₂O, MeOH y MeOH:CHCl₃ (1:1); finalmente, las muestras fueron secadas a 40°C.

2.7 Determinación del contenido relativo de fenoles unidos a paredes celulares

Los compuestos fenólicos esterificados a polisacáridos de pared celular fueron liberados por hidrólisis alcalina. Paredes celulares purificadas como se indicó en el punto anterior, fueron saponificadas en 5 ml de NaOH 2N (desgasificado) por 20 h en viales sellados con N₂ y en agitación continúa a temperatura ambiente. El sobrenadante fue colectado y se acidificó a pH 2,0, con HCl 5N. En esta fracción se evaluó el contenido relativo de fenoles esterificados mediante la técnica del folin de acuerdo a Swain y Hillis (1959). Una alícuota de la muestra (200 µl) se diluyó a 1 ml con agua y se hizo reaccionar con 250 µl del reactivo de Folin y 1ml de Na₂CO₃ 20% (p/v), durante una h a temperatura ambiente. La absorbancia del complejo coloreado se midió a 765 nm. El contenido de fenoles fue expresado como µg equivalentes de ácido ferúlico, ya que éste fue determinado como el componente mayoritario mediante análisis de HPLC.

2.8 Determinación de lignina

Paredes celulares purificadas fueron saponificadas, el residuo remanente fue lavado tres veces en H₂O, MeOH, MeOH:CHCl₃ (1:1), secado a 40°C y pesado. La determinación de lignina fue ensayada de acuerdo a Cahill y McComb (1992). Se midió los productos de la reacción del ácido tioglicólico con los residuos alcohólicos de la lignina (LTGA). Se hicieron reaccionar siete mg de pared purificada con 0,5 ml de ácido tioglicólico y 5ml HCl 2 N (4 h a 95°C). Luego se lavó el pellet con H₂O y fue resuspendido en 5ml de NaOH 0,5N por 16 h a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se acidificó con 1ml de HCl concentrado (incubado 4 h a 4°C) para precipitar los complejos de LTGA. Finalmente se obtuvo el precipitado, el que fue lavado con agua y se solubilizó en 5 ml de NaOH 0,5N. El contenido de lignina fue estimado midiendo la absorbancia del complejo LTGA a 280 nm.

2.9 Ensayo de dietas artificiales

Los áfidos de la especie *Schizaphis graminum* R pertenecen a un clon de ninfas ápteras, el cual ha sido mantenido en el laboratorio. Para evaluar el efecto de saponarina en la sobrevivencia de los áfidos, estos fueron crecidos con dietas artificiales conteniendo el flavonoide. El sistema usado para las preparación y aplicación de las dietas fue el descrito por Argandoña y col., (1983). Este consiste en preparar una solución rica en amino ácidos y sacarosa, la cual es depositada entre dos secciones de Parafilm, el que es colocado en un extremo de una cápsula abierta en ambos lados. Una vez preparada las cámaras, se depositaron 10 ninfas de tercer estadio en el interior y se selló la cámara con

un trozo de gasa. Los áfidos en estas condiciones fueron mantenidos bajo luz continua a 25°C durante-72 h. Se evaluó el efecto de la saponarina en concentraciones de 0,75; 1,5 y 3 mM. El número de áfidos vivos fue determinado a las 24, 48 y 72 h. Se determinó el porcentaje de sobrevivencia respecto al control. Para cada tratamiento se realizaron 10 repeticiones y el experimento se llevó a cabo 2 veces.

2.10 *Determinación de proteínas solubles*

La concentración de proteínas solubles en cada tratamiento y en las plantas control se realizó de acuerdo al método colorimétrico de Bradford (1976). La extracción de proteínas se realizó de acuerdo al método establecido para la medición de actividad PAL. La medición se llevó a cabo con 10 µl del sobrenadante obtenido de cada muestra y por duplicado. Esta alícuota se hizo reaccionar con el reactivo de Bradford por 10 minutos a temperatura ambiente, midiendo la absorbancia a 595 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-240 (P/N 204-58000). Se expresó el contenido de proteínas de acuerdo a una curva de calibración con albúmina de bovino (BSA).

2.11 *Peso seco de las plantas*

Muestras de un gramo de plantas sanas e infestadas de acuerdo a los distintos tratamientos fueron pesadas y contadas. Luego se colocaron en una estufa a 70°C hasta lograr el peso de equilibrio. Se determinó la variación del peso seco por gramo de materia fresca original, además del peso seco específico por planta. Todas las muestras fueron hechas por triplicado en experimentos independientes.

3. RESULTADOS

3.1 Actividad PAL en cultivares de cebada bajo condiciones de infestación por áfidos

3.1.a. Determinación de la actividad PAL en distintos órganos de cultivares de cebada

Inicialmente, se midió la actividad de PAL cada cuatro h, durante un periodo de 24h, en las hojas de plantas sanas y infestadas de los cultivares Frontera y Libra. En este experimento, no se encontraron diferencias significativas de actividad PAL entre plantas infestadas y sanas. Además, se observó una gran variabilidad en los valores de actividad que presentaban las muestras. Debido a este resultado, se decidió examinar el nivel de actividad PAL en los diferentes órganos aéreos de plantas sanas de 10 días, en los cultivares Frontera, Acuario y Libra. La medición se realizó en la lámina foliar de la primera y segunda hoja, en la vaina, y también en la raíz. La actividad PAL fue medida a las cuatro h de comenzado el periodo de luz y la actividad fue expresada como actividad específica (pKat mg⁻¹ de proteína) y total (pKat g⁻¹ p.f.). La mayor actividad específica, la presentó la vaina (sobre 99 pKat mg⁻¹ de proteína), seguida por la lámina de la segunda hoja (sobre 21 pKat mg⁻¹ de proteína) y finalmente la lámina de la primera hoja con aproximadamente 6 pKat mg⁻¹ de proteína de actividad PAL (Fig. 1A). Sin embargo, al comparar la actividad total entre la vaina y la 2ª hoja, las diferencias de actividad fueron menores (Fig. 1B). La gran diferencia en la actividad específica de la vaina comparado con la 2ª hoja, se debería al bajo contenido de proteínas que se encuentra en la vaina.

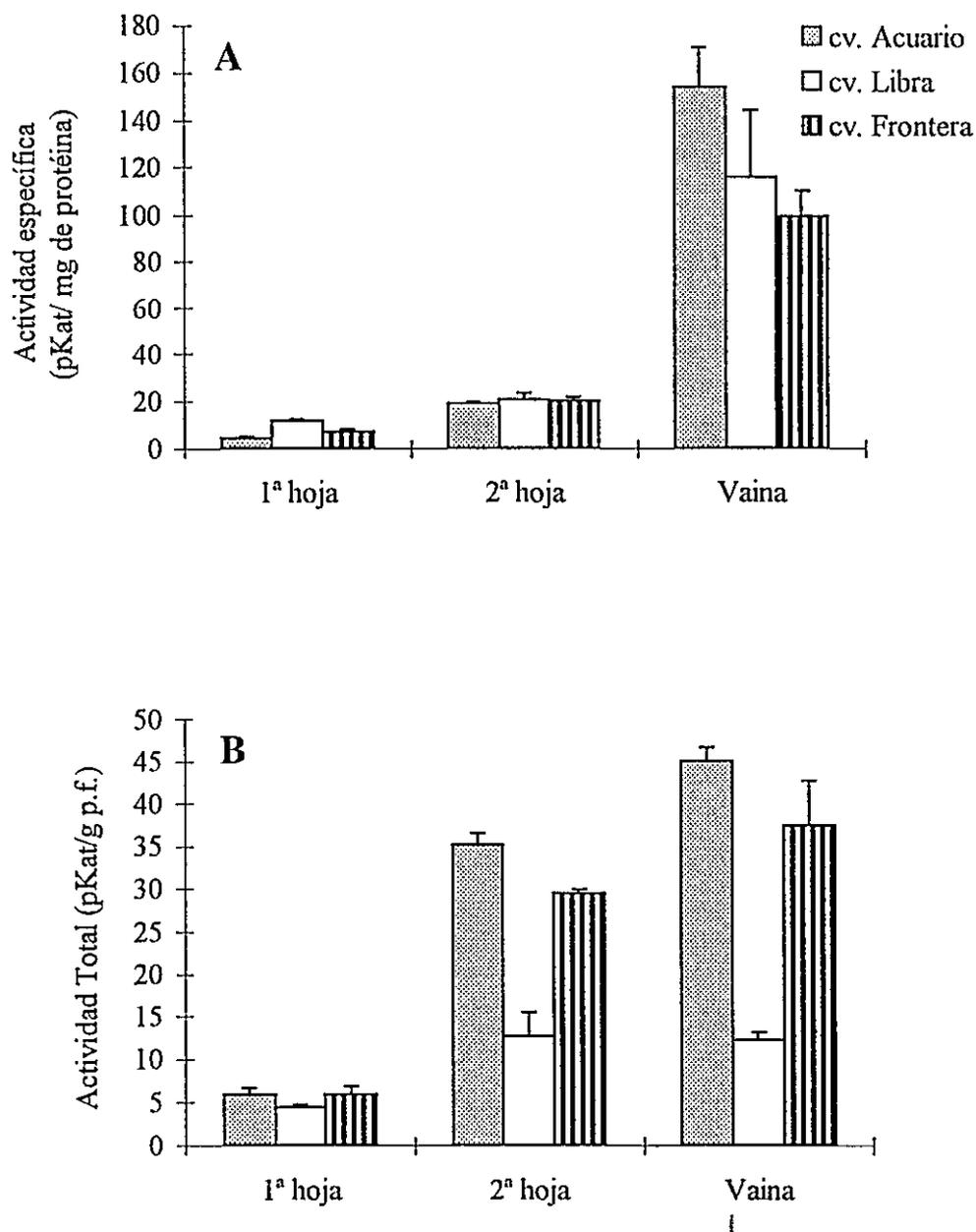


Figura 1. Actividad PAL presente en distinto órganos aéreos de cebada. Se determinó la actividad específica (A) y total (B) en la vaina, 1ª y 2ª hoja, en plantas de 10 días de los cultivares Acuario, Libra y Frontera. Cada valor representa el valor promedio de tres muestras ± 1 e.e.

Al comparar la actividad específica de PAL entre los cultivares, no se observaron diferencias significativas. En cambio, al comparar la actividad total, el cultivar libra mostró en todos los órganos un nivel menor de actividad PAL, mientras que Frontera y Acuario presentaron niveles de actividad similares. En la raíz, la actividad específica de PAL fue tres veces superior a la observada en la vaina, el cultivar Libra alcanzó valores de 330 pKat mg^{-1} de proteína y en Frontera cercano a los 600 pKat mg^{-1} de proteína. Es importante destacar que las plantas usadas en este experimento (10 días de edad), presentan una segunda hoja incipiente sobre todo en el cultivar Frontera. De acuerdo con estos resultados, se decidió medir la actividad PAL en los experimentos siguientes sólo en la lámina foliar del primer par de hojas.

3.1.b. Cinética de actividad PAL durante 48 h de infestación bajo fotoperíodo normal o en luz continua

Se examinó la cinética de actividad PAL medida cada cuatro h, en plantas sanas e infestadas con 20 áfidos iniciales, durante un período de 48 h. La cinética de actividad PAL en plantas sanas, medida como actividad específica o total, mostró una oscilación periódica entre el 1º y 2º día. Se observó un significativo aumento de la actividad de la enzima durante el período de luz, entre las ocho y 12 h, después de este tiempo los valores fueron disminuyendo al nivel inicial, respuesta que fue similar en los tres cultivares (Fig. 2). En cambio, en las plantas infestadas del cultivar Frontera y Acuario, la enzima presentó un aumento significativo de su actividad (Fig. 2A-B y 2E-D respectivamente), mientras que en el cultivar Libra mostró un pequeño aumento y sólo al

final del experimento (Fig. 2C-D). En los tres cultivares, el aumento de actividad PAL en plantas infestadas ocurrió después de las 24 h de infestación, esta respuesta fue coincidente entre la actividad total y específica de la enzima. En el cultivar Frontera el aumento fue progresivo después de las 36 h, alcanzando valores máximos de 15 y 12 pKat de actividad específica y total respectivamente. El cultivar Acuario, presentó un máximo de actividad alrededor de las 40 h, alcanzando 18 pKat mg⁻¹ de proteína de actividad específica y 16 pKat g⁻¹ p.f. de actividad total.

Para evaluar el efecto del aumento en el período de luz sobre la actividad de la enzima, plantas del cultivar Frontera fueron expuestas a un fotoperíodo de luz continua durante 48 h (Fig. 3). Durante las primeras 24 h, la cinética de actividad PAL en plantas sanas mostró las mismas tendencias observadas bajo un fotoperíodo normal de luz-oscuridad. En cambio, las muestras infestadas mostraron un aumento significativo de la actividad total y específica desde las 24h. En el segundo día de exposición a luz continua, ocurrió un aumento drástico de la actividad de la enzima en las plantas control e infestadas. En plantas sanas, la actividad específica a las 28 h fue 2,5 veces el nivel observado a las cuatro h, para luego ir disminuyendo hasta las 48 h. Al final del experimento, la actividad específica de PAL en plantas sanas alcanzó un valor de 6,7 pKat mg⁻¹ de proteína, el doble del observado a tiempo cero (3,4 pKat mg⁻¹ de proteína).

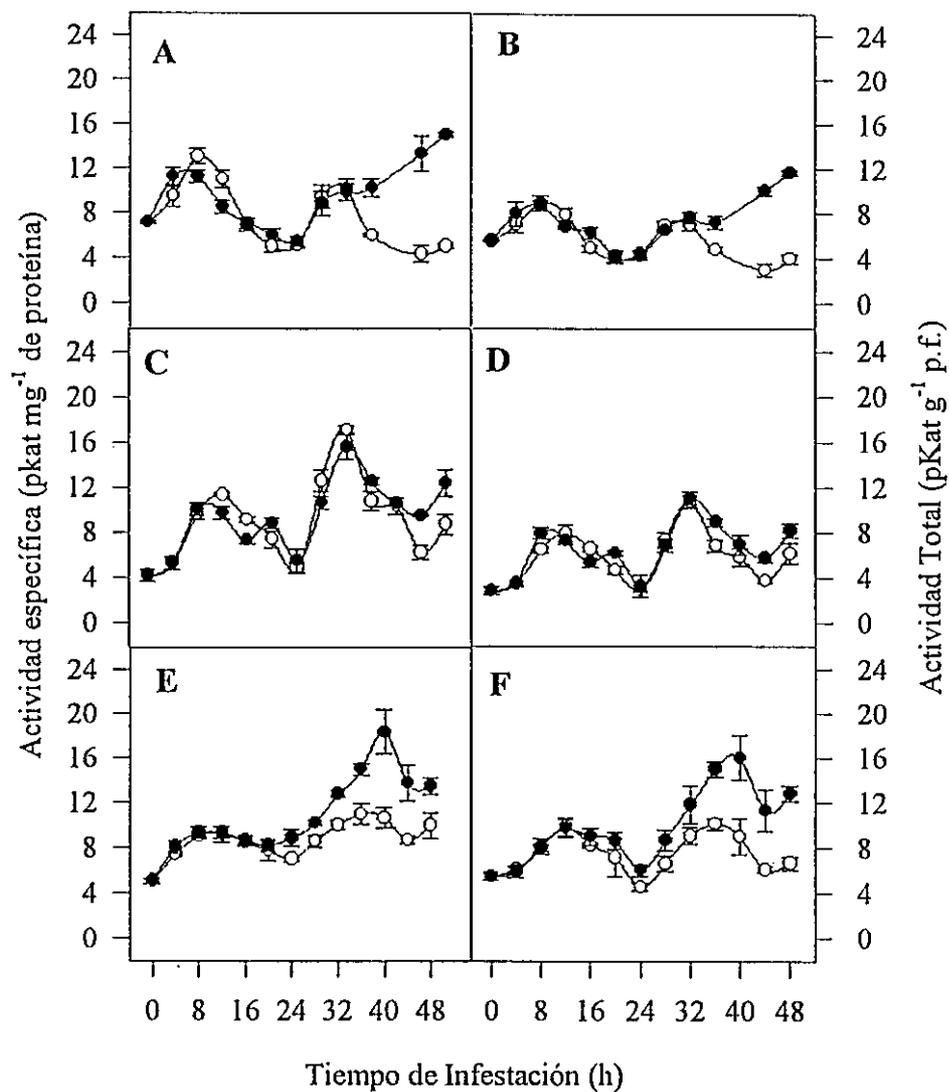


Figura 2. Cinética de actividad PAL durante 48h en plantas infestadas y sanas de cebada. La actividad de la enzima fue medida en plantas del cultivar Frontera (A-B), Libra (C-D) y Acuario (E-F). Se usaron plantas de 10 días de edad, las que fueron infestadas con 20 áfidos (●) y el control sano (○). Cada punto es el promedio de tres muestras \pm 1 e.e..

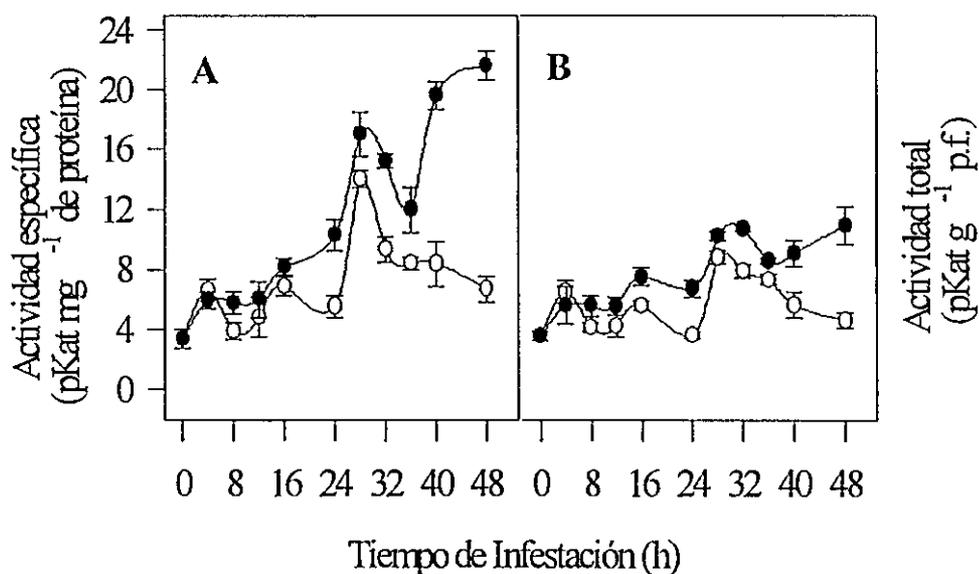


Figura 3. Actividad PAL en plantas infestadas y sanas del cultivar Frontera mantenidas 48 h en un régimen de luz continua. Se usaron plantas de 10 días de edad, la actividad PAL fue expresada como actividad específica (A) y total (B), en plantas infestadas con 20 áfidos (●) y sanas (○). Cada valor representa el promedio de tres muestras ± 1 e.e..

En las plantas infestadas, también ocurrió un mayor aumento de la actividad con relación a un fotoperíodo normal. El curso de la cinética de PAL fue el mismo que en plantas sanas hasta las 36h, pasado este tiempo la actividad PAL cambió drásticamente respecto al control sano. La actividad específica continuó aumentando hasta el final del experimento y alcanzó un valor de $21,6 \text{ pKat mg}^{-1}$ de proteína, esto es 3,3 veces el valor del control sano. Una respuesta similar fue observada al analizar la actividad total, aun cuando las diferencias de actividad entre el tratamiento y el control fueron menores.

3.1.c. Cinética de actividad PAL en tiempos largos de infestación

Los experimentos precedentes mostraron que el aumento de actividad PAL producida por el áfido *S. graminum* tiene una cinética lenta. Además, la actividad de la enzima en los tres cultivares continuó subiendo hasta el final del experimento. Debido a estos resultados, se decidió extender el tiempo de medición. La extensión debería alcanzar hasta ver la caída de actividad, para ello se utilizó el protocolo de infestación anterior, bajo un fotoperíodo normal (14/10, luz-oscuridad) y por un tiempo de 228 h (10 días). Dado que la actividad PAL se encuentra bajo la regulación de luz, las muestras fueron tomadas a las 12 h de iniciado el fotoperíodo. Como resultado, se encontró en los tres cultivares un aumento significativo de la actividad PAL por efecto de la infestación, presentando además una cinética muy similar. Sin embargo, el nivel de actividad de la enzima varió de manera muy marcada entre los cultivares (Fig. 4). En los tres cultivares, la cinética de actividad PAL en plantas infestadas presentó tres picos de actividad, dos previo a las 132h y uno posterior, para luego disminuir a los niveles del control sano. El

cultivar Frontera, considerado el menos susceptible mostró el mayor aumento de actividad, medido tanto como actividad específica o total, con valores máximos de actividad específica de 18, 19 y 34 pKat mg⁻¹ de proteína (Fig. 4A y 4B). Además, en Frontera la actividad PAL se mantuvo alta durante todo el experimento, en comparación a Libra y Acuario donde se observaron caídas de actividad muy pronunciadas cercanas al valor del control sano (Fig. 4 C-D y 4E-F respectivamente). El cultivar Acuario, presentó un nivel intermedio de actividad PAL bajo infestación en comparación con Frontera y Libra. En este cultivar, los valores máximos de actividad específica fueron 17, 20 y 21 pKat mg⁻¹ de proteína. En el cultivar Libra, la actividad PAL inducida por los áfidos fue muy baja en los picos observados antes de las 132 h (10,6 y 11,9 pKat mg⁻¹ de proteína de actividad específica, respectivamente). Sin embargo, presentó un significativo aumento de actividad alrededor de las 156 h, alcanzando 37,6 pKat mg⁻¹ de proteína. Las mismas tendencias fueron observadas al comparar la actividad total, en los tres cultivares. Los niveles de actividad PAL encontrados en Libra y Acuario, contrastan con las estimaciones de su susceptibilidad a *S. graminum*. Los experimentos de crecimiento poblacional de éste áfido en los tres cultivares, mostraron que los insectos presentaron la mayor tasa de crecimiento intrínseca en Acuario, seguido de Libra y Frontera.

Al comparar las cinéticas de actividad PAL entre las plantas sanas e infestadas, se encontró que los picos de actividad producidos por el insecto coinciden con pequeños cambios de actividad en el control. También, se observó un lento y progresivo aumento de la actividad PAL del control en el tiempo. Con la finalidad de determinar el real efecto

de la infestación en la actividad de la enzima, se decidió analizar la variación de actividad PAL con respecto al control sano (Fig. 5). Se encontró que en los cultivares Frontera y Libra ocurren sólo dos picos de aumento real de PAL, uno previo a las 132 h y uno posterior, mientras en Acuario se observó la misma cinética previa con tres máximos de actividad. En Libra y Acuario, se observó un desplazamiento de 24 h para el primer pico de actividad, en cambio, en Frontera el desplazamiento fue menor. Además, el cultivar Frontera presentó el mayor aumento porcentual de actividad PAL, con un 400 y 300% de aumento a las 36 y 156 h respectivamente (primer y segundo pico de actividad). En Acuario, el aumento fue de alrededor de 250% a las 60 h y la actividad fue decayendo lentamente en los picos sucesivos. En Libra en cambio, se observó un aumento de 150 y 300% respecto del control sano, para el primer y segundo máximo de actividad (60 y 156 h, respectivamente).

3.1.d. *Efecto de la densidad de infestación en el aumento de actividad PAL*

Con la finalidad de determinar si los cambios de actividad PAL y su cinética están asociados al nivel de daño que provocan los áfidos, se realizaron experimentos de infestación con 20, 40 y 60 áfidos iniciales. Se usó el cultivar Frontera, el cual había presentado el mayor aumento de actividad de PAL por el insecto. Al aumentar la densidad de áfidos por planta, se encontró un aumento de actividad PAL, total y específica, directamente relacionado al aumento de la densidad de los áfidos (Fig. 6).

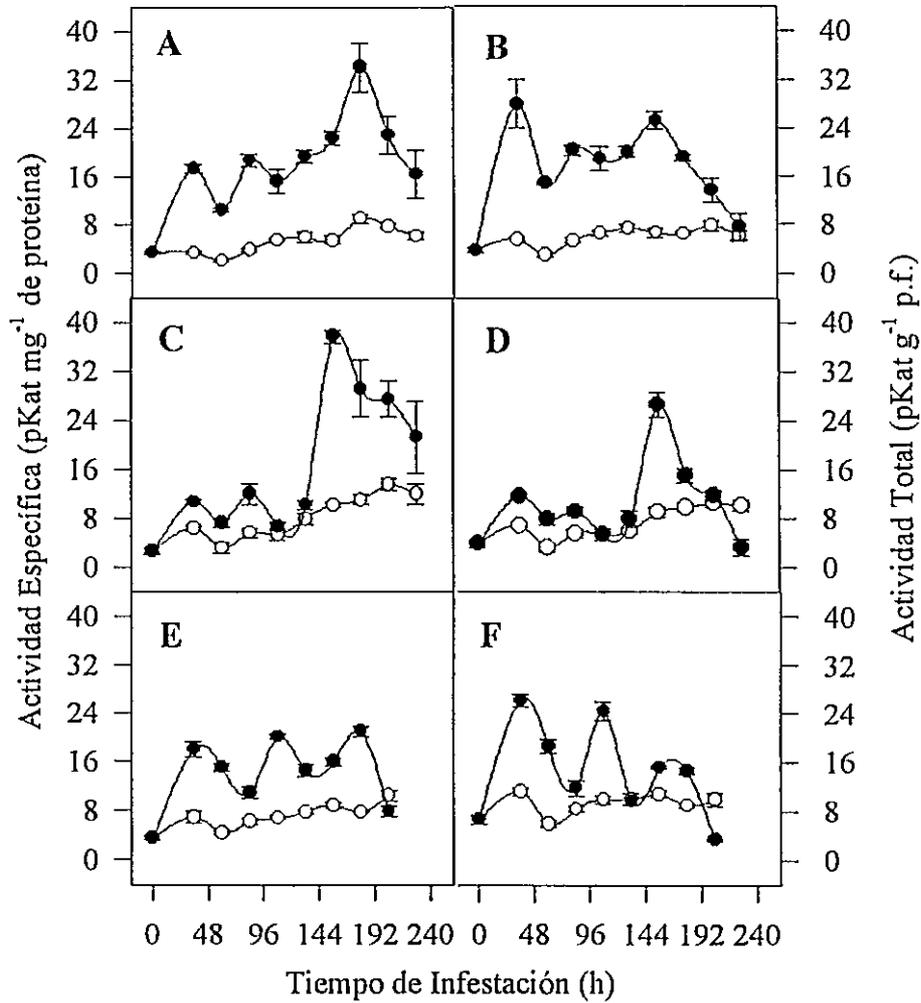


Figura 4. Cinética de la actividad PAL durante 228 h de infestación en cebada. La actividad de la enzima fue medida en plantas del cultivar Frontera (A-B), Libra (C-D) y Acuario (E-F). Plantas de 10 días de edad fueron infestadas con 20 áfidos (●) y el control sano (○). Cada punto es el promedio de tres muestras \pm 1 e.e..

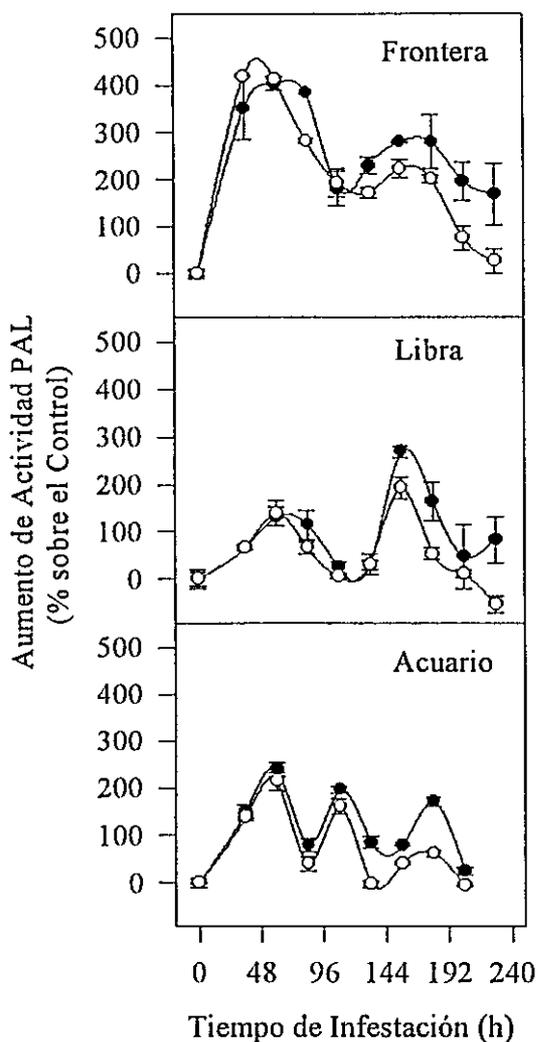


Figura 5. Aumento de la actividad PAL en plantas de cebada infestadas durante 228 h por el áfido *S. graminum*. La figura muestra la magnitud del aumento de la actividad PAL en plantas infestadas con respecto al control sano. Plantas de 10 días de edad fueron infestadas con 20 áfidos, midiéndose la actividad específica (●) y total (○). Cada punto representa el promedio de tres muestras ± 1 e.e..

Bajo las tres densidades de infestación usadas, las cinéticas de actividad específica de la enzima, mostraron los mismos tres máximos de actividad descritos en el experimento anterior. Sin embargo, se encontró que el tercer pico de actividad (posterior a las 132 h), se adelantó 24 h al aumentar la densidad de infestación, de 20 a 40 y de 40 a 60 áfidos, respectivamente. En cambio, al observar las cinéticas de actividad total de PAL₃ se encontró la desaparición del tercer pico en los tratamientos de 40 y 60 áfidos, en su lugar ocurrió una caída progresiva de actividad hasta un nivel de actividad inferior al control (Fig. 6B). Es importante considerar que se han determinado serios daños metabólicos por los áfidos, como son la disminución del contenido de proteínas solubles y azúcares totales. La disminución del contenido de proteínas podría estar alterando la estimación de la actividad específica de PAL, y también podría explicar la desaparición del tercer pico en la actividad total de la enzima. Así, se determinó la variación del contenido de proteínas solubles, en función del tiempo y densidad de infestación. Se encontró una progresiva caída en el contenido de proteínas con el tiempo de infestación, la que se correlaciona positivamente con el nivel de infestación. A partir de las 132 h de infestación, la disminución en el contenido de proteínas fue muy pronunciada, fenómeno que coincidió con la aparición del tercer pico de actividad específica de la enzima (Fig. 7).

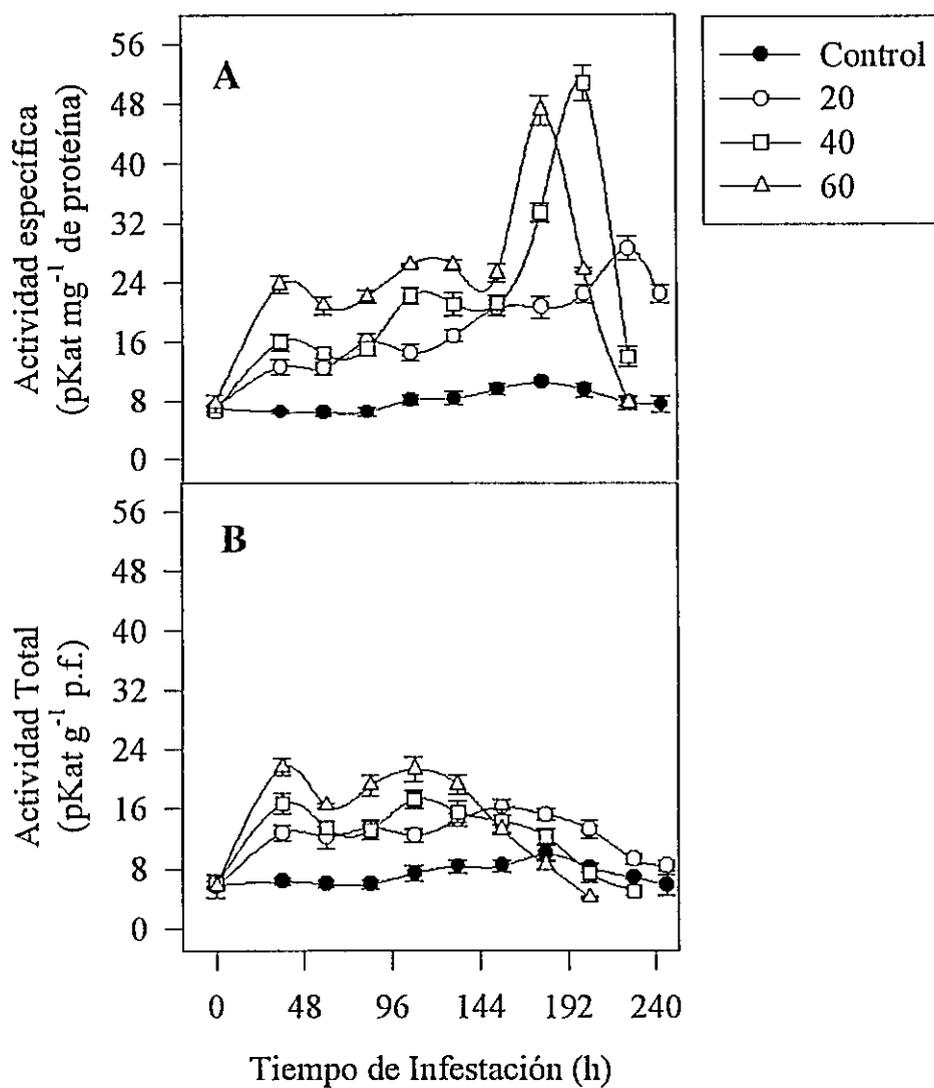


Figura 6. Efecto de la densidad de infestación en la cinética de actividad PAL en el cultivar Frontera. Plantas de 10 días de edad fueron infestadas con 20, 40 y 60 áfidos, se midió la actividad específica (A) y total (B). Cada punto es el promedio de seis muestras ± 1 e.e..

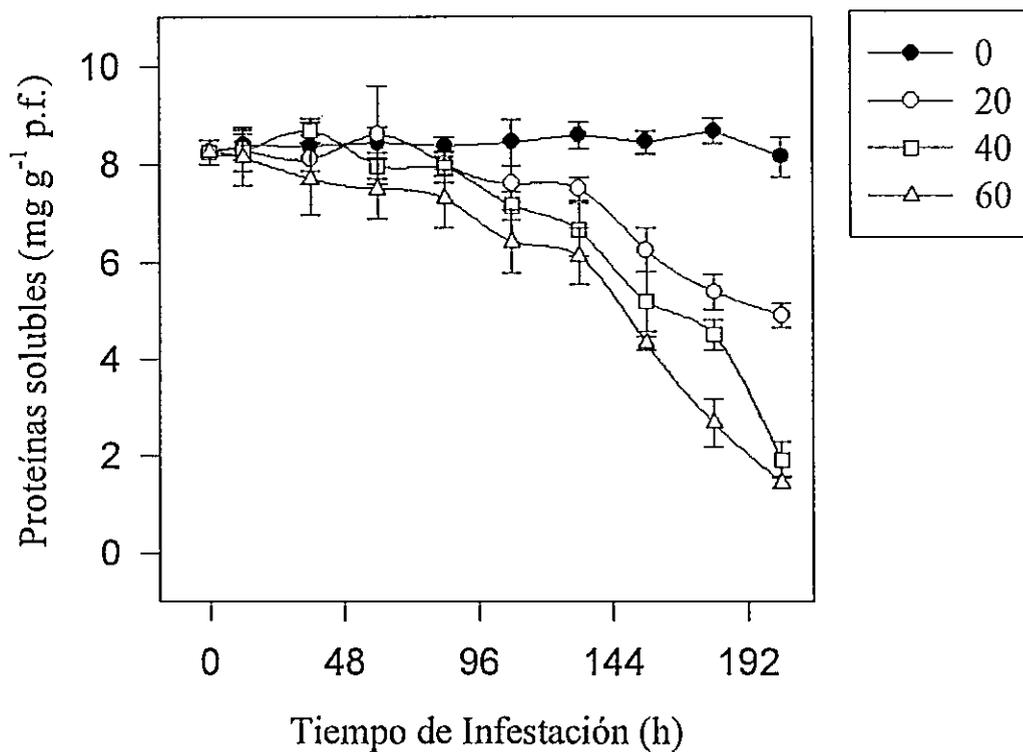


Figura. 7. Variación del contenido de proteínas solubles en el cultivar Frontera en función de la densidad de infestación. Se determinó la concentración de proteínas solubles en las hojas de plantas de 10 días de edad, las que fueron infestadas con 20, 40 y 60 áfidos iniciales. Cada punto es el promedio de seis muestras ± 1 e.e..

3.1.f. *Efecto de la edad de las plantas en la variación de la actividad PAL bajo infestación.*

En muchos estudios, se ha descrito que la actividad de PAL y la expresión de los genes PAL se modifica con el estado de desarrollo de los órganos (Kervine y col., 1997; Liang y col., 1989; Bevam y col., 1989), por ésta razón se estudió el efecto de la edad de las plantas en la actividad PAL bajo infestación. Plantas del cultivar frontera de 8 a 20 días de edad fueron infestadas con 40 áfidos iniciales, evaluándose la actividad PAL a las 36 h de infestación. Al aumentar la edad de las plantas se encontró una fuerte disminución de la actividad PAL. La mayor disminución de la actividad ocurrió entre los 8 y 10 días (de 40 a 7 pKat mg⁻¹ de proteína, de actividad específica respectivamente en las plantas sanas), para luego estabilizarse y tender a aumentar levemente con la edad. La misma tendencia fue observada en la actividad PAL de las plantas infestadas (Fig. 8A y 8B). El aumento real de actividad PAL bajo infestación fue muy similar en plantas de 8 a 14 días de edad, tendiendo a aumentar a los 16 y 20 días de edad (Fig. 8C). Es importante destacar que las plantas de 8 días presentan sólo la primera lámina foliar en expansión, la cual continúa su crecimiento hasta los 16 días; después, sólo continúa creciendo la segunda hoja. Un análisis de correlación simple (Pearson), mostró que no existe correlación entre la edad y el aumento de actividad PAL bajo infestación, en las edades evaluadas. Al determinar el porcentaje de aumento de la actividad PAL sobre el control, se observaron dos máximos de actividad, a los 10 y 16 días de edad, con un aumento del 450 y 550% respectivamente, para la actividad total (Fig. 8D). Este resultado, fue producto de las variaciones de actividad que presentan las plantas sanas y debieran ser

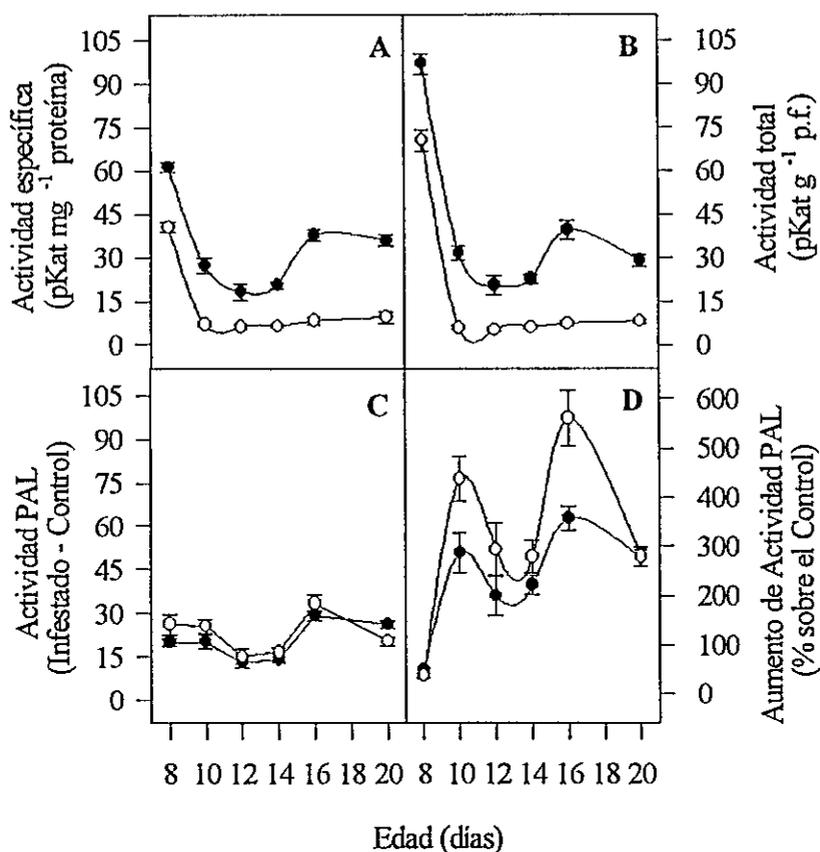


Figura 8. Efecto de la edad de las plantas en el cambio de actividad PAL en hojas producido por infestación con áfidos. Plantas del cultivar Frontera de 8 a 20 días de edad fueron infestadas con 40 áfidos por 36 h. La figura muestra la actividad específica (A) y total (B) de la enzima para las muestras infestadas (●) y sanas (○). También, se presenta la diferencia de actividad entre plantas infestadas y el control sano (C), y además, el aumento de la actividad PAL sobre el control (D), ambos parámetros expresados como actividad específica (●) y total (○). Cada punto es el promedio de 4 muestras \pm 1 e.e..

analizado en función del crecimiento que presentan las láminas foliares de primera y segunda hoja, lo cual será discutido en forma posterior.

3.2. Variación en el contenido de materia seca en las hojas de cebada bajo infestación.

Cuando se midió el cambio de actividad PAL en plantas infestadas, se encontró que el cultivar Acuario presentó un mayor aumento de actividad PAL, en comparación al cultivar Libra, previo a las 132 h de infestación. Este resultado es opuesto a lo esperado, de acuerdo a los niveles de susceptibilidad establecidos para estos cultivares previamente, siendo Libra menos susceptible que Acuario. Debido a éstas observaciones, se decidió determinar la variación de peso seco en plantas infestadas respecto a plantas sanas, y además analizar la variación del peso seco específico de las plantas, en condiciones de infestación con 20 áfidos. Los resultados mostraron que en las plantas infestadas, ocurre un aumento en la razón peso seco/peso fresco, a partir del sexto día, manteniendo esta tendencia hasta el final del experimento (Fig. 9A). También, se encontró que el aumento en este parámetro se correlaciona positivamente con el grado de susceptibilidad del cultivar, siendo Acuario el que presentó el mayor aumento de la razón peso seco/peso fresco, seguido de Libra y finalmente Frontera. Al analizar la variación del peso seco específico de las plantas sanas e infestadas, se encontró que mientras el peso seco en las plantas sanas aumenta sostenidamente, en las plantas infestadas el peso específico aumentó sólo hasta el tercer día, para luego disminuir y permanecer relativamente constante (Fig. 9B). El cultivar Frontera presentó el mayor peso específico, tanto en plantas sanas como infestadas, mientras que Libra y Acuario no fueron diferentes.

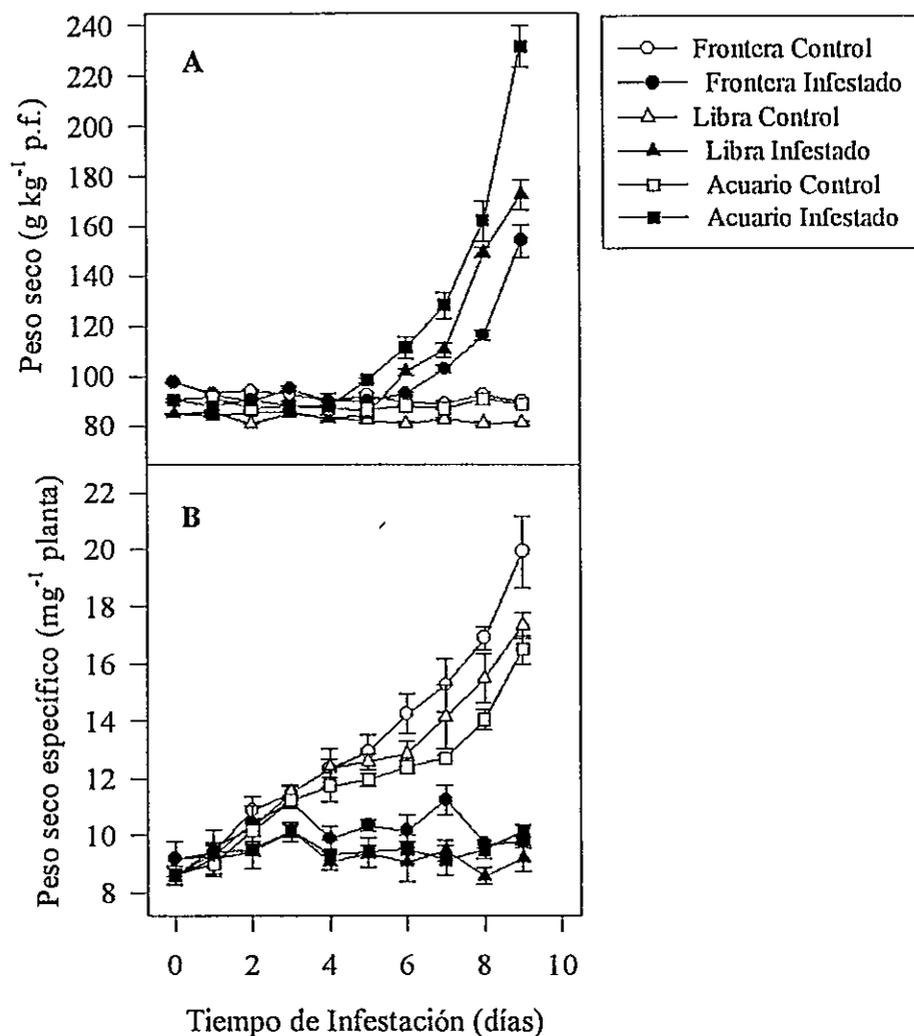


Figura 9. Contenido de materia seca en plantas sanas e infestadas por áfidos en cebada. Plantas de 10 días de edad, del cultivar Frontera, Libra y Acuario fueron infestadas con 20 áfidos iniciales. Se muestra la variación de pesos seco por kg de materia fresca (A) y la variación de peso específico (B), en las plantas sanas (símbolos abiertos) y plantas infestadas (símbolos cerrados). Cada punto es el promedio de 3 muestras \pm 1 e.e..

3.3. *Efecto de la infestación en la composición de los flavonoides presentes en la cebada*

3.3.1. *Flavonoides aislados en cebada*

Con la finalidad de determinar si la infestación provoca cambios en el contenido de los flavonoides presentes en las hojas de la cebada, se realizó un estudio de su contenido en dos de los cultivares en estudio (Frontera y Libra). Se analizaron extractos metanólicos, obtenidos de plantas sanas e infestadas. Las plantas fueron infestadas con 40 áfidos iniciales durante seis días. Los extractos metanólicos obtenidos de plantas infestadas, mostraron un aumento de masa respecto a los controles sanos en ambas variedades. En Frontera se presentó la mayor diferencia en este parámetro con un 4,2% de rendimiento, con respecto a un 3,3% obtenido en el control sano. Mediante cromatografía de capa fina (TLC 1D), en placas de celulosa, se pudo establecer la presencia de flavonoides en los extractos metanólicos. Al analizar la fracción soluble en agua (F002), se verificó la presencia de 3 flavonoides, los que de acuerdo a su reacción colorimétrica con 2-aminoetil difenilborato serían flavonas. Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas entre controles y muestras infestadas de ambas variedades. Sólo uno de los posibles flavonoides se destacó por la intensidad de su fluorescencia bajo luz UV, siendo en los otros muy leve. Este compuesto fue purificado desde la fracción F005 (Frontera infestada, acetona insoluble), para ello se usó un sistema MPLC, con una columna RP 18, y además, se realizó una purificación posterior en una columna de Sephadex LH20 eluida con metanol. Las fracciones colectadas ricas en el

flavonoide fueron recombinadas y se pudo cristalizar el compuesto. Se obtuvieron 120 mg de este purificado, el que mediante análisis de HPLC mostró un 95% de pureza. Este compuesto, fue también analizado mediante espectrometría de masas, APCI-MS y MS-MS, obteniéndose un patrón característico de fragmentación (Fig. 10). El compuesto fue identificado como la flavona, saponarina (4',5,7-hidroxi-6-C-glucosilflavona 7-O-glucósido). El extracto purificado de saponarina, fue utilizado como estándar para identificar y medir el nivel de este flavonoide en los experimentos de infestación. El contenido de saponarina, fue eficientemente resuelto a través de HPLC. Se desarrolló un sistema de elución isocrática, como se describió en la sección de Materiales y Métodos. El método de elución mostró una excelente resolución del pico del flavonoide en las muestras (Fig. 11). EL pico correspondiente a saponarina fue identificado por comparación del tiempo de retención con el estándar y su respectivo espectro UV. De las áreas y de la curva de calibración para el flavonoide, fue posible determinar que los niveles aproximados de saponarina en las hojas de cebada en plantas sanas de 10 días, están en el orden de 3 a 9 mmoles g^{-1} p.f., en los cultivares Frontera y Libra, respectivamente.

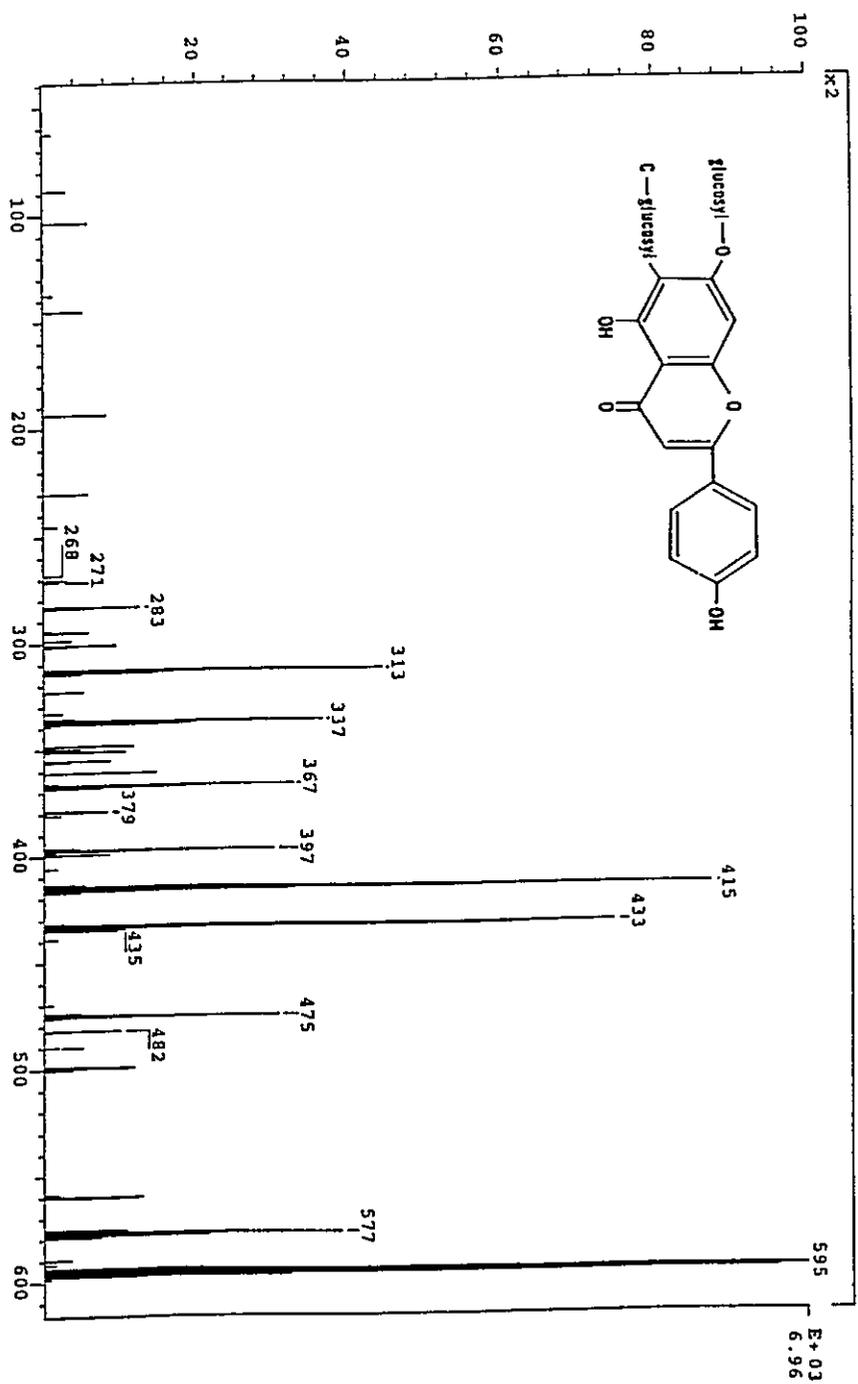


Figura 10. Espectro de masas de la saponarina purificada desde extractos metanólicos. La figura muestra la estructura y el patrón de fragmentación del flavonoide obtenido mediante espectrometría de masas AP/CI, MS-MS. El pico base de 595 (m/z), mostró el patrón de fragmentación correspondiente al flavonoide 4',5,7-hidroxi-6-C-glucosilflavona 7-O-glucósido, saponarina. Este compuesto fue el principal flavonoide encontrado en los cultivares de cebada Frontera y Libra.

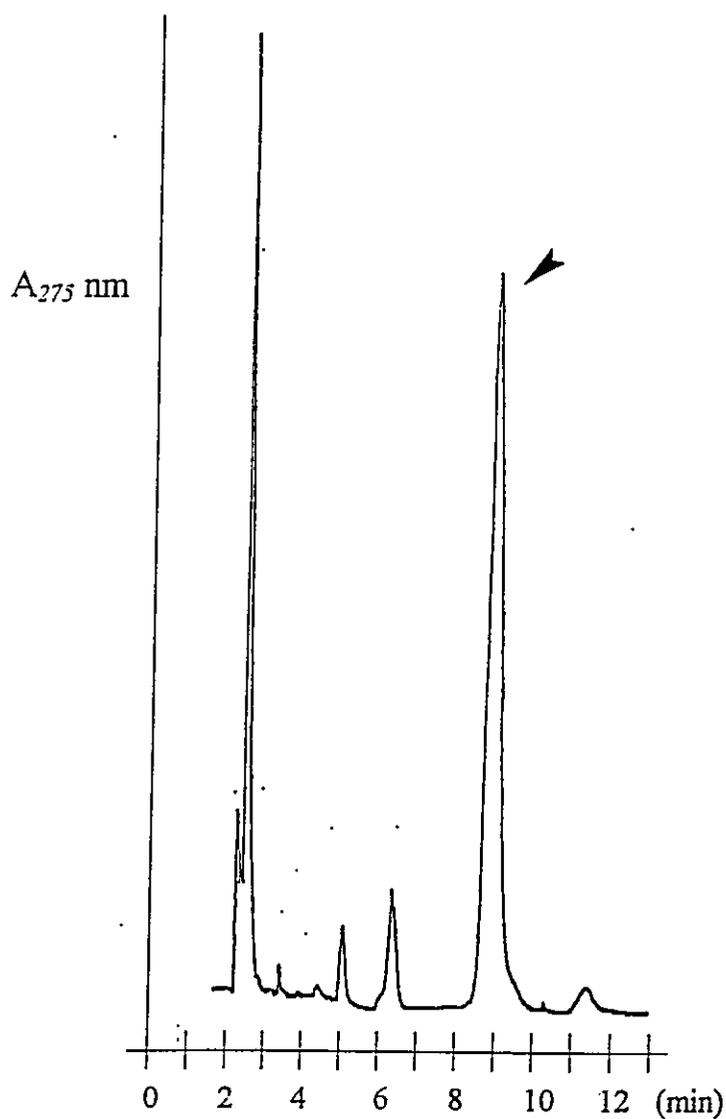


Figura 11. Separación de saponarina mediante HPLC utilizando una elución isocrática. La mezcla usada fue H₂O: acetonitrilo (97:3) y acetato de etilo 2,5% y H₃PO₄ 1.5%, a un flujo de 1.5 ml/min. La detección se realizó a 275 nm. El tiempo de retención de la Saponarina bajo estas condiciones fue de 9 min. La flecha indica el pico correspondiente al flavonoide.

3.3.2. Efecto de la infestación por áfidos en el contenido de saponarina en cebada

Para determinar si la variación de actividad PAL provocada por los áfidos, tenía como consecuencia un aumento en el contenido de saponarina, se realizó un estudio cinético de su contenido, en plantas infestadas con 40 áfidos iniciales. Se encontró que el contenido del flavonoide aumenta como respuesta a la infestación y que este aumento está asociado a la variación de la actividad PAL, respuesta que fue similar en los tres cultivares (Fig. 12). Sin embargo, la magnitud del aumento en el contenido del flavonoide no fue proporcional al aumento de la actividad de PAL. En el cultivar Frontera y Acuario, la acumulación del flavonoide coincidió con el aumento de actividad PAL previo a las 132 h, para luego disminuir a los valores encontrados en plantas sanas. Los valores máximos alcanzados en los cultivares Frontera y Acuario bajo infestación fueron de 37,3 y 32,4 $\mu\text{moles g}^{-1}$ p.s. respectivamente. En el cultivar Libra, las plantas infestadas, presentaron un fuerte retraso en la acumulación de saponarina, 48 h respecto a Frontera y Acuario, alcanzando un contenido máximo de 63,2 $\mu\text{moles g}^{-1}$ p.s.. Además, este cultivar Libra presentó el mayor nivel basal del flavonoide, de tres a dos veces el contenido presente en Frontera y Acuario (105 a 60 $\mu\text{moles g}^{-1}$ p.s., aproximadamente). En las plantas sanas de los tres cultivares, se encontró una tendencia a la disminución de saponarina durante los primeros dos a tres días, respuesta que fue muy pronunciada en el cultivar Libra. Esta caída en el contenido del flavonoide podría estar asociada a la disminución previa de la actividad PAL, observada entre los ocho a 10 días en Frontera. Hacia el final del experimento se observó un aumento de saponarina en plantas sanas, respuesta que coincidió con el aumento de la actividad basal de PAL.

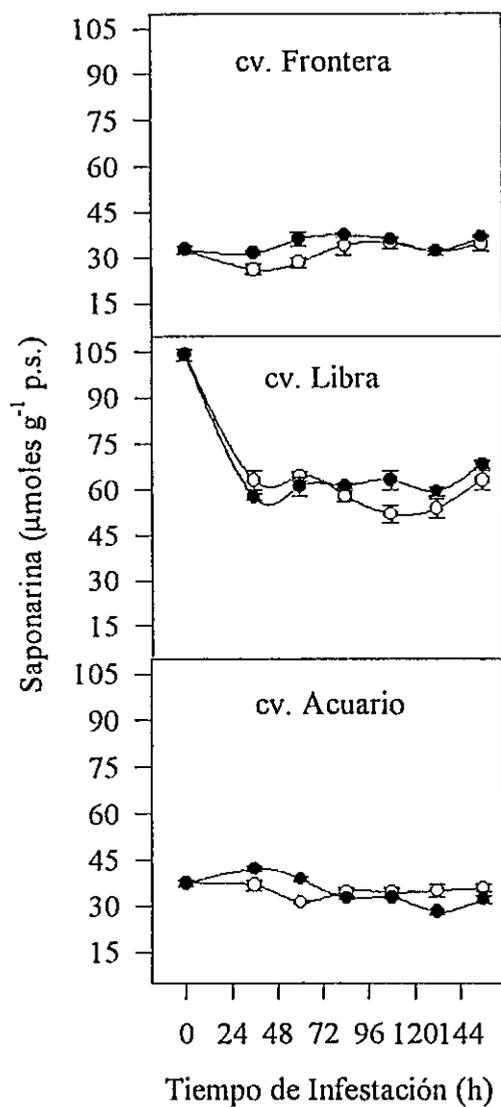


Figura 12. Efecto de la infestación por áfidos en el contenido de saponarina en cebada. Plantas de 10 días de edad de los cultivares Frontera, Libra y Acuario se infestaron con 40 áfidos por 156h. La figura muestra el contenido de saponarina para las muestras infestadas (●) y sanas (○). Cada punto corresponde al promedio de 3 muestras \pm 1 e.e..

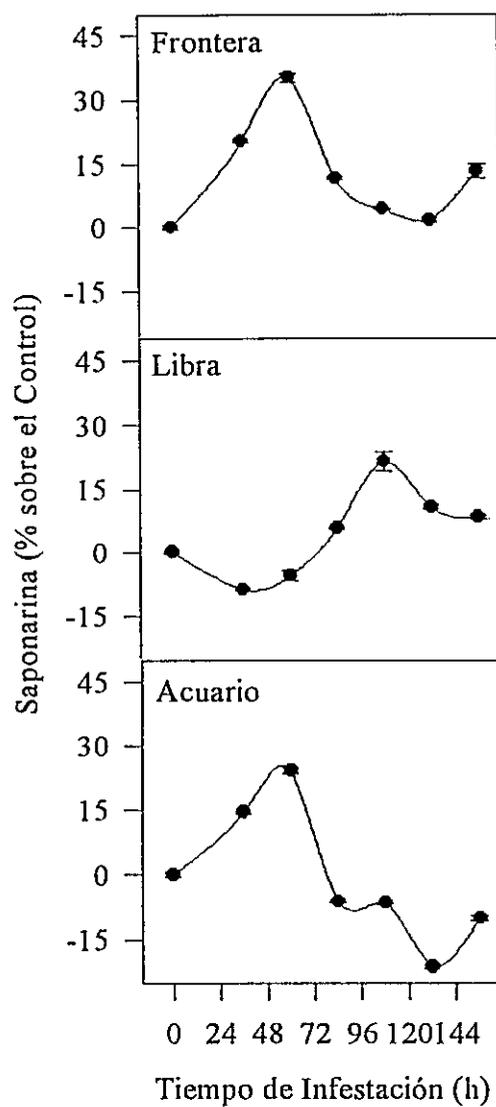


Figura 13. Aumento del contenido de saponarina en plantas de cebada infestadas por *S. graminum*. El contenido de saponarina fue expresado como porcentaje de aumento sobre el control sano, se usaron los cultivares Frontera, Libra y Acuario. Cada punto representa el promedio de 3 muestras \pm 1 e.e..

Como los niveles de saponarina fluctuaron mucho entre los cultivares y durante el experimento, se decidió analizar el porcentaje de aumento sobre el control. Este parámetro mostró que el mayor aumento se alcanzó en el cultivar Frontera con un 35,2%, seguido de Acuario (24,1%) y finalmente Libra (21,54%).

3.3.3. *Efecto de la densidad de infestación sobre el contenido de saponarina en cebada*

Las mediciones del contenido de saponarina en los tres cultivares, mostraron que el flavonoide aumenta en respuesta al ataque del áfido. Para determinar el grado de correlación entre la actividad PAL y la acumulación de saponarina bajo infestación, se infestaron plantas del cultivar Libra con 20,40 y 60 áfidos. El contenido de saponarina fue medido al cuarto día de infestación. El cultivar Libra, mostró un claro aumento del contenido de saponarina con el grado de infestación (Fig. 14). Sin embargo, a pesar de existir una correlación positiva entre el nivel de infestación y contenido del flavonoide ($p = 0,8471$), su aumento no tuvo una progresión proporcional al nivel de infestación ni al aumento de la actividad PAL.

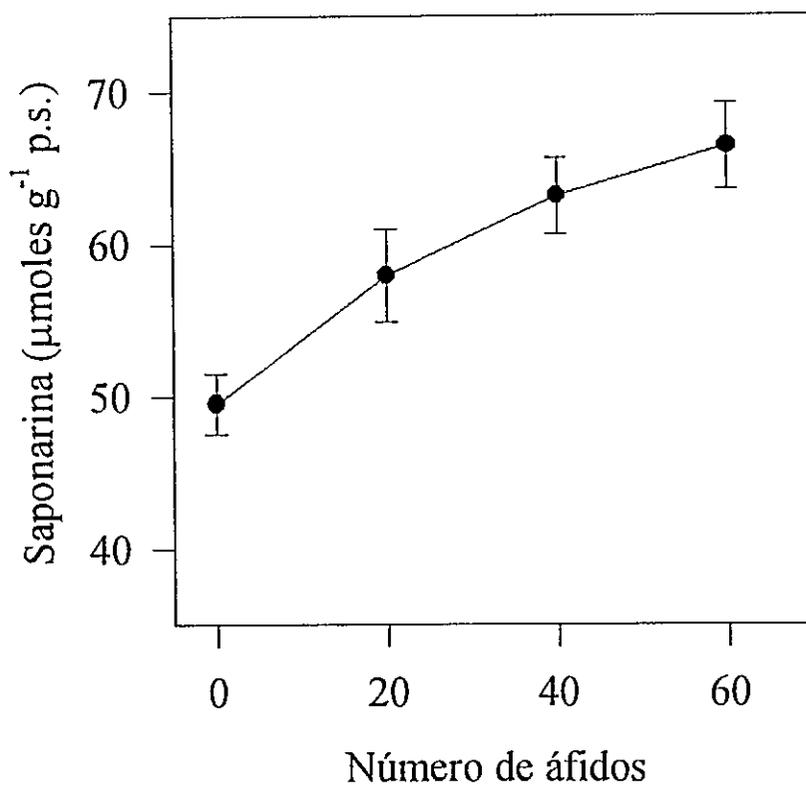


Figura. 14. Efecto de la densidad de infestación en el contenido de saponarina. Plantas del cultivar Libra de 10 días de edad fueron infestadas con 20, 40 y 60 áfidos iniciales. El contenido de saponarina fue medido al 4^{to} día de infestación. Cada punto es el promedio de seis muestras ± 1 e.e..

3.3.4. Evaluación de la toxicidad de la saponarina en ensayos de sobrevivencia de áfidos alimentados con dietas artificiales.

La saponarina aumenta con la infestación y con el nivel de daño producido por el áfido. Además, su contenido fluctúa con la edad de la planta y entre los cultivares. El cultivar Libra de susceptibilidad intermedia, presentó el mayor contenido basal de saponarina, a pesar de presentar la más baja actividad PAL, lo que además se reflejó en una menor acumulación porcentual del flavonoide bajo condiciones de infestación. Para determinar la importancia de este flavonoide como barrera para la actividad de los áfidos, se estudió su efecto en la sobrevivencia de *S. graminum*, en ensayos de dietas artificiales. Se usaron tres concentraciones, la máxima concentración fue similar a la encontrada en el cultivar Frontera (3 mM.). La sobrevivencia de los áfidos se vio afectada con las tres concentraciones probadas; las concentraciones de 0,75 y 1,5 mM tuvieron el mismo efecto reduciendo a un 75% la sobrevivencia de los áfidos a las 48 h, mientras al usar 3mM se redujo la sobrevivencia en un 50% a las 48 h (Fig. 15). Debido al alto peso molecular de este compuesto y a que no contamos con una mayor cantidad del flavonoide purificado, no se pudo utilizar una dosis similar a la encontrada en el cultivar Libra; sin embargo estos resultados muestran que saponarina podría tener una función disuasiva o tóxica para el insecto y sería más efectiva en Libra debido a su alto contenido.

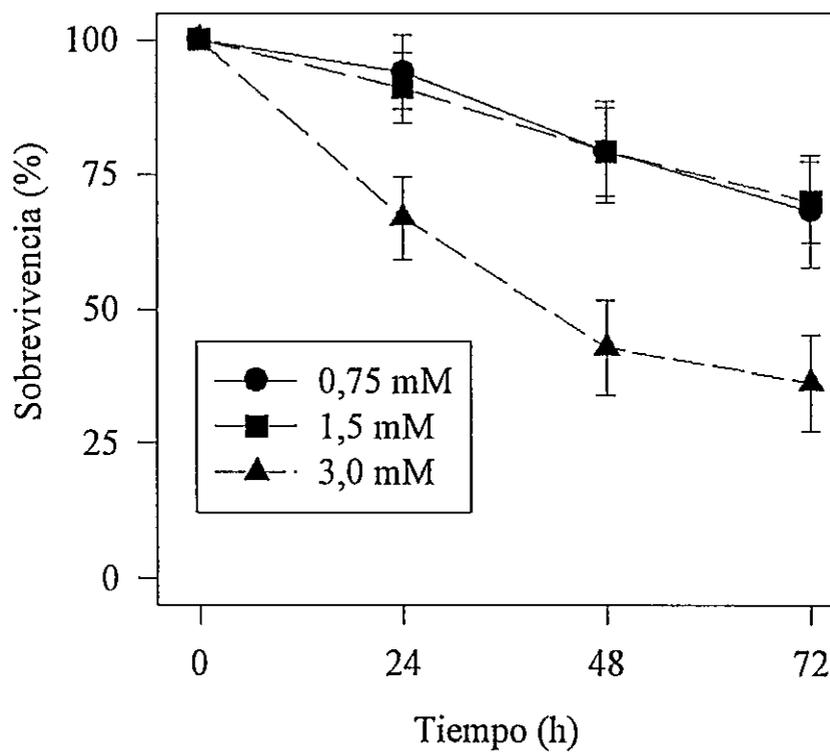


Figura 15. Efecto del flavonoide saponarina en la sobrevivencia de áfidos crecidos en dietas artificiales. Ninfas del tercer estadio fueron alimentadas con una dieta artificial conteniendo saponarina 0,75; 1,5; ó 3,0 mM. La sobrevivencia de las ninfas fue evaluada a las 24, 48 y 72 h. Cada valor representa el promedio de 10 muestras \pm 1 e.e..

3.4. *Contenido relativo de fenoles esterificados a la pared celular y lignina*

Como se describiera en los capítulos previos, la actividad PAL y el grado de aumento de saponarina se correlacionó positivamente con el grado de susceptibilidad de los cultivares cebada. Además, estas respuestas fueron dependientes del nivel de infestación. Sin embargo, el aumento en el contenido de saponarina no fue proporcional al incremento de la actividad PAL, observada bajo la infestación. Estas observaciones, indicaban que la actividad PAL podría estar siendo utilizada en otras vías del metabolismo fenilpropanoide. Se decidió entonces, estudiar otros componentes de esta vía, como son los fenoles esterificados a la pared celular y el contenido de lignina. Para realizar este estudio, se infestaron plantas de 10 días con 40 áfidos por planta durante 156 h (seis días).

3.4.1. *Acumulación de fenoles esterificados a paredes celulares en cebada infestada*

La medición de los fenoles de pared se realizó por la prueba colorimétrica de Folin Ciocalteu (Swain y Hillis, 1959), determinando el contenido total de los fenoles liberados por hidrólisis alcalina en extractos purificados de pared celular. Como este tipo de medición no permite determinar la composición e importancia de cada uno de los compuestos fenólicos, se realizó un análisis de HPLC de los extractos purificados. Se encontró que los compuestos mayoritarios fueron ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico. Por esta razón, se decidió expresar el contenido relativo de fenoles de pared como equivalentes de ácido ferúlico. El estudio cinético de la acumulación de fenoles de pared

mostró que estos aumentan durante el proceso de infestación, encontrándose el mayor aumento en el cultivar Frontera, seguido por Libra y Acuario respectivamente (Fig. 16). La respuesta de acumulación de los fenoles en Frontera fue bimodal y mostró estar desfasada 24 h con respecto a la cinética de actividad PAL. La primera fase, alcanzó un máximo a las 60 h ($10 \mu\text{g mg}^{-1}$ de pared), para luego disminuir y volver a aumentar al final del experimento, llegando a $12,6 \mu\text{g mg}^{-1}$ de pared. En el cultivar Libra se observó un aumento progresivo de los fenoles de pared, alcanzando su contenido mayor a las 132 h ($12,3 \mu\text{g mg}^{-1}$ de pared). En Acuario, la mayor acumulación ocurrió a las 60 h de infestación ($10,1 \mu\text{g mg}^{-1}$ de pared), para luego ir disminuyendo y alcanzar valores similares a los encontrados en plantas sanas. En los tres casos, el contenido de fenoles de pared de las plantas sanas fué aumentando con la edad; ello concuerda con la disminución del crecimiento de las láminas foliares cuando llegan a su madurez funcional.

Al analizar el cambio en el contenido de fenoles, esta vez con respecto al control, el cultivar Frontera presentó el mayor aumento, cercano a un 40% a las 60 y 156 h respectivamente (Fig. 17). En segundo lugar Libra, presentó un 23% de aumento y finalmente Acuario un 20%. Las respuestas de acumulación observadas fueron coincidentes con las cinéticas de actividad PAL; la única excepción fue Libra, que a pesar de presentar un bajo nivel de actividad PAL, tiene una mayor acumulación de fenoles de pared al compararlo con el cultivar Acuario.

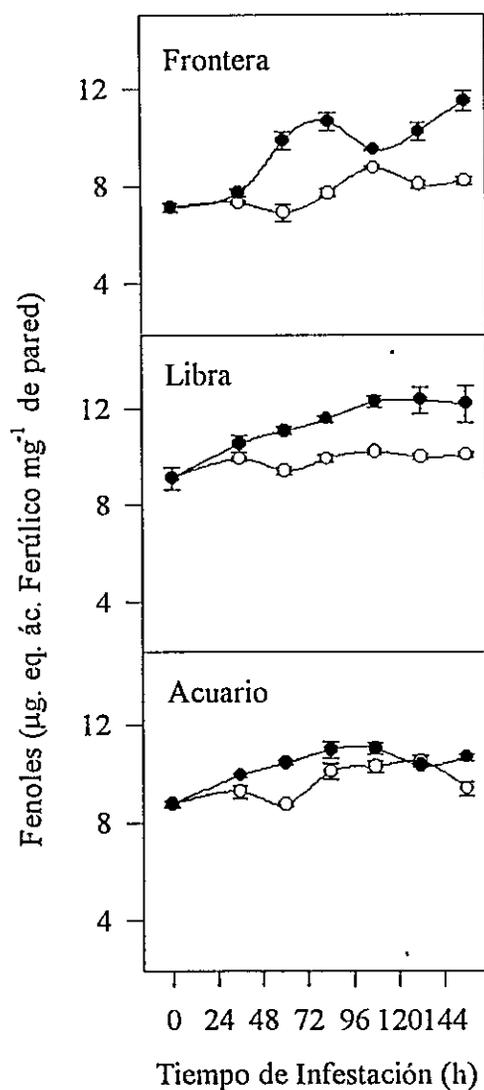


Figura 16. Cinética de acumulación de fenoles esterificados a pared celular, bajo infestación por áfidos. Plantas de 10 días de edad, de los cultivares Frontera, Libra y Acuario se infestaron con 40 áfidos. La figura muestra el contenido de fenoles de las muestras infestadas (●) y sanas (○). Cada punto es el promedio de 3 muestras \pm 1 e.e..

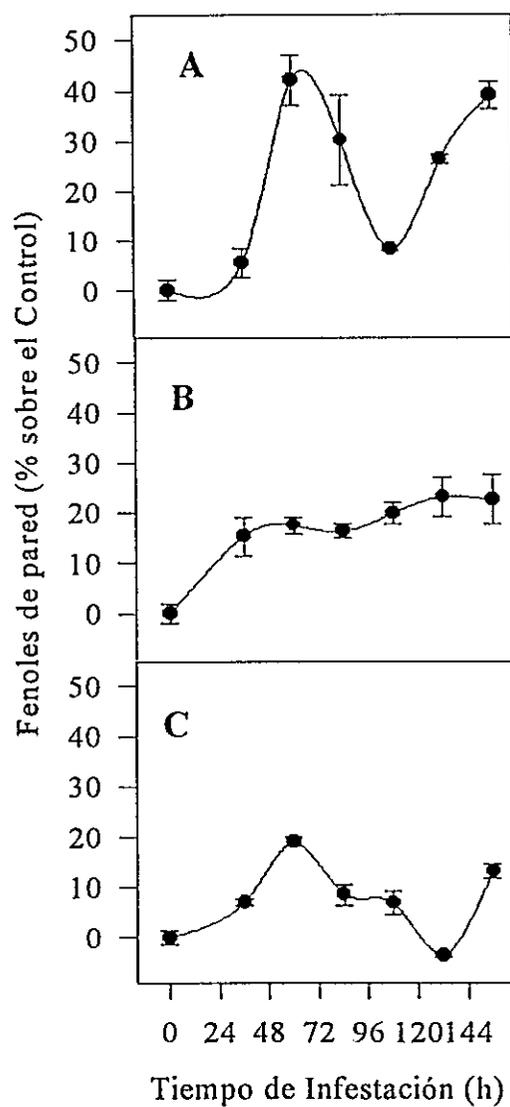


Figura 17. Porcentaje de acumulación de fenoles esterificados a pared en condiciones de infestación por áfidos. Plantas de 10 días de edad, del cultivar Frontera (A), Libra (B) y Acuario (C), se infestaron con 40 áfidos por 228 h. Cada valor representa el promedio de 3 muestras ± 1 e.e

3.4.2. *Acumulación de lignina en paredes celulares de plantas infestadas*

Dado que el contenido de lignina es uno de los principales determinantes del grado de susceptibilidad de las plantas al ataque de parásitos, se analizó su contenido en plantas sanas e infestadas.

El análisis del contenido de lignina mostró una cinética de acumulación similar a la acumulación de fenoles de pared y saponarina. El aumento de lignina fue posterior al aumento de actividad PAL en los tres cultivares. El cultivar Frontera presentó el mayor nivel basal de lignina al comienzo del experimento, 25% superior a Acuario y 100% mayor que Libra (Fig. 18), mientras que en el caso de los fenoles, el contenido inicial fue muy similar entre los cultivares (Fig. 16). La respuesta de acumulación de lignina presentó dos fases, la primera a partir de las 60 h, alcanzando el cultivar Frontera un 7% de aumento y en Acuario un 12%. La segunda fase ocurrió al final del experimento, a partir de las 132 h y pareciera estar acoplado al segundo pico de actividad PAL. En estos experimentos no se alcanzó a detectar el nivel de saturación en la acumulación de lignina. A las 156 h de infestación, el cultivar Frontera alcanzó un 33% de aumento sobre el control, mientras que el cultivar Libra alcanzó un 18% y finalmente Acuario aumentó en un 12% (Fig. 19). Como en los casos anteriores, el cultivar Libra mostró un retraso de 48 h en la acumulación de lignina con respecto a los cultivares Acuario y Frontera. Los niveles basales de lignina fueron aumentando en los tres cultivares, pero más significativamente en Libra y Acuario, mientras en Frontera el aumento fue menor.

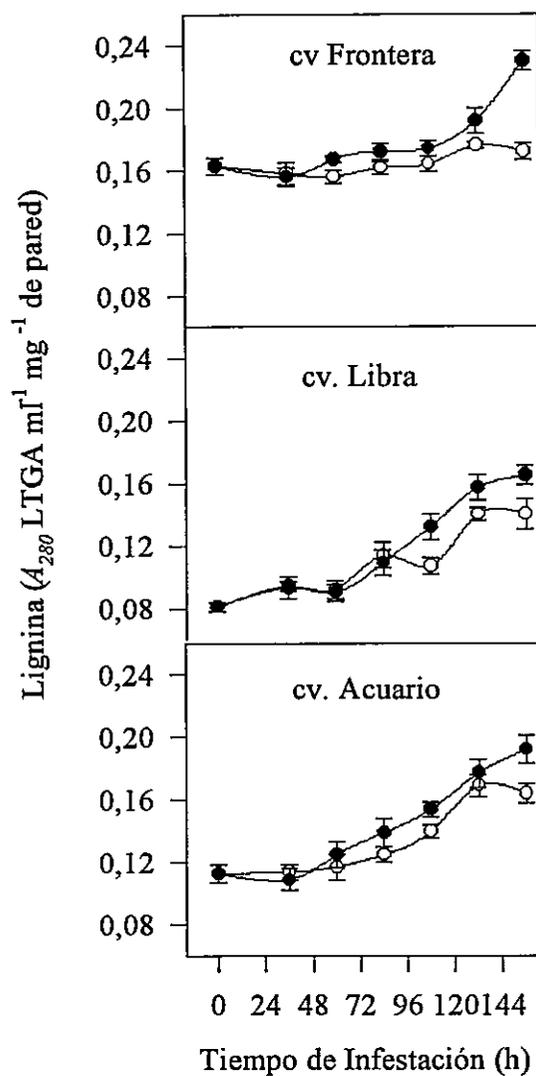


Figura 18. Cinética de acumulación de lignina en plantas infestadas y no infestadas con áfidos. Plantas de 10 días de edad, de los cultivares Frontera, Libra y Acuario fueron infestadas con 40 áfidos iniciales. La figura muestra el contenido de lignina en las plantas infestadas (●) y sanas (O). Cada punto es el promedio de 3 muestras ± 1 e.e..

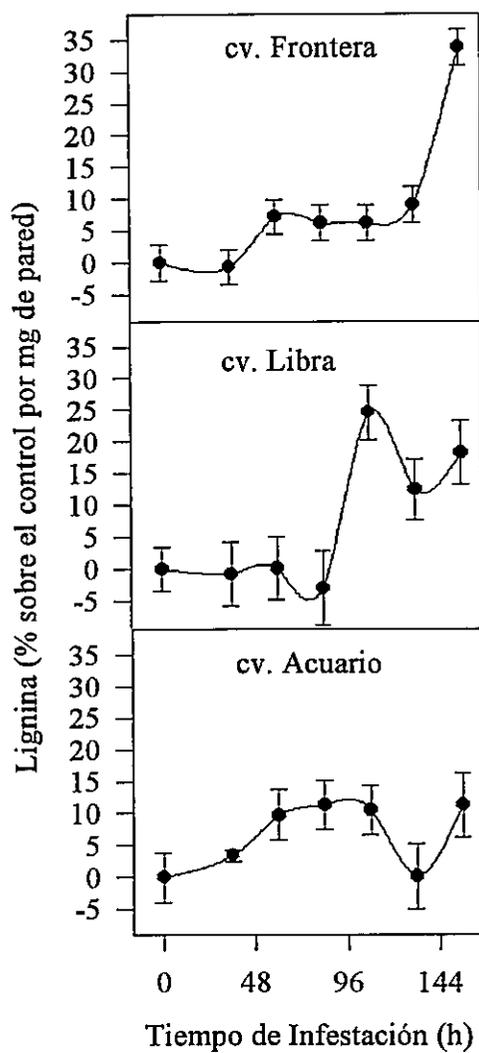


Figura 19. Porcentaje de aumento del contenido de lignina en plantas infestadas por áfidos. Plantas de 10 días de edad, del cultivar Frontera, Libra y Acuario se infestaron con 40 áfidos por 156 h. Cada valor representa el promedio de 3 muestras ± 1 e.e

El contenido basal de lignina fue similar al final del experimento en los tres cultivares, lo que podría estar indicando que Frontera sería menos susceptible a los áfidos sólo en los estadios iniciales de su desarrollo.

Con la finalidad de evaluar si el contenido de lignina y de fenoles esterificados a pared celular, se modifican en función del grado de infestación, se realizaron ensayos de acumulación a diferentes densidades de áfidos. Se usó el cultivar Frontera, ya que este presentó la mayor acumulación de estos compuestos en los experimentos precedentes. Se infestaron plantas de 10 días con 20, 40 y 60 áfidos iniciales y se midió el contenido relativo de fenoles y lignina a los 4 días. Se encontró que ambos compuestos aumentan en función del nivel de infestación (Fig. 20), existiendo una correlación positiva entre el aumento de lignina y la densidad de los áfidos ($p < 0,8250$). Lo mismo ocurrió al analizar la acumulación de los fenoles esterificados ($p < 0,8940$). Sin embargo el aumento de fenoles esterificados a pared y de lignina no fue proporcional al nivel de infestación aplicado a las plantas.

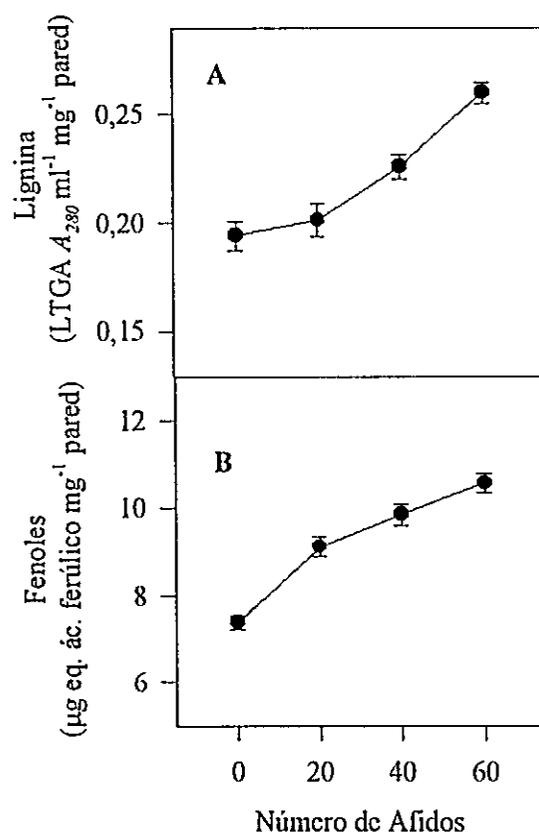


Figura. 20. Efecto de la densidad de infestación en el contenido de fenoles de pared y lignina. Plantas del cultivar Frontera de 10 días de edad fueron infestadas con 20, 40 y 60 áfidos iniciales, se midió el contenido de lignina y fenoles de pared al 4^{to} día de infestación. Cada punto es el promedio de seis muestras ± 1 e.e..

4. DISCUSIÓN

La actividad de la enzima PAL y los productos de la vía fenilpropanoide, han sido estudiados en las respuestas defensivas de las plantas a factores de estrés biótico y abiótico (Dixon y Paiva, 1995). En el caso de estrés por patógenos, se ha encontrado que ocurre un significativo aumento de actividad PAL, debido a síntesis *de novo* de la enzima. Como consecuencia del cambio de actividad de PAL, se produce la síntesis de compuestos fenólicos solubles, de fenoles esterificados a la pared celular y de lignina (Dixon y Paiva, 1995; Börner y Grisebach, 1982; Orr y col., 1993). En el sistema cebada-áfido se conocen pocas aproximaciones para determinar la participación de la vía fenil propanoide como mecanismo de defensa. Comparativamente, en cultivares de trigo infestados por áfidos se han establecido respuestas similares a las que ocurren frente a hongos (Leszczynski y col. 1985a; 1985b; Ciepiela, 1989).

4.1 *Aumento de actividad PAL bajo infestación.*

En el desarrollo de esta tesis, se ha logrado establecer que frente al ataque del áfido *S. graminum*, en la cebada ocurre un significativo aumento de la actividad PAL. El cambio de actividad PAL, está relacionado en parte con la susceptibilidad del cultivar y es dependiente de la densidad de infestación. Además, la actividad de la enzima se modifica con la edad de las plantas y con la duración del período de luz. En cultivares de cebada infectada con hongos, se ha encontrado que la actividad de la enzima presenta una

cinética bimodal en respuesta al patógeno y que el primer pico de actividad se relaciona con el proceso de penetración de las hifas, siendo necesario para detener la infección (Clarc y col. 1994; Shiraishi y col. 1995; Zeyen y col. 1995). Además, el aumento de actividad PAL ha sido caracterizado como parte de la respuesta de hipersensibilidad en las relaciones de patogenicidad hongo-planta. Entre los efectos del aumento de la síntesis de PAL, se ha determinado la acumulación de lignina, compuesto que permitiría aislar el patógeno y restringir su avance en las células infectadas (Clark y col., 1994; Mauch-Mani y Slusarenko, 1996). La participación de ésta enzima como mecanismo de defensa, ha sido confirmada en experimentos con inhibidores específicos de la actividad PAL, demostrándose que su inhibición resulta en una disminución de la síntesis de lignina y en el aumento de la susceptibilidad a los patógenos (Mauch-Mani y Slusarenko, 1996).

En el sistema cebada-áfido, el aumento de la actividad PAL presentó una cinética bimodal. En el cultivar Frontera, menos susceptible al áfido, se observó que el primer pico de actividad fue de mayor magnitud y más temprano en comparación con los cultivares más susceptibles, mientras que el segundo pico de actividad fue bastante similar en magnitud entre los cultivares. Así, la respuesta cinética del aumento de actividad PAL en cebada infestada, es similar a la observada en cebada frente al ataque de hongos. Además, la actividad PAL mostró una correlación positiva con la densidad de infestación, manteniéndose la temporalidad de los máximos de actividad. Sin embargo, el aumento de actividad PAL observado en el sistema cebada-áfido ocurre en forma tardía en comparación con el observado en plantas infectadas con esporas de hongos o tratadas con elicitores fúngicos. En estos casos, el aumento de la actividad de PAL y la

acumulación de los transcritos de genes *pal*, son detectados en pocas horas (Clark y col. 1994), mientras que el primer pico de actividad en cebada infestada se observó alrededor de las 36 h. La rápida acumulación de transcritos de PAL frente a hongos, pueden ser explicados por la forma de penetración del patógeno, ésta es mediada por la secreción de un cocktail de enzimas hidrolíticas entre ellas cutinasas, celulasas, pectinasas y proteasas, y además, la liberación de compuestos elicitores de PAL desde la pared celular del hongo (Knogge, 1996). La acción de las enzimas liberadas por el hongo, permiten la penetración directa al simplasto, además de generar abundante cantidad de fragmentos de pared celular de la planta (oligogalacturonanos), los que también pueden elicitar la síntesis de PAL (Hammond-Kosack y Jones, 1996). En cambio, en el caso de los áfidos, la penetración a la planta es menos directa, ya que el aparato bucal del insecto puede penetrar vía simplasto o apoplasto, lo cual depende de la especie de áfido y de la planta hospedera, siendo su objetivo principal alcanzar el floema (Niemeyer, 1992). La estrategia usada por el áfido para penetrar la planta contribuye a evitar la liberación de compuestos tóxicos, los que son acumulados en células parenquimáticas o epidérmicas, esta conducta podría dar cuenta del retraso en la activación de la vía fenilpropanoide.

Al estudiar el efecto que tiene la densidad de infestación sobre el aumento de actividad PAL, se encontró que el último pico de actividad específica de PAL desaparecía al expresar la actividad de la enzima como actividad total. Esta respuesta fué relacionada a la caída del contenido de proteínas solubles bajo el 50%, y además, coincidió con un aumento significativo de la razón peso seco/peso fresco, es decir con la pérdida de humedad de los tejidos. En síntesis, a pesar de la importante disminución del

metabolismo en las plantas infestadas, la PAL pareciera presentar una alta estabilidad. Una posible explicación ha este fenómeno, es considerar que esta enzima participa de la maquinaria metabólica que actúa en el proceso de muerte celular y senescencia, posiblemente inducida por la infestación con una masiva degradación de proteínas. De esta manera, se puede especular que la enzima es más resistente a la proteólisis o que su tasa de recambio podría estar equilibrada por una mayor síntesis, cuando la maquinaria de proteólisis ha sido activada. Evidencias en este sentido lo aporta el estudio de Nakashima y col. (1997), quienes demuestran que el depósito de lignina requiere de actividad PAL *in situ*, observación realizada en elementos del xilema en desarrollo. El proceso de diferenciación del xilema, es parecido al fenómeno de muerte celular programada, este ocurre en los órganos senescentes, donde son activados genes de enzimas hidrolíticas como lipasas, proteasas, ribonucleasas, la ACC sintetasa y ACC oxidasa (Pennell y Lamb, 1997), además de estar activada la proteólisis vía ubiquitina (Belknap y Garbarinó, 1996). La ACC- sintetasa es la principal enzima de la vía de síntesis de etileno, y a su vez, se encuentra implicada en la inducción de PAL (Ecker y Davis, 1987), y también, de los genes de poliubiquitina que participan en la proteólisis (Belknap y Garbarino, 1996).

Al exponer plantas infestadas del cultivar Frontera a un fotoperíodo de luz continua se encontró un significativo aumento de la actividad PAL, tanto en las plantas infestadas como en el control sano. Además, las plantas infestadas, alcanzaron valores mayores de actividad PAL que bajo un fotoperíodo normal de luz oscuridad. Esta respuesta podría implicar que bajo condiciones de mayor radiación y número de horas de luz, las plantas estarían mejor preparadas a responder al ataque de patógenos o insectos

herbívoros. Sistemas de cooperatividad positiva entre factores de estrés han sido descritos, donde la exposición a un tipo de estrés prepara a las plantas para un factor de estrés diferente. Por ejemplo se ha observado que plantas expuestas a estrés hídrico, se hacen más resistentes a la salinidad y al frío (Davies y Jones, 1992). En este mismo sentido, los órganos aéreos etiolados de avena, presentan un bajo contenido de fenoles de pared (González, 1998), si se comparan con los tejidos verdes de la cebada. Una alta radiación luminica (saturante), es una condición de estrés, lo que posiblemente induce en la planta respuestas de protección, que son comunes a otros tipos de estrés, entre ellos la infestación por áfidos.

Quando se analizó el efecto de la edad en la actividad PAL bajo infestación, se observó una drástica disminución de la actividad PAL al aumentar la edad de las plantas. Sin embargo, ésta disminución no incide en la capacidad de aumento de PAL bajo infestación, encontrándose que el aumento de actividad PAL es relativamente homogéneo. A pesar de que no se presentaron grandes diferencias en el aumento de PAL con la edad, si fue posible determinar que plantas de 10 y 16 días presentan un mayor aumento de actividad por los áfidos. Esta respuesta, se debería a la caída de actividad en el control, más que a un aumento real de la actividad PAL. Estos resultados, son coincidentes con los cambios de la actividad PAL que ocurren con el desarrollo de hojas y frutos en otras especies. En general, la actividad PAL tiende a disminuir con la edad y madurez fisiológica de los órganos, además, se ha observado que pequeños aumentos de PAL hacia el final de las etapas de desarrollo se correlacionan con síntesis de lignina (Knogge y Weissenböck, 1986; Lister y Lancaster, 1996; Cheng y Breen, 1991; Morrison

y Buxton 1993; Fünfgelder y col., 1994). Las variaciones observadas en la actividad basal y aumento de PAL con la edad, implicarían que las plantas están mejor preparadas para enfrentar algunos factores de estrés en estadios tempranos del desarrollo, cuando tienen una mayor actividad de PAL. Una respuesta similar, fue encontrada al medir la actividad basal de PAL en los distintos órganos aéreos de los cultivares de cebada. La lamina foliar de la segunda hoja (más juvenil), mostró una mayor actividad PAL que la primera hoja, y a su vez, la vaina que protege el eje de la planta presento una mayor actividad que las hojas. Estos resultados podrían indicar que existe una susceptibilidad diferencial al ataque de los áfidos entre los órganos de la planta. Sin embargo, también podrían reflejar los requerimientos de compuestos fenólicos relacionados al crecimiento, como por ejemplo, para el desarrollo de elementos de xilema (Nakashima y col., 1997).

Cuando se midió la variación en el contenido de materia orgánica en plantas infestadas, se encontró que en todos los cultivares se produce aumento de la razón peso seco/peso fresco, después de 6 días de infestación. Este aumento se correlacionó directamente con los niveles de susceptibilidad establecidos por Casaretto (1996). Sin embargo, el aumento de la actividad PAL en plantas infestadas de los cultivares Acuario y Libra mostró un resultado contrario a lo esperado de los análisis de susceptibilidad. Ello podría ser explicado porque los niveles de tolerancia a los insectos o patógenos no sólo dependen de la vía fenil propanoide. Por ejemplo, en la respuesta HR de *A. thaliana* a hongos, participa el alcaloide camalexina, un compuesto tóxico derivado del triptofano que no está en la vía de PAL (Mauch-Mani y Slusarenko, 1996). En cebada, los áfidos pueden producir la acumulación de gramina, un protoalcaloide tóxico, y cuyo contenido

se correlaciona negativamente con la susceptibilidad de los cultivares (Veloza, y col., 1997; Corcuera, 1993). Junto a lo anterior, en el desarrollo de esta tesis, se encontró la presencia del cianoglicósido lotoaustralina. Este compuesto está presente sólo en el cultivar Frontera. Estos antecedentes hacen pensar que dentro de la maquinaria defensiva a los áfidos, la vía fenilpropanos es sólo una parte de un sistema más complejo. Otro parámetro medido fue la variación del peso específico de las plantas. Se observó, que en plantas infestadas ocurre una detención total del crecimiento a partir del tercer día, y que esta tendencia se mantiene hasta el final de los experimentos. Este resultado reflejaría dos de los principales problemas detectados por la infestación de áfidos, la detención del crecimiento y la pérdida de agua foliar (Cabrera, 1994).

4.2 Acumulación de flavonoides durante la infestación y su toxicidad para el áfido.

Entre los flavonoides presentes en trigo, se han encontrado compuestos disuasivos para los áfidos (Jördens-Rottger, 1979; Dreyer y col., 1981; Todd, y col., 1971). Antecedentes similares han sido encontrados ante el ataque de hongos (Dixon y Paiva, 1995; Börner y Grisebach, 1982; Orr y col., 1993). En esta tesis, se encontró sólo un flavonoide mayoritario, tanto en plantas sanas como infestadas de cebada, la saponarina una C-glicosil flavona. Este resultado fue coincidente con observaciones previas, donde se ha demostrado que la síntesis de lutoarina (2ª flavonoide en importancia en cebada), ocurre cuando las plantas son crecidas en condiciones de campo (Seikel y Bushnell, 1959; Seikel y col., 1962; Dietz y col., 1994). En plantas infestadas de los tres cultivares, se observó el aumento del contenido de saponarina, el que fue dependiente del nivel de

infestación y cuya acumulación fue siempre posterior a los aumentos de actividad PAL. Significativamente, el mayor porcentaje de acumulación se encontró en Frontera (variedad menos susceptible), seguido de Acuario y Libra. Esta última variedad, mostró un fuerte retraso en su acumulación; sin embargo, presentó el mayor contenido inicial y durante el experimento. Cuando se evaluó la toxicidad de saponarina en dietas artificiales, se encontró que afecta significativamente el porcentaje de sobrevivencia de los áfidos, al usar dosis similares a las encontradas en los cultivares Frontera y Acuario. Como se mencionara previamente, en cultivares de trigo se ha demostrado que la preferencia de los áfidos por un cultivar se relaciona de forma opuesta al contenido de flavonoides (Nariz y Col., 1985). En cambio, en este estudio no se encontró el mismo tipo de correlación, con los cultivares de cebada usados. Además, la saponarina, se encuentra principalmente en tejido epidérmico (Dietz, y col. 1994), barrera que es rápidamente sobrepasada por el áfido. Estas evidencias ponen en duda la importancia de saponarina como estrategia disuasiva para el áfido. Una posible función de este flavonoide, podría ser él de reducir el estrés oxidativo producto del daño mecánico ocasionado por el áfido. El estrés por daño mecánico genera especies activas de O_2 , las que son reducidas a peróxido de hidrógeno y el cual es la señal inicial para la respuesta HR; sin embargo, su acumulación genera daño oxidativo en macromoléculas vitales (Thordal-Christensen y col., 1997, Draper, 1997). En la cebada en condiciones de infestación, se ha determinado un severo daño oxidativo de membranas (después de 72 h), el que es acompañado por un aumento de la actividad de catalasas y peroxidasas solubles (Zúñiga, 1997). Sumado a lo anterior, se ha encontrado que las secreciones

salivales de *S. graminum* contienen pectinasas y celulasas (Dreyer y Campbell, 1984). Estas enzimas liberan fracciones de las pectinas, también llamadas oligosacarinas y se ha demostrado que pueden elicitar respuestas defensivas y generar una explosión oxidativa (Hammond-Kosack y Jones, 1996). En un estudio reciente, Yamasaki y col. (1997) han demostrado que los flavonoides pueden actuar en una reacción flavonoide-peroxidasa para reducir peróxido de hidrógeno, tanto *in vitro* como en extractos vegetales. También, se ha determinado que las flavonas tienen una alta actividad antioxidante, mayor que la vitamina C y E (Rice-Evans, y Col., 1997). De esta manera, la saponarina podría participar de un proceso similar, entonces, Libra a pesar de no generar una acumulación temprana del flavonoide, tendría un sistema constitutivo para disminuir el daño oxidativo que genera el áfido, mientras que este sistema estaría reducido en Frontera y Acuario.

4.3 *Función de los fenoles de la pared celular en la susceptibilidad diferencial a los áfidos*

En condiciones de estrés, la biosíntesis de fenoles de pared celular requiere un aumento previo de la actividad PAL, lo cual ocurre como respuesta a patógenos y daño mecánico (Dixon y Paiva, 1995). En esta tesis se demostró, que los fenoles esterificados a la pared celular, aumentan bajo infestación y que este aumento es posterior al incremento de la actividad PAL. La acumulación de los fenoles de pared se correlacionó negativamente con la susceptibilidad del cultivar y positivamente con la densidad de la infestación. Los valores máximos de acumulación se alcanzaron entre las 60 y 84 h en el

cultivar Frontera, en esta misma temporalidad ocurrió la detención del crecimiento bajo infestación.

Los fenoles en la pared celular, participan del fenómeno de entrecruzamiento de polímeros de pared celular, este proceso es importante para determinar la extensibilidad de la pared y la capacidad de elongación de la célula. La esterificación de ácidos hidroxicinámicos a los polímeros de pared sería la principal forma de aumentar la resistencia mecánica de la pared celular y limitar el crecimiento, principalmente mediante la formación de diferulato en gramíneas (Liyama y col., 1994). González, (1998), ha postulado que peroxidasas asociadas a la pared celular (de la fracción iónica y covalente de la pared celular), catalizarían distintas reacciones relacionadas con la síntesis de diferulato, siendo más importante las peroxidasas de la fracción iónica para estas funciones. En cebada, se han estudiado los cambios en la actividad de peroxidasas de pared celular bajo infestación, encontrándose que aumenta la actividad de la fracción iónica y covalente y que estos cambios de actividad se deben a cambios en la masa de las enzimas (Chaman, 1998, Indarte, 1995). Bajo infestación, la actividad peroxidasa alcanza un máximo a las 72 h (posterior a PAL), para luego mantenerse. El aumento de actividad de las peroxidasas, además, mostró una correlación negativa con el nivel de susceptibilidad de los cultivares (Indarte, 1995). También, se encontró que el aumento de actividad de las peroxidasas de la fracción iónica en plantas infestadas, pareciera estar bajo el control de etileno (Chaman, 1998). Finalmente Cabrera, (1994), analizó los cambios en el contenido de fenoles solubles en cebada infestada por áfidos, encontrando que el contenido de fenoles totales no cambia significativamente, mientras que el ácido

ferúlico aumenta de manera importante. Los resultados y comentarios expuestos apuntan a explicar el aumento de actividad de PAL, como generadora de substratos para la acción de las peroxidasas de pared, encargadas de insolubilizar los ácidos fenólicos en la pared celular. Se ha postulado que la acción de las peroxidasas de pared tendría como resultado la reparación de la pared dañada y al mismo tiempo sería una respuesta defensiva para limitar el acceso a patógenos (Liyama y col., 1994). Una respuesta similar estaría ocurriendo en la cebada en repuesta al ataque del áfido.

Además de la participación de las peroxidasas en la unión covalente de ácidos fenólicos, ellas también serían necesarias para la polimerización de los residuos fenólicos de la lignina (Whetten, y col., 1998). Al estudiar como se modifica el contenido de lignina bajo infestación, se encontró que plantas sanas del cultivar Frontera presentaron el doble de contenido de lignina comparado con Libra y un 25% más que Acuario. El alto contenido de lignina detectado en Frontera podría ser un factor constitutivo de resistencia ante el insecto (antixenosis). El aumento de lignina en Frontera y Acuario fue anterior al observado en el cultivar Libra, el cual mostró un retraso de 48h en su acumulación. En todos los casos, la acumulación de lignina se correlacionó con el aumento de la actividad PAL; y además, su aumento mostró una correlación positiva con la densidad de infestación. Al evaluar el aumento de lignina como porcentaje sobre el control, se encontró que a las 60 h de infestación en Frontera aumentó sólo un 7%, mientras en Acuario el aumento llegó al 12%. Aunque, los cambios iniciales en el contenido de lignina parecen poco importantes, podrían ser suficientes para cambiar la resistencia mecánica de la pared y limitar el crecimiento. Hacia el final de los experimentos de

infestación, se observaron aumentos significativos de lignina, los que mostraron una correlación negativa con el nivel de susceptibilidad a los áfidos. Esta segunda fase de acumulación de lignina es muy tardía y podría ser considerada más que una respuesta defensiva, el resultado de muerte celular. Esta posible explicación, se sustenta en las observaciones de la caída de proteínas solubles y en el significativo aumento de la razón peso seco/peso fresco, fenómenos que ocurren en la misma temporalidad que el aumento de lignina. La acumulación temprana de lignina forma parte de la respuesta HR en interacciones planta-patógenos (Mauch-Mani y Slusarenko, 1996). En el sistema cebada-áfido, esto parece ocurrir del mismo modo, a pesar de que no se correlacionó el aumento de lignina con los niveles de susceptibilidad que presentan las plantas estudiadas.

Los cambios observados en el contenido de fenoles esterificados a la pared y de lignina, presentan bastante similitud con las respuestas de las plantas al ataque de hongos. Ikegawa y col. (1996), encontraron que en avena infectada con el hongo *Puccinia coronata*, ocurre un importante aumento de ácido diferúlico unido a la matriz de polisacáridos de la pared celular, posterior a las 36 h de infección. Simultáneamente, ocurre un significativo aumento de la fracción de peroxidasas unidas iónicamente a la pared. La extensibilidad de la pared celular ha sido relacionada en forma inversa a los niveles de ácido ferúlico y ácido diferúlico esterificado a las paredes celulares (Kamisaka y col., 1990; Tan y col., 1991; 1992). De este modo, el aumento de los fenoles esterificados a pared podrían tener un importante papel en la limitación del crecimiento y acceso del patógeno (Liyama y col., 1994). En gramíneas, los principales ácidos cinámicos unidos a la pared, son el ácido cumárico, ferúlico y diferúlico, siendo el ácido

ferúlico el principal componente (Lam, y col., 1992; Smart y O'Brien, 1979). Similarmente el estrés oxidativo aumenta la cantidad de diferúlico unido a hemicelulosa y lignina (Grabber y col., 1995). Como se mencionó anteriormente, Zúñiga, G. (1997), ha reportado que durante los primeros días de la infestación ocurre un significativo aumento del daño oxidativo. El peróxido de hidrógeno, que es producido por este tipo de estrés, es requerido para la síntesis de lignina (Whetten, y col., 1988). Para contrarrestar la acumulación de este oxidante la célula usa las catalasas, las que descomponen el H_2O_2 hasta agua y oxígeno (Hernández-Ruiz y col., 1996). El pequeño aumento de lignina, en los primeros días de la infestación en los cultivares Frontera y Acuario, podría ser explicado por un sistema inducido de protección del estrés oxidativo, el que reduciría los niveles de peróxido, limitando de esta forma la síntesis de lignina y además de fenoles esterificados a la pared celular.

4.4 Regulación de la vía fenil propanoide y proyecciones del estudio

Además de la PAL, existen otras enzimas de la vía fenil propanoide que son reguladas por factores de estrés, como la chalcona sintetasa, isoflavona reductasa y O-metyltransferasa, cuya actividad da lugar a la síntesis de flavonoides, isoflavonoides y lignina respectivamente (Lee y col., 1997; Coronado y col., 1995; Takeda y col., 1994). De esta forma, la síntesis de los distintos compuestos fenil propanoides bajo condiciones de estrés, es el resultado de un delicado equilibrio de regulación metabólica, donde la PAL es sólo el punto de partida. Un aspecto que no fue abordado en esta tesis, fueron los factores de regulación endógena de la vía fenil propanoide, como son el ácido

jasmónico (JA), etileno y ácido salicílico. La acumulación de estos compuestos bajo la infestación, podría dar cuenta de la modulación de la síntesis de los compuestos fenólicos analizados de cebada. Además, debemos considerar que los productos de esta vía no son los únicos factores asociados a mecanismos de tolerancia y resistencia a insectos.

El etileno ha sido relacionado como factor de regulación de PAL en varios estudios, observándose que es capaz de inducir la acumulación de transcritos de PAL y CHS (Ecker y Davis, 1987). Así, la producción de etileno ha sido asociada a un significativo aumento de la actividad PAL en suspensiones celulares (Cvikrová y col., 1991). La participación de etileno, también, ha sido establecida en la enfermedad denominada punteamiento oxidativo de la lechuga. Esta enfermedad es un desorden fisiológico que causa puntos de necrosis en la lámina foliar después de la cosecha. En los trabajos realizados para entender la enfermedad, se ha visto que el etileno media el aumento de actividad PAL y de peroxidasas unidas iónicamente a la pared celular (Hyodo, y col., 1978; Ke y Saltveit, 1988). Como consecuencia, aumenta el contenido de lignina, fenoles esterificados de pared y flavonoides (Hyodo, y col., 1978; Ke y Saltveit, 1988; Ritenour y col., 1995; Ritenor y Saltveit, 1996). En estudios de inducción de PAL por elicitores fúngicos en poroto, también han encontrado que el etileno participa, al menos, en una parte del proceso de elicitación (Hughes y Dickerson, 1989). Finalmente, en un estudio sobre regulación de la actividad de etileno, con 2,5-norbornadieno (inhibidor de la acción de etileno), se encontró que éste es capaz de inhibir la actividad de PAL, evidencia que apoya fuertemente la participación de etileno en la inducción de la enzima. Es importante destacar que Chaman, (1998), describió que bajo

infestación ocurre un aumento de etileno, el que está correlacionado a la actividad de peroxidasa de pared en plantas de cebada.

El ácido jasmónico, también ha sido asociado a la activación de ésta vía metabólica. Existen evidencias que este compuesto se acumula en respuesta a patógenos e insectos, y se ha visto que además, tiene la capacidad de inducir la actividad PAL y CHS (Creelman y Mullet, 1995, 1997). Así, aplicaciones exógenas de JA, provocan la acumulación de fenoles de pared y activación de enzimas que participan en la formación de lignina en cebada (Lee, y col., 1997a;b). Sin embargo, en estudios de patogenicidad entre la cebada y el hongo *Erysiphe graminis*, se encontró que la resistencia a este patógeno no está asociada a incrementos del JA endógeno y que además, este parece no participar como señal durante interacciones compatibles o incompatibles con el hongo (Hause, y col., 1997; Kogel, y col., 1995). En síntesis, considerando los antecedentes expuestos sería muy útil en el futuro dilucidar la participación del etileno y ácido jasmónico en el aumento de actividad PAL bajo infestación, ya que permitiría una mejor caracterización de las respuestas defensivas mediadas por la vía fenilpropanoide.

En esta tesis se postuló, que en la cebada se modificaría la actividad PAL en respuesta a la infestación por áfidos y que el cambio de actividad PAL se reflejaría en variaciones en el contenido de compuestos fenólicos en la planta, lo que sería importante en la defensa de la planta al ataque de los áfidos. Como resultado, se ha logrado establecer que frente al ataque del áfido *S. graminum*, ocurre un significativo aumento de la actividad PAL. Además, que el cambio de actividad PAL, está relacionado en parte con la susceptibilidad del cultivar y es dependiente de la densidad de infestación.

También, que la actividad de la enzima se modifica con la edad de las plantas y con la duración del periodo de luz. Como consecuencia del cambio de actividad PAL, en cebada ocurre el aumento del contenido de saponarina (principal flavonoide), siendo dependiente del nivel de infestación. Cuando se evaluó la toxicidad de saponarina en dietas artificiales, se encontró una disminución significativa del porcentaje de sobrevivencia de los áfidos. Al analizar el contenido de fenoles esterificados a pared celular y de lignina, se observó que ambos aumentan con la infestación y con la densidad de los áfidos. El aumento de los tres compuestos analizados, ocurrió en forma posterior al aumento de actividad PAL. El cultivar Frontera (menos susceptible), presentó la mayor actividad PAL bajo infestación y en forma más temprana. Consecuentemente, el cultivar Frontera presento el mayor grado de acumulación de los tres tipos de compuestos fenólicos analizados. Los resultados de esta tesis presentan bastante similitud con investigaciones sobre interacción hongo-planta, evidencias que sugieren una alta similitud en la respuestas defensivas de las plantas a patógenos y este tipo de insectos.

5. CONCLUSIONES

1.- Bajo condiciones de infestación por áfidos, en la cebada ocurre un aumento de actividad PAL que se correlaciona positivamente con el grado de infestación y negativamente con el grado de susceptibilidad de los cultivares Frontera y Acuario. Siendo además, la actividad de la enzima afectada por la edad de las plantas y duración del período de luz.

2.- El aumento de actividad PAL presenta una cinética de actividad bimodal en el cultivar Frontera y Libra. En todos los casos, los máximos de actividad PAL preceden la acumulación de saponarina, fenoles esterificados a pared celular y de lignina.

3.- Saponarina fue el principal flavonoide presente en los cultivares estudiados y su grado de acumulación bajo infestación se correlacionó negativamente con el nivel de susceptibilidad de los cultivares. Sin embargo, el cultivar Libra de susceptibilidad intermedia presentó el mayor nivel basal. Saponarina, además, mostró un efecto negativo en la sobrevivencia de áfidos en dietas artificiales. El rol de saponarina como compuesto disuasivo para el áfido es discutible ya que en la hoja, se encuentra acumulada en la epidermis y su contenido basal no se correlacionó con la susceptibilidad de los cultivares. Sin embargo, no se puede descartar que saponarina tenga un rol disuasivo, ya que aumenta con la infestación.

4.- Con la infestación se produce un aumento de fenoles esterificados a la pared celular, el que se correlacionó negativamente con el nivel de susceptibilidad de los cultivares de cebada y positivamente con el grado de infestación. La acumulación de fenoles esterificados a la matriz de la pared celular sería una de las estrategias de la planta para limitar el acceso de los áfidos al floema vía apoplasto.

5.- Bajo infestación ocurren dos fases de acumulación de lignina, la primera fase no mostró correlación con el grado de susceptibilidad de los cultivares; mientras que en la segunda fase se encontró una correlación negativa. Sin embargo, la acumulación de lignina en la primera fase, fue dependiente del grado de infestación. La deposición de lignina en la primera fase actuaría como una barrera de protección al ataque de los áfidos; en cambio, su acumulación posterior estaría relacionada a un mecanismo de reparación de tejidos dañados.

6.- El cultivar Frontera, presentó un contenido mayor de lignina en relación a los cultivares más susceptibles. Ello sería un factor constitutivo de resistencia al ataque del áfido. Además, éste cultivar presentó el mayor aumento de actividad PAL, porcentaje de acumulación de saponarina y fenoles esterificados de pared celular. El conjunto de estas respuestas, sumado a la presencia de otros metabolitos secundarios darían cuenta de su menor susceptibilidad al insecto.

REFERENCIAS

- Argandoña, V.H., Corcuera, L.J., Niemeyer, H.M., y Campbell, B.C. 1983. Toxicity and feeding deterrence of hydroxamic acids from Graminae in synthetic diets against the greenbug *Shizaphis graminum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 24: 134 – 138.
- Beggs, Ch. J., Kuhn K., Böcker, R. y Wellmann, E. 1987. Phytochrome-induced flavonoid biosynthesis in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons. Enzymic control and differential regulation of anthocyanin and quercetin formation. *Planta* 172: 121 – 126.
- Belefant-Miller, H., Portes, D.R., Pierce, M.L., Mort, A.J. 1994. An early indicator of resistance in barley to russian wheat aphids. *Plant Physiology* 105: 1289 - 1294.
- Belknap, W.R y Garbardino, J.E. 1996. The role of ubiquitin in plant senescence and stress responses. *Trends in Plant Science* 1: 331 - 335
- Bevan, M., Schuffebottom, D., Edwards, K., Jefferson, R. y Schuch, W. 1989. Tissue – and cell – specific activity of a phenylalanine ammonia-lyase promoter in transgenic plants. *Embo Journal* 8: 1899 – 1906.
- Bolwell, G. P., Bell, J.N., Cramer, C.L., Schuch, W., Lamb, C.J. y Dixon, R. A. 1985. L-Phenylalanine ammonia – lyase from *Phaseolus vulgaris*. Characterization and differential induction of multiple forms from elicitor-treated cell suspension cultures. *European Journal of Biochemistry* 149: 411 – 419.
- Bolwell, G.P., Mavandad, M., Millar, D.J., Edwards, K.J., Schuch, W. y Dixon, R.A. 1988. Inhibition of mRNA levels and activities by trans-cinnamic acid in elicitor-induced bean cells. *Phytochemistry* 27: 2109 – 2117.

Börner, H. y Grisebach, H. 1982. Enzyme induction in soybean infected by *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 217: 65 – 71.

Bradford, M. 1976. A rapid and quantitative method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Cabrera, H. M. 1994. Respuestas fisiológicas y metabólicas de la cebada ante la infestación por áfidos. Tesis Magister, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias. 92 pp.

Cabrera, H.M., Muñoz, O., Zúñiga, G.E., Corcuera, L.J. y Argandoña V.H. 1995. Changes in ferulic acid and lipid content in aphid – infested barley. Phytochemistry 39: 1023 – 1026.

Cahill, D.M. y McComb, J.A. 1992. A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) and *E. marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora cinnamomi*. Physiological and Molecular Plant Pathology 40: 315 – 332.

Casaretto, J. 1996. Acumulación de inhibidores de proteinasas en cebada infestada por áfidos. Tesis Magister, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias. 80 pp.

Cassab, G.I. 1997. Plant cell wall proteins. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49: 281 - 309.

Chaman, M.E. 1998. Caracterización del patrón de isoformas de peroxidasas de pared celular en plantas de *Hordeum vulgare* L. infestadas con áfidos. Tesis Magister, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias. 76 pp.

Cheng, G.W. y Breen, P.J. 1991. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. Journal of The American Society for Horticultural Science 116: 865 – 869.

Ciepiela, A. 1989. Changes in phenylalanine and tyrosine content and metabolism in ears of susceptible and aphid resistant winter wheat cultivars upon infestation by *Sitobion avenae*. Entomologia Experimentalis et Applicata 51 : 277 – 281.

Clark, T.A., Zeyen, R.J., Smith, A.G., Carver, T.L.W. y Vance, C.P. 1994. Phenylalanine ammonia lyase mRNA accumulation, enzyme activity and cytoplasmic responses in barley isolines, differing at *MI-a* and *MI-o* loci, attacked by *Erysiphe graminis* f.sp.hordei. Physiological and Molecular Plant Pathology 44: 171 – 185.

Corchete, M.P., Diez, J.J. y Valle, T. 1993. Phenylalanine ammonia-lyase activity in suspension cultures of *Ulmus pumila* and *U. campestris* treated with spores of *Ceratocystis ulmi*. Plant Cell Reports 13: 111 – 114.

Corcuera, L.J. 1993. Biochemical basis for the resistance of barley to aphids. Review article number 78. Phytochemistry 33: 741 - 747.

Coronado, C., Silveira, J.A., Sallaud, C., Quirion, J.C., Esnault, R., Husson, H.P., Kondorosi, A. y Ratet, P. 1995. Alfalfa root flavonoid production is nitrogen regulated. Plant Physiology 108: 533 - 542.

- Creelman, R.A. y Mullet, J.E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 355 - 381.
- Creelman, R.A. y Mullet, J.E. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America* 92: 4114 - 4119.
- Cui, Y., Magill, J. Frederiksen, R. y Magill, C. 1996. Chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase mRNA levels following exposure of sorghum seedlings to three fungal pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49: 187 - 199.
- Cvikrová, M., Meravý, L., Machácková, I. y Eder, J. 1991. Phenylalanine ammonia-lyase, phenolic acid and ethylene in alfalfa (*Medicago sativa* L.) cell cultures in relation to their embryogenic ability. *Plant Cell Reports* 10: 251 - 255.
- Dalkin, K., Edwards, R., Edington, B. y Dixon, R.A. 1990. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) I. Induction of phenylpropanoid biosynthesis and hydrolytic enzymes in elicitor-treated cell suspension cultures. *Plant Physiology* 92: 440 - 446.
- Davies, W.J. y Jones, H.G. 1992. An assessment of the role of ABA in plant development. Trewavas, A.J. y Jones, H.G, Ed: *Abscisic acid: Physiology and biochemistry*. pp. 169 - 187. Davies, W.J (ed.). Bios Scientific Publishers. Lancaster.
- Dietz, K.J., Hollenbach, B., Kirch, J. y Veit, M. 1994. Cell type and organelle specific accumulation and transmembrane transport of flavonoids in barley leaves. *Acta Horticulturae*. 381: 109 - 112.

- Dixon, R.A. Dey, P.M. y Whitehead, I.M. 1982. Purification and properties of chalcone isomerase from cell suspension cultures of *Phaseolus Vulgaris*. *Biochimica et Biophysica Acta* 715: 25 –33.
- Dixon, R.A. y Paiva, N.L. 1995. Stresses-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7: 1085 - 1097.
- Draper, J. 1997. Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. *Trends in Plant Science* 2: 162- 165.
- Dreyer, D.L. y Jones, K.C. 1981. Feeding deterrency of flavonoids and related phenolics towards *Schizaphis graminum* and *Myzus Persicae* : Aphid feeding deterrents in wheat. *Phytochemistry* 20: 2489 – 2493.
- Dreyer, D.L. y Campbell, B.C. 1984. Association of the degree of methylation of intercellular pectin with plant resistance to aphids and with induction of aphid biotypes. *Experientia* 40: 224 - 226.
- Ecker, J.R. y Davis, R.W. 1987. Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proceedings of the National Academy of Science of The United Stated of America*. 84: 5202 - 5206.
- Fröst, S. , Harborne, J.B. y King, L. 1977. Identification of the flavonoids in five chemical races of cultivated barley. *Hereditas* 85: 163 – 168.
- Fukasawa-Akada, T., Kung, S. y Watson, J.C. 1996. Phenylalanine ammonia-lyase gene structure, expression, and evolution in *Nicotiana*. *Plant Molecular Biology* 30: 711 – 722.

Fünfgelder, S., Mayr, U., Treutter, D. y Feucht, W. 1994. The activity of phenylalanine ammonia – lyase in apple leaves after wounding. *Acta Horticulturae* 381: 474 – 478.

García, S., García, C., Heinzen, H. y Moyna, P. 1997. Chemical basic of the resistance of barley seeds to pathogenic fungi . *Phytochemistry* 44: 415 – 418.

Gerding, M. P. 1992. Control biológico de áfidos en cereales. En: Taller Internacional de control biológico del áfido ruso del trigo. Gerding, M. P. (ed.) Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Quilamapu. Chillan, Chile. Pp. 29 - 43.

Gonzalez, L.F. 1998. Efecto de reguladores del crecimiento sobre peroxidasas de pared celular de coleoptilos de avena. Tesis de Doctorado, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias. 150 pp.

Grabber, J.H., Hatfield, R.D., Ralph, J., Zon, J. y Amrhfin, N. 1995. Ferulate cross – linking in cell suspensions. *Phytochemistry* 40: 1077 – 1082.

Grosskopf, D.G., Felix, G. y Boller, T. 1991. A yeast – derived glycopeptide elicitor and chitosan or digitonin differentially induce ethylene biosynthesis, phenylalanine ammonia – lyase and callose formation in suspension – cultured tomato cells. *Journal of Plant Physiology* 138: 741 – 746.

Hahlbrock, K. y Scheel, D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 347 – 369.

Hammond-Kosack, K.E. y Jones, J.D. 1996. Resistance gene-dependent plant defence responses. *The Plant Cell* 8: 1773 - 1791.

Harborne, J.B. y Williams, Ch.A. 1994. Recent advances in the chemosystematics of the monocotyledons. *Phytochemistry* 37: 3 – 18.

Hause, B., Kogel, K.H., Parthier, B. y Wasternack, C. 1997. In barley cells, jasmonates do not act as a signal during compatible or incompatible interactions with the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f.sp *hordei*). *Journal of Plant Physiology* 150: 127 - 132.

Hernández-Ruiz, J., Cano, A., Arnao, M.B., Acosta, M. y Sánchez-Bravo, J. 1996. Distribution of ascorbate- and guaiacol- peroxidase and catalase in etiolated lupin hypocotyls. En C. Obinger, U. Burner, R. Eberman, C. Penel, H. Greppin (eds.), "*Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology*". pp 281-285. University of Agriculture, Vienna and University of Geneva.

Hirai, N., Kuwano, Y., Kojima, Y., Koshimizu, K., Shinozaki, M. y Takimoto, A. 1995. Increase in the activity of phenylalanine ammonia – lyase during the non- photoperiodic induction of flowering in seedlings of morning glory (*Pharbitis nil*). *Plant Cell Physiology* 36: 291 – 297.

Horber, E. 1980. Types and classification of resistance. En: *Breeding plants resistant to insects*. Maxwell, F.G. y Jennings, P.R. (eds.). Wiley, New York, pp. 15 - 21.

Hughes, R.K. y Dickerson, A.G. 1989. The effect of ethylene on phenylalanine ammonia lyase (PAL) induction by a fungal elicitor in *Phaseolus vulgaris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34: 361 – 378.

Hyodo, H., Kuroda, H., y Yang, S.F. 1978. Induction of phenylalanine ammonia – lyase and increase in phenolics in lettuce Leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. *Plant Physiology* 62: 31 – 35.

Hyodo, H., y Fujinami, H. 1989. The effects of 2,5-norbornadiene on the induction of the activity of 1-aminocyclopropane - 1 - carboxylate synthase and of phenylalanine ammonia - lyase in wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Plant Cell Physiology* 30: 857 - 860.

Ikegawa, T., Mayama, S., Nakayashiki, H. y Kato, H. 1996. Accumulation of diferulic acid during the hypersensitive response of oat leaves to *Puccinia Coronata* f.sp. avenae and its role in the resistance of oat tissues to cell wall degrading enzymes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 48: 245 - 255.

Indarte, R. G. 1995. Capacidad de recuperación de plantas de cebada infestadas por áfidos: Su relación con las peroxidases y compuestos fenolicos de pared celular. Tesis Magister, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias. 86 pp.

Ishizuka, M., Yamada, F., Tanaka, Y., Takeuchi, Y. y Imaseki, H. 1991. Sequential Induction of mRNAs for phenylalanine ammonia - lyase in slices of potato tuber. *Plant Cell Physiology* 32: 57 - 64.

Jones, D.H. 1984. Phenylalanine ammonia lyase: Regulation of its induction and its role in plant development. Review article number 3. *Phytochemistry* 23: 1349 - 1359.

Jördens-Röttger, D. 1979. Role of phenolic substances for host-reaction behaviour of the black bean aphid, *Aphis fabae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 26: 49-54.

Jorin, J. y Dixon, R.A. 1990. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology* 92: 447 - 455.

Kamisaka, S., Takeda, S., Takahashi, K. y Shibata, K. 1990. Diferulic and ferulic acid in the cell wall of *Avena* coleoptiles. Their relationships to mechanical properties of the cell wall. *Physiolgia Plantarum* 78: 1-7.

- Ke, D., y Saltveit, M.E.JR. 1988. Plant hormone interaction and phenolic metabolism in the regulation of russet spotting in iceberg lettuce. *Plant Physiology* 88: 1136 – 1140.
- Kervinen, T., Peltonen, S., Utriainen, M., Kangasjärvi, J., Teeri, T.H. y Karjalainen, R. 1997. Cloning and characterization of cDNA clones encoding phenylalanine ammonia-lyase in barley. *Plant Science* 123: 143 – 150.
- Knogge, W. y Weissenböck, G. 1986. Tissue – distribution of secondary phenolic biosynthesis in developing primary leaves of *Avena sativa* L. *Planta* 167: 196 – 205.
- Kogel, K.H., Ortel, B., Jarosch, B., Atzorn, R., Schiffer, R. y Westernack. 1995. Resistant in barley against the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f.sp *hordei*) is not associated with enhanced levels of endogenous jasmonates. *European Journal of Plant Pathology* 101: 319 - 332.
- Koukol, J. y Conn, E.E. 1961. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *Journal of Biological Chemistry* 236: 2692 - 2698.
- Kreuzaler, F. y Hahlbrock K., 1975. Enzymic synthesis of an aromatic ring from acetate units. *European Journal of Biochemistry* 56 : 205 – 213.
- Lam, T.T, Iiyama, K. y Stone, B.A. 1992. Changes in phenolic acids from internode walls of wheat and *Phalaris* during maturation. *Phytochemistry* 31: 8, 2655 – 2658.
- Lawton, M.A., Dixon, R.A., Hahlbrock, K. y Lamb, CH. 1983. Rapid induction of the synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and of chalcone synthase in elicitor- treated. plant cell. *European Journal Biochemistry* 129: 593 – 601.

Lee, J., Vogt, T., Schmit, J., Parthier, B. y Löbler, M. 1997a. Methyljasmonate induced accumulation of coumaroyl conjugates in barley leaf segments. *Phytochemistry* 44: 589 - 592.

Lee, J., Vogt, T., Hause, B. y Löbler, M. 1997b. Methyl jasmonate induces an O-methyltransferase in barley. *Plant Cell Physiology* 38: 851 - 862.

Leszczynski, B. 1985a. Changes in phenols content and metabolism in leaves of susceptible and resistant winter wheat cultivars infested by *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hom., Aphididae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 100 : 343 - 348.

Leszczynski, B., Warchol, J. y Niraz, S. 1985b. The influence of phenolic compounds on the preference of winter wheat cultivars by cereal aphids. *Insect Science and its Application* 6: 157 - 158.

Lewinsohn, E., Britsch, L., Mazur, Y. y Gressel, J. 1989. Flavanone glycoside biosynthesis in citrus. chalcone synthase, UDP-glucose: flavanone-7-O-glucosyltransferase and-rhamnosyl-transferase activities in cell-free extracts. *Plant Physiology* 91: 1323 - 1328.

Leyva, A., Jarillo, J.A., Salinas, J. y Martinez-Zapater, J.M. 1995. Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiology* 108: 39 - 46.

Li, J., Ou-Lee, T., Raba, R., Amundson, R.G. y Last, R.L. 1993. *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *The Plant Cell* 5: 171 - 179.

Liang, X., Dron, M., Cramer, C.L., Dixon, R.A. y Lamb, Ch. J. 1989a. Differential regulation of phenylalanine ammonia – lyase genes during plant development and by environmental cues. *The Journal of Biological Chemistry* 264: 14486 – 14492.

Lister, C.E. y Lancaster, J.E. 1996. Phenylalanine ammonia – lyase (PAL) activity and its relationship to anthocyanin and flavonoid levels in New Zealand – grown apple cultivars. *Journal of The American Society for Horticultural Science* 121: 281 – 285.

Liu, L., Gitz III, D.C. y McClure, J.W. 1995. Effects of UV-B on flavonoids, ferulic acid, growth and photosynthesis in barley primary leaves. *Physiologia Plantarum* 93: 725 – 733.

Liyama, K., Thi Bach-Tuyet Lam, y Stone, B.A. 1994. Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiology* 104: 315 – 320.

Mauch – Mani, B. y Slusarenko, A.J. 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia – lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *The Plant Cell* 8 : 203 – 212.

McClure, J.W. y Wilson, K.G. 1970. Photocontrol of C-glycosylflavones in barley seedlings. *Phytochemistry* 9: 763 – 773.

Miklas, P.N., Grafton, K.F. y McClean, P.E. 1993. Estimating phenylalanine ammonia-lyase activity in common beans inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum*. *HortScience* 28: 937 - 938.

Miller, R.H. y Haile, A. 1988. Russian wheat aphids on barley in Ethiopia. *Rachis* 7: 51 – 52.

Morrison, T.A. y Buxton, D.R. 1993. Activity of phenylalanine ammonia – lyase, and cinnamyl alcohol dehydrogenase in the maize stalk. *Crop Science* 33: 1264 – 1268.

Nakashima, J., Awano, T., Takabe, K., Fujita, M. y Saiki, H. 1997. Immunocytochemical localization of phenylalanine ammonia – lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase in differentiating tracheary elements derived from *Zinnia* mesophyll cell. *Plant Cell Physiology* 38: 113 – 123.

Niemeyer, H.M. 1992. Aspectos ecológicos y moleculares de la interacción entre áfidos y sus plantas hospederas. *Revista Chilena de Historia Natural*. 65: 103 – 114.

Nariz, S., Leszczynski, B., Ciepiela, A., Urbanska, A. y Warchoe, J. 1985. Biochemical aspectos of winter wheat resistance to aphids. *Insect Science and it's Application* 6: 253 – 257.

Norambuena, H. 1992. El áfido ruso del trigo *Diuraphis noxia* (Mordvilko) en Chile: Distribución y pérdidas de rendimiento. En: Taller Internacional de control biológico del áfido ruso del trigo. Gerding, M. P. (ed.) Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Quilamapu. Chillan, Chile. pp 7 - 18.

Notsu, S., Saito, N., Kosaki, H., Inui, H. y Hirano, S. 1994. Stimulation of phenylalanine ammonia – lyase activity and lignification in rice callus treated with chitin, chitosan, and their derivatives. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 58: 552 – 553.

Oosterhaven, K., Hartmans, K.J., Scheffer, J.J.C. y H.W.van der Plas. L. 1995. Scarvone inhibits phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity and suberization during wound healing of potato tubers. *Journal of Plant Physiology* 146: 288 – 294.

- Orr, J.D., Edwards, R. y Dixon, R.A. 1993. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology* 101: 847 – 856.
- Poehlman, J.M. 1985. Adaptation and distribution. En: Barley. Rasmusson, D.C. (ed.). *Agronomy Monograph No 26*, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America y Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin, USA. pp. 1 - 17.
- Pennell, R.I. y Lamb, C. 1997. Programmed cell death in plants. *The Plant Cell* 9: 1157 - 1168.
- Quiroz, C. E. y Zerené, M. E. 1992. Relación planta - pulgon ruso. En: Taller Internacional de control biológico del áfido ruso del trigo. Gerding, M. P. (ed.) Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Quilamapu. Chillan, Chile. Pp. 87 -98.
- Reddy, V.S., Goud, K.V., Sharma, R. y Reddy, A.R. 1994. Ultraviolet-B-responsive anthocyanin production in a rice cultivar is associated with a specific phase of phenylalanine ammonia lyase biosynthesis. *Plant Physiology* 105: 1059 – 1066.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. y Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2: 152 - 159.
- Ritenour, M.A. y Saltveit, M.E. 1996. Identification of a phenylalanine ammonia – lyase inactivating factor in harvested head lettuce. (*Lactuca sativa*). *Physiologia Plantarum* 97: 327 – 331.
- Ritenour, M.A., Ahrens, M.J. y Saltveit, M.E. 1995. Effects of temperature on ethylene – induced phenylalanine ammonia lyase activity and russet spotting in harvested iceberg lettuce. *Journal of The American Society for Horticultural Science* 120: 84 – 87.

Saunders, J.A y McClure, J.W. 1975. Phytochrome controlled phenylalanine ammonia lyase in *Hordeum vulgare* plastids . Phytochemistry 14: 1285 - 1289.

Schöpker, H., Kneisel, M., Beerhues, L., Robenek, H.y Wiermann, R. 1995. Phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase in glands of *Primula kewensis* (W.Wats) : immunofluorescence and immunogold localization. Planta 196: 712 -- 719.

Schröder, J., Heller, W. y Hahlbrock, K. 1979. Flavanone synthase: Simple and rapid assay for the key enzyme of flavonoid biosynthesis. Plant Science Letters 14: 281 – 286.

Seikel, M.K. , Bushnell, A.J. y Birzgalis, R. 1962. The flavonoid constituents of barley (*Hordeum vulgare*). III. Lutonarin and its 3'-methyl ether. Archives of Biochemistry and Biophysics 99: 451 – 457.

Seikel, M.K. y Bushnell, A.J. 1959. The flavonoides constituents of barley (*Hordeum vulgare*). II. Lutonarin. Journal of The Organic Chemistry 24: 1995-1997.

Shinozaki, M., Hirai, N., Kojima, Y., Koshimizu, K. y Takimoto, A. 1994. Correlation between level of phenylpropanoids in cotyledons and flowering in pharbitis seedling under high – fluence illumination. Plant Cell Physiology 35: 807 – 810.

Shiraishi, T., Yamada, T., Nicholson, R.L. y Kunoh, H. 1995. Phenylalanine ammonia – lyase in barley: activity enhancement in response to *Erysiphe graminis* f.sp. hordei (race 1) a pathogen , and *Erysiphe pisi* , a nonpathogen. Physiological and Molecular Plant Pathology 46: 153 – 162.

Shiraishi, T., Yamaoka, N. y Kunoh, H. 1989. Association between increased phenylalanine ammonialyase activity and cinnamic acid synthesis and the induction of

temporary inaccessibility caused by *Erysiphe graminis* primary germ tube penetration of the barley leaf. *Physiological and Molecular Plant pathology* 34: 75 – 83.

Smart, M.G. y O'Brien, T.P. 1979. Observation on the scutellum. III Ferulic acid as a component of the cell wall in wheat and barley. *Australian Journal of Physiology* 6: 485 – 491.

Solecka, D. y Kacperska, A. 1995. Phenylalanine ammonia- lyase activity in leaves of winter oilseed rape plants as affected by acclimation of plants to low temperature. *Plant Physiology and Biochemistry* 33: 585 – 591.

Sounders, J.A. y McClure, J.W. 1973. Acetylcholine inhibition of phytochrome-mediated increases in a flavonoid and phenylalanine ammonia lyase activity of etiolated barley plumules. *Plant Physiology* 51: 407 - 408.

Starks, K.J. y Webster, J.A. 1985. Insects and related pests. En: Barley. Rasmusson, D.C. (ed.). *Agronomy Monograph No. 26 American Society of Agronomy, Crop Science Society of America y Soil Science Society of America*. Madison, Wisconsin, USA. pp. 335 - 365.

Swain, T. y Hillis, W.E. 1959. The phenolics constituents of *Prunus domestica* L. The quantitative analysis of phenolics constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 10: 63 - 68.

Takeda J., Obi, I. y Yoshida, K. 1994. Action spectra of phenylalanine ammonia – lyase and chalcone synthase expression in carrot cells in suspension. *Physiologia Plantarum* 91: 517 – 521.

Tan, K-S., Hoson, T., Masuda, Y. y Kamisaka, S. 1991. Correlation between cell wall extensibility and the content of diferulic and ferulic acids in cell walls of *Oryza sativa* coleoptiles grown under water and in air. *Physiologia Plantarum* 83 : 397-403.

Tan, K-S., Hoson, T., Masuda, Y. y Kamisaka, S. 1992. Involvement of cell wall-bound diferulic acid in light-induced decrease in growth rate and cell wall extensibility of *Oryza* coleoptiles. *Plant and Cell Physiology* 33: 103-108.

Tanaka, Y., Matsuoka, M., Yamanoto, N., Oshashi, Y., Kano-Murakami, Y. y Ozeki, Y. 1989. Structure and characterization of a cDNA clone for phenylalanine ammonia-lyase from cut-injured roots of sweet potato. *Plant Physiology* 90 : 1403 – 1407.

Thordal – Christensen, H., Zhang, Z. Wei, Y. y Collinge, D. B. 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley – powdery mildew interaction. *The Plant Journal* 11: 1187 - 1194.

Tood, G.W., Getahun, A. y Cress, D.C. 1971. Resistance in barley to the greenbug, *Schizaphis graminum*. 1. Toxicity of phenolic and flavonoid compounds and related substances. *Annals of the Entomological Society of America* 64: 718 – 722.

Trejos, C.L., Davies, W.J. y Ruiz, L. P. 1993. Sensitivity of stomata to abscisic acid. An effect of the mesophyll. *Plant Physiology* 102: 497 - 502.

Velozo, J.A., Alvarez, R., Waechter, G. y Corcuera, L.J. 1997. Aumento del contenido de gramina en cebada (*Hordeum vulgare* L.) infestada por el áfido *Schizaphis graminum*. En: XL Reunión Anual, Sociedad de Biología de Chile. *Noticiero de Biología* 5: 144.

Whetten, R. y Sederoff, R. 1995. Lignin Biosynthesis. *The Plant Cell* 7: 1001 – 1013.

- Whetten, R. W., MacKay, J.J. y Sederoff, R. 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 585 - 609.
- Yamada, T., Sriprasertsak, P., Kato, H., Hashimoto, T., Shimizu, H. y Shiraishi, T. 1994. Functional analysis of the promoters of phenylalanine ammonia - lyase genes in pea. *Plant Cell Physiology* 35: 917 - 926.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y. y Ikehara, N. 1997. Flavonoid - peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiology* 115: 1405 - 1412.
- Zerené, M. y Quiroz, C. 1993. Presencia y daño del pulgon ruso del trigo, *Diuraphis noxia* (Mordvilko) y de otros afidos de los cereales en la zona centro norte de Chile durante las temporadas 1990/91 y 1991/92. *Agricultura Técnica* 53: 319 - 326.
- Zeyen, R.J., Bushnell, W.R., Carver, T.L.W., Robbins, M.P., Clark, T.A., Boyles, D.A. y Vance, C.P. 1995. Inhibiting phenylalanine ammonia lyase and cinnamyl - alcohol dehydrogenase suppresses *MI a 1* (HR) but not *mlo5* (non - HR) barley powdery mildew resistances. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47: 119 - 140.
- Zimmermann, A. y Hahlbrock, K. 1975. Light-induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 166: 54 - 62.
- Zucker, M. 1965. Induction of Phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiology* 40: 779 - 784.
- Zúñiga, G.E. 1997. Respuestas antioxidantes de plantas de cebada infestada con áfidos. En: XL Reunión Anual, Sociedad de Biología de Chile. *Noticiero de Biología* 5: 142.