

UCH-FC  
MA5-B  
I38

CAPACIDAD DE RECUPERACION DE PLANTAS DE  
CEBADA INFESTADAS POR AFIDOS:  
SU RELACION CON LAS PEROXIDASAS Y  
COMPUESTOS FENOLICOS DE PARED CELULAR

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

Ricardo Gabriel Indarte Galli

Agosto, 1995

04-0206016

Director de Tesis: Dr. Luis Corcuera  
Co-Director: Dra. Liliana Cardemil

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

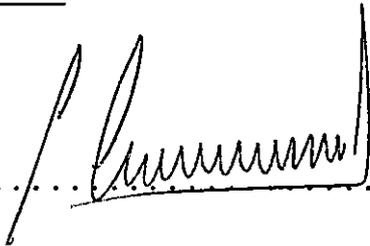
INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGISTER

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

RICARDO GABRIEL INDARTE GALLI

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Biología, en Examen de Defensa de Tesis rendido el día \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 1995.

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

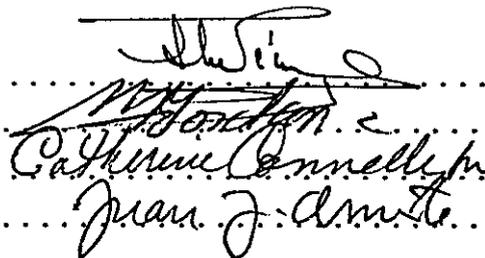
  
.....

Co-Director de Tesis:  
Dra. Liliana A. Cardemil O.

  
.....

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Luz María Pérez  
Dr. Miguel Jordan  
Dra. Catherin Connelly  
Dr. Juan Armesto

  
.....  
.....  
.....  
.....

"No te olvides del pago  
si te vas para la ciudad,  
cuanto más lejos te vayas  
más te tenes que acordar..."

## AGRADECIMIENTOS

A la Red Latinoamericana de Botánica que financió mi beca (ref. 92-M6) y el proyecto de tesis (ref: 94-SP5).

A mis tutores, el Dr. Luis Corcuera y la Dra. Liliana Cardemil, quienes creyeron en mí.

A mis amigos, León Bravo, Jose Cassareto y Angelica Vega, quienes me apoyaron no sólo en el trabajo, sino que me hicieron sentir como en casa.

A mis también amigos Danny Acevedo, Maria Antonieta Reyes, Susana Maldonado, Teresa Jerez y Juan Velozo, con quienes compartí más que un ambiente de trabajo y estudio.

A Victor Hugo Argandoña, por sus siempre buenas observaciones.

## Indice de Materias

Título.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Indice.....	iv
Abreviaciones.....	vii
Resumen.....	1
Abstract.....	4
1. Introduucción.....	6
2. Materiales y Métodos.....	16
2.1.- Material vegetal.....	16
2.2.- Afidos.....	16
2.3.- Estado hídrico.....	17
2.3.1.- Contenido relativo de agua (RWC).....	17
2.3.2.- Potencial hídrico (PH).....	18
2.4.- Clorofila.....	18
2.5.- Extracción de paredes celulares.....	18
2.6.- Actividad enzimática.....	20
2.7.- Electroforesis.....	21
2.8.- Fenoles.....	22
2.9.- Histología.....	23
2.10.- Cálculos estadísticos.....	24
3. Resultados.....	26
3.1.- Estado hídrico.....	26
3.1.1.- Contenido relativo de agua.....	26
3.1.2.- PH.....	29
3.2.- Clorofila.....	31
3.3.- Actividad peroxidasa.....	34
3.3.1.- Variedad Aramir.....	38

3.3.2.-Variedad Libra.....	40
3.3.3.- Variedad Frontera.....	42
3.4.- Isoelectroenfoque.....	44
3.5.- Compuestos de pared celular.....	44
4. Discusión.....	52
5. Conclusiones.....	67
6. Bibliografía.....	69

Lista de Tablas

Tabla 1.- Efecto de los inhibidores de proteasas.....	37
---	----

Lista de Figuras

Figura 1.- Plantas controles, con áfidos y al eliminar los áfidos.....	27
Figura 2.- Contenido relativo de agua.....	28
Figura 3.- Potencial hídrico.....	30
Figura 4.- Contenido de clorofila.....	32
Figura 5.- Cortes frescos de hojas (luz blanca).....	35
Figura 6.- Cortes frescos de hojas (luz azul).....	36
Figura 7.- Actividad peroxidasa var. Aramir .....	39

Figura 8.- Actividad peroxidasa var. Libra.....	41
Figura 9.- Actividad peroxidasa var. Frontera.....	43
Figura 10.- Isoelectroenfoque.....	45
Figura 11.- Cortes frescos de hojas tratados con etanol Luz azul.....	46
Figura 12.- Contenido de Fenoles.....	48
Figura 13.- Cortes frescos de hojas tratados con etanol Var. Aramir. Fluoroglucinol y azul de toluidina....	50
Figura 14.- Cortes frescos de hojas tratados con etanol.	51

## Apéndices

A.- Contenido relativo de agua.....	87
B.- Potencial hídrico.....	88
C.- Contenido de clorofila.....	89
D.- Actividad peroxidasa. var. Aramir.....	90
E.- Actividad peroxidasa. var. Libra.....	91
F.- Actividad peroxidasa. var. Frontera.....	92
G.- Contenido de Fenoles.....	93
H.- Indices de correlación.....	94

## ABREVIACIONES

ABTS ácido 2,2'-Azino-di-(3-etil-benzotiazolino-6-sulfúrico)  
CHL clorofila, MPa megapascal, o-PDA orto fenilendiamida,  
PAL Fenilalanina amonio-liasa, PC peroxidasas unidas  
covalentemente, PMSF floruro de fenil metil-sulfonilo PH  
potencial hídrico, PI peroxidasas unidas iónicamente, pI  
punto isoeléctrico, RWC contenido relativo de agua.

## RESUMEN

La reparación de la pared celular puede ser un mecanismo importante en la defensa de las plantas contra los áfidos. Este proceso se ha asociado a las peroxidases de pared celular. En este trabajo se describe la recuperación de plantas infestadas con áfidos y su correlación con los cambios en la actividad peroxidasa y algunos componentes de la pared celular. Plantas de siete días de edad de tres variedades de cebada (*Hordeum vulgare* L.) fueron infestadas con 20 áfidos (*Schizaphis graminum* R.) por planta. Se determinó el contenido relativo de agua, potencial hídrico, contenido de clorofila, fenoles y actividad de las peroxidases presentes en la pared celular, durante la infestación y luego de retirar los áfidos. La actividad se midió en las peroxidases de la pared celular unidas iónica y covalentemente. El contenido de agua, clorofila y potencial hídrico fueron constantes en las plantas control, mientras que éstos descendieron durante la infestación. Una vez retirados los áfidos, los tres parámetros mostraron una recuperación a niveles similares a los del control en las variedades Libra y Frontera. La

otra variedad, Aramir, no mostró ninguna recuperación. La actividad de las peroxidases fue constante en los controles. Sin embargo, las covalentemente unidas de la variedad Aramir descendieron a medida que crecían las plantas y las covalentemente unidas de Frontera fueron indetectables. La actividad basal de las peroxidases en los tres cultivares mostró diferencias significativas. En la variedad Aramir se encontró una actividad menor y en Libra una actividad mayor. En el primer día de la infestación, la actividad de las enzimas descendió a valores entre 10 a 0% del control. En los días siguientes, la actividad aumentó en todas las variedades, hasta llegar a valores mayores al doble, con respecto al control de la misma edad. En el caso de las covalentes de Frontera, aumentó de 0 a 1500 U/gramos de pared celular. Al mismo tiempo los niveles de los fenoles de pared aumentaron entre 4 y 5 veces en Frontera, 3 a 4 veces en Libra y al doble en Aramir, con respecto a los controles. Estos valores fueron similares a los aumentos relativos de fluorescencia relacionadas a polifenoles, que fueron observados en cortes histológicos. Estos aumentos ocurrieron principalmente en la cutícula de la epidermis, mesófilo y tejido vascular. Las variedades de cebada Frontera y Libra presentaron los mayores incrementos, lo que significaría una mayor incorporación de polifenoles en estas dos variedades. Las peroxidases

tendrían una importante participación en la reparación de la pared celular, y por lo tanto en la recuperación de las plantas.

## ABSTRACT

Cell wall repair mechanisms may be important in the protection reaction of plants against aphids. Peroxidases may be involved in this process. This work describes the recovering of infested barley plants with aphids and their correlation with changes in peroxidase activities and cell wall components in barley. Seven days old plants of three cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.) were infested with 20 aphids (*Schizaphis graminum* R.) per plant. Relative water content, water potential, total chlorophyll, activity of cell wall peroxidases, and phenol content, were determined during infestation and after removal of the aphids from the leaves. Ionically and covalently cell wall bound peroxidases were studied. The water content, water potential, and total chlorophyll were constant in the non-infested controls, while in infested plants, the three parameters fell during infestation. When the aphids were removed in cultivars Frontera and Libra, these parameters had a recovery to values near to those of the controls. The other cultivar, Aramir, did not recover after removing the aphids. The activity of peroxidase was in general constant

in controls. Exception were the covalently bound in Aramir that fell with age, and the ones covalently bound in Frontera, that were undetectable. Peroxidases in control plants showed significant differences between cultivars. Aramir had the lowest activity and Libra the highest. The activity decreased to 10-0% of the controls during the first day of infestation, in all the cultivars. After the first day, peroxidase activity in the three cultivars, increased more than two-fold. Covalently bound peroxidases in Frontera, increased their activity from 0 to 1500 U/g. cell wall. Cell wall phenols increased 4-5 fold in the cultivar Frontera, 3-4 fold in Libra and 2 fold in Aramir. Epidermal, mesophyll parenchyma and vascular bundle cell walls showed an increase in autofluorescence related to polyphenols. Phenols increased more evident in Frontera and Libra than in Aramir, suggesting a higher incorporation of polyphenols in these cultivars. Cell wall peroxidases could participate in the repairment of the cell wall and, therefore, the recovery of the damaged plants after aphids removal.

## 1. INTRODUCCION

### Importancia de la cebada

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) es el cuarto cereal cultivado más importante en el mundo (Stanca y col., 1992). Aproximadamente el 12% de la superficie sembrada y de la producción de cereales en el mundo provienen de este cultivo (Corcuera, 1993).

Los cereales son atacados por una gran variedad de patógenos como virus, bacterias y hongos, y por plagas como insectos y ácaros, los cuales ocasionan pérdidas importantes en la producción. Estos hechos han llevado a la selección de variedades más resistentes a estos patógenos. Los factores que determinan el grado de susceptibilidad de una variedad a patógenos son muy variados y pueden no ser los mismos en cada relación patógeno-planta.

Los áfidos constituyen una de las plagas importantes en la cebada. *Schizaphis graminum* R. es uno de los principales que atacan a la cebada. Su distribución es cosmopolita.

La saliva de este áfido contiene enzimas, como poligalacturonasas y pectinesterasas (Reese y col, 1992).

Por esta razón, la infestación por áfidos produce daños a diversos niveles, entre los cuales los más importantes son los daños en la pared celular vegetal (Reese y col., 1992), pérdida de clorofila, contenido relativo de agua y potencial hídrico (Cabrera, 1994). Este último autor encontró una disminución del 70% del contenido de clorofila, 50 % del potencial hídrico y 10% del contenido de agua, como consecuencia de la infestación. Al mismo tiempo la planta sufre otros cambios fisiológicos, entre los más estudiados están los de la actividad peroxidasa (Belefant-Miller, 1994; Bruce y West, 1989; Espelie y col., 1986; Lagrimini y Rothstein, 1987; Mohan y Kolattukudy, 1994; Smith y col., 1994).

#### Tipos de peroxidasas

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son enzimas que se encuentran en todos los eucariotas (Asada, 1992; Burel y col., 1994) y algunos procariotas (Asada, 1992; Hochman, 1993). En las plantas, están distribuidas en casi todos los organelos y membranas (McDougall, 1991). Las funciones atribuidas son muy variables, dada la amplia distribución en la célula. Estas son, entre otras, la síntesis de etileno (Asada, 1992), degradación de auxina (Ferrer y col., 1992), protección del cloroplasto (Asada, 1992; Asada y col., 1993; Prasad, 1994), síntesis de lignina (Ferrer y col,

1992; Gaspar y col., 1985; McDougall, 1991) y su degradación (Harvey y col., 1993; Walton, 1994). Las peroxidasas de plantas también han sido consideradas marcadores genéticos en estudios de evolución (Esnault y van Huystee, 1994) y relaciones filogenéticas (Krzakowa, 1993).

Una clasificación que se ha realizado con las peroxidasas es con respecto a su estructura (Welinder y Gajhede, 1993). De esta forma se las divide en tres clases: clase I- peroxidasas bacterianas, citocromo C oxidasas, ascorbato peroxidasas cloroplásticas y citosólicas; clase II- peroxidasas fúngicas extracelulares y clase III- peroxidasas de plantas generalmente excretadas vía retículo endoplásmico. Estas últimas contienen  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  o  $\text{Mg}^{+2}$ , puentes disulfuro y generalmente están glicosiladas. La secreción y activación de esta clase de peroxidasas ha sido correlacionada con la presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  y calmodulina (Xu y van Huystee, 1993). Marañón y van Huystee (1994) encuentran que la presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  es fundamental para la actividad de las peroxidasas.

Otra vía que pueden seguir estas enzimas es hacia la vacuola. En ese caso, presentan un péptido señal que la dirige hacia ese organelo (Welinder y Gajhede, 1993; Rasmussen y col., 1993).

Las plantas presentan las clases I y III (Acosta y

col., 1993) y generalmente se las clasifica en dos formas, citoplásmicas (solubles) y de pared celular (insolubles). Estas últimas están unidas a la pared por enlaces iónicos y covalentes. Existe controversia sobre la existencia de las peroxidasas unidas covalentemente. Ros Barceló y col. (1987) consideran que sólo hay diferencia en la fuerzas iónicas por las que están unidas. Penel y Greppin (1994) encuentran una correlación interesante entre la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y la unión de peroxidasas a la pectina.

Por otro lado, McDougall (1991) y Penel y Greppin (1994) determinaron que algunas peroxidasas sólo son extraíbles de la pared por digestión enzimática de la pared, por lo que han afirmado la existencia de enlaces covalentes para unir las a la pared celular.

Otra forma de clasificar a las peroxidasas es en función de su punto isoeléctrico (pI) (Gijzen y col., 1993; Polle y col., 1994). De esta forma se han clasificado en catiónicas (básicas), aniónicas (ácidas) y neutras (Polle y col., 1994).

#### Importancia de las peroxidasas

Las peroxidasas de pared celular se relacionan con síntesis de compuestos de pared como lignina (McDougall, 1991), suberina (Espelie y col., 1986), síntesis y polimerización de polifenoles (Lagrimini, 1991) e

insolubilización de proteínas en la pared (Everdeen y col., 1988; Iiyama y col., 1994; Keller, 1993). Estas funciones dependen de la producción de peróxido de hidrógeno a partir, generalmente, de NADH. Esta reacción también está catalizada por peroxidasas (Gross y col., 1977; Mäder y col., 1980). Por lo tanto, es debido a estas funciones que las peroxidasas de pared celular se han relacionado con los procesos de síntesis de la misma (Lagrimini y Rothstein, 1987).

Estas suposiciones han llevado a pensar que el control del crecimiento celular podría deberse a cambios en la extensibilidad de la pared celular mediado por las peroxidasas (Jackson y Ricardo, 1994; McQueen-Mason, 1995; Taiz, 1984).

Se ha encontrado diferencias en la actividad peroxidasa según el estado de desarrollo de los haces vasculares (Sato y col., 1993; McDougall, 1991). También en diferenciación de tejidos (Suzuki y col., 1992), actividad de yemas en diferentes estaciones (Baier, 1993), morfogénesis de raíces en *Eucalyptus globulus* (Calderón-Baltierra, 1994), activación por luz en hipocótilos (Burel y col., 1994; Schopfer, 1994) con posible participación del fitocromo (Burel y col., 1994).

MacAdam y col. (1992 a,b) encontraron una correlación entre el crecimiento de tallos y la actividad peroxidasa en

*Festuca arundinacea*. Sánchez y col. (1993) correlacionaron el detenimiento del crecimiento de hipocótilos de pino con la actividad de las peroxidasas de pared celular. Por otro lado, Swoap y col. (1993) no encontraron ninguna relación entre estas enzimas y el estado de desarrollo de plantas de *Cucumis* sp.

Riquelme y Cardemil (1993) han descrito dos peroxidasas que cambian su actividad durante la imbibición y germinación de semillas de *Araucaria araucana*, una conífera sudamericana. Una de las isoformas disminuye su actividad, con un mínimo a las 72 horas y la otra aumenta, con un máximo a las 48 horas de imbibición.

Por lo tanto, no es posible extrapolar resultados entre diferentes especies vegetales durante el desarrollo (Polle y col., 1994).

Sin embargo, existe concordancia en relación a la actividad de peroxidasas inducidas por patógenos. Se ha determinado que las peroxidasas son inducidas por hongos (Hammerschmidt y col, 1982; Kerby y Somerville, 1992; Kogel y col., 1994) y virus (Lagrimini y Rothstein, 1987). También por insectos (Bellefant-Miller y col., 1994; Cabrera, 1994), y daño mecánico (Lagrimini y Rothstein, 1987; Riquelme y Cardemil, 1993).

En muchos casos de ataque por patógenos, se ha observado un aumento de la actividad peroxidasa con una

ligera disminución en las primeras horas, para alcanzar un máximo entre las 48 y 72 horas después de la infección o daño. Estos cambios van acompañados de patrones isoelectroforéticos diferentes. Ferrer y col. (1992), Hislop y Stahann (1971) y Kerby y Somerville (1989) encontraron cambios en las peroxidasas básicas, determinando aparición de nuevas bandas con pI superiores a 9. El tiempo de aparición de estas isoformas varía con el material vegetal utilizado. La presencia de inductores, como los productos de la degradación de paredes celulares vegetales o fúngicas, parecería ser necesaria para la inducción de estas enzimas (Lesney, 1990; Mitchell y col., 1994; Russo y Bushnell, 1989).

Hay algunas evidencias que indicarían que las peroxidasas aniónicas participan en el último paso de la síntesis de lignina (Baier y col., 1993; Imberty, 1985) y que las catiónicas son importantes en la formación de polifenoles y precursores de lignina que luego son polimerizados por las primeras (Gaspar y col., 1985; Polle y col., 1994). Incluso las peroxidasas aniónicas tienen una mayor afinidad por sustratos como la siringaldazina, que es un sustrato similar a los precursores de lignina (Goldberg y col., 1993).

La participación de las peroxidasas en la síntesis de compuestos de pared celular ha sido intensamente estudiada.

Dada la gran diversidad de isoformas de la enzima, no siempre es claro como participa cada una de ellas en la regulación del proceso. Goldberg y col. (1985) y Ros Barceló y col. (1987) han planteado un modelo de interacción entre las peroxidasas básicas y ácidas para la síntesis de polifenoles y lignina. Ros Barceló y col. (1987) han informado la importancia de las peroxidasas iónicamente unidas a la pared. Existen pocas referencias con respecto a las unidas covalentemente. Sin embargo, McDougall (1993) encuentra una acumulación de peroxidasas covalentemente unidas a la pared junto con un aumento de lignina en el tejido vascular de maíz, a consecuencia de daño mecánico.

#### Pared celular y su composición

Los procesos de lignificación son importantes en la dicotiledoneas. En monocotiledoneas, y en particular en las gramíneas, los polifenoles y la suberina son más abundantes (Esau, 1972). La presencia de éstos es considerada entre los primeros síntomas detectables ante la infestación por áfidos (Belefant-Miller y col., 1994), la infección por hongos (Kogel y col., 1994) y por el daño mecánico (Russo y Bushnell, 1989) en la cebada.

Se ha planteado que los polifenoles participan en la formación de una malla sobre la cual se repara la pared

celular (Kogel y col., 1994), o bien directamente, reparando las perforaciones (Shackel y col., 1991). De ambas formas se lograría impedir la pérdida de agua, entrada de metabolitos tóxicos e incluso detener el avance del patógeno (Iiyama y col., 1994). Shackel y col (1991) encontraron una correlación entre la velocidad con que son selladas las zonas de daño y el mantenimiento de la turgencia en *Tradescantia virginiana* L..

MacAdam y col (1992 a,b) plantean que el área foliar es más importante que la tasa fotosintética en la producción agrícola. Por lo tanto la recuperación de las zonas dañadas puede ser un proceso importante.

De ser correctas estas presunciones, sería entonces factible que aquellas plantas o variedades que presenten aumento de la actividad peroxidasa ante un patógeno, tengan la capacidad de reparar más eficientemente la pared y así recuperarse del daño, una vez eliminado el estrés.

### Hipótesis y objetivos

La hipótesis de esta tesis es: si las peroxidasas de pared celular están relacionadas con la reparación celular, entonces aquellas variedades que presenten mayor actividad de estas enzimas, tendrán una mayor capacidad de recuperación al eliminar los áfidos.

Para someter a prueba esta hipótesis, se planteó como objetivo general determinar la actividad de las peroxidasas en plantas sometidas a infestación y controles, y estudiar la correlación entre el daño causado por los áfidos y la actividad de las enzimas. Este objetivo se realizó en varias fases:

A.- Se evaluó la capacidad de recuperación de las plantas del daño causado por los áfidos.

B.- Se realizó una evaluación de los cambios de actividad de las enzimas peroxidasas de pared celular en diferentes variedades de cebada.

C.- Se determinaron las principales isoenzimas con actividad peroxidasa de la pared celular en plantas bajo condiciones de infestación por áfidos, y plantas no infestadas.

D.- Se estudió la correlación entre la actividad de peroxidasas, los parámetros fisiológicos y la síntesis de compuestos, principalmente de pared celular, que pudieran derivar de la actividad de estas enzimas.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Material vegetal

Se trabajó con tres variedades de cebada, Aramir, Libra y Frontera. Trabajos previos en este laboratorio, no publicados, indicarían que estas tres variedades presentan diferencias en sus respuestas fisiológicas ante diferentes estrés.

Se sembraron en vermiculita y se crecieron durante siete días a 25°C con un fotoperíodo de 14 horas de luz. Se regaron semanalmente con solución nutritiva Hoagland y diariamente con agua.

Las semillas de cebada fueron suministradas por el Dr. Edmundo Beratto, INIA, Carillanca.

### 2.2 Afidos

Se trabajó con una colonia de *Schizaphis graminum* R., la cual fue mantenida en plantas de cebada de la variedad Aramir. *S. graminum* presenta la mayor tasa de reproducción sobre ésta variedad. La colonia es mantenida a 25°C y 14 horas luz.

La infestación de las plantas se realizó, en las tres

variedades, al séptimo día de ser sembradas y con 20 áfidos por planta. Cabrera (1994) encontró que este nivel de infestación induce cambios significativos en la actividad enzimática. En algunos tratamientos los áfidos fueron retirados a las 48 horas.

## 2.3 Estado hídrico

### 2.3.1 Contenido relativo de agua (RWC)

Se calculó el RWC de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{RWC} = \frac{\text{PF} - \text{PS}}{\text{PTH} - \text{PS}}$$

PF- peso fresco

PS- peso seco

PTH- peso totalmente hidratado

Se cortaron secciones de hoja y se pesaron (PF). Luego fueron colocadas en agua desionizada durante un período de entre treinta a sesenta minutos, hasta que se obtuvo un peso constante (PTH). Luego, los trozos de hoja se secaron en estufa a 45°C hasta que el peso fue constante (PS).

El RWC fue determinado a las 0, 24, 36, 48, 72, 96 y 120 horas de infestación y a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas de haberse retirado los áfidos. Los controles se hicieron a los mismos tiempos.

### 2.3.2 Potencial hídrico (PH)

El potencial hídrico se determinó por la tensión xilemática en una bomba de Schölander, en secciones de hojas.

Las determinaciones fueron realizadas a los mismos tiempos que para el RWC.

### 2.4 Clorofila (CHL)

El contenido de clorofila fue determinado de acuerdo a la técnica de Lichtenthaler y Wellburn (1989). Según esta técnica se extrajo la clorofila macerando 0,5 gr de tejido fresco en 10 ml de etanol 95%, se filtró por papel Whatman N°1 y se determinó el volumen final.

Se midió la absorbancia a 649 y 665 nm. El cálculo final se hizo por la siguiente fórmula:

$$\text{CHL} = 18,08 (\text{Abs } 649) + 6,63 (\text{Abs } 665)$$

El resultado se dividió por el volumen final del filtrado y por el peso fresco y se expresa en CHL por gramo de peso fresco.

Estas determinaciones se realizaron a las 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96 y 120 horas de infestación y a las 12, 24, 36, 48, 72 y 96 horas después de retirar los áfidos. Los controles se hicieron a los mismos tiempos

## 2.5 Extracción de las paredes celulares y peroxidasas

Las paredes celulares se extrajeron según la técnica de Ros Barceló y col. (1987). El tejido fue congelado en hielo seco y molido en un molinillo de café con trozos de hielo seco. El polvo congelado se suspendió en un amortiguador Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2, 0,25 M de sacarosa, 1 mM de acetato de magnesio y cuarzo. Se utilizaron 3 ml de amortiguador y 0,05 g de cuarzo por g de peso fresco. Siempre se utilizó el mismo peso fresco para las determinaciones de actividad. Todos los procedimientos fueron realizados a 4°C. Se probaron dos inhibidores de proteasas, el fluoruro de fenil metil-sulfonilo (PMSF) en una concentración de 0,2mM y la benzamidina en una concentración de 2mM. También se hizo un control sin inhibidores.

Se filtró el macerado por cuatro capas de gasa y se centrifugó a 1000g por cinco minutos. El sobrenadante se desechó y la pella fue lavada dos veces con amortiguador Tris-HCl 0,05 M y 1% de Tritón X-100, pH 7,2. Luego fue lavado tres veces con amortiguador fosfato de sodio 0,1 M pH 6, a fin de eliminar el detergente. La última pella fue incubada una hora con KCl 1M en agitación. Luego se centrifugó a 15000 g por treinta minutos. De acuerdo con la técnica, en el sobrenadante se encuentran las peroxidasas unidas iónicamente a la pared y en la pella están las

paredes celulares con las peroxidasas unidas covalentemente.

Se hicieron extracciones a las 0, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72 y 96 horas de haber infestado las plantas y 12, 24, 48 y 72 horas después de haberse retirado los áfidos, así como los controles en los mismos tiempos.

## 2.6 Actividad enzimática de peroxidasas.

La actividad en los extractos con peroxidasas extraídas por fuerza iónica se realizó por la técnica de Cassab y col. (1988) y la de las pellas, con las peroxidasas unidas covalentemente, por la técnica de Sato y col. (1993). En ambas se utilizó la o-fenilendiamina (o-PDA) como cromógeno. La mezcla de reacción fue la siguiente:

0,250ml de extracto (0,500ml para las covalentes)

1ml o-PDA 2mM

1ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01%

El volumen final fue llevado a 3 ml con amortiguador fosfato de sodio 0,1 M pH 6. Todos los reactivos fueron preparados en amortiguador fosfato de sodio 0,1 M pH 6. Se incubó 10 minutos a 37°C y se midió la absorbancia a 450nm.

Se realizó una curva de calibración con peroxidasa comercial de rábano (Sigma, peroxidasa tipo I) siguiendo la misma metodología, obteniéndose la siguiente regresión:

$$y = 0,086(\text{Act}) + 0,3701$$

La actividad se expresó en unidades por gramos de pared celular, siendo definida la unidad como  $\mu\text{moles}$  de sustrato oxidado por minuto.

Se ensayó la actividad con el ácido 2,2'-Azino-di-(3-etil-benzotiazolino-6-sulfúrico (ABTS) como cromógeno, de acuerdo con la técnica de Childs y Bradsley (1975).

Se hicieron determinaciones a las 0, 12, 18, 24, 36, 48 y 72 horas de infestación y a las 24 y 48 horas de retirar los áfidos. Se realizaron los controles a los mismos tiempos.

Se midió la actividad con ácido ferúlico en los tiempos más importantes.

## 2.7 Electroforesis

Para realizar los geles se maceraron 50 gramos de tejido según la misma metodología (Ros Barceló, 1987). Los extractos fueron desalinizados y concentrados por centrifugación en microconcentradores con corte a los 10 KD (centricon-10, Amicon).

Los isoelectroenfoces se realizaron con rango de pH de 3 a 10 (anfolitos Bio-Rad) en el equipo Mini IEF Cell, model 111, Bio-Rad, según la metodología recomendada por los fabricantes. El rango de pH obtenido fue determinado por medio de un electrodo de pH de superficie.

El revelado de los geles fue realizado por la actividad peroxidasa, con o-PDA y peróxido de hidrógeno. La foto del gel fue tomada con luz blanca y ultravioleta, dada la fluorescencia del producto formado.

## 2.8 Fenoles

Se determinaron los fenoles de pared según las técnicas de Fry (1979) y Zieslin y Ben-Zaken (1993). En ambas técnica se somete el tejido fresco al mismo tratamiento. El tejido fresco se sometió a ebullición consecutivamente en los siguientes solventes, temperaturas y tiempos, H<sub>2</sub>O a 100°C por 30', etanol 60% a 85°C por 30', acetona a 56°C por 30', metanol a 85°C por 30', eter dietílico a 34°C por 30'. Se secó el tejido y se peso. Se incubó toda la noche con NaOH 1 M (0,1 ml de NaOH por gramo de peso seco) en vacío a fin de esterificar los fenoles. Se llevó a pH 2,5 y se mezcló en partes iguales con acetato de etilo.

Para la primera técnica se midió la absorbancia en la fase del acetato de etilo, a 320 nm. Para la segunda técnica, la mezcla de reacción se hizo con 1 ml de la extracción en acetato de etilo, 5 ml de H<sub>2</sub>O y 0,250 ml de reactivo de Folin-Ciocalteau. Se incubó por tres minutos y luego se agregó 1 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturado. Se incubó por una hora y se midió la absorbancia a 725 nm.

Para ambos casos se realizó una curva de calibración con fenol (cristales), de acuerdo a Zieslin y Ben-Zaken (1993). Para el método de la absorbancia, la regresión fue  $y = 36,65([\text{Fenol}]) - 0,321$ , determinando fenoles en una concentración entre 0,2 y 2,0  $\mu\text{g}$  de fenol/ml de extracto. Para el método del reactivo de Folin-Ciocalteu, la regresión fue  $y = 13,27([\text{Fenol}]) + 0,012$ , determinando fenoles en una concentración entre 3,0 y 12  $\mu\text{g}$  Fenol/ml de extracto.

Las determinaciones de fenoles se realizaron a las 0, 24 y 48 horas de infestación.

## 2.9 Histología

Se utilizaron varias técnicas. Se incluyeron hojas en paraplast por deshidratación en una serie de alcohol butílico según Jensen (1962). Se hicieron cortes en micrótopo y se tiñeron con Safranina-fast green, fluoroglucinol y azul de toluidina (O'Brien y McCully, 1981). La safranina-fast green tiñe la lignina y la pectina respectivamente, el fluoroglucinol tiñe la lignina y el azul de toluidina es un colorante metacromático que tiñe de rosado la pectina y celulosa, de verde los polifenoles, de azul la lignina y de púrpura la callosa.

También se hicieron cortes frescos con micrótopo de mano y se tiñeron con fluoroglucinol y azul de toluidina.

Los cortes frescos se observaron en microscopio de epifluorescencia azul según la técnica de Belefant-Miller y col. (1994). Los polifenoles, suberina y lignina fluorescen en amarillos o verdes (Belefant-Miller y col., 1994) y la clorofila en rojo (Jensen, 1962).

Estos cortes frescos fueron sometidos a ebullición en etanol 70% hasta que se eliminaron todos los pigmentos (Belefant-Miller y col., 1994). Luego fueron teñidos con fluoroglucinol, azul de toluidina y también fueron observados en el microscopio de epifluorescencia azul. Aquí sólo se observa la fluorescencia de los polifenoles, lignina y suberina.

Las fotografías de fluorescencia fueron tomadas en un microscopio Zeiss Axioscope, de epifluorescencia azul con el sistema de fotografía MC80. Las fotografías de luz blanca fueron tomadas en el microscopio Nikon Optiphot con el sistema de fotografía FX-II.

#### 2.10. Cálculos estadísticos.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Se realizó un test de t para determinar diferencias significativas entre los tratamientos. También se calculó la correlación (por análisis de covarianza) entre todos los parámetros determinados. En la tabla 9 están las

correlaciones que dieron  $r > 0,9$ . Ambos cálculos se hicieron en el programa STAT-ITCF (Service des études statistiques, Institut Technique des Céréales et des Fourrages (ITCF, France)).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Estado hídrico.

Al evaluar visualmente la evolución del estado hídrico durante la infestación y al eliminar los áfidos, se evidenció una pérdida de la turgencia de las plantas con los días de infestación. Esta pérdida, aparentemente fue mayor en la variedad Aramir y menor en Frontera (Fig. 1). Al eliminar los áfidos, las plantas mostraron un mejor estado hídrico que las plantas de la misma edad con áfidos, siendo más notables las diferencias en la variedad Aramir.

El estado hídrico de las plantas fue evaluado por dos métodos, el contenido relativo de agua (RWC) (Apéndice A) y el potencial hídrico (PH) (Apéndice B).

##### 3.1.1 Contenido relativo de agua (RWC).

En las plantas control de las tres variedades, el RWC se mantiene constante (Fig. 2 a, b, c, círculos vacíos).

Cuando se infestan, las tres variedades no muestran cambios hasta el primer día (Fig. 2 a, b, c, círculos llenos). A partir de ese momento, Frontera presenta un menor descenso. La variedad Libra desciende su RWC

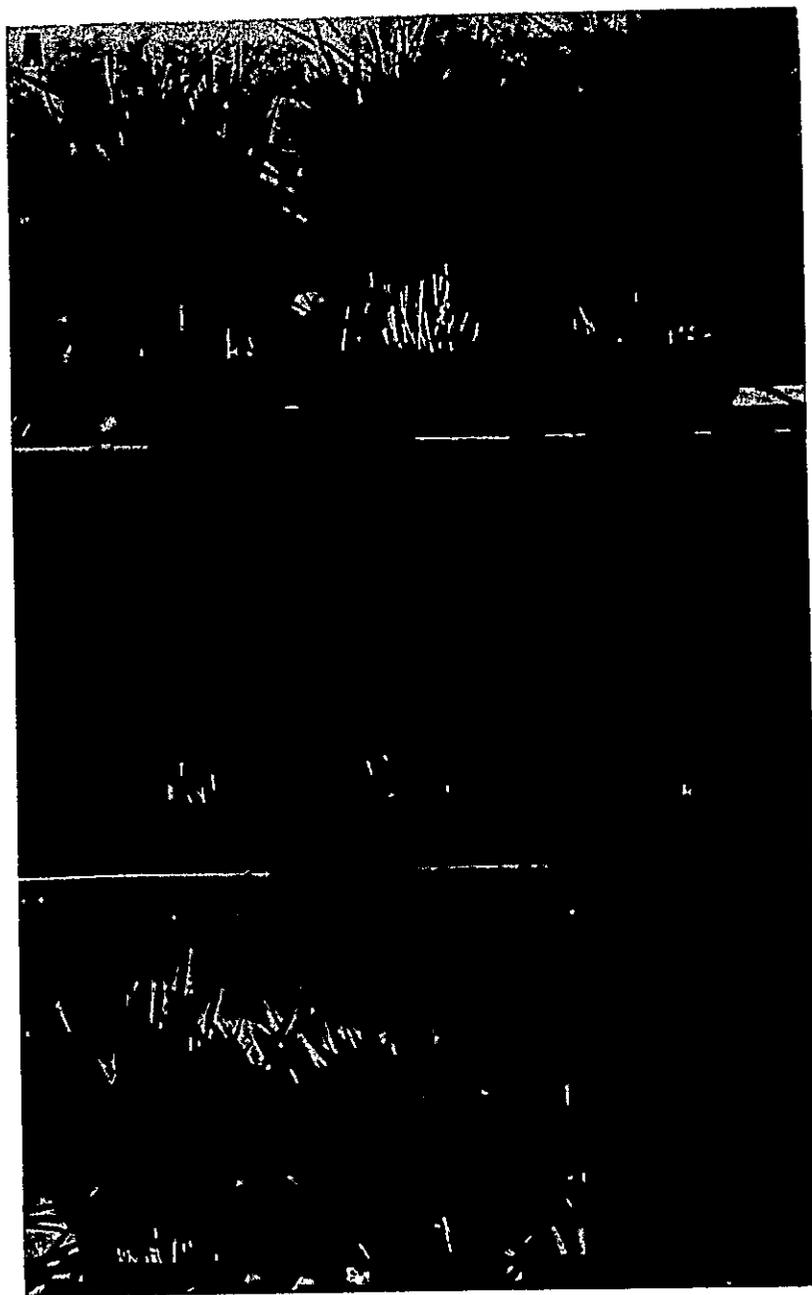


Figura 1.- Plantas de cebada de 10 días de edad. Orden de izquierda a derecha, Frontera, Libra, Aramir. A. Controles B. Infestadas 72 horas. C. 24 horas después de eliminar los áfidos.

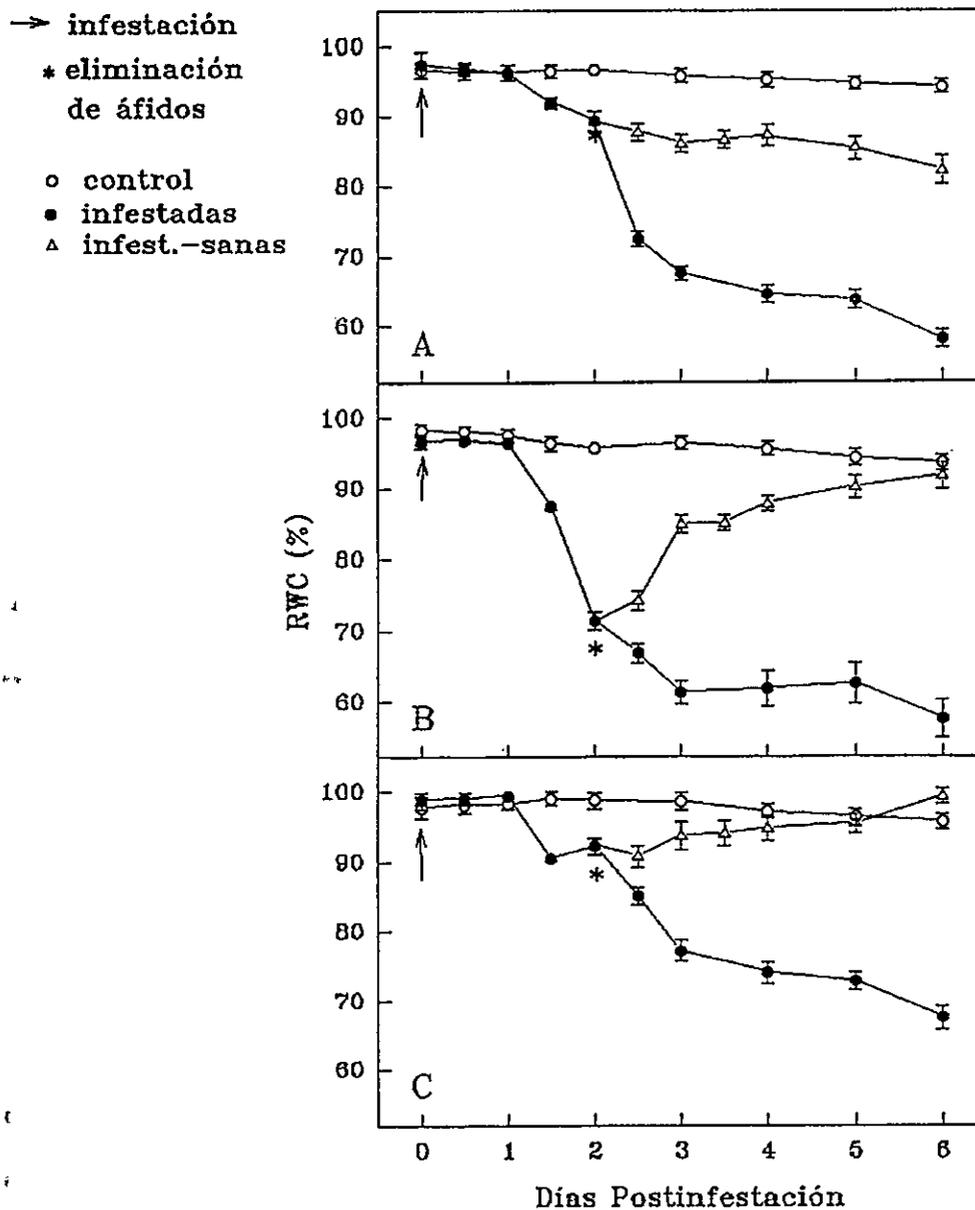


Figura 2.- Contenido relativo de agua (RWC) (%). A- Aramir, B- Libra, C- Frontera. En las infest.-sanas se eliminaron los áfidos al segundo día de infestación. Las barras verticales indican el error estándar (n=3)

bruscamente, de 96% a 71%, entre el primer y segundo día. En Aramir ocurre un descenso similar entre el segundo y tercer día (89% a 67%). Estas dos variedades llegan a valores similares al final del experimento (58%), mientras que Frontera sólo desciende hasta el 69% en el mismo período.

Después de la eliminación de los áfidos, las tres variedades se recuperaron de diferente forma (Fig. 2 a, b, c, triángulos vacíos). En Aramir, el RWC llega a una fase estacionaria después de la eliminación de los áfidos, manteniendo el valor alcanzado en ese momento, con tendencia a descender (Fig. 2 a). Las variedades Libra y Frontera recuperan su RWC. Al segundo día de haber retirado los áfidos, Frontera tiene valores similares a los controles.

La recuperación en el caso de Libra es mayor, debido a una mayor pérdida de agua causada por la infestación, tal como se observa al momento de eliminar los áfidos (Fig. 2 c). Incluso, al final del experimento, alcanza a valores iguales a los del control.

### 3.1.2 Potencial hídrico

Al igual que para el RWC, en las plantas control se mantiene constante el PH (Fig. 3 a, b, c, círculos vacíos). Pero a diferencia, el PH comienza a descender a partir del

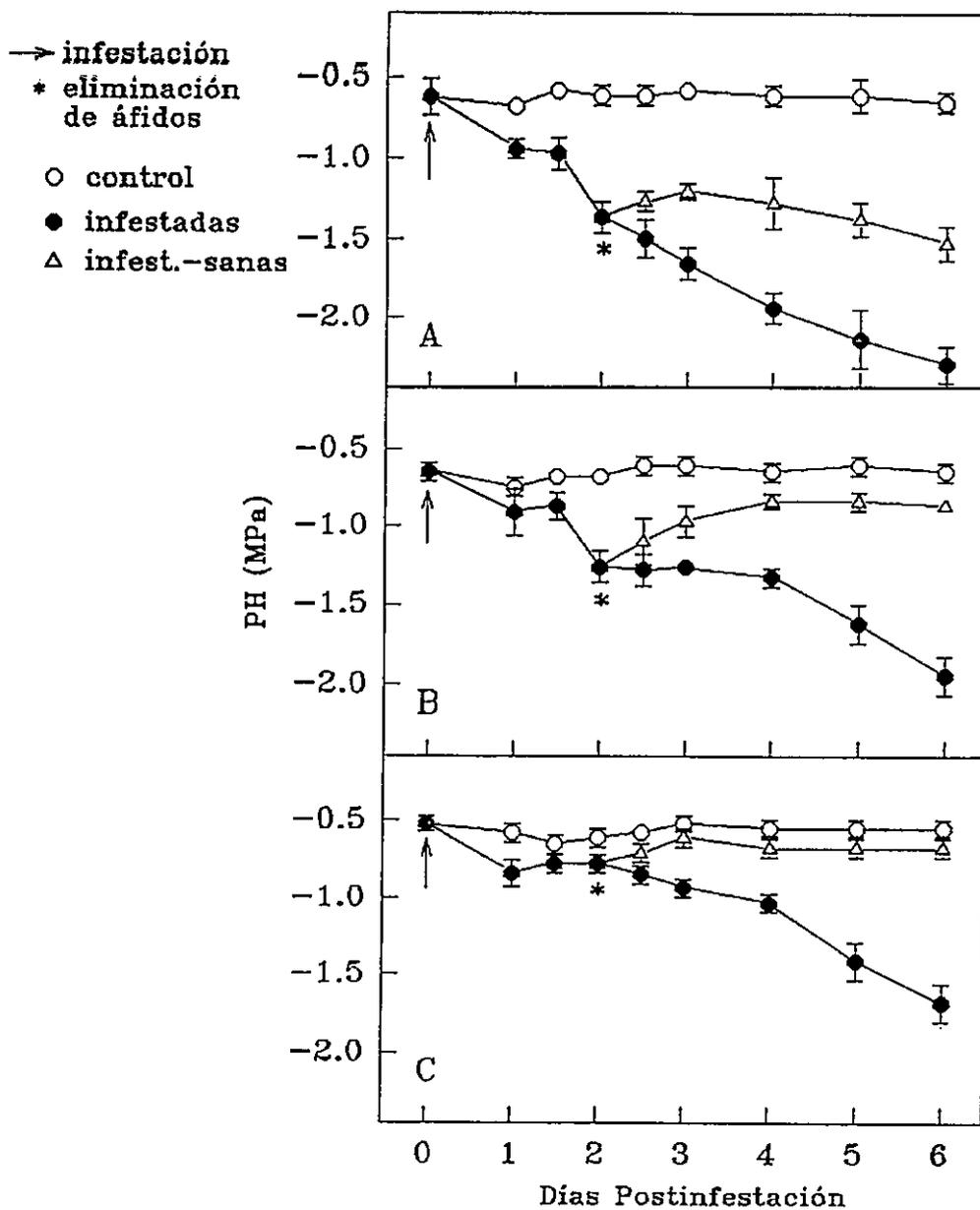


Figura 3.- Potencial hídrico (PH) (MPa). A- Aramir, B- Libra, C- Frontera. En las infest.-sanas se eliminaron los áfidos al segundo día de infestación. Las barras verticales indican el error estándar (n=3)

primer día de infestación en las tres variedades (Fig. 3 a, b, c, círculos llenos). En Aramir el descenso fue casi constante durante el experimento, mientras que en las otras dos, este descenso es menor en las primeras horas de infestación. Sin embargo, al 1,5 día de infestación, las tres variedades comenzaron a descender su PH, llegando al sexto día a los valores más bajos. En Aramir descendió hasta -2,3 MPa, -1,94 MPa en Libra y -1,68 MPa en Frontera (Apéndice G).

Al eliminar los áfidos el comportamiento es similar que para el RWC (Fig. 3 a, b, c triángulos vacíos). En Aramir hay un período de estabilidad y luego desciende (Fig. 3 a), Libra presenta una recuperación hasta valores inferiores a las plantas control (Fig. 3 c) y Frontera recupera su PH a valores iguales al control al segundo día de eliminar los áfidos (Fig. 3 b).

### 3.2 Clorofila (CHL).

Un síntoma visual evidente que ocurre en los primeros días de infestación con *S. graminum*, es la aparición de manchas cloróticas en las hojas. Por esta razón se evaluó el contenido de clorofila total (Fig. 4 a, b y c).

En las plantas control la CHL es constante, con descensos en el último día del experimento (Fig. 4 a, b, c, círculos vacíos). El contenido de clorofila fue mayor en

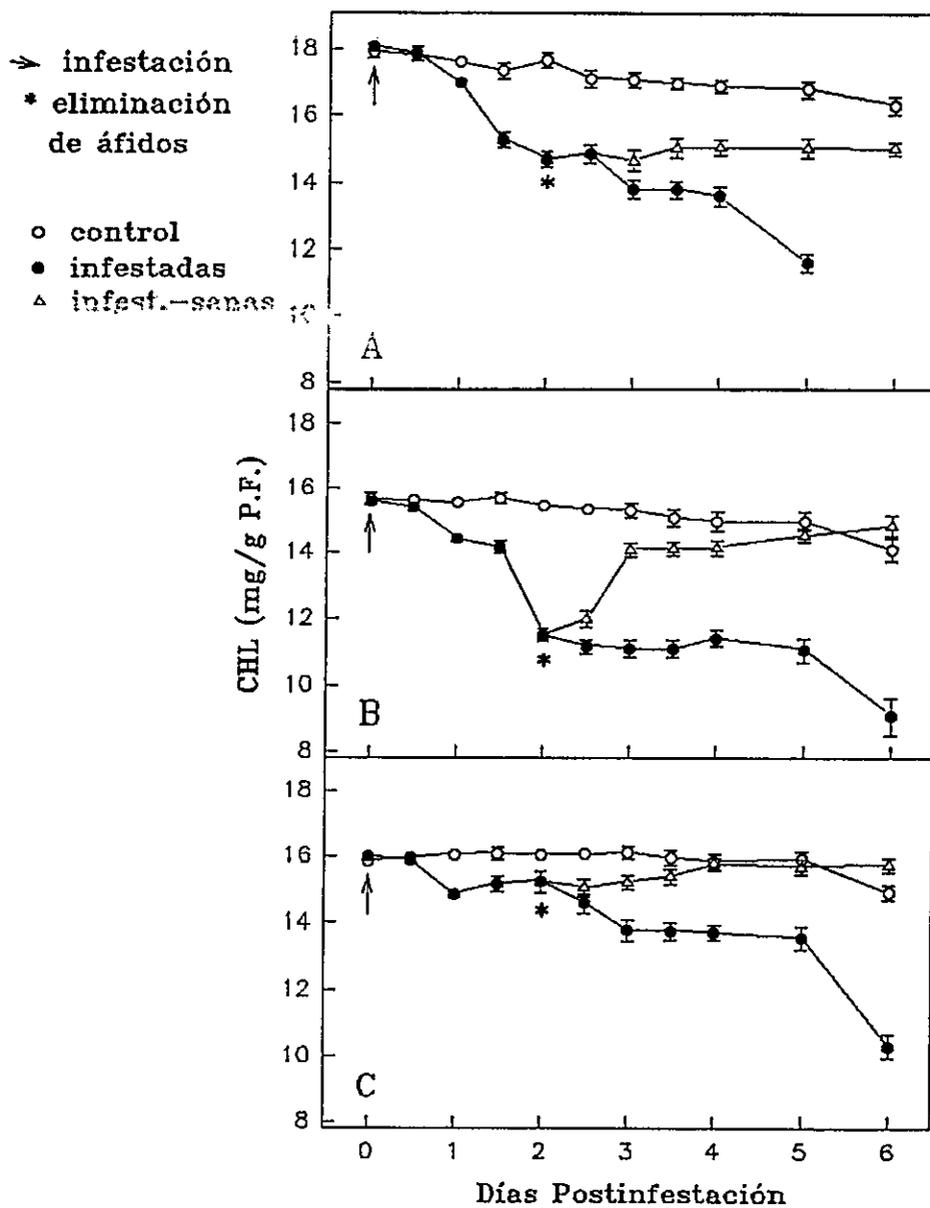


Figura 4.- Contenido de clorofila (CHL) (mg/g P.F.).  
 A- Aramir, B- Libra, C- Frontera. En las infest.-sanas se eliminaron los áfidos al segundo día de infestación. Las barras verticales indican el error estándar (n=3)

Aramir (17,94 mg/g P.F.) (Fig. 4 a) y menores en Libra y Frontera (15,68 y 15,86 mg/g P.F. respectivamente) (Fig. 4 b y c) (Apéndice C).

En las plantas infestadas de las tres variedades, el descenso del contenido de clorofila se detecta a partir del 0,5 día de infestación (Fig. 4 a, b, c círculos llenos). En la variedad Aramir el descenso es constante, siendo imposible determinar la CHL al final del experimento ya que las plantas estaban completamente deshidratadas y cloróticas (Fig. 4 a).

La variedad Libra presenta dos descensos importantes, uno entre los 1,5 y 2 días, y otro entre el quinto y sexto día de infestación (Fig. 4 c). Frontera muestra un pequeño descenso entre el día 2 y 2,5, y un gran descenso a partir del quinto día (Fig. 4 b). Las pérdidas de clorofila al final del experimento son mayores en Aramir (no determinable), intermedias en Libra (60%) y menores en Frontera (38%) (Apéndice C).

Al eliminar los áfidos, la recuperación de la clorofila es similar al del RWC y PH. La variedad Aramir mantiene constante el valor del segundo día de infestación. Si bien no ocurre el descenso que se observa para el RWC y PH (Fig. 4 a, triángulos vacíos), no se evidencia ninguna recuperación del contenido de clorofila. En Libra, se produce una gran recuperación en el primer día de eliminar

los áfidos, que luego continua, llegando a valores significativamente iguales a los del control (Fig. 4 c, triángulos vacíos). La variedad Frontera recupera completamente el contenido de clorofila, teniendo valores semejantes al control al segundo día de eliminar los áfidos (Fig. 4 b, triángulos vacíos).

Se hicieron cortes histológicos a fin de confirmar la perdidas de clorofila. Se observa que aparecen zonas completamente sin clorofila o con grandes disminuciones, al observar los cortes frescos con luz blanca (Fig. 5). La observación de estos cortes al microscopio de epifluorescencia azul, en donde la clorofila fluoresce en rojo, dio resultados similares (Fig. 6).

### 3.3 Actividad peroxidasa

A fin de evaluar la importancia de la reparación de las paredes celulares en la capacidad de recuperación, se determinó la actividad de las peroxidasas de pared celular en plantas controles, infestadas y al eliminar los áfidos, así como la presencia de compuestos de pared que puedan derivar de la actividad de este grupo de enzimas.

No hubo diferencias significativas en las extracciones realizadas con el PMSF o la benzamidina, en la actividad peroxidasa (Tabla 1). Diferencias hubieron con respecto a la extracción sin inhibidor cuando se

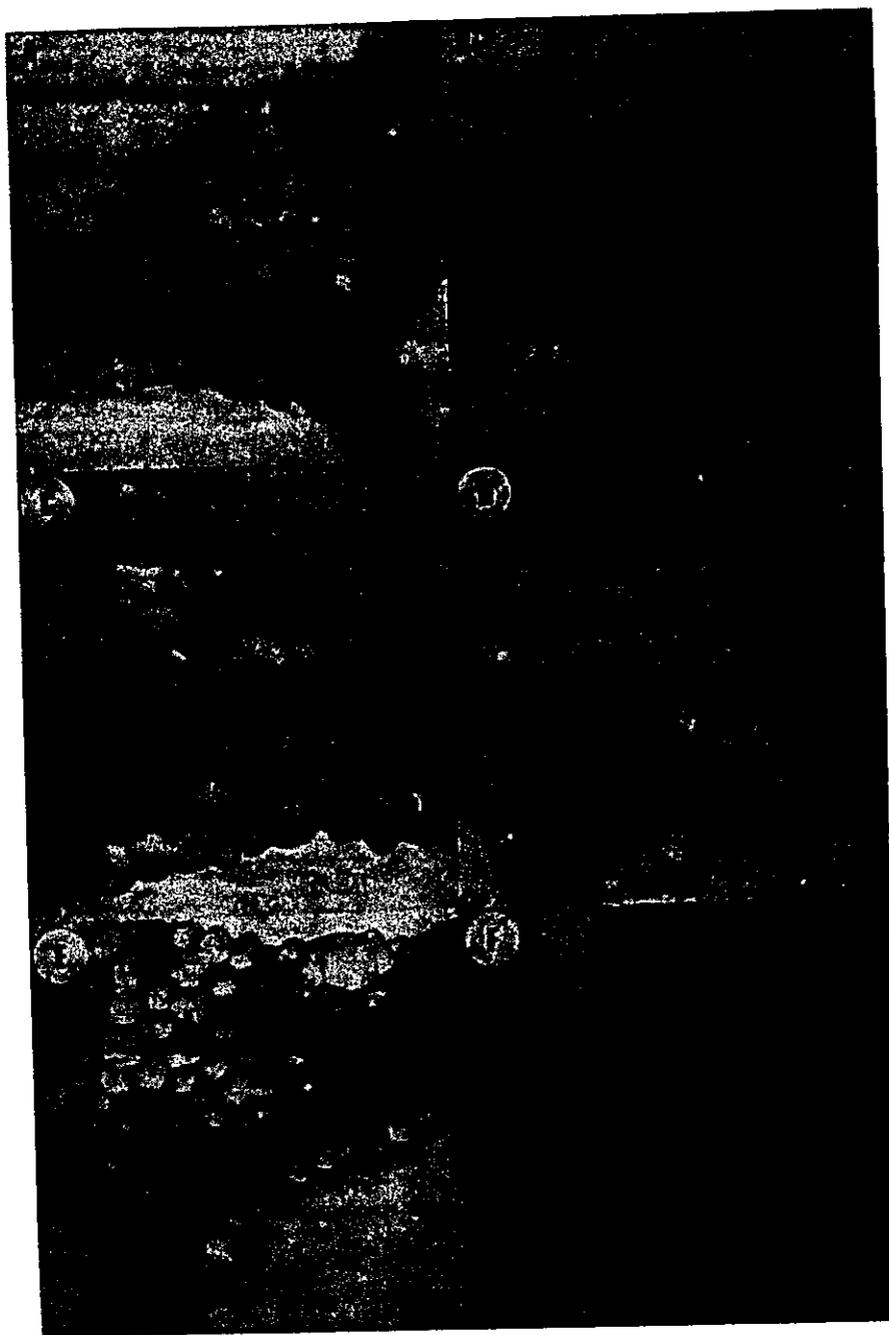


Figura 5.- Cortes frescos de hojas de las tres variedades en microscopio de luz blanca (400x). A. Aramir control, B. Aramir infestada, C. Libra control, D. Libra infestada, E. Frontera control, F. Frontera infestada. En negro se observa la presencia de clorofila.

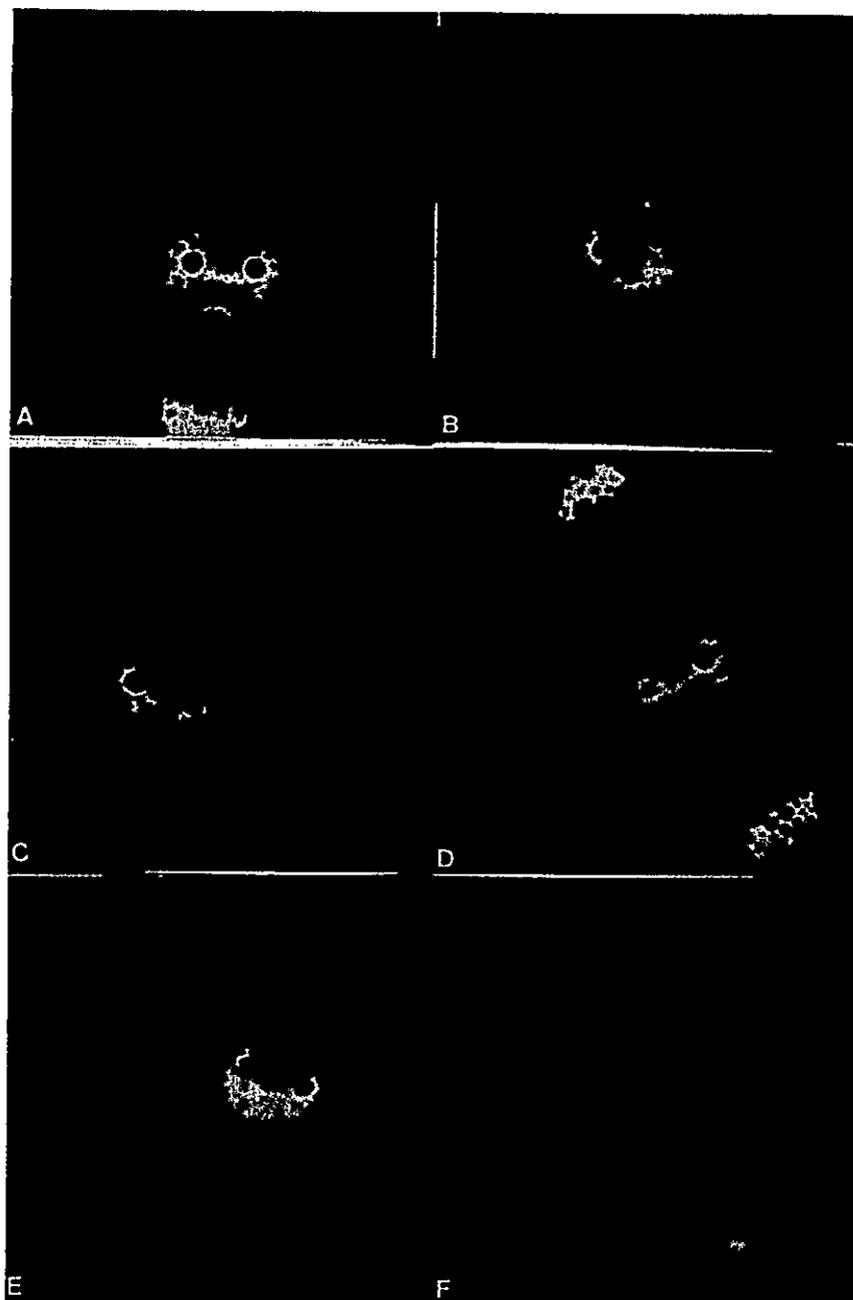


Figura 6.- Cortes frescos de hojas de las tres variedades, en microscopio de epifluorescencia azul (400x). A. Aramir control, B. Aramir infestada, C. Libra control, D. Libra infestada, E. Frontera control, F. Frontera infestada. La clorofila fluoresce en rojo y los polifenoles en amarillo.

**Tabla 1.-** Efecto de dos inhibidores de proteasas en la extracción de proteínas y en la actividad peroxidasa. Cada valor es la media de tres réplicas. Las letras iguales significan que no hay diferencias significativas ( $r < 0,05$ ) y letras diferentes que hay diferencias significativas ( $r < 0,05$ ).

INHIBIDOR	PROTEINAS (mg/g P.F.)	ACT. PEROXIDASA (U/g pared celular)
sin inhibidor	0.80 ± 0.05a	167.5 ± 35.7c
PMSF	0.84 ± 0.06a	230,5 ± 52,25c
Benzamidina	1.15 ± 0.08b	200,66 ± 45,44c

cuantificó la concentración de proteínas totales, donde la benzamidina tuvo mejores resultados. Dados éstos, las extracciones se continuaron realizando con benzamidina.

Se determinó la actividad de las peroxidasas unidas iónicamente (PI) y covalentemente (PC) a la pared.

La actividad con ABTS dio resultados negativos, por lo que se continuó utilizando solamente el o-PDA.

### 3.3.1 Variedad Aramir

En las plantas control, las peroxidasas iónicas tuvieron actividad constante durante el tiempo que duró el experimento, mientras que las covalentes mostraron un descenso desde 369 U/g pared celular, al día 0 hasta 80.2 U/g pared celular a los 12 días (Fig. 7 a y b, círculos vacíos) (Apéndice D).

A consecuencia de la infestación, la actividad enzimática desciende en ambos grupos de peroxidasas (Fig. 7 a y b, círculos llenos). En las iónicas el valor llega a su mínimo al primer día y en las covalentes, lo mismo ocurre entre las 12 y 18 horas después de la infestación. Es de destacar que las iónicamente unidas a la pared, llegan a ser indetectables al primer día de infestación (Fig. 7 a círculos llenos).

A partir del momento de mínima actividad, comienza a aumentar la actividad peroxidasa hasta llegar a un máximo

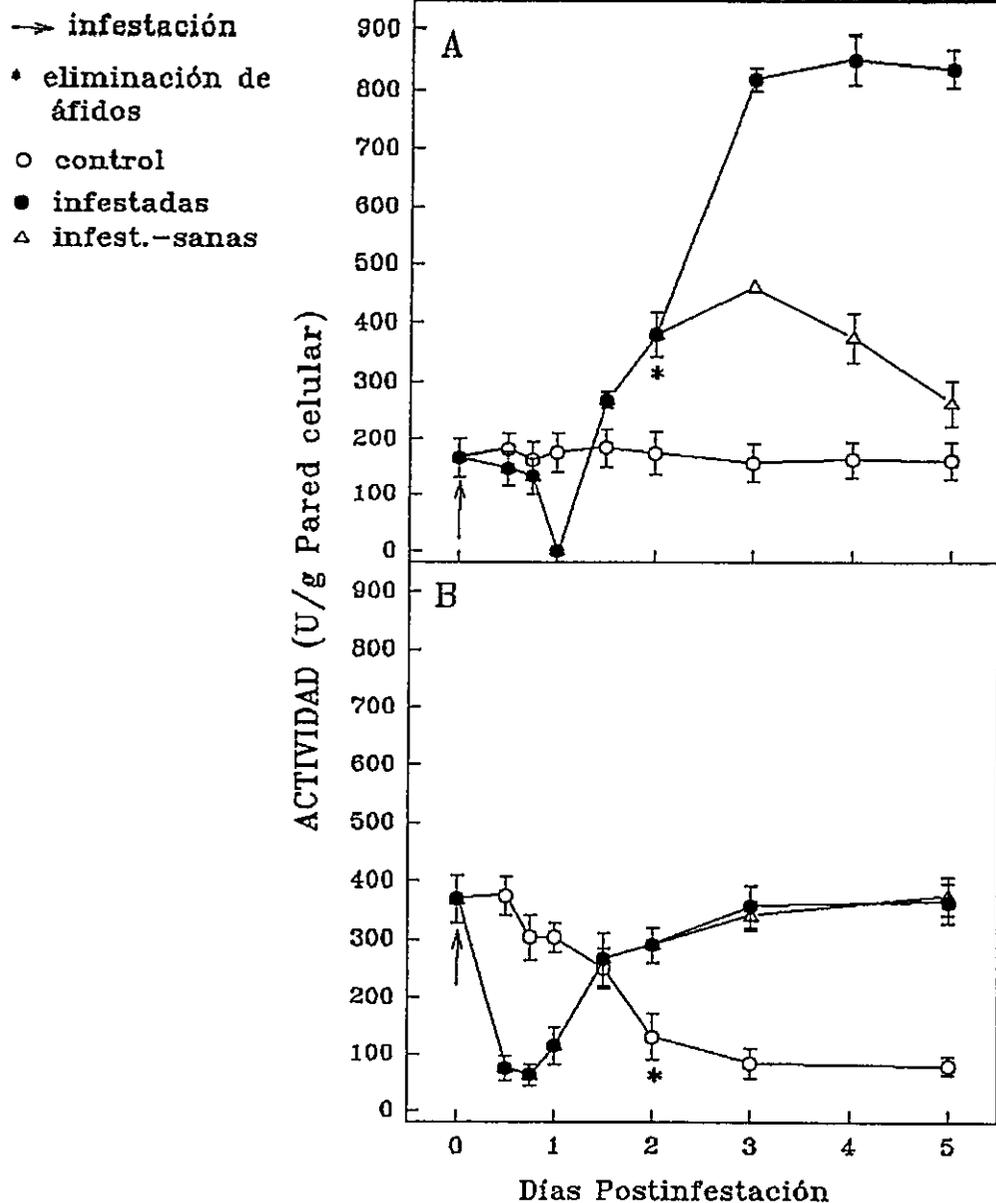


Figura 7.- Actividad peroxidasa en la variedad Aramir (U/g pared celular). A- Iónicamente unidas, B- Covalentemente unidas. En las infest.-sanas se eliminaron los áfidos al segundo día de infestación. Las barras verticales indican el error estándar (n=3)

entre los días 3 y 4 de infestación para las iónicas y covalentes. A pesar de que ambas formas aumentan entre 3 y 4 veces con respecto al valor del control de la misma edad, las covalentes sólo llegan a valores similares a los del día 0 (Fig. 7 b).

Al eliminar los áfidos, las iónicas descienden su actividad después de un período donde se mantienen estables (Fig. 7 a, triángulos vacíos). En las covalentes no hay diferencias entre las infestadas y a las que se le retiraron los áfidos (Fig. 7 b, triángulos vacíos).

En esta variedad se ensayó la actividad peroxidasa de algunos extractos con ácido ferúlico como sustrato. Esto se realizó a fin de determinar si la afinidad de las peroxidosas por el sustrato variaba a consecuencia de la infestación. La relación de actividad encontrada entre plantas sanas e infestadas fue similar a la realizada con o-PDA, por lo que no se realizó este ensayo en las otras variedades.

### 3.3.2 Libra

Las plantas control tienen una actividad constante (Fig. 8 a y b, círculos vacíos) (Apéndice E). En las infestadas desciende la actividad a las 12 horas postinfestación en ambas formas de enzimas (Fig. 8 a y b, círculos llenos). Las iónicas no presentan un aumento de

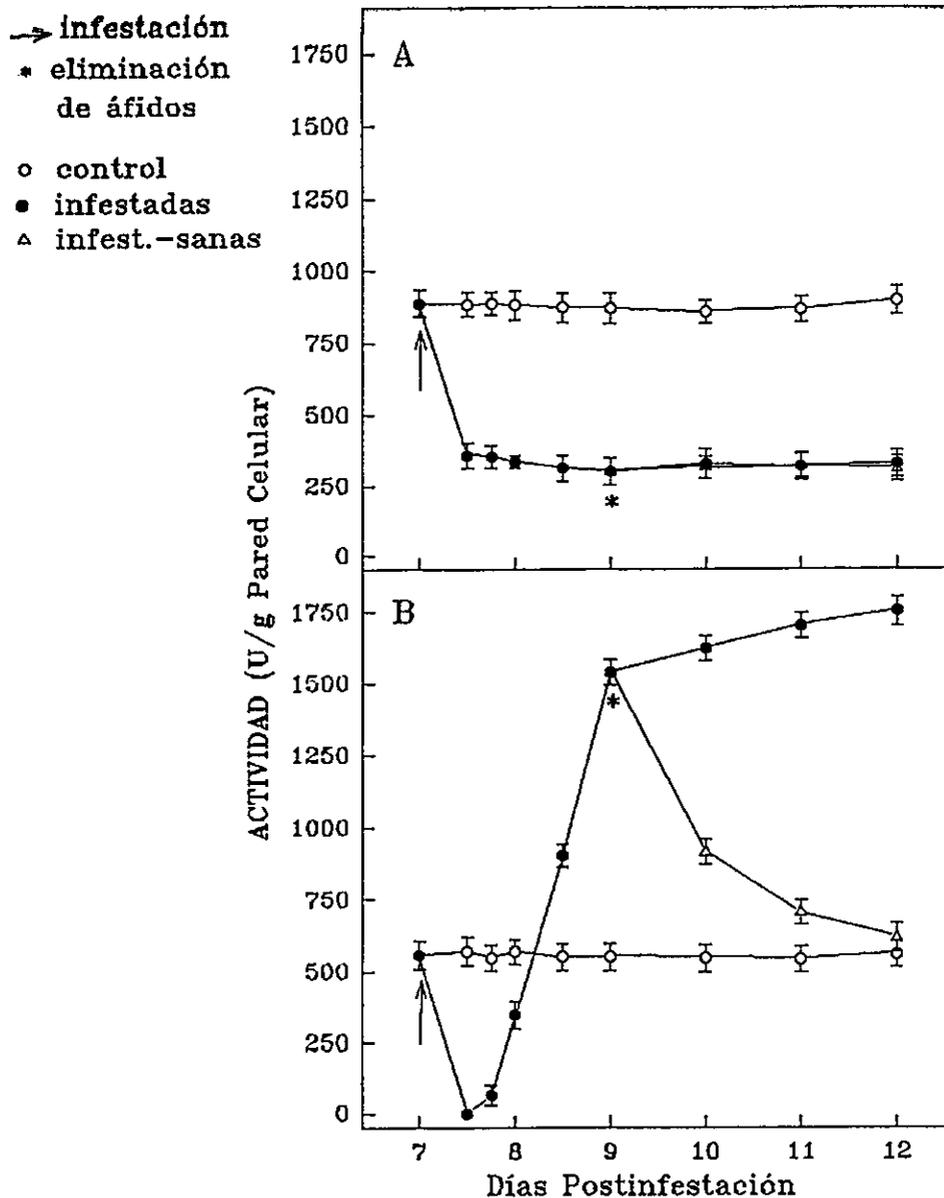


Figura 8.- Actividad peroxidasa en la variedad Libra (U/g pared celular). A- Iónicamente unidas, B- Covalentemente unidas. En las infest.-sanas se eliminaron los áfidos al segundo día de infestación. Las barras verticales indican el error estándar (n=3)

actividad durante el tiempo en que fue determinado. Por el contrario, las covalentes aumentan su actividad desde el primer día, llegando al máximo entre los días 2 y 3. Este aumento es aproximadamente de 3 veces el valor del control.

Al eliminar los áfidos, las iónicas no varían su actividad, pero las covalentes disminuyen (Fig. 8, triángulos vacíos).

### 3.3.3 Frontera

En las plantas controles, las peroxidasas unidas iónicamente fueron constantes y las unidas covalentemente no fueron detectables (Fig. 9 a y b, círculos vacíos, respectivamente) (Apéndice F).

Al infestar, las peroxidasas iónicas presentan un rápido descenso, llegando al mínimo al primer día de infestación (Fig. 9 a, círculos llenos). A partir de ese momento comienza a aumentar hasta llegar al máximo entre los días 2 y 3. Las covalentes muestran incremento de actividad desde las 12 horas, llegando al máximo entre los días 2 y 3 (Fig. 9 b, círculos llenos).

La eliminación de los áfidos produce en ambas formas un descenso de la actividad (Fig. 9 a, triángulos vacíos).

Por lo tanto, se puede especular que en esta variedad no hay peroxidasas covalentemente unidas, y que éstas como las formas iónicas son inducidas por la infestación

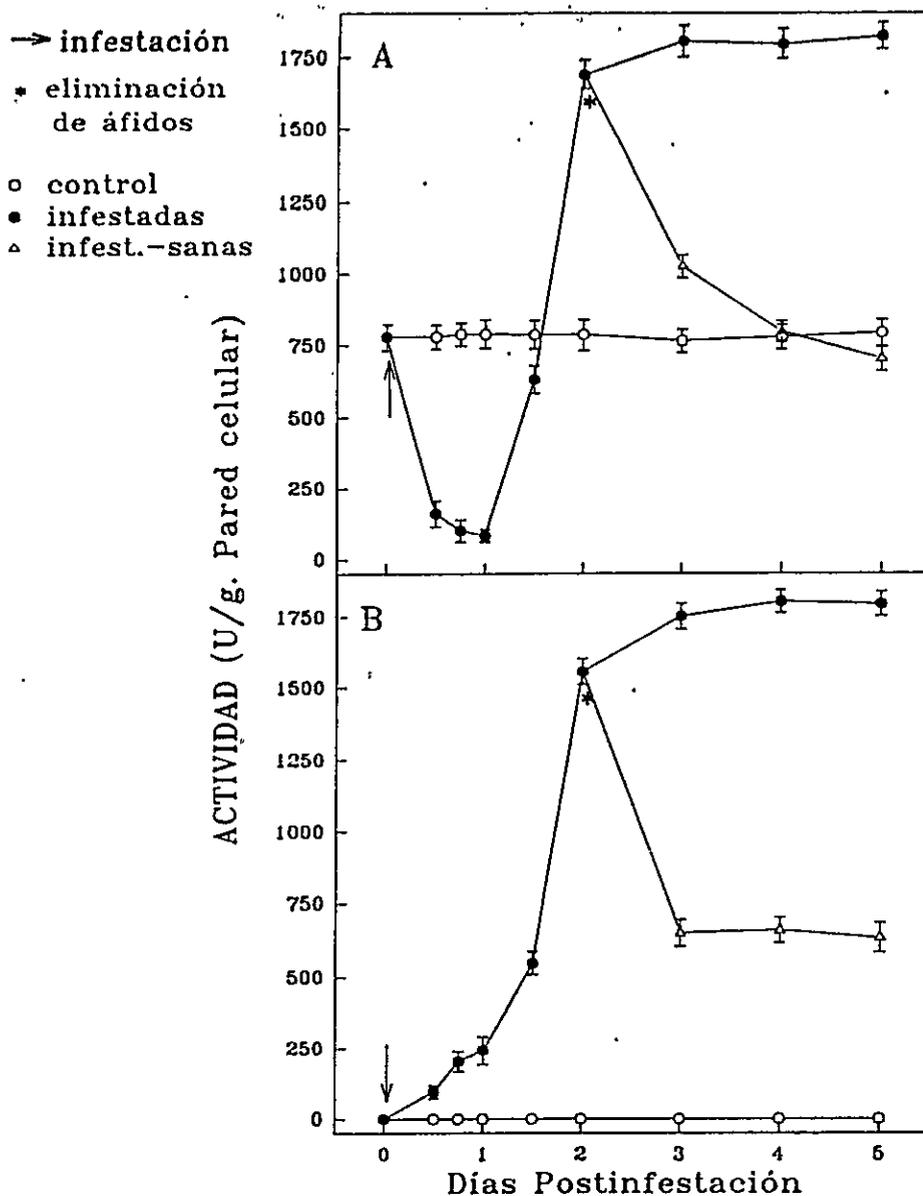


Figura 9.- Actividad peroxidasa en la variedad Frontera (U/g. pared celular). A- Iónicamente unidas, B- Covalentemente unidas. En las infest.-sanas se eliminaron los áfidos al segundo día de infestación. Las barras verticales indican el error estandar (n=3).

(Apéndice F).

### 3.4 Isoelectroenfoque.

Debido a la presencia de isoformas de pI ácidos y básicos, se eligió un rango de pH amplio (Fig. 10).

El gradiente de pH que se formó al correr el isoelectroenfoque fue de entre 4,5 a 9,5.

Se detectó una solo isoforma ácida de pI 4,5. Esta no mostró cambios, ni inducción por la infestación. Las isoformas de pI básico tuvieron cambios importantes, En la variedad Frontera infestada 48 hs, apareció una nueva de pI 9,5, además de la ya existente de pI 9,4, desapareciendo la de pI 9,3. Estas dos últimas se encuentran en la variedad Libra, pero la de pI 9,3 desaparece con la infestación, no apareciendo ninguna otra. En Aramir solo fueron identificadas dos bandas a pI 9,3 y 9,4, no habiendo diferencias entre sanas e infestadas.

### 3.5. Compuestos de pared.

Se determinó la presencia y aumento de lignina y polifenoles en plantas control e infestadas. La lignina no dio diferencias de tinción a nivel histológico, por lo cual no fue cuantificada. Por el contrario, los polifenoles mostraron diferencias claras a nivel histológico (Fig. 11), lo cual permitió que fueran cuantificados (Apéndice G). Se

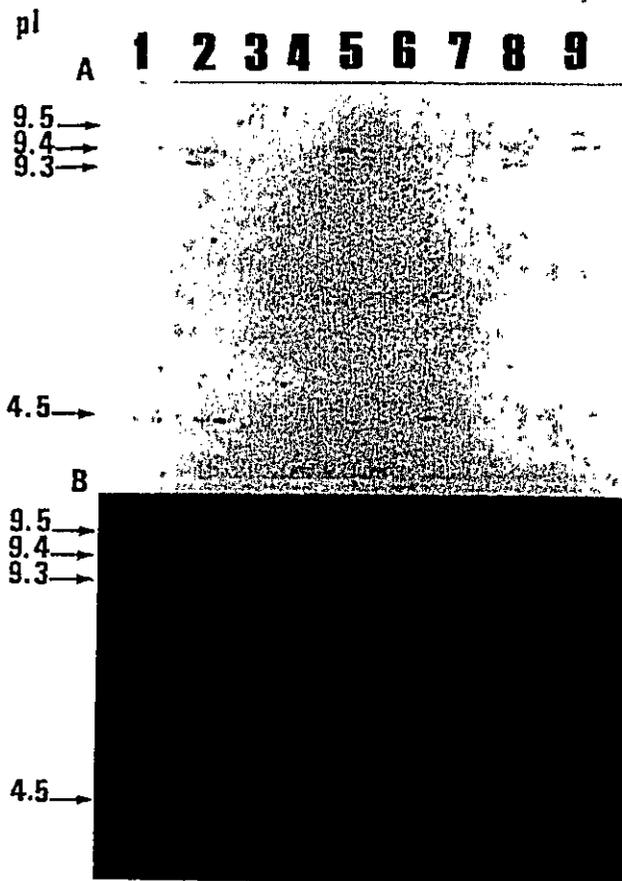


Figura 10.- Isoelectroenfoque. A- Fotografiado con luz blanca, B- Fotografiado con luz UV. Carriles: 1- Aramir control, 2- Aramir infestada 48hs, 3 y 4 amortiguador, 5 Libra control, 6- Libra infestada 48hs, 7- amortiguador, 8 Frontera control, 9- Frontera infestada 48hs. Puntos isoeléctricos determinados por electrodo de superficie. El revelado de las bandas s'fue realizado por actividad con o-PDA

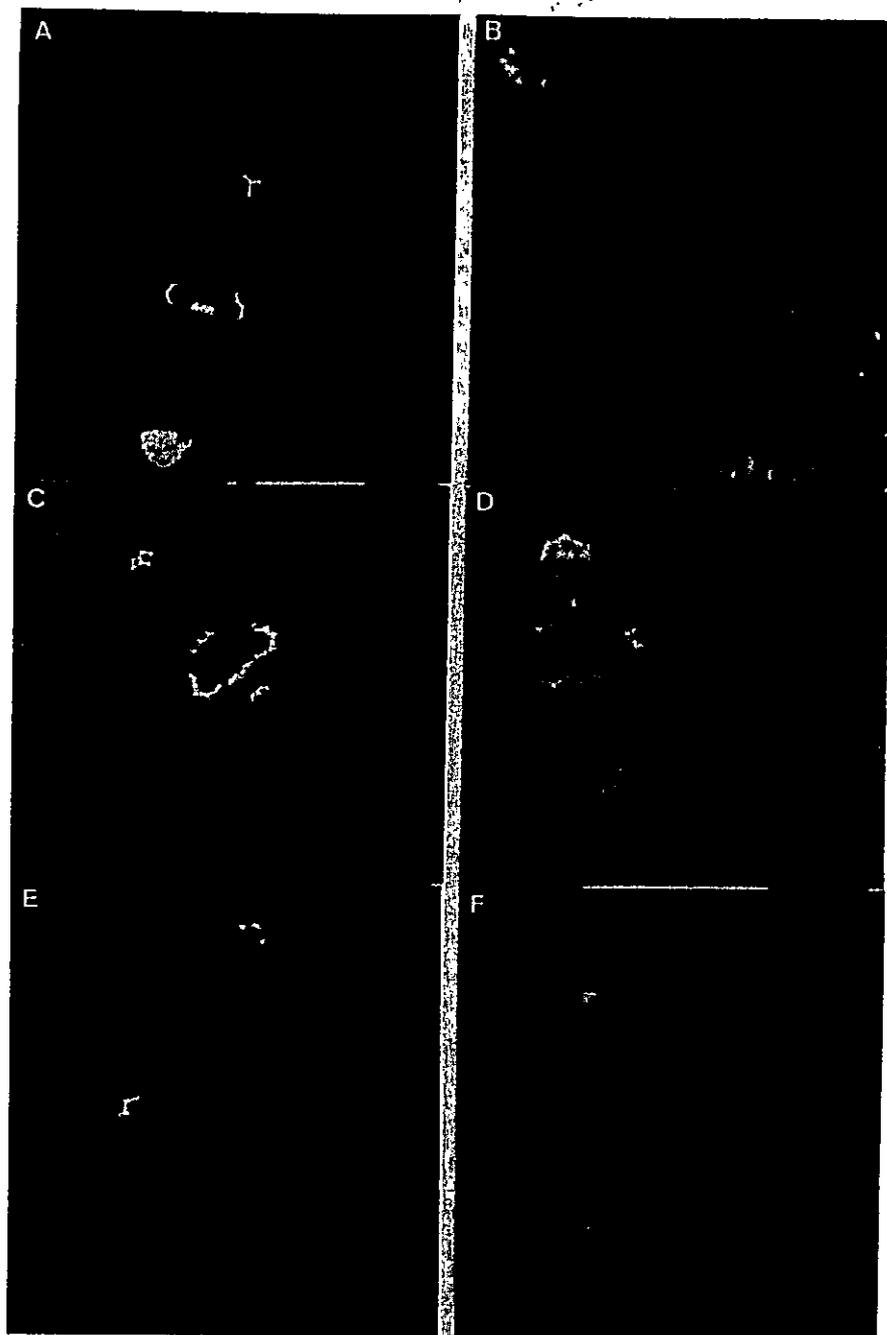


Figura 11.- Cortes frescos de hojas tratados con etanol, en microscopio de epifluorescencia azul (400x). A- Aramir control, B- Aramir infestada, C- Libra control, D- Libra infestada, E- Frontera control, F- Frontera infestada. Los polifenoles fluorescen en amarillo.

utilizaron dos métodos el de Fry (1979) que es más específico para el ácido ferúlico y el de Zieslin y Ben-Zaken (1993) que es más general para todos los fenoles (Fig. 12 a y b respectivamente).

La variedad Aramir, por ambos métodos, es la que presentó menor cantidad de fenoles en las plantas control y aumentó a poco más del doble a causa de la infestación. Libra y Frontera presentaron valores similares en las plantas controles por el método de Zieslin y Ben-Zaken, y un poco mayor en Libra por el método de Fry.

Por ambos métodos se observó un incremento en estas dos variedades de 3 a 4 veces. Según el método utilizado, podría pensarse que, a consecuencia de la infestación, Frontera presenta una mayor acumulación de polifenoles, y en particular de ácido ferúlico (Fig. 12). Esto está en concordancia con lo observado histológicamente, donde el mayor incremento de fluorescencia se observó en Frontera y Libra. Aramir presentó cambios de fluorescencia muy pequeños. Las zonas fluorescentes se observaron en diferentes lugares de la hoja, dependiendo de la variedad. En Aramir solamente aumentó la fluorescencia en el tejido vascular, en particular las bandas en U de la vaina mestomática, y en pequeñas regiones de la epidermis (Fig. 11). En las plantas infestadas de Aramir, además se observó una estructura filamentososa que se ha asociado con el canal

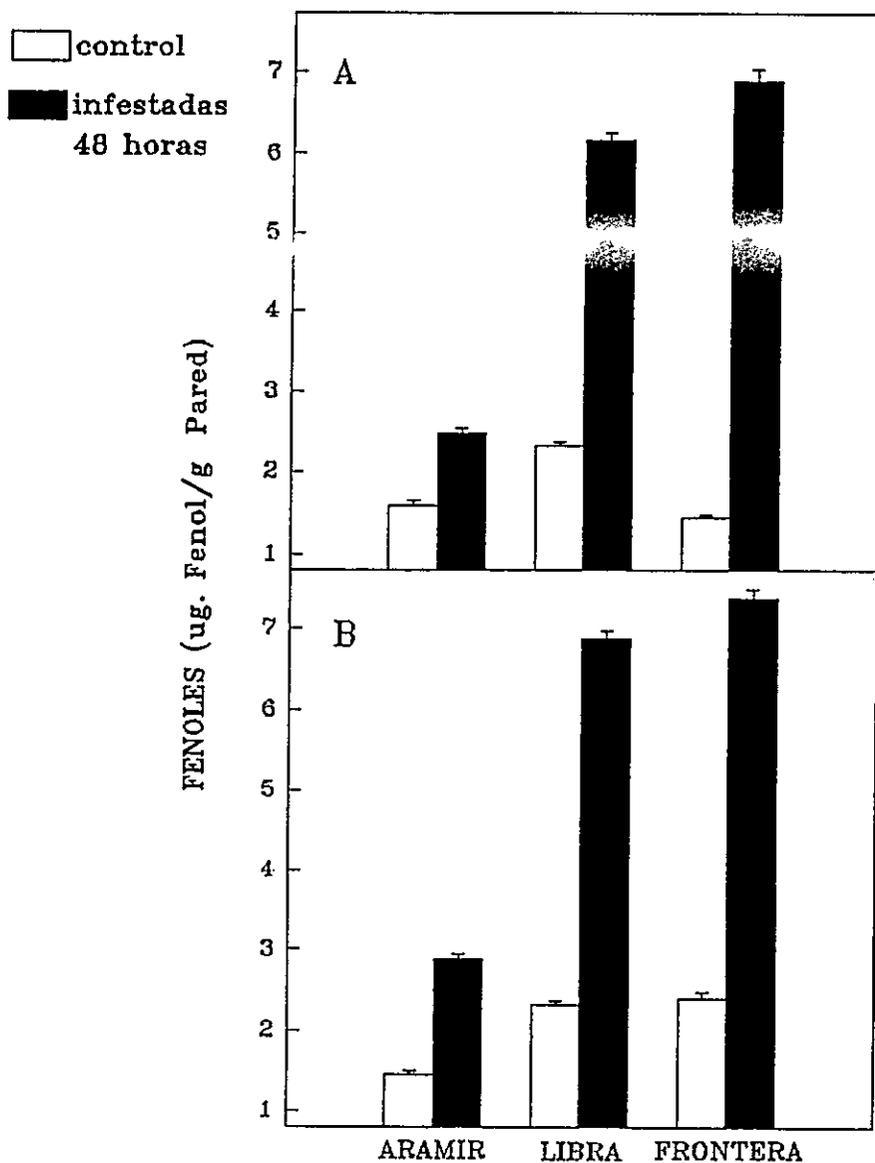


Figura 12.- Contenido de fenoles ( $\mu\text{g}$  Fenol/g pared celular). A- Método de Fry (absorbancia), B- Método de Zieslin y Ben-Zaken (reactivo de Folin-Ciocalteu). Las barras verticales indican el error estándar ( $n=3$ ).

del entrada del estilete del áfido (Belefant-Miller y col., 1994). En general estos canales se dirigen al tejido vascular. En ningún caso fue posible determinar la presencia de lignina, callosa o polifenoles en estas zonas (Fig. 13).

Las plantas infestadas de Libra y Frontera presentaron zonas fluorescentes más intensas y grandes que Aramir (Fig. 14). Se incrementó la fluorescencia en el tejido vascular, bandas en U de la vaina mestomática, epidermis y en el mesófilo. En ambas variedades, pero más intensamente en Frontera, el mesófilo presentó grandes zonas fluorescentes entre los haces vasculares. Sin embargo, no fue posible determinar la deposición de lignina en ninguna de las tres variedades.

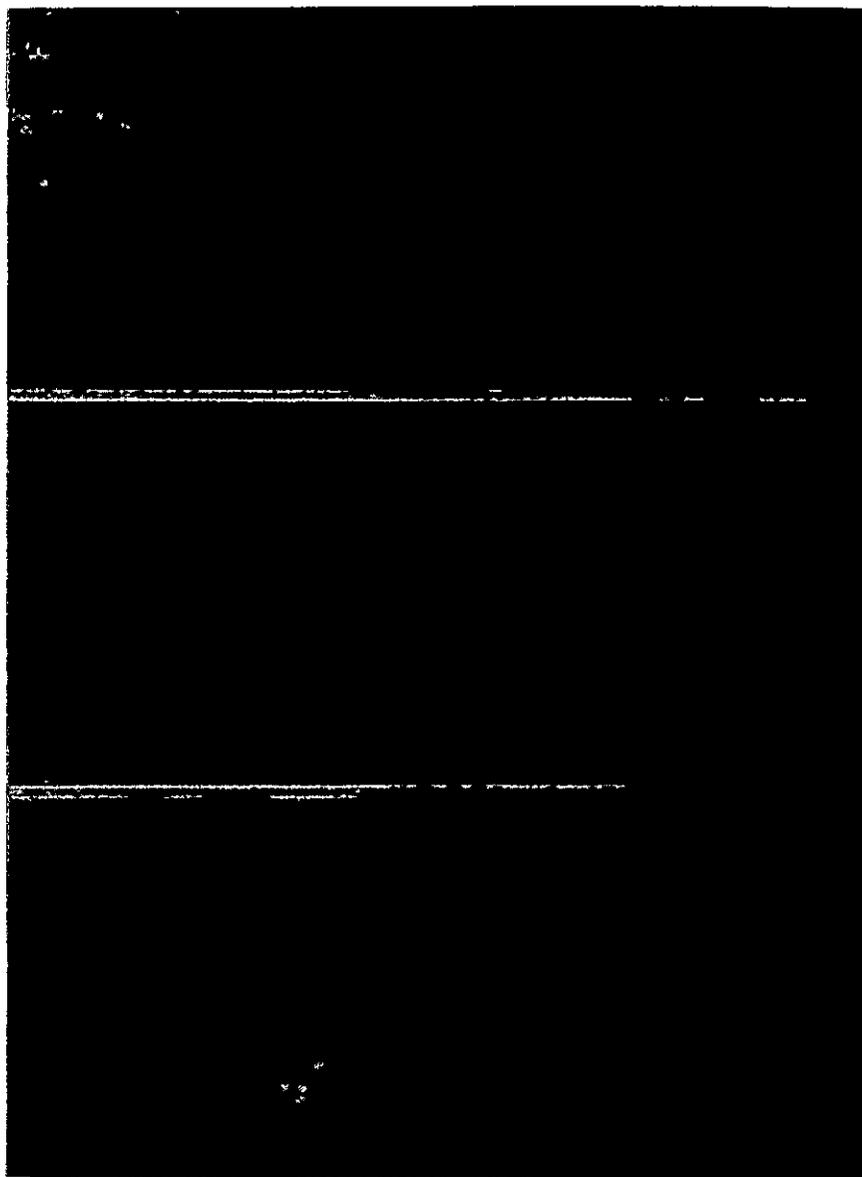


Figura 13.- Cortes frescos de hojas de Aramir infestada, tratados con etanol. A. Teñido con fluoroglucinol, 400x, B. Igual a A, 600x, C. Teñido con azul de toluidina, 600x.

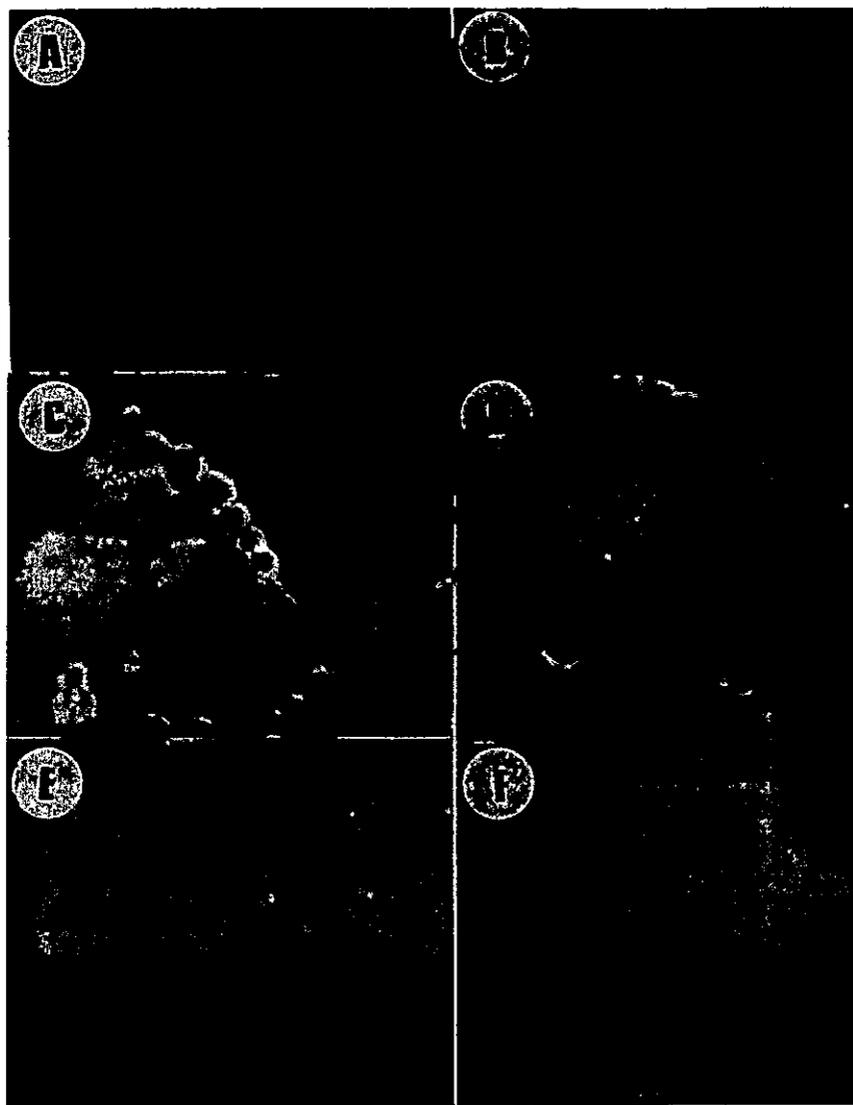


Figura 14.- Cortes frescos de hojas de las tres variedades, tratados con etanol, en microscopio de epifluorescencia azul. A- Aramir infestada 200x, B- Aramir infestda 400x, C- Libra infestada, 200x, D- Libra infestada 200x, E- Frontera infestada 400x, F- Frontera infestada 400x. En amarillo fluorescen los polifenoles.

#### 4. DISCUSION

##### Daño y recuperabilidad

Las tres variedades de cebada sufren un daño muy importante al cabo de seis días de infestación con *S. graminum*. Cabrera (1994) trabajando en una de las variedades utilizadas, Aramir, encontró disminución del contenido de clorofila, del contenido relativo de agua y del potencial hídrico ante la infestación por el mismo áfido. Estos resultados son similares a los encontrados en esta tesis para las tres variedades en RWC, PH y CHL en seis días de infestación. Sin embargo, las tres variedades se comportan de diferente forma en los primeros días de la infestación.

Se podría suponer que tienen diferencias en la susceptibilidad a la infestación, aunque ésta es muy difícil de diferenciar. En las tres variedades de cebada, un tiempo indefinido de infestación por áfidos, provoca la muerte de las plantas, con diferencia de uno o dos días entre las variedades. Esto hace que sea aún más difícil hacer una evaluación de la susceptibilidad.

Los dos métodos usados para evaluar el estado hídrico

de las plantas, arrojaron resultados similares al final del experimento ( $r > 0,9$ ) (Apéndice H). En las tres variedades se estableció una alta correlación entre los RWC y PH de las sanas y de las infestadas. Sin embargo, el PH parece ser más sensible ya que se detectó cambios a las 12 horas de infestación mientras que en el RWC no se detectaron diferencias significativas hasta el primer día. De todas formas, ambas metodologías permiten cuantificar el daño producido por los áfidos, así como una capacidad de recuperación diferencial de las variedades estudiadas.

Es importante destacar que la variedad Libra presenta descensos importantes al segundo día de infestación en el RWC y PH. Sin embargo, una vez eliminados los áfidos, la recuperación de esta variedad es muy rápida. Esta rápida recuperación podría estar mediada por el ABA. De acuerdo a resultados obtenidos en el laboratorio, no publicados, ésta variedad es la que presenta mayores contenidos de ABA en condiciones normales. Podemos suponer que en el caso de la infestación, la rápida recuperación se debería al importante rol que juega el ABA en la regulación de la apertura estomática, protegiendo el estado hídrico de la planta (MacRobbie, 1991; Tardieu, y Davies, 1992; Weyers y col., 1982). La variedad Aramir, en cambio, presenta un contenido basal de ABA más bajo y probablemente no controlaría la apertura estomática como ocurre en la

variedad Libra. La cuantificación de ABA y determinaciones de conductancia estomática permitirían corroborar estos datos, para el caso de la infestación por áfidos. Esto podría explicar las diferencias detectadas en el estado hídrico.

El contenido de clorofila resultó ser un buen parámetro para determinar el daño producido y la recuperabilidad de cada variedad. Los cambios son significativos a partir del primer día de infestación. En los experimentos en los cuales se eliminan los áfidos al segundo día, las tres variedades presentaron respuestas diferentes. Frontera y Libra presentaron una recuperación total de la clorofila. En la otra variedad, se llegó a un valor de clorofila superior al de las infestadas, pero inferiores a las de las plantas control. La pérdida de clorofila en Frontera es menor que en las otras variedades. Probablemente sea ésta una razón importante para explicar la recuperación total en el contenido de clorofila. En las tres variedades se estableció una buena correlación ( $p > 0,9$ ,  $r < 0,05$ ) entre el CHL, RWC y PH, por lo que podemos suponer que existe algún tipo de interacción entre estos parámetros.

De acuerdo a estas determinaciones, las tres variedades pueden ser claramente divididas con respecto a su recuperabilidad. Así es que se plantea la siguiente

clasificación:

Frontera, con alta recuperabilidad

Libra, con recuperabilidad media

Aramir, con baja o ninguna recuperabilidad.

Por lo tanto podríamos suponer que cuando un cultivo de las variedades Libra o Frontera es atacado por áfidos, es posible aplicar medidas de control hasta dos días después de iniciada la infestación. Hasta ese momento tendrían una buena capacidad de recuperación. En el caso de Aramir la recuperación no será total y probablemente sufra deterioros posteriores.

#### Peroxidasas

Las peroxidasas de pared celular están siendo estudiadas con respecto a la síntesis y reparación de pared celular. Por esta razón se determinó la actividad de estas enzimas en las tres variedades y en los tres tratamientos. Es importante recordar que al comienzo de la infestación, la actividad peroxidasa bajó rápidamente en las tres variedades. Este descenso ha sido encontrado por otros autores en diferentes condiciones de estrés. Riquelme (1991) encuentra descenso de las proteínas totales de pared a la media hora de haber dañado mecánicamente las hojas de *Araucaria araucana*. Kerby y col. (1993) encuentran un descenso en la actividad peroxidasa entre las 24 y 48 horas

de infestar plantas de cebada con *Erysiphe graminum* f.sp. *hordei*. Lagrimini (1991) encontró descensos a las 24 horas en la actividad peroxidasa y fenol oxidasa de pared celular, en respuesta al ataque por hongos y por daño mecánico. También encuentra que ambas aumentan su actividad hasta llegar al máximo entre las 48 y 72 horas. Cabrera (1994) encuentra los valores máximos de actividad de las peroxidasas solubles, al tercer día de infestación.

Los datos obtenidos en esta tesis, corroboran estos resultados, ya que inicialmente la actividad desciende y luego aumenta hasta llegar a sus valores máximos entre el segundo o tercer día de infestación. De acuerdo a los valores de actividad peroxidasa de las plantas controles, más los valores a los que llega a consecuencia de la infestación, se puede concluir que las variedades Frontera y Libra son las que presentan mayor actividad peroxidasa (5500 y 5700 U/g pared respectivamente) y Aramir la que presenta menor (2600 U/g pared). Por otro lado, las variedades Aramir y Libra presentan descensos tan grandes en la actividad, en el primer día de infestación, que llega a ser indetectable.

McDougall (1993) ha encontrado una mayor actividad de peroxidasas covalentemente unidas a la pared durante la lignificación en *Linum usiatissimum* L. con una mayor afinidad de las covalentes por la siringaldazina.

Hammerschmidt y col. (1982), Kerby y Somerville (1989) y Mohan y Kolattukudy (1994) han encontrado aumento de las peroxidasas iónicas en plantas infectadas con hongos. Lagrimini y Rothstein (1987) han determinado resultados similares con virus.

En esta tesis hemos encontrado, en Aramir, una buena correlación ( $p > 0,9$ ,  $r < 0,05$ ) entre las PI y el RWC, mientras que en Libra la correlación fue entre las PC y el RWC y en Frontera entre las PI y PC con el RWC. Por lo tanto, no puede descartarse la posible participación de ambas formas de peroxidasas en la reparación de la pared celular.

Edreva y col. (1993) proponen que para que se produzca la inducción de actividad peroxidasa, es necesario que se produzca el daño a nivel tisular. Lesney (1990) trabajando con una suspensión celular de *Pinus elliottii*, observó una disminución de la actividad peroxidasa a las 24 horas de tratar con baja concentración de quitosano, seguido de un aumento. Si trataba la suspensión celular con alta concentración de quitosano, el aumento era desde el principio, sin una disminución inicial. Bruce y West (1989) encontraron un comportamiento semejante con fragmentos pécticos en suspensiones celulares de *Ricinus communis* L. Según estos autores la inducción de actividad depende de que la planta detecte el daño y se inicien los mecanismos de reparación o defensa (Bruce y West, 1989). El

desfazamiento entre la infestación y la inducción de peroxidasas podría deberse, entre otros factores, a la velocidad de la trasducción de la señal en cada variedad. Bruce y West también determinaron un retardo de 12 horas entre la estimulación con fragmentos pécticos y la inducción de peroxidasas. Esto también podría explicar el retardo que en el aumento de actividad peroxidasa, después de la infestación. En casi todos los casos no comienza a aumentar la actividad hasta después del primer día de infestación. Otros autores (Gross y col., 1977; Prasad, y col., 1994; Price y col., 1994; Schopfer, 1994) han planteado que el peróxido de hidrógeno es una de las señales que desencadena las respuestas. Esta señal oxidativa induce cambios a varios niveles, entre los cuales Price y col. (1994) destacan cambios en los niveles de  $Ca^{+2}$ . El calcio es importante en la activación de las peroxidasas (Marañón y van Huystee, 1994; Xu y van Huystee, 1993). Por lo tanto, cambios en su disponibilidad o en la permeabilidad de la membrana podrían controlar la actividad peroxidasa.

#### Isoformas de peroxidasas

Gaspar y col. (1985) plantean un modelo donde se le atribuye a las peroxidasas básicas un papel principal en la formación e incorporación de fenoles a la pared, los cuales

son utilizados por las peroxidasas ácidas en las síntesis de lignina.

Por otro lado, Pedreño y col. (1994) plantean que no es posible atribuir una función específica a estas isoformas, ya que ambas tienen la capacidad de oxidar los mismos compuestos.

Si aceptamos el modelo de Gaspar, la baja presencia y no aparición de nuevas bandas de pI ácidos explicaría la ausencia de síntesis de lignina. Sin embargo, el incremento de polifenoles no puede explicarse por los cambios en las peroxidasas ácidas, excepto en Frontera, donde aparece una nueva isoforma. En la variedad Libra, desapareció la isoforma pI 9,3, lo cual podría explicar el descenso de actividad peroxidasa, sin un posterior incremento como ocurre en las otras dos variedades. La aparición de una isoforma de pI 9,5 en la variedad Frontera, podría explicar el incremento la actividad de la fracción iónica. En la variedad Libra, la incorporación de fenoles en la pared es similar a la que ocurre en Frontera, así que podría suponerse una baja participación de las peroxidasas unidas iónicamente a la pared en la incorporación de fenoles.

Dado que las PC presentan una mayor correlación con la recuperabilidad, habría que determinar el patrón isoelectroforético en esta fracción a fin de poder justificar esa correlación.

### Compuestos de pared celular

La importancia de las peroxidasas es su participación en la síntesis e incorporación de compuestos en la pared celular, tanto durante el crecimiento, diferenciación y ante daño. Uno de estos compuestos son los polifenoles. Estos forman parte de la estructura de la suberina y lignina, aunque también se encuentran unidos a otros componentes de la pared.

Algunos autores han planteado que estos son los primeros compuestos determinables que se depositan en la pared celular ante el ataque por hongos, áfidos y daño mecánico en cebada (Belefant-Miller y col, 1994; Kogel y col., 1994; Russo y Bushnell, 1989). Russo y Bushnell (1989) observaron por microscopía electrónica que un material amorfo se deposita en las zonas dañadas de las paredes celulares. También determina que estos compuestos presentan autofluorescencia inducida por luz UV, reacción característica de los polifenoles y sus polímeros. Shackel y col. (1991) han encontrado resultados similares, pero no descartaron la posibilidad de que otros compuestos puedan ser los responsables de esta fluorescencia. Sin embargo, otros autores usan como reacción específica para polifenoles, lignina y suberina la autofluorescencia inducida por luz azul o UV (Jensen, 1962; O'Brian y McCully, 1981). Tanto los resultados de Belefant-Miller y

col. (1994) con áfidos, Kogel y col. (1994) con hongos y de Russo y Bushnell (1989) con daño mecánico en cebada, coinciden en atribuir esta autofluorescencia a los polifenoles.

Cabrera (1994) determinó un aumento del ácido ferúlico soluble en plantas infestadas por áfidos. Este fenol ha sido citado como uno de los más importantes que se depositan en la pared durante el daño (Belefant-Miller y col., 1994; Kogel y col., 1994). En nuestros resultados, también hay aumento de autofluorescencia en las paredes celulares de la epidermis y haces vasculares de las plantas infestadas comparadas con las de los controles. De aquí se puede inferir que posiblemente hay deposición de polifenoles después de la infestación.

Las dos metodologías utilizadas para determinar los fenoles de pared, permite hacer alguna discriminación sobre qué fenoles se depositan en la pared, ya que uno de los métodos (Fry, 1979) determina principalmente al ácido ferúlico y sus derivados. Al parecer, Frontera deposita más cantidad de ácido ferúlico que las otras dos variedades.

Iiyama y col. (1994) plantean un modelo de interacción entre los polisacáridos de pared celular mediante puentes de ácido ferúlico o ácido dihidiferúlico. Taiz (1984) plantea que las giberelinas inducirían el crecimiento porque inhiben la excreción de peroxidasas y por

consiguiente la formación de uniones covalentes entre diferulatos y la pectina. Zimmerlin y Bolwell (1993) encontraron una peroxidasa catiónica implicada en la formación de enlaces covalentes entre fenoles y polisacáridos de pared celular. Datos similares a éstos, fueron determinados por Lagrimini y Rothstein (1987).

El aumento de fenoles de pared celular que se encontró en estas tres variedades de cebada, a consecuencia de la infestación por áfidos, es menor que el encontrado para otras plantas y con otros factores de inducción (Espelie y col., 1986; Mohan y Kolattukudy, 1994; Stark y col., 1994). Esas determinaciones están hechas en dicotiledoneas y en tejidos con alta lignificación. Sin embargo, el tiempo de aparición de estos compuestos es similar. Stark y col. (1994) encontraron suberización en papa, a las 48 horas de dañar el tejido.

Ya que en esta tesis se trabajó con una gramínea, los valores de contenido de fenoles no son comparables con los resultados encontrados en las dicotiledoneas. De todas formas, se puede suponer que los procesos de síntesis son similares, ya que la estructura de la lignina y de la suberina son parecidas (Espelie y col., 1986). La diferencia está en que la suberina presenta compuestos alifáticos, además de los fenólicos.

La lignificación en las monocotiledoneas es menor que

en las dicotiledoneas (Esau, 1972; Smith y col., 1994; Taiz, 1984). En este trabajo, la determinación de lignina fue realizada a nivel histológico sólo hasta el segundo día de infestación. La posibilidad de determinar incrementos de lignina en ese período es muy baja, ya que el tiempo de aparición de la lignina a consecuencia de daño o patógenos es mayor (Baier y col., 1993).

Lagrimini (1993) trabajando con tomate y tabaco transgénicos, a los que se le incorporó un gen de peroxidasa, encontró una mayor resistencia a patógenos como hongos, virus e insectos. También encontró un adelanto de la marchitez y oscurecimiento de los tejidos en las plantas transformadas. Resultados similares encontraron Lagrimini y col. (1990). En ambos casos, el gen incorporado tenía como promotor al 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV). Esto hace que la expresión sea muy alta, lo que podría explicar el oscurecimiento de los tejidos por la sobredeposición de polifenoles y el adelanto en la marchitez. Con respecto a los insectos, Lagrimini y col. (1990) plantean que los polifenoles puedan darle a la pared mayor resistencia a la digestión por enzimas, así como una posible función como metabolitos repelentes.

De los compuestos de pared, tal vez sean la suberina y los polifenoles los que mayormente participan en la reparación, ya que de acuerdo a los trabajos de Iiyama y

col. (1994), Lagrimini y Rothstein (1987) y Zimmerlin y Bolwell (1993) participarían en la formación de enlaces covalentes entre los polifenoles, polisacáridos y proteínas de pared. Esto se deriva de que aparece un aumento importante del grosor y autofluorescencia de las bandas en U de la vaina mestomática, el tejido vascular, así como zonas fluorescentes en el mesófilo.

Por otra parte, la composición de la lignina y suberina varía entre plantas sanas y dañadas. La suberina presenta una mayor proporción de fenoles, principalmente derivados del ácido ferúlico, lo que le daría una mayor hidrofobicidad (Espelie y col., 1986; Taiz, 1984). En la lignina también cambia la proporción de fenoles, aumentando los derivados de ácido cumárico y sinápico (Mitchel y col., 1994, Smith y col., 1994).

La actividad peroxidasa en las plantas sanas de Aramir, es la menor de las tres variedades. Si atribuimos como función de las peroxidasas la incorporación de fenoles en la pared celular, explicaría el menor contenido de fenoles en la pared en la variedad Aramir por una menor actividad peroxidasa.

Podría suponerse que el inmediato descenso de actividad peroxidasa al eliminar los áfidos en las variedades Libra y Frontera, podría deberse al aumento de polifenoles que ocurre en este período. En estas dos

variedades, podemos suponer que la deposición es suficiente para permitir la reparación de la pared. El retardo en el descenso de actividad en Aramir podría deberse al menor contenido y deposición de polifenoles que en las otras dos variedades, por lo que sería necesaria una actividad peroxidasa por más tiempo. Esto llevaría a suponer que la variedad Aramir repare en cierta medida la pared, pero que el daño sufrido sea tan grande que la planta no llegue a recuperarse. De esta forma se esperaría que las plantas continúen vivas pero sin una evidente recuperación, como puede observarse en la figura 1.

### Correlaciones

Se establecieron altas correlaciones ( $p > 0,9$ ,  $r < 0,05$ ) entre la actividad enzimática y cambios de algunos de los parámetros, principalmente los de estado hídrico (RWC y PH). Esto significaría que la relación que existe entre ellos podría ser directa.

Zieslin y Ben-Zaken (1993) consideran que el factor limitante para la actividad peroxidasa son los sustratos y no la enzima. Esto nos lleva a pensar que en las tres variedades la diferente deposición de polifenoles se pueda deber a este factor. Mitchell y col. (1994) y Smith y col. (1994) han encontrado relación entre la actividad de la PAL

(EC 4.3.1.5 Fenilalanina amonio-liasa) y la lignificación. Gross y col. (1977) informan resultados similares con la formación de peróxido de hidrógeno y la malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37). Así entonces se hace necesario el estudio de las vías de síntesis de fenoles a ser utilizados por las peroxidases.

## 5. CONCLUSIONES

1.- Se propone una clasificación con respecto a la recuperabilidad de las tres variedades, Aramir, Libra y Frontera, en baja, media y alta, respectivamente.

2.- Se determinó que la actividad de las peroxidasas de pared celular cambian su actividad a consecuencia de la infestación.

3.- Se encontró una alta correlación entre la recuperabilidad y la inducción de peroxidasas unidas covalentemente a la pared celular.

3.- El patrón isoelectroforético de las PI no mostró cambios importantes que permita asociarlas con el aumento de fenoles en la pared, excepto en la variedad Frontera.

4.- Tanto la histología como la cuantificación de fenoles en la pared, parecerían indicar que estos están involucrados en la recuperabilidad de las plantas del ataque de áfidos.

5.- La función de los fenoles en la pared celular podría estar relacionada con la reparación de la misma, y/o detener el daño producido por el áfido.

6.- La inducción de peroxidasas podría ser un mecanismo de recuperabilidad ante la infestación por áfidos, si es que éstas realmente participan en la reparación de la pared celular.

Esto podría ser impidiendo la degradación de la pared celular, haciéndola más resistente a la acción de las enzimas o volviendo impalatable el tejido para el áfido.

## 6. BIBLIOGRAFIA

ACOSTA, M.; Arnao, M.B.; Hernández-Ruiz, J.; García-Cánovas, F. 1993.- Inactivation of peroxidase by hydroperoxides. In: Plant Peroxidase. Biochemistry and Physiology. Proceedings of III International Symposium. K.G. Welinder, S.K. Rasmussen, C. Penel, H. Greppin (Eds), University of Copenhagen and University of Geneva.

ASADA, K. 1992.- Ascorbate peroxidase- a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85:235-241.

ASADA, K.; Miyake, C.; Sano, S.; Amako, K. 1993.- Scavenging of hydrogen peroxide in photosynthetic organisms -from catalase to ascorbate peroxidase.

In: Plant Peroxidase. Biochemistry and Physiology. Proceedings of III International Symposium. K.G. Welinder, S.K. Rasmussen, C. Penel, H. Greppin (Eds), University of Copenhagen and University of Geneva.

BAIER, M.; Goldberg, R.; Catesson, A.M.; Franceschi, C.; Rolando, C. 1993.- Seasonal changes of isoperoxidases from poplar tissues. *Phytochemistry* 32: 789-793.

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 Physiol.* 105:1289-1294.

BRUCE, R.; West, Ch.A. 1989.- Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of Castor bean. *Plant Physiol.* 90: 889-897.

BUREL, C.; Berthe, T.; Mery, J-C.; Morvan, C.; Balangé, A.P. 1994.- Isoelectric focusing analysis of peroxidase in flax seedlings hypocotyls grown in different light condition. *Plant Physiol. Biochem.* 32: 853-860

CABRERA, H.M. 1994.- Respuestas fisiológicas y metabólicas de la cebada ante la infestación por áfidos. Tesis de Magister, U. de Chile.

CALDERON-BALTIERRA, X.V. 1994.- Changes in peroxidase activity during root formation by *Eucalyptus globulus* shoot raised *in vitro*. *Plant Peroxidase Newslett.* 4: 27-28.

CASSAB, G.; Lin, J-J.; Lin, L-S; Varner, J.E. 1988.- Ethylene effect on extensin and peroxidase distribution in the subapical region of pea epicotyls. *Plant Physiol.* 88: 522-524.

CHILDS, R.E.; Bradsley, W.G. 1975.- The steady-state kinetics of peroxidase with (2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid) as chromogen. *Biochem. J.* 145: 93-103.

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

EDREVA, A.; Salcheva, G.; Georgieva, D. 1993.- Stress damage is related to peroxidase induction in wheat plants. In: *Plant Peroxidase. Biochemistry and Physiology. Proceedings of III International Symposium.* K.G. Welinder, S.K. Rasmussen, C. Penel, H. Greppin (Eds), University of Copenhagen and University of Geneva.

ESAU, K. 1972.- *Plant anatomy.* John Willey & Sons, Inc.; New York. Ediciones Omega S.A. Barcelona

ESNAULT, R.; van Huystee, R.B. 1994.- A new phylogenetic tree but not the last!. *Plant Perox. Newslett.* 3: 7-11.

ESPELIE, K.E.; Franceschi, N.R.; Kolattukudy, P.E. 1986.- Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue. *Plant Physiol.* 81: 487-2

EVERDEEN, D.S.; Defer, S.; Willard, J.J.; Muldoon, P. 1988.- Enzymic cross-linkage of monomeric extensin precursors in vitro. *Plant Physiol.* 87:616-621.

FERRER, M.A.; Pedreño, M.A.; Ros Barceló, A.; Muñoz, R. 1992.- The cell wall localization of two strongly basic isoperoxidases in etiolated *Lupinus albus* hypocotyls and its significance in conyferyl alcohol oxidation and Indole-3-acetic acid catabolism. *J. Plant Physiol.* 39: 611-616.

FRY, S.C. 1979.- Phenolic components of primary cell wall and their possible role in the hormonal regulation of growth. *Planta* 146: 343-351.

- GASPAR, T.; Penel, C.; Castillo, F.J.; Greppin, H.** 1985.- A two step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol. Plant.* 64: 418-423.
- GIJZEN, M.; van Huystee, R.; Buzzell, R.I.** 1993.- Soybean seed coat peroxidase. A comparison of high-activity and low-activity genotypes. *Plant Physiol.* 103: 1061-1066.
- GOLDBERG, R.; Chabanet, A.; Catesson, A.M.** 1993.- Cell wall peroxidase and oxidase activities. In: *Plant Peroxidase. Biochemistry and Physiology. Proceedings of III International Symposium.* K.G. Welinder, S.K. Rasmussen, C. Penel, H. Greppin (Eds), University of Copenhagen and University of Geneva.
- GOLDBERG, R.; Lê, T.; Catesson, A.M.** 1985.- Localization and properties of cell wall enzyme activities related to the final stages of lignin biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 36: 503-510
- GROSS, G.G.; Janse, C.; Elstner, E.F.** 1977.- Involvement of malate, monophenols and superoxide radical in hydrogen peroxide formation by isolated cell wall from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.). *Planta* 136: 271-2276.

- HAMMERSCHMIDT, R.; Nuckles, E.M.; Ku, J. 1982.- Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Plant Path.* 20: 73-82.
- HARVEY, P.J.; Candeias, L.P.; Renzoni, D.; Jones, P.; Wardman, P.; Palmer, J.M. 1993.- Regulation of ligninase catalysis with veratyl alcohol as cofactor. In: *Plant Peroxidase. Biochemistry and Physiology. Proceedings of III International Symposium.* K.G. Welinder, S.K. Rasmussen, C. Penel, H. Greppin (Eds), University of Copenhagen and University of Geneva.
- HISLOP, E.C.; Stahmann, M.A. 1971.- Peroxidase and ethylene production by barley leaves infected with *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiol. Pl. Path.* 1: 297-312.
- HOCHMAN, A. 1993.- The diversity of bacterial hydroperoxidases. In: *Plant Peroxidase. Biochemistry and Physiology. Proceedings of III International Symposium.* K.G. Welinder, S.K. Rasmussen, C. Penel, H. Greppin (Eds), University of Copenhagen and University of Geneva.
- IMBERTY, A.; Goldberg, R.; Catesson, A.M. 1985.- Isolation and characterization of *Populus* isoperoxidase involved in

the last step of lignin formation. *Planta* 164: 221-226.

IIYAMA, K.; Lam, T-T.; Stone, B.A. 1994.- Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.* 104: 315-320.

JACKSON, P.; Ricardo, C.P.P. 1994.- An examination of the peroxidase from *Lupinus albus* L. hypocotyls. *Planta* 194: 311-317.

JENSEN, W.A. 1962.- Botanical histochemistry. W.H. Freeman and Co., San Francisco, CA.

KELLER, B. 1993.- Structural cell wall proteins. *Plant Physiol.* 101: 1127-1130.

KERBY, K.; Scott-Craig, J.S.; Somerville, S.C. 1993.- Characterization of a pathogen-related peroxidase gene from barley. In: *Plant Peroxidase. Biochemistry and Physiology. Proceedings of III International Symposium.* K.G. Welinder, S.K. Rasmussen, C. Penel, H. Greppin (Eds), University of Copenhagen and University of Geneva.

KERBY, K.; Somerville, S.C. 1989.- Enhancement of specific intercellular peroxidase following inoculation of barley with *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiol. Mol. Pathol.*

35: 323-337.

KERBY, K.; Somerville, S.C. 1992.- Purification of an infection-related, extracellular peroxidase from barley. *Plant Physiol.* 100: 397-402.

KOGEL, K-H.; Beckhove, U.; Drescher, J.; Munch, S.; Rommé, Y. 1994.- Acquired resistance in barley. *Plant Physiol.* 106: 1269-1277.

KRZAKOWA, M. 1993.- The significance of cathodal peroxidase in taxonomy of Bryophytes. In: *Plant Peroxidase. Biochemistry and Physiology. Proceedings of III International Symposium.* K.G. Welinder, S.K. Rasmussen, C. Penel, H. Greppin (Eds), University of Copenhagen and University of Geneva.

LAGRIMINI, L.M. 1991.- Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiol.* 96: 577-583.

LAGRIMINI, L.M. 1993.- Analysis of peroxidase function in transgenic plants. In: *Plant Peroxidase. Biochemistry and Physiology. Proceedings of III International Symposium.* K.G. Welinder, S.K. Rasmussen, C. Penel, H. Greppin (Eds),

University of Copenhagen and University of Geneva.

LAGRIMINI, L.M.; Bradford, S.; Rothstein, S. 1990.- Peroxidase-induced wilting in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 2: 7-18.

LAGRIMINI, L.M.; Rothstein, S. 1987.- Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* 84: 438-442.

LESNEY, M.S. 1990.- Effect of "elicitors" on extracellular peroxidase activity in suspension-cultured slash pine (*Pinus elliotti* Engelm.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20: 173-175.

LICHTENTHALER, H.K.; Wellburn, A.R. 1989.- Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. In: 603<sup>rd</sup> Meeting, Biochemical Society Transaction, Liverpool, vol.11: 591-592.

MacADAM, J.; Nelson, C.J.; Sharp, R.E. 1992a.- Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. I. Spatial distribution of ionically bound peroxidase activity

genotypes differing in length of the elongation zone. *Plant Physiol.* 99: 872-878.

MacADAM, J.; Nelson, C.J.; Sharp, R.E. 1992b.- Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. II. Spatial distribution of apoplastic peroxidase activity in genotypes differing in length of the elongation zone. *Plant Physiol.* 99: 879-885.

MacROBBIE, E.A.C. 1991.- Effect of ABA on ion transport and stomatal regulation. In: Abscisic acid. Physiology and biochemistry. Edited by W.J. Davies & H.G. Jones. Bios Scientific Publishers, University of Lancaster, Lancaster LA1 4YQ, UK.

MÄDER, M.; Ungemach, J.; Scholb, P. 1980.- The role of peroxidase isoenzyme groups of *Nicotiana tabacum* in hydrogen formation. *Planta* 147: 467-470.

MARAÑÓN, M.J.R.; van Huystee, R.B.; 1994.- Plant peroxidase: Interaction between their prosthetic groups. Review article N° 95. *Phytochemistry* 37: 1217-1225.

McDOUGALL, G. 1991.- Cell wall-associated peroxidase and lignification during growth of flax fibers. *J. Plant*

Physiol. 139: 182-186.

McDOUGALL, G. 1993.- Covalently bound peroxidase and lignification. In: Plant Peroxidase. Biochemistry and Physiology. Proceedings of III International Symposium. K.G. Welinder, S.K. Rasmussen, C. Penel, H. Greppin (Eds), University of Copenhagen and University of Geneva.

McQUEEN-MASON, S.J.; Cosgrove, D.J. 1995.- Expansin mode of action on cell wall. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation and binding. Plant Physiol. 107: 87-100.

MITCHELL, H.J.; Hall, J.L.; Barber, M.S. 1994.- Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. Plant Physiol. 104: 551-556.

MOHAN, R.; Kolattukudy, P. 1994.- Differential activation of expression of a suberization associated anionic peroxidase gene in near isogenic resistance and susceptible tomato line by elicitors of *Verticillium albo-atrum*. Plant Physiol. 921: 276-280.

O'BRIAN, T.P.; McCully, M.E. 1981.- The study of plant structure: principles and selected methods. Termarphi,

Melbourne, Australia.

PEDREÑO, M.A.; Ferrer, M.A.; Gaspar, T.; Muñoz, R.; Ros Barceló, A. 1995.- The polyfunctionality of cell wall peroxidases avoids the necessity of independent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating system for phenolic coupling in the cell wall. *Plant Perox. Newslett.* 5: 3-9.

PENEL, C.; Greppin, H. 1994.- Binding of plant isoperoxidase to pectin in the presence of calcium. *FEBS Letters* 343: 51-55.

POLLE, A.; Otter, T.; Seifert, F. 1994.- Apoplastic peroxidase and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol.* 106: 53-60

PRASAD, T.; Anderson, M.D.; Stewart, C.R. 1994.- Acclimation, hydrogen peroxide and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiol.* 105: 619-627

PRICE, A.H.; Taylor, A.; Ripley, S.J.; Griffith, A.; Trewavas, A.J.; Knight, M.R. 1994.- Oxidative signals in tobacco increases cytosolic calcium. *Plant Cell* 6: 1301-1310.

**RASMUSSEN, C.B.; Bakovic, M.; Dunford, H.B.; Welinder, K.G.** 1993.- Reaction kinetics of barley peroxidase. In: Plant Peroxidase. Biochemistry and Physiology. Proceedings of III International Symposium. K.G. Welinder, S.K. Rasmussen, C. Penel, H. Greppin (Eds), University of Copenhagen and University of Geneva.

**REESE, J.; Zhang Ma, R.; Black IV, W.** 1992.- Aphid pectinase, cell wall fragments and biotype evolution. In Proc. 8th Int. Symp. Insect-plant Relationships, Dodrecht; Kluwer Acad. Publ. S.B.J. Menkel, J.H. Visser & Harrewign (Eds).

**RIQUELME, A.** 1991.- Respuesta a estrés mecánico en semillas de *Araucaria araucana* (Mol.) Koch. Tesis para optar al título de Bioquímico. Facultad de Ciencias, Universidad de Santiago de Chile.

**RIQUELME, A; Cardemil, L.** 1993.- Peroxidases in the cell wall of seeds and seedlings of *Araucaria araucana*. *Phytochemistry* 32: 15-20.

**ROS BARCELO, A.; Muñoz, R.; Sabater, F.** 1987.- Lupin peroxidase: I. Isolation and characterization of cell wall-bound isoperoxidase activity. *Physiol. Plant.* 71: 448-454.

RUSSO, V.M.; Bushnell, W.R. 1989.- Response of barley cells to puncture by microneedles and to attempted penetration by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Can. J. Bot.* 67: 2912-2921.

SANCHEZ, M.; Revilla, G.; Zarra, I. 1993.- Role of cell wall peroxidase in cessation of growth in pine hypocotyls. In: *Plant Peroxidase. Biochemistry and Physiology. Proceedings of III International Symposium.* K.G. Welinder, S.K. Rasmussen, C. Penel, H. Greppin (Eds), University of Copenhagen and University of Geneva.

SATO, Y.; Sujiyama, M.; Górecki, R.; Fukuda, H.; Komamine, A. 1993.- Interrelationships between lignin deposition and the activities of peroxidase isoenzymes in differentiating tracheary elements of *Zinnia*. *Planta* 189: 584-589.

SCHOPFER, P. 1994.- Histochemical demonstration and localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in organs of higher plants by tissue printing on nitrocellulose paper. *Plant Physiol.* 104: 1269-1275.

SHACKEL, K.; Polito, V.; Ahmadi, H. 1991.- Maintenance of turgor by rapid sealing of puncture wounds in leaf epidermal cells. *Plant Physiol.* 97: 907-912.

SHINMYO, A.; Fujiyama, K.; Kawaoka, A.; Intapruk, C. 1993.- Structure and expression of peroxidase isozyme genes in horseradish and *Arabidopsis*. In: Plant Peroxidase. Biochemistry and Physiology. Proceedings of III International Symposium. K.G. Welinder, S.K. Rasmussen, C. Penel, H. Greppin (Eds), University of Copenhagen and University of Geneva.

SMITH, C.; Rodgers, M.W.; Zimmerlin, A.; Ferdinando, D.; Bolwell, G.P. 1994.- Tissue and subcellular immunolocalization of enzymes of lignin synthesis in differentiating and wounded hypocotyls tissue of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta* 192: 155-164.

STANCA, A.M.; Terzi, V.; Cattivelli, L. 1992.- Biochemical and molecular studies of stress tolerance in barley. In: Barley: Genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology. Edited by Peter R. Shewry. C.A.B. International, Wallingford, Oxon OX10 8DE, UK.

STARK, R.E.; Sohn, W.; Pacchiano, R.; Al-Bashir, M.; Garbow, J. 1994.- Following suberization in potato wound peridermis by histochemical and solid state <sup>13</sup>C-Nuclear magnetic resonance methods. *Plant Physiol.* 104: 527-533.

SUZUKI, K.; Ingold, E.; Sugiyama, M.; Fukuda, H.; Komamine, A. 1992.- Effects of 2,6-dichlorobenzonitrile on differentiation to tracheary elements of isolated mesophyll cells of *Zinnia elegans* and formation of secondary cell walls. *Plant Physiol.* 86: 43-48.

SWOAP, S.; Sooudi, S.K.; Shinkle, J.R. 1993.- Uncorrelated changes in the distribution of stem elongation, tissue extensibility and cell wall peroxidase activity along hypocotyls axes of *Cucumis* seedlings exhibiting different patterns of growth. *Plant Physiol. Biochem.* 31: 361-368.

TAIZ, L. 1984.- Plant cell expansion: Regulation of cell wall mechanical properties. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 585-657.

TARDIEU, F.; Davies, W. 1992.- Stomatal response to abscisic acid is a function of current plant water status. *Plant Physiol.* 98: 540-545.

WALTON, J.D. 1994.- Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol.* 104: 1113-1118

WELINDER, K.G.; Gajhede, M. 1993.- Structure and evolution of peroxidase. In: Plant Peroxidase. Biochemistry and Physiology. Proceedings of III International Symposium. K.G. Welinder, S.K. Rasmussen, C. Penel, H. Greppin (Eds), University of Copenhagen and University of Geneva.

WEYERS, J.; Paterson, N.W.; Fitzsimons, P.J.; Dudley, J.M. 1982.- Metabolic inhibitors block ABA-induced stomatal closure. *J. Exp. Bot.* 33: 1270-1278.

XU, Y.; van Huystee, R.B. 1993.- Association of calcium and calmodulin to peroxidase secretion and activation. *J. Plant Physiol.* 141: 141-146.

ZIESLIN, N.; Ben-Zaken, R. 1993.- Peroxidase activity and presence of phenolic substance in peduncles of rose flowers. *Plant Physiol. Biochem.* 31: 333-339.

ZIMMERLIN, A.; Bolwell, G.P. 1993.- Characterization of a cell wall peroxidase from french bean which synthesizes diferulate *in vitro*. In: Plant Peroxidase. Biochemistry and Physiology. Proceedings of III International Symposium. K.G. Welinder, S.K. Rasmussen, C. Penel, H. Greppin (Eds), University of Copenhagen and University of Geneva.

ZUÑIGA, G.E.; Varanda, E.M.; Corcuera, L.J. 1988.- Effect of gramine on the feeding behavior of the aphids *Schizaphis graminum* and *Rhopalosiphum padi*. *Entomol. exp. appl.* 47: 161-165.

**Apéndice A.** - Contenido relativo de agua. En las infestadas-sanas se eliminaron los áfidos a las 48 hs. de infestación. Valores  $\pm$  error estandar (n=3). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ( $r < 0,05$ ) y letras diferentes indican que hay diferencias significativas ( $r < 0,05$ ).

VARIEDAD	EDAD	TRATAMIENTO		
		CONTROL	INFESTACION	INFES. - SANAS
ARAMIR	7	96,67 $\pm$ 1,03a	97,46 $\pm$ 1,79a	97,46 $\pm$ 1,79a
	7,5	96,50 $\pm$ 1,05a	96,82 $\pm$ 0,95a	98,62 $\pm$ 0,95a
	8	96,28 $\pm$ 1,07a	96,16 $\pm$ 0,93a	96,16 $\pm$ 0,93a
	8,5	96,50 $\pm$ 0,95a	91,95 $\pm$ 0,83b	91,95 $\pm$ 0,83b
	9	96,74 $\pm$ 0,76a	89,27 $\pm$ 1,52b	89,27 $\pm$ 1,52b
	10	95,81 $\pm$ 1,02a	67,55 $\pm$ 1,05c	86,01 $\pm$ 1,30e
	11	95,14 $\pm$ 1,09a	64,51 $\pm$ 1,32c	87,16 $\pm$ 1,48be
	12	94,68 $\pm$ 0,98a	63,67 $\pm$ 1,33c	85,36 $\pm$ 1,62e
	13	94,22 $\pm$ 0,99a	58,04 $\pm$ 1,30d	82,14 $\pm$ 1,97e
LIBRA	7	98,28 $\pm$ 0,85a	96,68 $\pm$ 1,01a	96,68 $\pm$ 1,01a
	7,5	98,06 $\pm$ 0,80a	96,84 $\pm$ 0,64a	96,84 $\pm$ 0,64a
	8	97,56 $\pm$ 0,85a	96,46 $\pm$ 0,77a	96,46 $\pm$ 0,77a
	8,5	96,38 $\pm$ 0,94a	87,41 $\pm$ 0,84b	87,41 $\pm$ 0,84b
	9	95,69 $\pm$ 0,75a	71,40 $\pm$ 1,25c	71,40 $\pm$ 1,25c
	10	96,38 $\pm$ 0,91a	61,25 $\pm$ 1,63d	84,90 $\pm$ 1,23b
	11	95,62 $\pm$ 1,06a	61,82 $\pm$ 2,54d	87,80 $\pm$ 1,03b
	12	94,31 $\pm$ 1,18a	62,54 $\pm$ 2,83d	90,10 $\pm$ 1,60b
	13	93,64 $\pm$ 1,09a	57,50 $\pm$ 2,64e	91,70 $\pm$ 1,92b
FRONTERA	7	97,74 $\pm$ 1,54a	98,70 $\pm$ 1,13a	98,70 $\pm$ 1,13a
	7,5	98,05 $\pm$ 1,05a	98,90 $\pm$ 0,94a	98,90 $\pm$ 0,94a
	8	98,25 $\pm$ 0,85a	99,25 $\pm$ 0,75a	99,25 $\pm$ 0,75a
	8,5	99,01 $\pm$ 1,06a	90,52 $\pm$ 0,77b	90,52 $\pm$ 0,77b
	9	98,68 $\pm$ 1,22a	92,20 $\pm$ 1,23b	92,20 $\pm$ 1,23b
	10	98,58 $\pm$ 1,23a	77,15 $\pm$ 1,51c	93,71 $\pm$ 1,91b
	11	97,21 $\pm$ 0,96a	73,95 $\pm$ 1,58c	94,80 $\pm$ 1,82ab
	12	96,32 $\pm$ 1,21a	72,73 $\pm$ 1,22d	95,43 $\pm$ 1,36ab
	13	95,67 $\pm$ 1,05a	67,50 $\pm$ 1,69e	99,24 $\pm$ 1,07a

Apéndice B.- Potencial hídrico (MPa). En las infestadas-sanas se eliminaron los áfidos a las 48 hs. de infestación. Valores  $\pm$  error estandar (n=3). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ( $r < 0,05$ ) y letras diferentes indican que hay diferencias significativas ( $r < 0,05$ ).

VARIEDAD	EDAD	TRATAMIENTO		
		CONTROL	INFESTACION	INFES. - SANAS
ARAMIR	7	-0,62 $\pm$ 0,11a	-0,62 $\pm$ 0,11a	-0,62 $\pm$ 0,11a
	7,5	-0,58 $\pm$ 0,00a	-0,94 $\pm$ 0,06b	-0,94 $\pm$ 0,06b
	8	-0,58 $\pm$ 0,00a	-0,97 $\pm$ 0,10b	-0,97 $\pm$ 0,10b
	8,5	-0,61 $\pm$ 0,06a	-1,36 $\pm$ 0,10c	-1,36 $\pm$ 0,10c
	9	-0,61 $\pm$ 0,06a	-1,49 $\pm$ 0,12c	-1,26 $\pm$ 0,06c
	10	-0,58 $\pm$ 0,00a	-1,65 $\pm$ 0,10d	-1,20 $\pm$ 0,05c
	11	-0,61 $\pm$ 0,06a	-1,94 $\pm$ 0,10e	-1,27 $\pm$ 0,16c
	12	-0,61 $\pm$ 0,10a	-2,14 $\pm$ 0,19e	-1,37 $\pm$ 0,11c
	13	-0,65 $\pm$ 0,06ab	-2,30 $\pm$ 0,12ef	-1,52 $\pm$ 0,11d
LIBRA	7	-0,65 $\pm$ 0,06a	-0,65 $\pm$ 0,06a	-0,65 $\pm$ 0,06a
	7,5	-0,75 $\pm$ 0,06a	-0,91 $\pm$ 0,15b	-0,91 $\pm$ 0,15b
	8	-0,68 $\pm$ 0,00a	-0,87 $\pm$ 0,09b	-0,87 $\pm$ 0,09b
	8,5	-0,68 $\pm$ 0,00a	-1,26 $\pm$ 0,10c	-1,26 $\pm$ 0,10c
	9	-0,61 $\pm$ 0,06a	-1,28 $\pm$ 0,10c	-1,10 $\pm$ 0,15c
	10	-0,61 $\pm$ 0,06a	-1,26 $\pm$ 0,00c	-0,97 $\pm$ 0,10bc
	11	-0,65 $\pm$ 0,06a	-1,33 $\pm$ 0,06d	-0,84 $\pm$ 0,05b
	12	-0,61 $\pm$ 0,06a	-1,62 $\pm$ 0,12e	-0,84 $\pm$ 0,06b
	13	-0,65 $\pm$ 0,06a	-1,94 $\pm$ 0,12f	-0,87 $\pm$ 0,00b
FRONTERA	7	-0,52 $\pm$ 0,05a	-0,52 $\pm$ 0,05a	-0,52 $\pm$ 0,05a
	7,5	-0,58 $\pm$ 0,06a	-0,84 $\pm$ 0,09b	-0,84 $\pm$ 0,09b
	8	-0,65 $\pm$ 0,06a	-0,78 $\pm$ 0,06b	-0,78 $\pm$ 0,06b
	8,5	-0,61 $\pm$ 0,06a	-0,78 $\pm$ 0,06b	-0,78 $\pm$ 0,06b
	9	-0,58 $\pm$ 0,00a	-0,85 $\pm$ 0,06b	-0,71 $\pm$ 0,06b
	10	-0,55 $\pm$ 0,05a	-0,94 $\pm$ 0,06b	-0,68 $\pm$ 0,06b
	11	-0,55 $\pm$ 0,05a	-1,04 $\pm$ 0,06bc	-0,68 $\pm$ 0,06b
	12	-0,55 $\pm$ 0,05a	-1,42 $\pm$ 0,12d	-0,68 $\pm$ 0,06b
	13	-0,55 $\pm$ 0,05a	-1,68 $\pm$ 0,12d	-0,68 $\pm$ 0,06b

Apéndice C.- Contenido de clorofila (mg/g.P.F.). En las infestadas-sanas se eliminaron los áfidos a las 48 hs. de infestación. Valores  $\pm$  error estandar (n=3). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ( $r < 0,05$ ) y letras diferentes indican que hay diferencias significativas ( $r < 0,05$ ).

TRATAMIENTO					
VARIEDAD	EDAD	CONTROL	INFESTACION	INFES. - SANAS	
ARAMIR	7	17,94 $\pm$ 0,22a	18,08 $\pm$ 0,29a	18,08 $\pm$ 0,29a	
	7,5	17,86 $\pm$ 0,21a	17,89 $\pm$ 0,29a	17,89 $\pm$ 0,29a	
	8	17,63 $\pm$ 0,14a	16,99 $\pm$ 0,28b	16,99 $\pm$ 0,28b	
	8,5	17,35 $\pm$ 0,25a	15,24 $\pm$ 0,23b	15,24 $\pm$ 0,23b	
	9	17,66 $\pm$ 0,23a	14,67 $\pm$ 0,22c	14,67 $\pm$ 0,22b	
	9,5	17,09 $\pm$ 0,28a	14,84 $\pm$ 0,28c	14,84 $\pm$ 0,28b	
	10	17,05 $\pm$ 0,23a	13,81 $\pm$ 0,28d	14,63 $\pm$ 0,31b	
	10,5	16,95 $\pm$ 0,18a	13,79 $\pm$ 0,24d	15,01 $\pm$ 0,29b	
	11	16,85 $\pm$ 0,20a	13,60 $\pm$ 0,29d	15,03 $\pm$ 0,24b	
	12	16,77 $\pm$ 0,24a	11,61 $\pm$ 0,27e	15,01 $\pm$ 0,30b	
	13	16,28 $\pm$ 0,26b	N, D,	15,00 $\pm$ 0,19b	
	LIBRA	7	15,68 $\pm$ 0,18a	15,58 $\pm$ 0,26a	15,58 $\pm$ 0,26a
		7,5	15,62 $\pm$ 0,16a	15,40 $\pm$ 0,26a	15,40 $\pm$ 0,28a
8		15,55 $\pm$ 0,16a	14,40 $\pm$ 0,16b	14,40 $\pm$ 0,16b	
8,5		15,68 $\pm$ 0,17a	14,14 $\pm$ 0,20b	14,14 $\pm$ 0,20b	
9		15,44 $\pm$ 0,10a	11,50 $\pm$ 0,20c	11,50 $\pm$ 0,20c	
9,5		15,33 $\pm$ 0,12a	11,15 $\pm$ 0,20c	12,00 $\pm$ 0,25c	
10		15,28 $\pm$ 0,22a	11,09 $\pm$ 0,27c	14,05 $\pm$ 0,21b	
10,5		15,06 $\pm$ 0,28a	11,08 $\pm$ 0,26c	14,09 $\pm$ 0,21b	
11		14,94 $\pm$ 0,30a	11,40 $\pm$ 0,25c	14,11 $\pm$ 0,22b	
12		14,96 $\pm$ 0,28a	11,04 $\pm$ 0,37c	14,50 $\pm$ 0,21b	
13		14,07 $\pm$ 0,35b	9,06 $\pm$ 0,55d	14,80 $\pm$ 0,33b	
FRONTERA		7	15,86 $\pm$ 0,05a	15,99 $\pm$ 0,15a	15,99 $\pm$ 0,15a
		7,5	15,97 $\pm$ 0,15a	15,88 $\pm$ 0,20a	15,88 $\pm$ 0,20a
	8	16,05 $\pm$ 0,14a	14,85 $\pm$ 0,18b	14,85 $\pm$ 0,18b	
	8,5	16,07 $\pm$ 0,20a	15,17 $\pm$ 0,23b	15,17 $\pm$ 0,23b	
	9	16,04 $\pm$ 0,11a	15,22 $\pm$ 0,31b	15,22 $\pm$ 0,31b	
	9,5	16,08 $\pm$ 0,16a	14,58 $\pm$ 0,28b	15,06 $\pm$ 0,26b	
	10	16,10 $\pm$ 0,19a	13,77 $\pm$ 0,34c	15,22 $\pm$ 0,21b	
	10,5	15,97 $\pm$ 0,22a	13,76 $\pm$ 0,26c	15,40 $\pm$ 0,23b	
	11	15,84 $\pm$ 0,24a	13,71 $\pm$ 0,24c	15,78 $\pm$ 0,17a	
	12	15,94 $\pm$ 0,21a	13,56 $\pm$ 0,36c	15,68 $\pm$ 0,23a	
	13	14,95 $\pm$ 0,23a	10,33 $\pm$ 0,37d	15,75 $\pm$ 0,21a	

Apéndice D.- Actividad peroxidasa en la variedad Aramir. En las infestadas-sanas se eliminaron los áfidos a las 48 hs. de infestación. Valores  $\pm$  error estandar (n=3). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ( $r < 0,05$ ) y letras diferentes indican que hay diferencias significativas ( $r < 0,05$ ). PI, peroxidadas unidas iónicamente a la pared celular; PC, peroxidadas unidas covalentemente a la pared.

PI	TRATAMIENTO			
	EDAD	CONTROL	INFESTADAS	INFES. -SANAS
	7	164,7 $\pm$ 35,7a	165,7 $\pm$ 35,7a	165,7 $\pm$ 35,7a
	7,5	180,8 $\pm$ 30,0a	145,9 $\pm$ 30,0a	145,9 $\pm$ 30,0a
	7,75	161,6 $\pm$ 31,7a	131,4 $\pm$ 32,1a	131,4 $\pm$ 32,1a
	8	174,6 $\pm$ 34,1a	0,0 $\pm$ 0,0b	0,0 $\pm$ 0,0b
	8,5	182,2 $\pm$ 33,5a	267,7 $\pm$ 14,5c	267,7 $\pm$ 14,6c
	9	173,2 $\pm$ 39,3a	378,8 $\pm$ 37,0d	378,8 $\pm$ 37,0d
	10	155,2 $\pm$ 34,5a	817,5 $\pm$ 20,4e	458,9 $\pm$ 38,2d
	11	160,2 $\pm$ 32,4a	850,2 $\pm$ 41,3e	372,7 $\pm$ 41,2d
PC				
	7	369,0 $\pm$ 40,2a	369,0 $\pm$ 40,2a	369,0 $\pm$ 40,2a
	7,5	373,7 $\pm$ 33,6a	74,2 $\pm$ 22,1b	74,2 $\pm$ 22,1b
	7,75	302,7 $\pm$ 39,2a	63,0 $\pm$ 18,2b	63,0 $\pm$ 18,2b
	8	302,8 $\pm$ 25,9a	114,4 $\pm$ 33,9b	114,4 $\pm$ 33,9b
	8,5	250,5 $\pm$ 33,9a	266,0 $\pm$ 45,1a	266,0 $\pm$ 45,1a
	9	131,0 $\pm$ 40,1b	290,2 $\pm$ 30,0a	290,2 $\pm$ 30,0a
	10	83,7 $\pm$ 27,5b	355,9 $\pm$ 36,7a	340,2 $\pm$ 25,7a
	11	80,2 $\pm$ 15,5b	362,5 $\pm$ 33,4a	374,0 $\pm$ 33,4a

**Apéndice E.-** Actividad peroxidasa en la variedad Libra, En las infestadas-sanas se eliminaron los áfidos a la 48 hs. de infestación. Valores  $\pm$  error estandar (n=3). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ( $r < 0,05$ ) y letras diferentes indican que hay diferencias significativas ( $r < 0,05$ ). PI, peroxidasas unidas iónicamente a la pared celular; PC, peroxidasas unidas covalentemente a la pared,

PI	TRATAMIENTO		
	CONTROL	INFESTADAS	INFES. - SANAS
7	886,5 $\pm$ 45,2a	886,5 $\pm$ 45,2a	886,5 $\pm$ 45,2a
7,5	881,0 $\pm$ 42,4a	356,9 $\pm$ 44,2b	356,9 $\pm$ 44,2b
7,75	883,6 $\pm$ 39,6a	354,2 $\pm$ 39,6b	345,2 $\pm$ 39,6b
8	880,0 $\pm$ 50,2a	336,9 $\pm$ 22,5b	336,9 $\pm$ 22,5b
8,5	870,5 $\pm$ 49,9a	312,8 $\pm$ 47,7b	312,8 $\pm$ 47,7b
9	867,5 $\pm$ 54,6a	300,6 $\pm$ 48,9b	300,6 $\pm$ 48,9b
10	854,9 $\pm$ 40,0a	326,7 $\pm$ 52,0b	319,3 $\pm$ 39,7b
11	861,3 $\pm$ 44,6a	318,5 $\pm$ 47,3b	309,0 $\pm$ 42,4b

PC			
7	556,5 $\pm$ 50,2a	556,5 $\pm$ 50,2a	556,5 $\pm$ 50,2a
7,5	568,2 $\pm$ 48,9a	0,0 $\pm$ 0,0b	0,0 $\pm$ 0,0b
7,75	548,9 $\pm$ 45,3a	65,8 $\pm$ 36,6c	65,8 $\pm$ 36,6c
8	568,3 $\pm$ 41,0a	348,3 $\pm$ 49,9d	348,3 $\pm$ 49,9d
8,5	550,7 $\pm$ 46,7a	900,5 $\pm$ 40,2e	900,5 $\pm$ 40,2e
9	551,0 $\pm$ 46,8a	1539,8 $\pm$ 44,6f	1539,8 $\pm$ 44,6f
10	546,1 $\pm$ 45,9a	1623,8 $\pm$ 44,6f	915,7 $\pm$ 43,3e
11	542,0 $\pm$ 44,7a	1702,4 $\pm$ 45,6g	704,5 $\pm$ 40,3e

Apéndice F.- Actividad peroxidasa en la variedad Frontera. En las infestadas-sanas se eliminaron los áfidos a las 48 hs. de infestación. Valores  $\pm$  error estandar (n=3). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ( $r < 0,05$ ) y letras diferentes indican que hay diferencias significativas ( $r < 0,05$ ). PI, peroxidadas unidas iónicamente a la pared celular; PC, peroxidadas unidas covalentemente a la pared.

PI	TRATAMIENTO			
	EDAD	CONTROL	INFESTADAS	INFES. - SANAS
	7	778,9 $\pm$ 45,2a	778,9 $\pm$ 45,2a	778,9 $\pm$ 45,2a
	7,5	780,2 $\pm$ 42,4a	159,1 $\pm$ 44,2b	159,1 $\pm$ 44,2b
	7,75	788,5 $\pm$ 39,6a	100,3 $\pm$ 39,7b	100,3 $\pm$ 39,7b
	8	789,4 $\pm$ 50,2a	83,4 $\pm$ 22,5b	83,4 $\pm$ 22,5b
	8,5	786,8 $\pm$ 49,9a	633,4 $\pm$ 47,7a	633,4 $\pm$ 47,7a
	9	785,3 $\pm$ 54,6a	1691,5 $\pm$ 48,5c	1691,5 $\pm$ 48,5c
	10	764,5 $\pm$ 40,0a	1805,4 $\pm$ 52,0c	1025,6 $\pm$ 39,7d
	11	778,0 $\pm$ 42,0a	1795,0 $\pm$ 49,6c	795,3 $\pm$ 36,5a
PC				
	7	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a
	7,5	0,0 $\pm$ 0,0a	93,7 $\pm$ 23,2b	93,7 $\pm$ 23,2b
	7,75	0,0 $\pm$ 0,0a	202,6 $\pm$ 36,6c	202,6 $\pm$ 36,6c
	8	0,0 $\pm$ 0,0a	242,6 $\pm$ 49,9c	242,6 $\pm$ 49,9c
	8,5	0,0 $\pm$ 0,0a	548,3 $\pm$ 40,2d	548,3 $\pm$ 40,2d
	9	0,0 $\pm$ 0,0a	1557,1 $\pm$ 44,6e	1557,1 $\pm$ 44,6e
	10	0,0 $\pm$ 0,0a	1752,0 $\pm$ 44,6e	649,2 $\pm$ 43,3d
	11	0,0 $\pm$ 0,0a	1804,0 $\pm$ 40,2e	658,2 $\pm$ 42,1d

Apéndice G.- Contenido de fenoles (eq, Fenol/g pared). Valores  $\pm$  error estandar (n=3). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ( $r < 0,05$ ) y letras diferentes indican que hay diferencias significativas ( $r < 0,05$ ).

## Método de Fry (1979)

VARIEDAD	EDAD	TRATAMIENTO	
		CONTROL	INFESTADA
ARAMIR	7	1,59 $\pm$ 0,1a	1,59 $\pm$ 0,1a
	8	1,60 $\pm$ 0,1a	1,64 $\pm$ 0,1a
	9	1,68 $\pm$ 0,1a	2,48 $\pm$ 0,1b
LIBRA	7	2,33 $\pm$ 0,1b	2,33 $\pm$ 0,1b
	8	2,42 $\pm$ 0,1b	3,40 $\pm$ 0,1c
	9	2,51 $\pm$ 0,1b	6,16 $\pm$ 0,1d
FRONTERA	7	1,45 $\pm$ 0,1a	1,45 $\pm$ 0,1a
	8	1,44 $\pm$ 0,1a	3,61 $\pm$ 0,1c
	9	1,51 $\pm$ 0,1a	6,89 $\pm$ 0,1d

## Método Zieslin y Ben-Zaken (1993)

ARAMIR	7	1,45 $\pm$ 0,1a	1,45 $\pm$ 0,1a
	8	1,52 $\pm$ 0,1a	1,68 $\pm$ 0,1a
	9	1,48 $\pm$ 0,1a	2,88 $\pm$ 0,1c
LIBRA	7	2,31 $\pm$ 0,1b	2,31 $\pm$ 0,1b
	8	2,40 $\pm$ 0,1b	3,65 $\pm$ 0,1d
	9	2,59 $\pm$ 0,1b	6,88 $\pm$ 0,1e
FRONTERA	7	2,39 $\pm$ 0,1b	2,39 $\pm$ 0,1b
	8	2,44 $\pm$ 0,1b	4,45 $\pm$ 0,1f
	9	2,61 $\pm$ 0,1b	7,37 $\pm$ 0,1g

**Apéndice H. Índices de correlación ( $p > 0,9$ ,  $r < 0,05$ ).**

**Aramir**

PI infestadas - RWC infestadas	: 0,98
PI inf.-sanas - RWC inf.-sanas	: 0,93
CHL infestadas- PH infestadas	: 0,95
CHL infestadas- RWC infestadas	: 0,98
CHL inf.-sanas- RWC inf.-sanas	: 0,95
PH sanas - RWC sanas	: 0,94
PH infestadas - RWC infestadas	: 0,93

**Libra**

PC infestadas - CHL infestadas	: 0,90
PC infestadas - RWC infestadas	: 0,95
PC inf.-sanas - RWC inf.-sanas	: 0,93
CHL infestadas- PH infestadas	: 0,91
CHL infestadas- RWC infestadas	: 0,90
PH sanas - RWC sanas	: 0,93
PH infestadas - RWC infestadas	: 0,94

**Frontera**

PI infestadas - PC infestadas	: 0,93
PC infestadas - RWC infestadas	: 0,91
PI inf.-sanas - RWC inf.-sanas	: 0,91
CHL infestadas- PH infestadas	: 0,96
CHL inf.-sanas- PH inf.-sanas	: 0,95
PH sanas - RWC sanas	: 0,91
PH infestadas - RWC infestadas	: 0,93