

**Efecto de los
ácidos hidroxámicos del trigo sobre
la alimentación
de áfidos de los cereales**

**Tesis
presentada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Química**

Facultad de Ciencias

por

Arturo E. Givovich Hernández

Director de Tesis: Dr. Hermann Niemeyer M.

1993

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Posgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el Candidato

ARTURO EUGENIO GIVOVICH HERNANDEZ

ha sido aprobada por la Comisión informante de Tesis como parte de los requisitos para optar al Grado de Doctor en Ciencias con Mención en Química.

Director de Tesis:

Dr. Hermann Niemeyer M.

Comisión informante:

Dr. Jaime Apablaza

Dr. Bruce Cassels

Dr. Fernando Castañeda

Dr. Luis Corcuera

Dra. Luz María Pérez

Dr. Mario Silva

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos al Dr. Herman Niemeyer Marich, quien con su apoyo y dirección en el desarrollo de esta Tesis ha contribuido enormemente a mi formación científica.

El apoyo del plantel de académicos del Laboratorio de Química Ecológica, Sylvia Copaja, Héctor Bravo y Francisco Pérez es ampliamente agradecido.

Agradezco también al Prof. Jan Pettersson de la Universidad de Ciencias Agrícolas de Suecia y al Dr. Freddy Tjallingii de la Universidad Agrícola de Wageningen, Holanda, quienes contribuyeron enormemente a mi formación entomológica.

Deseo dar mi mayor reconocimiento a la asistencia técnica de Lucía Muñoz, Patricia Muñoz y Alison Soriano.

Agradezco también al IPICS (International Program in the Chemical Sciences), por la beca obtenida para viajar a Suecia, por financiar mi estadía en Holanda y por el apoyo económico prestado durante el desarrollo de mi doctorado.

El apoyo financiero directo para el desarrollo de esta Tesis fue debido a proyectos de FONDECYT (90-029), DTI (91-029) e IFS (C/1448-1 y C/1448-2). Esta Tesis también es o ha sido parte de macroproyectos apoyados por IPICS, AID, CEE, SAREC y FONDECYT.

También, quiero agradecer el apoyo y compañerismo de los ahora integrantes del laboratorio Claudia C., Claudia L., Luisa, Paola, Carlos, Luis, Jorge.

Los he dejado para el final, porque quiero destacar y reconocer el apoyo desinteresado de mis mejores amigos y colegas Liliana, Victoria y Andrés.

A mis amadas esposa e hijas

Roxana

Nadine

y

Melissa

INDICE

	pág.
Lista de Figuras	iii
Lista de tablas	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	ix
INTRODUCCION	1
Algunos antecedentes de los ácidos hidroxámicos relacionados con la resistencia de gramíneas a insectos	2
Acción de los ácidos hidroxámicos sobre áfidos de los cereales	6
OBJETIVOS	11
MATERIALES Y METODOS	12
Plantas	12
Afidos	12
Obtención de estándares y cuantificación de ácidos hidroxámicos en distintos medios	13
Experimentos de elección	14
Estudio de comportamiento de áfidos en dieta y en plantas	16
Influencia de los ácidos hidroxámicos en la transmisión del virus del enanismo amarillo de la cebada (VEAC).	20
Presencia de ácidos hidroxámicos en la mielcilla de <i>R. padi</i> alimentado en trigo	22

Presencia de ácidos hidroxámicos en la savia floemática de cultivares de trigo	22
RESULTADOS	26
Pruebas de elección de <i>R. padi</i> en trigos	26
Estudio preliminar del comportamiento de <i>R. padi</i> en trigos	26
Prueba de transmisión de VEAC portado por <i>R. padi</i> a trigos	29
Presencia de ácidos hidroxámicos en la mielcilla de <i>R. padi</i> alimentándose en trigo	29
Presencia de ácidos hidroxámicos en la savia floemática de trigo	33
Estudio detallado del comportamiento de <i>R. padi</i> en trigos	33
Influencia de los ácidos hidroxámicos sobre el comportamiento de distintas especies de áfidos de los cereales alimentándose en trigo	36
Influencia de los ácidos hidroxámicos sobre el comportamiento de distintas especies de áfidos de los cereales alimentándose en dietas artificiales	43
DISCUSION	46
CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFIA	59
APENDICE A	67
Publicaciones derivadas de esta tesis	67
APENDICE B	69
Lista de presentaciones a congresos	69

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Estructuras de los ácidos hidroxámicos y compuestos relacionados	3
Fig. 1. Diagrama de la prueba de elección de <i>R. padi</i> en trigos	15
Fig. 2. Diseño experimental del método de gráficos de electropenetración (EPG) para estudiar el comportamiento alimentario de <i>R. padi</i> en trigo.	17
Fig. 3. Clasificación de las diferentes ondas obtenidas en el registro de las señales emitidas por el método EPG.	18
Fig. 4. Secuencia experimental para probar la influencia de los ácidos hidroxámicos en el proceso de transmisión viral por parte de <i>R. padi</i> .	21
Fig. 5. Sistema de colección de mielcilla de <i>R. padi</i> alimentándose en trigo.	23
Fig. 6. Método de microcauterización para obtener savia floemática desde estiletes amputados de áfidos.	25
Fig. 7. Habilidad de <i>R. padi</i> para llegar al floema y para inocular BYDV plantas de trigo con diferentes concentraciones de ácidos hidroxámicos.	31
Fig. 8. A) Producción de mielcilla y B) comportamiento de la concentración de DIMBOA-glucósido en la mielcilla con la variación de la concentración de ácidos hidroxámicos en las plantas.	32
Fig. 9. Determinación y comprobación de la presencia del glucósido de DIMBOA en la savia floemática de trigo.	34

Fig. 10.	Concentración del glucósido de DIMBOA en la savia floemática de plántulas de trigos con distinta concentración total de ácidos hidroxámicos.	35
Fig. 11.	Efecto de la concentración de ácidos hidroxámicos en plántulas de trigo sobre el tiempo para llegar al floema que toman diferentes especies de áfidos de los cereales.	39
Fig. 12.	Efecto de la concentración de ácidos hidroxámicos en plántulas de trigo sobre el tiempo de ingestión xilemática que toman diferentes especies de áfidos de los cereales.	40
Fig. 13.	Sensibilidad de las diferentes especies de áfidos de los cereales a los ácidos hidroxámicos presentes en plántulas de trigo.	41
Fig. 14.	Promedios del tiempo de ingestión floemática de las diferentes especies de áfidos de los cereales alimentándose en trigo.	42
Fig. 15.	Reacción de las diferentes especies de áfidos de los cereales a la presencia del glucósido de DIMBOA en dieta artificial.	44
Fig. 16.	Reacción de las diferentes especies de áfidos de los cereales a la presencia de DIMBOA en dieta artificial.	45

LISTA DE TABLAS

		pág.
Tabla 1.	Distribución de <i>R. padi</i> en trigos con diferentes contenidos de ácidos hidroxámicos.	27
Tabla 2.	Efecto de los ácidos hidroxámicos en trigo sobre el comportamiento alimentario de <i>R. padi</i> .	28
Tabla 3.	Efecto de los ácidos hidroxámicos en trigo en la transmisión de VEAC por <i>R. padi</i> .	30
Tabla 4.	Efecto de los ácidos hidroxámicos en las actividades de alimentación de <i>R. padi</i> en trigo.	37

RESUMEN

Los metabolitos secundarios están frecuentemente involucrados en la defensa de la planta contra herbívoros. El trigo contiene ácidos hidroxámicos (Hx), una familia de compuestos que juega un papel en la defensa de plántulas de trigo contra los áfidos de los cereales. Los Hx se encuentran en la planta intacta como glucósidos, siendo el más abundante en plántulas de trigo la 2-β-O-D-glucopiranosil-4-hidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona (DIMBOA-glucósido).

Pruebas de doble elección mostraron que el áfido *Rhopalosiphum padi* prefirió permanecer en hojas de trigo con bajas concentraciones de Hx. Los gráficos de electropenetración (EPG) mostraron que los individuos de *R. padi* necesitaron mayor tiempo para alcanzar el floema en plántulas con concentraciones altas de Hx. Áfidos virulíferos portadores del virus del enanismo amarillo de la cebada (VEAC) infestaron una proporción menor de plántulas de trigo, cuando éstas presentaban contenidos más altos de Hx.

Muestras de mielcilla obtenidas de áfidos alimentados en plántulas de trigo contenían DIMBOA-glucósido. No se detectaron ni agluconas de Hx, ni productos de su descomposición. Tanto la producción de mielcilla como la concentración de DIMBOA-glucósido en la mielcilla siguieron curvas bifásicas cuando se las graficó *vs.*

la concentración de Hx de las plántulas de trigo. Las curvas bifásicas sugirieron una ingestión pasiva del DIMBOA-glucósido desde el floema a bajas concentraciones de Hx en las plántulas y una ingestión limitada de Hx a altas concentraciones de Hx en las plántulas, probablemente debido al efecto antialimentario de los Hx presentes en las células del mesófilo.

La savia floemática de trigo obtenida a través de estiletes amputados de áfidos también contenía DIMBOA-glucósido, confirmándola como la principal fuente del Hx en la mielcilla. Los valores de la concentración de Hx en el floema no se correlacionaron con la concentración de Hx en toda la planta. Más aún, las concentraciones de Hx en la savia floemática fueron más bajas que las necesarias para producir el efecto antialimentario.

Un análisis detallado del comportamiento alimentario de *R. padi* en trigo mostró que durante la búsqueda del floema por el áfido, la proporción de incursiones intracelulares fue menor en plántulas con mayores concentraciones de Hx, probablemente como resultado de eludir los Hx de las células del mesófilo.

Estudios comparativos sobre el comportamiento alimentario de cinco especies de áfidos de los cereales, *R. padi*, *R. maidis*, *Schizaphis graminum*, *Sitobion avenae*, y *Metopolophium dirhodum*, mostraron correlaciones lineales negativas entre los tiempos de ingestión en dietas y la concentración de Hx en ellas. Además, se obtuvo correlaciones lineales positivas entre el tiempo que los áfidos toman para llegar al floema en plántulas de trigo y la concentración de Hx en ellas. Las pendientes de las

correlaciones en plantas permitieron agrupar las especies de áfidos como: muy sensibles (*R. padi*, *S. avenae* y *S. graminum*), sensibles (*M. dirhodum*) e insensibles (*R. maidis*) a la presencia de Hx en las plántulas de trigo. Un orden opuesto fue encontrado cuando las sensibilidades a Hx en dietas fueron comparadas. Las diferencias entre los órdenes de sensibilidad a los Hx en plantas y en dietas sugirió diferencias en la estrategia alimentaria de las especies en plantas de trigo.

ABSTRACT

Plant secondary metabolites are frequently involved in the defence of the plant against herbivores. Wheat contains hydroxamic acids (Hx), a family of compounds which plays a role in the defence of wheat seedlings against cereal aphids. Hx occur as glucosides in the intact plant. The most abundant Hx glucoside in wheat seedlings is 2- β -O-D-glucopyranosyl-4-hydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA-glucoside).

Dual choice tests showed that the aphid *Rhopalosiphum padi* preferred to settle on wheat leaves with lower Hx concentrations. Electropenetration graphs (EPG) showed that individuals of *R. padi* feeding on seedlings with higher Hx concentrations needed longer time periods to contact a phloem vessel. Viruliferous *R. padi* carrying the barley yellow dwarf virus (BYDV) infected a lower proportion of wheat seedlings when they contained higher Hx concentrations.

Honeydew samples obtained from aphids feeding on wheat seedlings contained DIMBOA-glucoside. Neither Hx aglucones nor breakdown products of them were found. Both honeydew production and concentration of DIMBOA-glucoside in the honeydew followed biphasic curves when plotted against the Hx concentration of the wheat seedlings. The biphasic curves suggested aphid passive ingestion of DIMBOA-glucoside from phloem at low seedling Hx concentrations, and a limited ingestion of Hx

glucoside from phloem at low seedling Hx concentrations, and a limited ingestion of Hx at high Hx concentration in seedlings, presumably due to feeding deterrence of Hx in mesophyll cells.

Wheat phloem sap obtained from excised aphid stylets also contained DIMBOA-glucoside, confirming phloem sap as the main source of Hx in aphid honeydew. Values of Hx concentration in the phloem did not correlate with Hx concentration in the whole plant. Moreover, Hx concentrations in the phloem sap were lower than needed to evoke a feeding deterrent effect.

A detailed EPG analysis of the feeding behavior of *R. padi* in wheat showed that during the search for phloem, the proportion of intracellular punctures was lower in seedlings with higher Hx concentration, presumably reflecting avoidance of Hx present in the mesophyll cells.

Comparative EPG studies on the feeding behavior of five cereal aphid species, *R. padi*, *R. maidis*, *Schizaphis graminum*, *Sitobion avenae*, and *Metopolophium dirhodum*, showed negative linear correlations between ingestion times in diets and Hx concentration in the diets. Furthermore, positive linear correlations were obtained between the time that aphids take to reach the phloem in wheat seedlings and Hx concentrations in the seedlings. Slopes for correlations in plants allowed the grouping of aphid species as very sensitive (*R. padi*, *S. avenae* and *S. graminum*), sensitive (*M. dirhodum*) and non-sensitive (*R. maidis*) to Hx present in wheat seedlings. An opposite order was found when sensitivities in diets were compared. The difference in the order

of sensitivities to Hx in plants and in diets suggested different feeding strategies of these species in wheat plants.

INTRODUCCION

Los metabolitos secundarios en plantas han sido vinculados con la interacción de las plantas que los poseen con otros organismos del ecosistema. Aquellos metabolitos secundarios que tienen acción deletérea sobre insectos pueden jugar un papel importante en el control de las poblaciones de estos organismos, lo que tendría relevancia económica y ecológica en el caso de insectos que atacan plantas de cultivo. La eventual utilización de esta defensa natural, permitiría la disminución de las aplicaciones de insecticidas sintéticos, los cuales, además de caros, constituyen un reconocido foco de contaminación progresiva para el planeta.

Entre los insectos que son plagas agronómicas están algunas especies de pulgones o áfidos (Homoptera: Aphididae). Los áfidos producen daño a las plantas de diferentes maneras: i) se alimentan normalmente de la savia floemática, disminuyendo así la nutrición de la planta; ii) algunas especies de áfidos pueden inyectar toxinas dentro del tejido foliar durante la salivación; iii) ya que el contenido de carbohidratos de la savia floemática sobrepasa la demanda nutricional de estos insectos, el excedente es eliminado por la excreta, la mielcilla, facilitando el establecimiento de organismos patógenos, tales

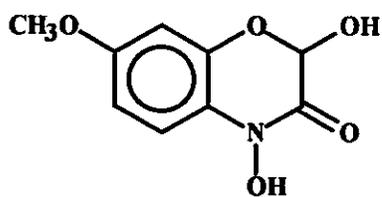
como hongos y bacterias (Schepers, 1989); iv) también pueden ser vectores de enfermedades virales.

Existen diversos ejemplos de metabolitos secundarios importantes en las relaciones entre áfidos y plantas (Niemeyer, 1992). Uno de los ejemplos mejor descritos es el de las 4-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-onas, presentes en cereales, que contienen en sus estructuras la función ácido hidroxámico y que en adelante se designan como Hx (Niemeyer, 1988).

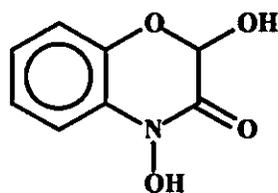
La presencia de estos compuestos en las plantas y el efecto que tienen sobre los áfidos permiten postularlos como potenciales controladores naturales de ellos, pudiendo, al ser incorporados en programas de control integrado de plagas, ayudar a prevenir que las poblaciones de áfidos alcancen niveles dañinos.

Algunos antecedentes de los ácidos hidroxámicos de las gramíneas relacionados con la resistencia de éstas a insectos

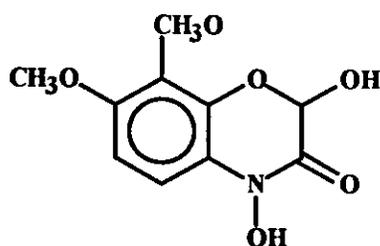
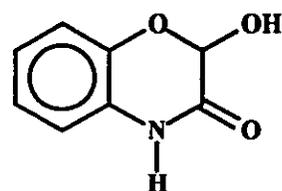
Los Hx fueron descubiertos en plantas de la familia Gramineae durante los años 50, debido a que algunas líneas de centeno presentaban resistencia al ataque de enfermedades fúngicas (Virtanen y Hietala, 1955a; 1955b). Luego fueron encontrados en otros cereales, como trigo y maíz (Virtanen y col., 1956). Primeramente se consideró que los responsables de la actividad biológica eran compuestos de la familia de las 2(3)-benzoxazolinonas, pero después de cuidadosos estudios fitoquímicos se determinó que estas últimas eran productos de descomposición de los Hx (Virtanen y Hietala, 1959;



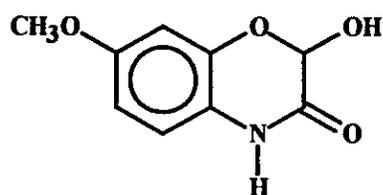
1 (DIMBOA)



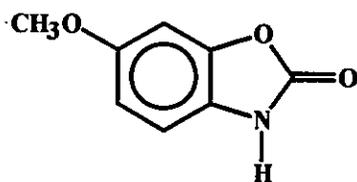
2 (DIBOA)

3 (DIM₂BOA)

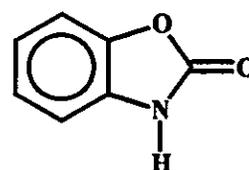
4 (HBOA)



5 (HMBOA)



6 (MBOA)



7 (BOA)

Wahlroos y Virtanen, 1959). Se determinó también que los Hx se encontraban en forma natural como glucósidos, los cuales eran hidrolizados por la acción de endo- β -glucosidasas y luego las agluconas, por un proceso no enzimático, se descomponían a las benzoxazolinonas (Virtanen y Hietala, 1959; Hofman y Hofmanova, 1969).

Por otro lado, se asoció la presencia de estos compuestos en algunas líneas de maíz a su resistencia hacia el taladrador europeo del maíz, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) (Beck y Stauffer, 1957). Por esta razón se desarrollaron programas de mejoramiento de maíz, que eventualmente condujeron a cultivares con niveles altos de Hx que eran resistentes al ataque de la primera generación del taladrador (Guthrie y col., 1986; Grombacher y col., 1989).

Los Hx han sido encontrados en diferentes especies pertenecientes a las Gramineae (Copaja y col., 1991; Barria y col., 1992; Niemeyer y col., 1992). Entre los cereales, el principal Hx presente en maíz y en trigo es la 2- β -D-O-glucosil-4-hidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona, cuya hidrólisis enzimática conduce a la 2,4-dihidroxy-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona **1** (DIMBOA). En centeno se encuentra el glucósido del compuesto desmetoxilado **2** (DIBOA). El Hx dimetoxilado **3** (DIM₂BOA) ha sido encontrado sólo en maíz (Klun y col., 1970; Woodward y col., 1979).

Las concentraciones de Hx varían de acuerdo a la edad de la planta. No están presentes en los frutos de los cereales (Argandoña y col., 1980), pero aparecen con la germinación, alcanzando un nivel máximo pocos días después. Posteriormente el

contenido decrece (Klun y Robinson, 1969; Argandoña y col., 1981). Estos compuestos se encuentran tanto en la parte aérea como en las raíces (Argandoña y col., 1981). La concentración de Hx varía dentro de una misma planta en las diferentes hojas, siempre concentrándose en la hoja más joven (Argandoña y col., 1981; Thackray y col., 1990). A nivel de tejidos foliares, se ha determinado su presencia en protoplastos del mesófilo y en los haces vasculares, pero no fueron detectados ni en la epidermis ni en la savia xilemática (Argandoña y Corcuera, 1985; Argandoña y col., 1987).

La biosíntesis de los Hx comparte sus primeras etapas con la ruta del triptófano (Tipton y col., 1973). Luego de formado el precursor tipo lactama 4 (HBOA), la secuencia está poco clara. Se observó que al alimentar plántulas de maíz con 4 con marca radioactiva, la marca era incorporada rápidamente en el DIBOA, más lentamente en el precursor 5 (HMBOA) y más lentamente aún en el DIMBOA. El análisis fitoquímico de extractos de plantas de maíz hechos en condiciones que desnaturaban las enzimas llevó a concluir que los Hx y los precursores 4 y 5 se encuentran probablemente como glucósidos (Hofman y Hofmanova, 1969). De esta manera, se propuso una ruta que partiría con la glucosilación de 4 y que terminaría con la síntesis independiente de 1 y 2 (Niemeyer, 1988). Posteriormente, se determinó que las agluconas de 1 y 2 se encuentran naturalmente en cultivo de tejidos y tejidos no diferenciados de trigo, donde no se encontraría actividad β -glucosidásica, lo que mantiene en pie la controversia acerca de la secuencia biosintética de los Hx-glucósidos (Zúñiga y Massardo, 1991).

Los Hx 1 y 2 se descomponen mayoritariamente a las benzoxazolinonas 6 (MBOA) y 7 (BOA) con liberación de ácido fórmico (Brendenberg y col., 1962; Copaja y col., 1986; Bravo y Niemeyer, 1986). Se ha determinado que altos valores del pH del medio y solventes básicos incrementan la velocidad de la reacción y el rendimiento de la benzoxazolinona (Bravo y Niemeyer, 1986).

Para explicar bioquímicamente la actividad biológica de los Hx, se ha estudiado su reactividad con tioles y aminas (Pérez y Niemeyer, 1985; Pérez y Niemeyer, 1989a), ejemplos de residuos nucleofílicos en enzimas. Posteriormente se observó que el DIMBOA inactivaba enzimas proteolíticas, tales como la papaína y la α -quimotripsina (Pérez y Niemeyer, 1989b; Cuevas y col., 1990), cuyos sitios activos presentan residuos nucleofílicos de gran actividad. También se ha observado que los Hx interfieren en sistemas enzimáticos de áfidos tales como las glutatión S-transferasas (Leszczynski y col., 1992), UDP-glucosa transferasas (Leszczynski y Dixon, 1992) y colinesterasas (Cuevas y Niemeyer, 1993).

Acción de los Hx sobre áfidos de los cereales

Existen varias especies de áfidos que infestan los cereales en Chile (Carter y col., 1980), entre las que *Rhopalosiphum padi* (L.), *Rhopalosiphum maidis* (Fitch), *Metopolophium dirhodum* (Walker), *Sitobion avenae* (Fabricius), *Schizaphis graminum* (Rondani) y *Diuraphis noxia* (Mordvilko) son actualmente consideradas las especies de

mayor importancia. La importancia relativa de las especies depende de condiciones climáticas generales y de su variación anual (Conti y col., 1990).

El daño que provocan los áfidos en los cultivos depende de la especie de insecto. Algunas especies se desarrollan en forma explosiva y los niveles poblacionales que alcanzan reducen las posibilidades de sobrevivencia de las plantas atacadas. En cambio, otras especies inyectarían toxinas cuando salivan durante su alimentación, como es el caso de *S. graminum* y *D. noxia*, lo que se traduciría en necrosis acelerada de las hojas aumentando el daño que los áfidos provocan por el hecho de alimentarse de la planta.

Otro origen de daño asociado al ataque de los áfidos es la transmisión viral. En cereales, uno de los virus de mayor importancia es el del enanismo amarillo de la cebada (VEAC). La fuente de esta enfermedad se encuentra en gramíneas silvestres tolerantes al virus, en las que es difícil determinar la presencia del VEAC debido a la carencia de síntomas (Eagling y col., 1989; Conti y col., 1990). La capacidad de los áfidos de alternar entre éstas y los cultivos de cereales permite la propagación de la enfermedad entre estos últimos. Se ha determinado que el VEAC requiere para ser transmitido que el áfido se alimente del floema (Scheller y Shukle, 1986), lo cual significa que el insecto debe permanecer en la planta con su estilete insertado en el tejido foliar buscando el tejido floemático por un cierto tiempo (Power y col., 1991).

La posibilidad de controlar efectivamente las poblaciones de áfidos de los cereales por métodos ambientalmente limpios ha recibido mucha atención. El control biológico de los áfidos mediante la introducción de enemigos naturales, ha sido de gran

éxito en Chile, ya que ha permitido una notable baja en las poblaciones de los áfidos de los cereales (Zúñiga, 1986). Aunque este método es efectivo en nuestro país, no lo ha sido en otras partes del mundo, requiriéndose otros medios de control para estos insectos. Por otro lado, el daño provocado por el VEAC prevalece en algunas regiones de Chile, ya que no se requieren grandes poblaciones de áfidos para que la propagación del VEAC sea efectiva (Herrera y Quiroz, 1988; Ramírez, 1990; Quiroz, 1990). Un método complementario al control biológico es la utilización de líneas de cultivo de cereales resistentes al ataque de áfidos.

La presencia de Hx en trigo y la acción que estos compuestos muestran en contra de los áfidos, los hace ideales como factores de resistencia natural.

El primer trabajo que relacionó la presencia de los Hx con la resistencia hacia áfidos fue uno de Long y col. (1977). En este trabajo se describió una correlación inversa entre poblaciones del áfido *R. maidis* y el contenido de Hx en diversas líneas de maíz. Similar resultado fue obtenido más adelante por Beck y col. (1983).

En estudios con *S. graminum*, se observó que al alimentar los áfidos con dietas artificiales a las que se adicionaron cantidades crecientes de Hx, la mortalidad de los insectos aumentaba a medida que aumentaban los Hx, pero pasado cierto valor de concentración la mortalidad comenzaba a disminuir (Argandoña y col., 1983). La explicación de este comportamiento se basó en que estos compuestos tendrían dos efectos sobre los áfidos. A bajas concentraciones, los Hx serían ingeridos pasivamente por los áfidos y los insectos morirían intoxicados por su efecto antibiótico; a

concentraciones mayores de Hx, los áfidos se alimentarían menos desde la dieta debido al efecto antixenótico de los Hx, lo que conduciría a su mayor sobrevivencia en relación a las dietas con bajas concentraciones de Hx (Argandoña y col., 1983). Las agluconas de los Hx son más activas que los glucósidos, ya que las primeras actúan a menores concentraciones (Corcuera y col., 1985). Estudios comparativos con *R. maidis*, *M. dirhodum* y *S. graminum* mostraron que el efecto antibiótico de los Hx lo sufrían con distinta intensidad las distintas especies de áfidos (Corcuera y col., 1982).

El efecto de los Hx presentes en las plantas ha sido demostrado con *R. maidis* en maíz (Long y col., 1977; Beck y col., 1983), y con *M. dirhodum* en trigo (Argandoña y col., 1980). La antibiosis sobre *S. avenae* y *R. padi* observada en distintos cultivares de trigo ha sido explicada en alto porcentaje por la presencia de Hx en ellas (Bohidar y col., 1986; Thackray y col., 1990). Sin embargo, no existen pruebas directas de que los Hx son encontrados por los áfidos cuando buscan dentro de la hoja el tejido floemático con su estilete. Se ha encontrado DIMBOA en el cuerpo de individuos de *S. avenae* alimentados sobre trigos (Niemeyer y col., 1989b). Al graficar el contenido de Hx en el cuerpo vs. el de la planta se observó un patrón bifásico, al igual que lo observado en dietas (Argandoña y col., 1983) y la explicación dada a dicho comportamiento es análoga. A baja concentración de Hx en la planta, los áfidos ingerirían pasivamente los Hx, pero pasada cierta concentración percibirían el efecto antialimentario, lo que se traduciría en una menor ingesta, y la disminución de la concentración en los áfidos. El encontrar Hx en el cuerpo de los áfidos puede significar

que estos compuestos circulan por el floema, ya que es el substrato de alimentación preferencial de estos insectos.

El efecto antialimentario de los Hx en plantas, podría ser un factor crucial en la aceptación por parte de los áfidos del substrato como fuente de alimentación (Niemeyer, 1992).

La presencia de factores antialimentarios que afectan al áfido vector pueden interferir con el proceso de transmisión de virus (Plumb, 1983). Debido a que los Hx se encuentran, entre otros tejidos, en las células del mesófilo de la hoja de trigo (Argandoña y col., 1987) y que el VEAC requiere para ser transmitido que el estilete del vector alcance el floema (Scheller y Shukle, 1986), es posible sugerir que los Hx al actuar sobre los áfidos podrían disminuir la transmisión de virus (Griffiths y col., 1989).

Ya que las distintas especies de áfidos de los cereales muestran susceptibilidades distintas al efecto antibiótico de los Hx (Corcuera y col., 1982), se plantea el problema de evaluar el efecto antialimentario de los Hx sobre las distintas especies, tanto en dietas artificiales como en plantas.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis fue evaluar si el efecto antialimentario de los Hx hacia los áfidos demostrado en dietas artificiales, se manifestaba en las plantas que los contienen. Para ello se propuso:

- i) Observar el efecto de los Hx en la elección del áfido *R. padi* entre líneas de cultivo de trigo con distintas concentraciones de Hx.
- ii) Estudiar la influencia de los Hx en la planta sobre el comportamiento en la alimentación de esta especie.
- iii) Evaluar la participación del efecto antialimentario de los Hx en plantas de trigo en la transmisión a ellas del VEAC
- iv) Determinar si los Hx forman parte de la ingesta de estos áfidos, mediante el análisis de la mielcilla que producen los insectos y el de la savia floemática del trigo donde ellos se alimentan.
- v) Estudiar comparativamente el comportamiento de distintas especies de áfidos de los cereales alimentándose tanto en trigos como en dietas artificiales que contenían cantidades crecientes de Hx.

MATERIALES Y METODOS

Plantas

Se utilizaron en general seis líneas de cultivo de trigo hexaploide (*Triticum aestivum* L., cvs. Platifén, Millaleu, Mexifén, Nobo, Anza y Maitén). Estas fueron elegidas porque contenían diferentes concentraciones de Hx. Las semillas fueron obtenidas del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) gracias a la gentileza del Dr. Ignacio Ramírez y de la Sra. Mireya Zerené. Los experimentos se realizaron con plántulas en el estado de una hoja (código decimal 10) (Zadoks y col., 1974; Tottman y col., 1979), estado en el cual la planta presenta su máxima concentración de Hx (Argandoña y col., 1981).

Afidos

Se trabajó con cinco especies de áfidos: *M. dirhodum*, *R. padi*, *R. maidis*, *S. graminum* y *S. avenae*. Cuatro de éstas fueron recolectadas en campos de trigo en La Platina, INIA, Santiago. Para comenzar el desarrollo de las colonias, se colectaron tan sólo unos pocos individuos, y desde una misma planta, con el objeto de disminuir la posibilidad de tener más de un biotipo de áfido en ellas. En el caso de *S. graminum*, los

individuos que generaron la colonia fueron provistos por el profesor V.H. Argandoña (Facultad de Ciencias, Universidad de Chile). Estos pertenecían al biotipo C (Zúñiga y col., 1989). Las colonias de áfidos fueron mantenidas en plantas de avena (*Avena sativa* L. cv. Nahuén) dentro de jaulas de malla en una pieza de crianza a 22 ± 3 °C, manteniendo un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Los áfidos usados en los experimentos eran hembras adultas ápteras que diferían en edad a lo más en 24 horas.

Los estudios más detallados fueron realizados con *R. padi*, debido a que ésta es una de las especies que transmiten VEAC en Chile (Herrera y Quiroz, 1988).

Obtención de estándares y cuantificación de Hx en distintos medios

Por ser el principal Hx en trigo, se trabajó exclusivamente con el DIMBOA y su glucósido. El estándar de DIMBOA fue obtenido a partir de extractos etéreos de maíz (*Zea mays* L.; cv. T129) mediante un método ya descrito (Queirolo y col., 1983). El estándar de DIMBOA-glucósido fue obtenido de la manera informada por Lyons y col. (1988). Las concentraciones de estos compuestos fueron determinadas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) usando un programa de gradientes ya descrito (Niemeyer y col., 1989a). La presencia de Hx en extractos de plantas, en savia floemática y en la mielcilla de áfidos, fue determinada por comparación con muestras auténticas. Para confirmar que el compuesto presente en la mielcilla y la savia floemática era el DIMBOA-glucósido y no algún otro compuesto con tiempo de

retención coincidente en el programa HPLC, se consideraron las propiedades bioquímicas (Cuevas y col., 1992) y químicas (Bravo y Niemeyer, 1986) de los Hx. Así, la muestra problema se sometió a la acción de un extracto enzimático activo de trigo, preparado como está descrito (Cuevas y col., 1992), llevándose a cabo la hidrólisis para pasar del glucósido a la aglucona. El producto obtenido de la muestra problema se comparó por HPLC con el obtenido del estándar de DIMBOA-glucósido con el extracto enzimático. Ambos productos fueron llevados en forma independiente a pH 9 y mantenidos a 80°C durante una hora, con el objeto de descomponer el DIMBOA principalmente a MBOA (Bravo y Niemeyer, 1986). Los productos de cada reacción fueron comparados por HPLC.

Experimentos de elección

Las hojas de dos cultivares de trigo que crecían en macetas separadas fueron colocadas en una cápsula tipo "clip" con cuatro individuos de *R. padi* (Fig. 1). Seis horas después, la distribución de áfidos entre las plantas fue registrada. Cada experimento consistió en 22 cápsulas. Los experimentos fueron realizados en duplicado.

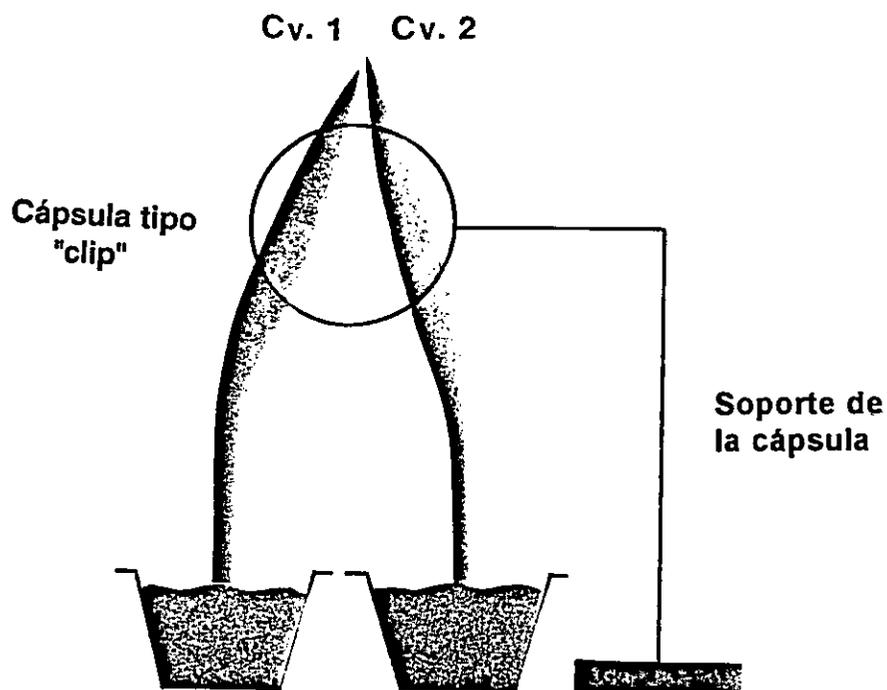


Fig. 1. Diagrama del diseño experimental para la prueba de elección de *R. padi* en trigos. El círculo sobre las hojas representa una cápsula tipo "clip", la cual encierra el sector de las hojas de dos cultivares de trigo, definido en el esquema, y a cuatro hembras apteras adultas de *R. padi*.

Estudio del comportamiento de los áfidos en dieta y en plantas

La alimentación de un áfido puede ser seguida eléctricamente por medio de gráficos de electropenetración, denominados comúnmente EPG ("Electrical Penetration Graphs") (Tjallingii, 1990) (Fig. 2). Cuando un áfido inserta su estilete en el tejido de una planta, la presencia de la saliva del insecto y de los fluidos vegetales, ambos eléctricamente conductores, hace posible el establecimiento de un circuito con ambos como electrodos. El "electrodo áfido" es construido pegando con pintura conductora de plata un alambre de oro de 20µm de diámetro en el dorso del insecto; el "electrodo planta" consiste en un alambre de cobre insertado en el substrato de la misma. El circuito se diseña de manera tal que se eliminan posibles interferencias eléctricas. Se ha demostrado que la interferencia mecánica del electrodo pegado al insecto no cambia significativamente su conducta (Tjallingii, 1990). Las señales obtenidas con este circuito son un reflejo de la penetración del aparato bucal y de la alimentación del áfido dentro de los distintos tejidos de la planta. En el registro se distinguen, entre otros, los siguientes patrones (Fig. 3): diferentes actividades del estilete durante la penetración hacia el floema (patrón ABC), alimentación floemática (patrón E) e ingestión xilemática (patrón G). La duración relativa de estas ondas caracteriza el nivel de resistencia de la planta (Tarn y Adams, 1982). El nivel de voltaje indica la posición del estilete en los diferentes tejidos que recorre, las caídas de potencial (pd) son un reflejo de incursiones intracelulares del estilete (Tjallingii, 1985).

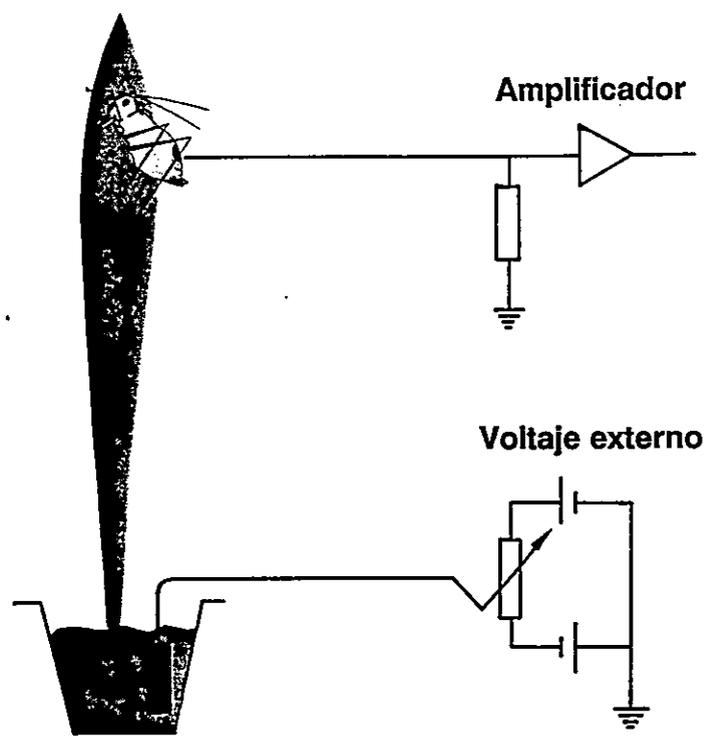
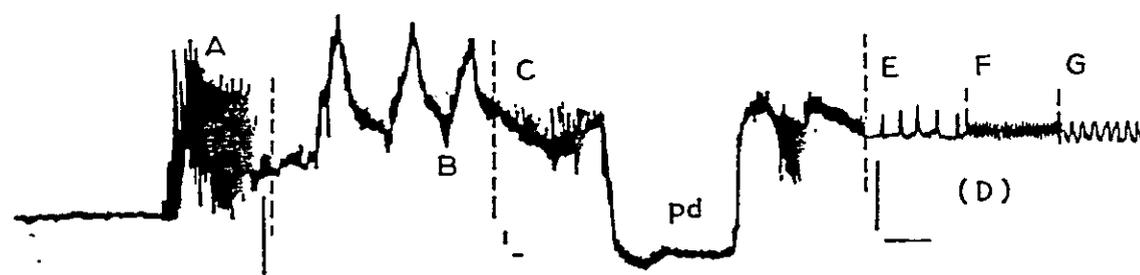


Fig. 2. Diseño experimental del método de gráficos de electropenetración (EPG) para estudiar el comportamiento alimentario de *R. padi* en trigo.



Señal EPG	Actividad del áfido en la planta
A	Contacto eléctrico del estilete sobre la epidermis
B	Salivación en la epidermis/mesófilo
C	Actividades del estilete en todos los tejidos
pd	Incursión dentro de una célula viva
E(pd)	Ingestión pasiva desde el floema
F	Trabajo mecánico del estilete en todos los tejidos
G	Ingestión activa desde el xilema

Fig. 3. Clasificación de las diferentes ondas obtenidas en el registro de las señales emitidas por el amplificador EPG.

Se estudió primeramente la reacción de *R. padi* a los Hx presentes en los cultivares de trigo elegidos. Para cada cultivar se utilizó un número mínimo de muestra de 20 individuos (Kimmins y Tjallingii, 1985) y su comportamiento fue seguido por 12 horas, determinándose el tiempo que permanecían en el xilema, el tiempo para llegar al floema y el tiempo que permanecían en el floema.

Para el estudio comparativo entre especies se realizó la experiencia descrita anteriormente para *R. padi*, con *M. dirhodum*, *R. maidis*, *S. graminum* y *S. avenae*.

Además, se estudió el efecto de DIMBOA y de su glucósido sobre el comportamiento de las distintas especies de áfidos, obteniendo EPGs en dietas artificiales con distintas concentraciones de los compuestos. La dieta artificial base consistía en una solución de sacarosa al 25% a pH 6,5, lo que permitía que la descomposición del DIMBOA fuera lenta (Niemeyer y col., 1982). No se utilizó dieta completa para evitar la reacción de los constituyentes de la dieta con los Hx (Argandoña y col., 1982)

En todos los experimentos previamente descritos los registros de EPG fueron obtenidos en papel, en forma comprimida.

Con la idea de evidenciar el efecto de los Hx presentes en las células del mesófilo, se realizó un estudio más detallado del comportamiento de *R. padi*. Para ello, se eligieron tres de las líneas de cultivo de trigo ya utilizadas, de bajo, medio y alto contenido de Hx. Se llevó a cabo un estudio utilizando adquisición y análisis computacional de los datos. Se utilizó un programa computacional (STYLET V:2.0) diseñado especialmente para el estudio de EPGs por el Dr. Freddy Tjallingii

(Departamento de Entomología, Universidad Agrícola de Wageningen , Holanda). Este programa permite expandir regiones y analizar en forma detallada el desarrollo de las distintas actividades del áfido dentro de la hoja. De esta forma se determinó el número de incursiones en células vivas y el tiempo que el estilete del áfido permanecía dentro de ellas, el tiempo que el estilete no estaba en contacto con la planta y el tiempo que el áfido estaba succionando desde el xilema. El tiempo invertido en actividades extracelulares antes de iniciar una ingestión floemática se determinó restando los tiempos anteriores al tiempo total previo a la ingestión floemática. Se estudió el comportamiento de 20 individuos por 12 horas en cada cultivar de trigo elegido.

Influencia de los Hx en la transmisión de VEAC

Un áfido virulífero fue dejado sobre una plántula de trigo por seis horas, tiempo suficiente para alcanzar un nivel de transmisión efectiva del VEAC (Power y col., 1991). A continuación, la infectividad de cada áfido fue probada transfiriéndolo por 24 horas a una planta de avena, muy susceptible al VEAC. Después de las seis horas en el trigo o las 24 en la avena, las plantas fueron rociadas con insecticida. Tanto la plántula de avena como la de trigo se observaron durante un mes para determinar si el virus se expresaba (Fig. 4). El experimento fue llevado a cabo con 20 áfidos por cada una de las 6 líneas de trigo elegidas. La presencia de VEAC fue detectada mediante la prueba de ELISA para VEAC (Lister y Rochow, 1979). El conjunto experimental fue repetido dos veces. Cabe hacer notar que en condiciones normales de ensayo de campo las líneas de

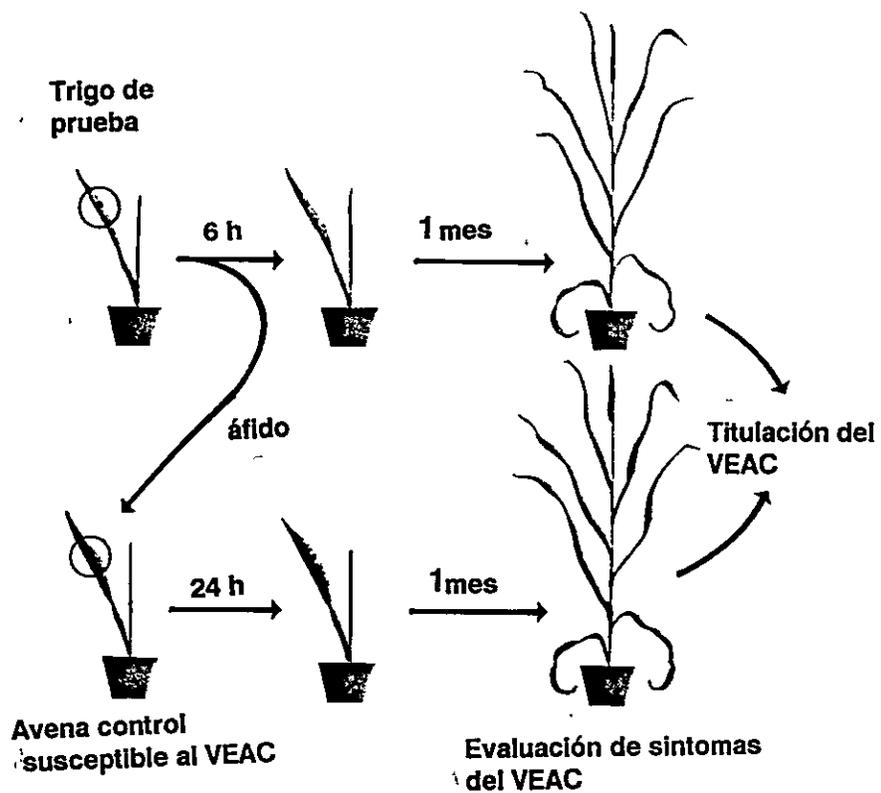


Fig. 4. Secuencia experimental para probar la influencia de los Hx en el proceso de transmisión viral por parte de *R. padi*.

trigo elegidas no mostraban resistencia intrínseca al VEAC (Zerené, comunicación personal).

Presencia de Hx en la mielcilla de *R. padi* alimentado en trigo

En una plántula de cada una de las 6 líneas de trigo elegidas, 20 individuos de *R. padi* fueron confinados en una cápsula, en el fondo de la cual se colocó un disco de papel de aluminio previamente pesado. Este diseño permitía que la excreción de los áfidos, denominada mielcilla, se depositara en el disco de aluminio (Fig. 5). Luego de 36 horas se recuperó el papel de aluminio, el cual fue pesado. La diferencia entre las pesadas fue atribuida a la mielcilla depositada en el disco. Posteriormente, el disco fue lavado en metanol y en agua. Los lavados provenientes de 7 discos fueron juntados y llevados a sequedad. Los residuos se redisolviéron en 200 μ l de agua y fueron analizados por HPLC. De esta forma se obtuvieron tres muestras de mielcilla para la avena y para cada una de las líneas de cultivo de trigo

Presencia de Hx en la savia floemática de cultivares de trigo

La savia floemática de diferentes líneas de cultivo de trigo fue obtenida a través de estiletes de áfidos cortados mediante microcauterización (Unwin, 1978). Esta técnica consiste en un sistema de calentamiento por radiofrecuencia de una finísima aguja de tungsteno, la cual es aproximada, mediante un sistema de micromanipulación, al aparato bucal del áfido cuando éste está alimentándose del floema. Cuando la aguja toca el

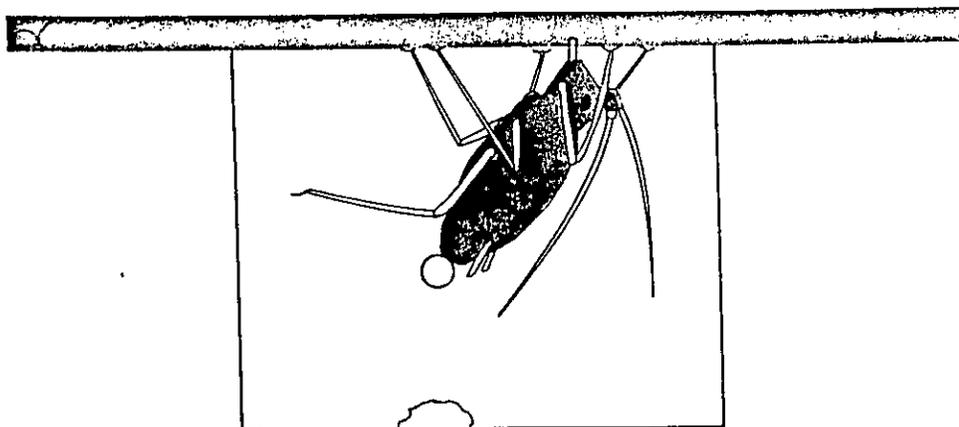


Fig. 5. Sistema de colección de mielcilla de *R. padi* comiendo en trigo.

labium del áfido, se gatilla un pulso de radiofrecuencia que la calienta y el estilete es separado del cuerpo del áfido. La savia obtenida desde los estiletes cortados es colectada en microcapilares para análisis posterior (Unwin, 1978; Weibull y col., 1986) (Fig. 6).

De este modo cinco plántulas de seis días de edad de una misma línea de trigo, y con una talla idéntica, fueron infestadas con siete áfidos adultos cada una. Los áfidos fueron ahí dejados por 12 horas. Dentro del conjunto de plantas, fue elegida aquella en la que un áfido se encontrara localizado en la superficie abaxial alrededor de una zona previamente elegida de la hoja. El corte se realizó después que se observó producción de mielcilla como indicativo de que el áfido estaba alimentándose en el floema. La savia floemática fue colectada durante tres horas en un microcapilar precalibrado de 0,5 μ l. El volumen colectado se midió determinando la altura de la columna de fluido, que se comparó con la altura total del microcapilar. La colección se realizó en un ambiente a $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Una humedad relativa del 95% fue mantenida para eliminar al máximo la evaporación de agua en la savia colectada (Sandström, comunicación personal). Sólo una colección diaria fue practicada, la que se llevó a cabo a la misma hora del día. Después de la colección, la muestra fue diluida en 30 μ l de agua destilada. La presencia y concentración de Hx fue determinada por HPLC.

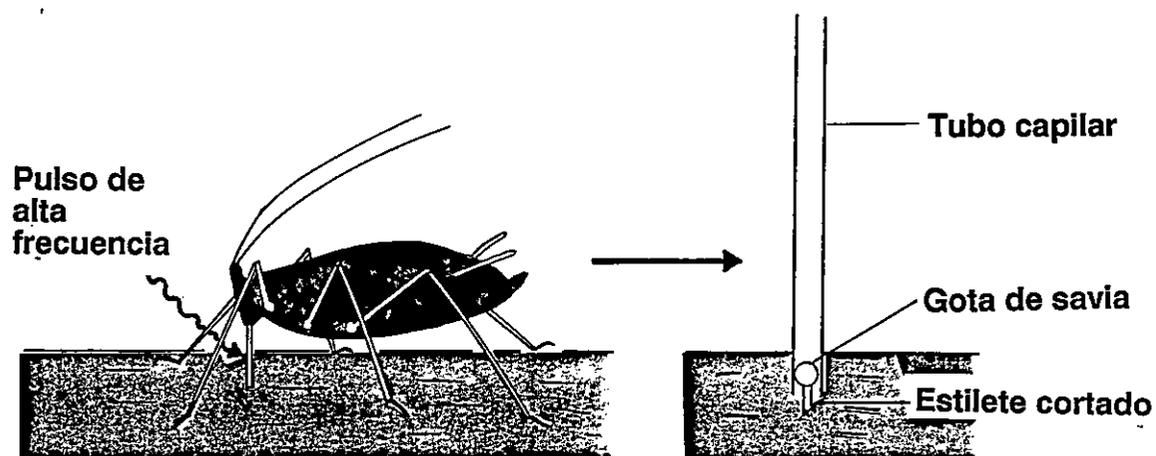


Fig. 6. Método de microcauterización para obtener savia floemática desde estiletes amputados de áfidos.

RESULTADOS

Pruebas de elección de *R. padi* en trigos

Las pruebas de elección en plantas que contenían la misma o diferente concentración de Hx mostraron que la distribución de áfidos entre plantas con altas y con bajas concentraciones de Hx diferían significativamente ($p < 0,1$) entre sí. Es decir, los áfidos prefieren alimentarse en plantas con bajo contenido de Hx (Tabla 1).

Estudio preliminar del comportamiento de *R. padi* en trigos

Mediante los registros de EPG fue posible distinguir, entre otras variables, si un áfido estaba probando en la superficie, penetrando el tejido foliar, ingiriendo desde el floema o desde el xilema. Los tiempos utilizados en estas actividades son presentados en la Tabla 2.

Los registros EPG mostraron que i) los áfidos toman un tiempo más largo para llegar al floema cuando la concentración de Hx en la planta es mayor; ii) existe un incremento en la ingestión xilemática con el incremento en la concentración de Hx en los trigos; y iii) una vez que un áfido llega al floema, su período de ingestión floemática sostenida no varía significativamente con la concentración de Hx en la planta. Los

Tabla 1. Distribución de *R. padi* en trigos con diferentes contenidos de Hx.

Cultivares de trigo	Concentración de Hx (mmol/kg p. fr.)					
	Bajo		Medio		Alto	
	0,9	1,0	1,3	1,4	2,0	2,7
	<i>Platifén</i>	<i>Millaleu</i>	<i>Mexifén</i>	<i>Nobo</i>	<i>Anza</i>	<i>Maitén</i>
Platifén	39 :38	34:28	43:36	33:28	53:27*	42:21*
Millaleu		35:40	37:31	38:32	56:24*	42:21*
Mexifén			36:36	38:38	39:38	57:18*
Nobo				36:31	44:28*	44:31*
Anza					26:26	37:40
Maitén						21:23

* Las distribuciones son significativamente diferentes ($p(X^2) < 0,1$).

Tabla 2. Efecto de los Hx en trigo sobre el comportamiento alimentario de *R. padi*.

Cultivares de trigo						
Plantas	Platifén	Millaleu	Mexifén	Nobo	Anza	Maitén
Hx (mmol/kg p. fr.)	0,9	1,0	1,3	1,4	2,0	2,7
Tiempo hasta ingestión floemática (min)	55 a*	55 a	67 b	71 b	95 c	153 d
Tiempo en ingestión floemática (min)	353 a	345 a	342 a	355 a	343 a	354 a
Tiempo en ingestión xilemática (min)	34 a	35 a	50 b	51 b	77 c	83 c

* Letras iguales en la misma fila indican que los promedios no difieren significativamente ($p > 0.05$; ANOVA/prueba de Duncan).

valores promedios de las ingestiones xilemáticas y floemáticas consideran aquellos individuos en que se observó que desarrollaban la actividad referida.

Prueba de transmisión de VEAC portado por *R. padi* a trigos

Los resultados de las pruebas de inoculación de VEAC (Tabla 3) muestran una correlación negativa entre la concentración de Hx en las plantas y la transmisión de VEAC (ver Fig. 7B). El título de virus no mostró variación significativa entre las plantas infectadas.

La Fig. 7 ilustra una posible relación entre los resultados obtenidos por EPG (Tabla 2) y los de transmisión del VEAC (Tabla 3).

Presencia de Hx en la mielcilla de *R. padi* alimentándose en trigo

El DIMBOA glucósido fue encontrado en todas las muestras de mielcilla de los áfidos que se alimentaban en las 6 líneas de trigo. Ni DIMBOA, ni MBOA fueron detectados en la muestras analizadas.

La producción de mielcilla en relación con la concentración de Hx en la planta es mostrada en la curva A de la Fig. 8. La producción en avena, especie de gramínea sin Hx, fue de $5,35 \pm 0,16$ $\mu\text{g}/\text{áfido}/36$ h. Las concentraciones de DIMBOA glucósido son mostradas en la curva B de la figura 8.

Tabla 3. Efecto de los Hx en trigo en la transmisión de VEAC por *R. padi*.

Cultivares de trigo						
Plantas	Platifén	Millaleu	Mexifén	Nobo	Anza	Maitén
Hx (mmol/Kg p. fr.)	0,9	1,0	1,3	1,4	2,0	2,7
N° inicial de plantas de trigo	20	20	20	20	20	20
N° de plantas de avena infectadas	18	20	20	18	20	16
N° de plantas de trigo infectadas	16	20	13	13	11	5
% de plantas de trigo infectadas	89	100	65	72	55	31

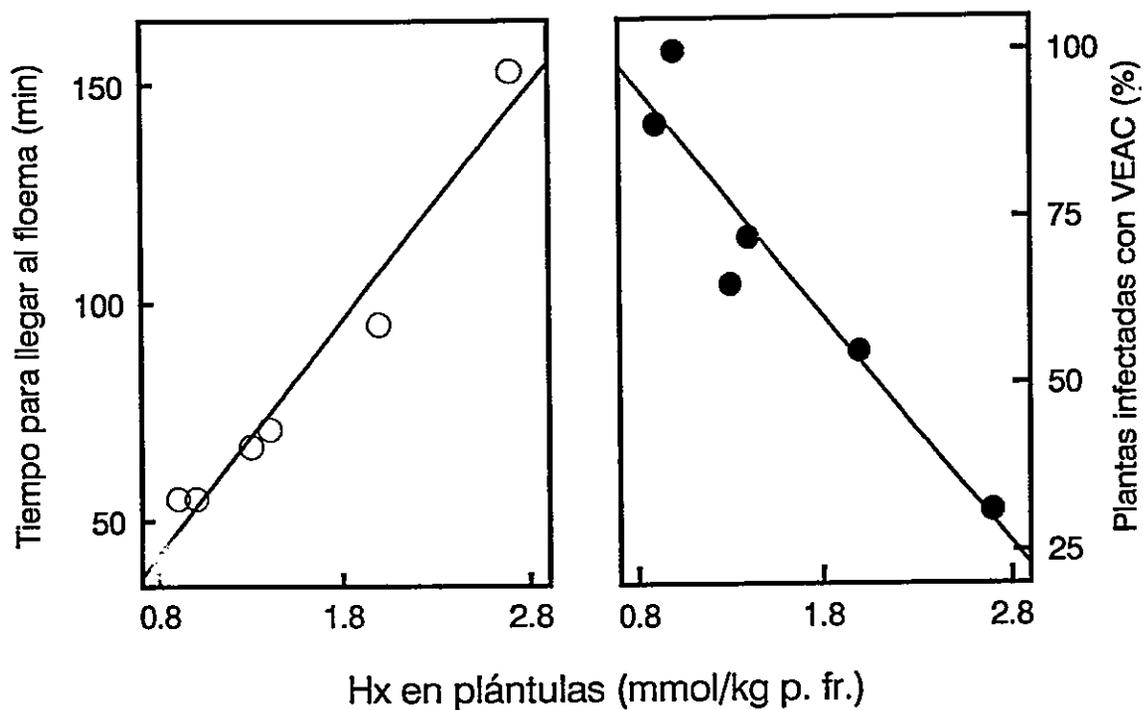


Fig. 7. Habilidad de *R. padi*: A (○) para llegar al floema y B (●) para inocular VEAC en plantas de trigo con diferentes concentraciones de Hx. Curva A) coef. correl. = 0,98, curva B) coef. correl. = -0,95.

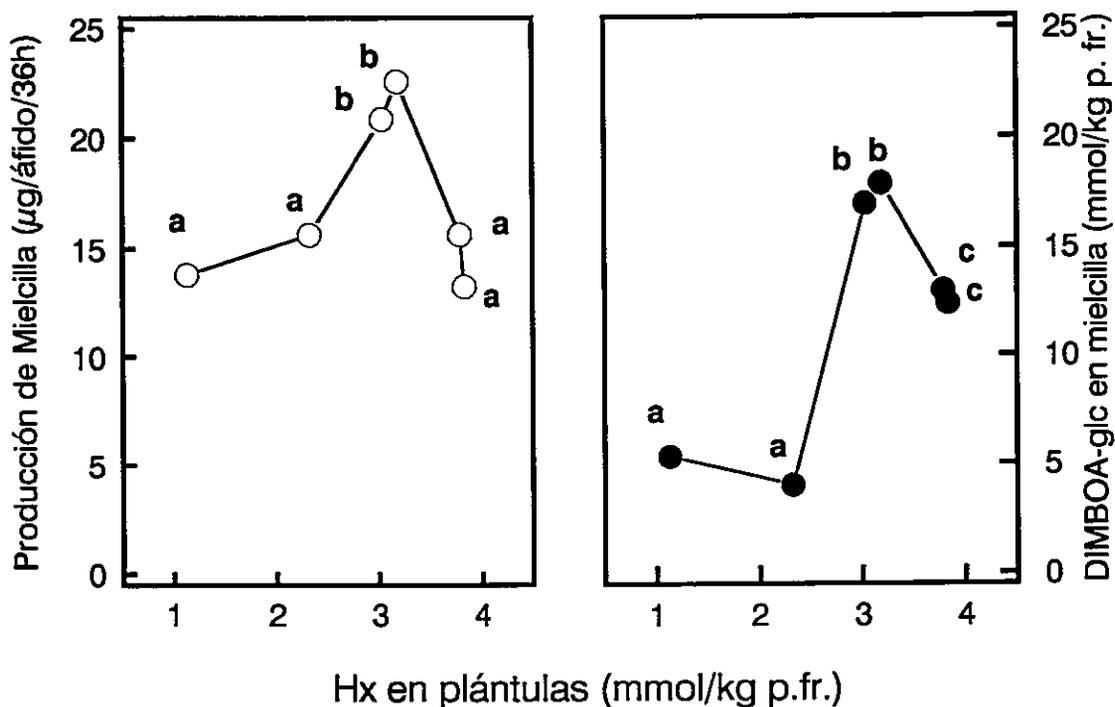


Fig. 8. A (○) Mielcilla producida por áfidos que se alimentaron en plantas de trigo con diferentes concentraciones de Hx. B (●) Comportamiento de la concentración de DIMBOA-glucósido presente en la mielcilla. Letras iguales sobre puntos de una misma curva indican que los valores no significativamente ($p > 0,05$; ANOVA/prueba de DUNCAN)

Presencia de Hx en el floema de trigo

El DIMBOA-glucósido sería el único Hx en la savia floemática, al menos hasta el límite de detección del método HPLC utilizado. La hidrólisis enzimática del DIMBOA-glucósido putativo de la savia floemática mostró, por medio de HPLC, la presencia de un compuesto con un tiempo de retención igual al del DIMBOA. La posterior descomposición del DIMBOA putativo en ambiente básico, llevó a la formación de un compuesto con el tiempo de retención del MBOA en el HPLC (Fig. 9). De esta forma se confirmó que es efectivamente el DIMBOA-glucósido el compuesto que se observa en la savia floemática.

No se observó correlación alguna entre la concentración del glucósido en el floema y la concentración global de Hx en la planta (Fig. 10).

Estudio detallado del comportamiento de *R. padi* en trigos

El análisis minucioso de las señales EPG en tres de las seis líneas de trigo consideradas en este estudio se resume en la Tabla 4. Consecuentemente con lo obtenido en el estudio de comportamiento previo (Tabla 2), se observó un incremento en el tiempo para empezar a ingerir desde el floema cuando la concentración de Hx aumentaba en la planta; igualmente, no se observó cambio en los tiempos de ingestión floemática. Además, el tiempo de ingestión xilemática aumentó con el aumento de Hx en las plantas, concordando así con la tendencia mostrada en la Tabla 2. El detalle de las actividades desarrolladas antes de la primera ingestión floemática muestra que el número de

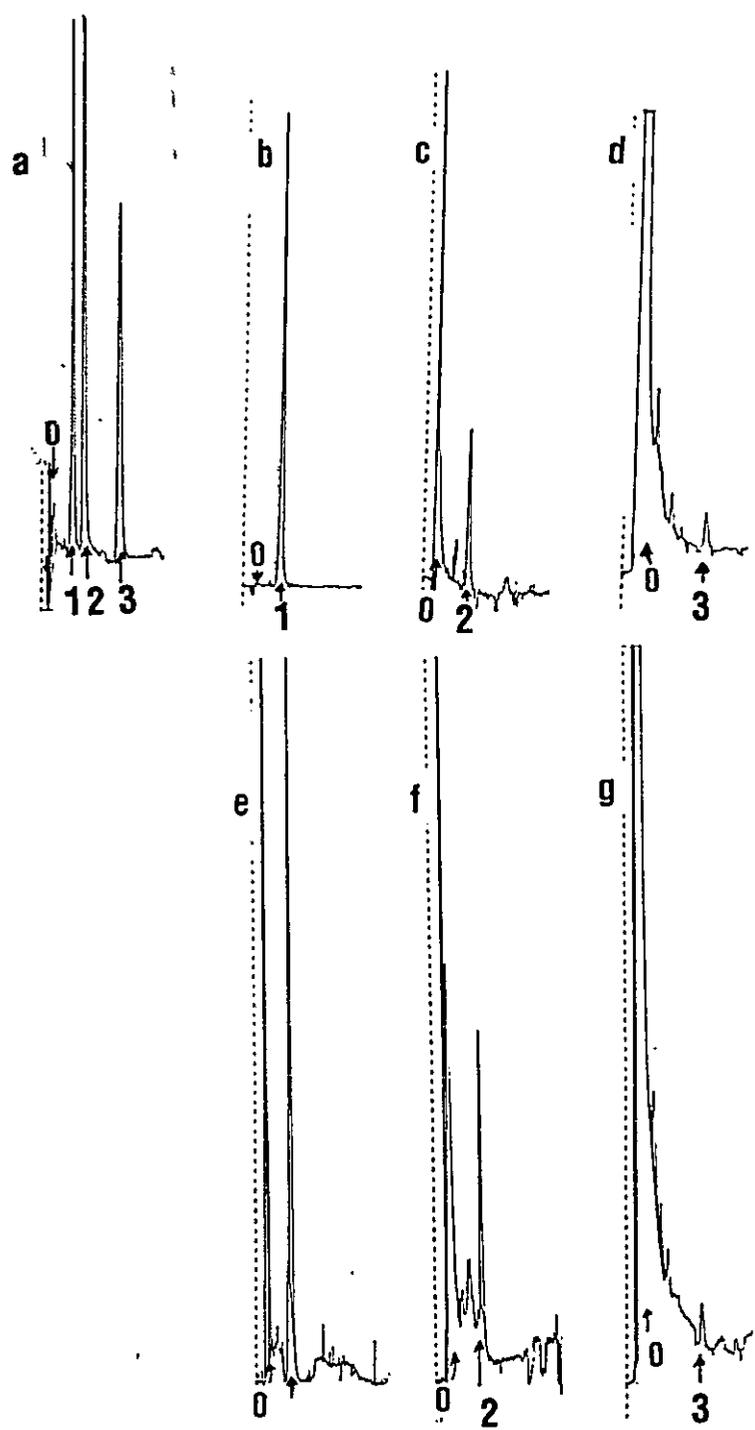


Fig. 9. Determinación y comprobación de la presencia de DIMBOA-glucósido en la savia floemática de trigo: a) mezcla de estándares; b) DIMBOA-glucósido estándar; c) producto de la reacción de b con extracto enzimático de trigo (actividad β -glucosidásica); d) producto de la descomposición en medio básico del producto obtenido en c; e) muestra de floema; f) reacción enzimática de e; g) descomposición en medio básico de f. Identidad de los picos: 0=Frente del solvente o compuestos no retenidos por la columna cromatográfica; 1=DIMBOA-glucósido; 2=DIMBOA; 3=MBOA.

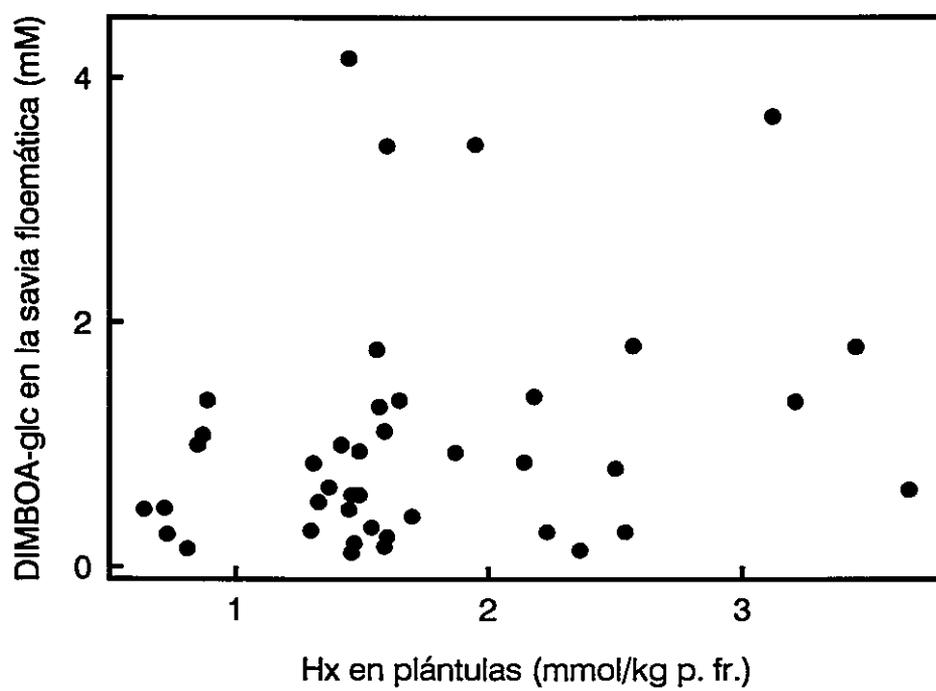


Fig. 10. Concentración de DIMBOA-glucósido en la savia floemática de plántulas de trigo con distinta concentración global de Hx.

incursiones intracelulares y el tiempo acumulado dentro de células, no varían significativamente con el cambio de concentración de Hx en las plantas. En cambio, el tiempo en actividades extracelulares y el tiempo sin penetrar el tejido foliar aumentan con el aumento de Hx en los trigos. Al relacionar los parámetros determinados con el tiempo total ocupado por los áfidos para llegar al floema, se observa que los tiempos ocupados en incursiones en células vivas disminuye a medida que aumentan los Hx en las plantas; los tiempos en ingestión xilemática aumentan; y los tiempos en las restantes actividades son independientes del contenido de Hx de las plántulas. Finalmente, la frecuencia de incursiones en células vivas disminuye con el aumento de Hx, como así también la frecuencia de no contactos con el tejido foliar.

Influencia de los Hx sobre el comportamiento de distintas especies de áfidos de los cereales alimentándose en trigo

El incremento de la concentración de Hx en las plantas produce un retardo en el tiempo para llegar al floema para todas las especies de áfidos, con la excepción de *R. maidis*. Los gráficos de tiempo para llegar al floema vs. la concentración de Hx en las plantas generan correlaciones lineales positivas significativas (Fig. 11). Los valores de las pendientes de estos gráficos se definen como el efecto relativo de los Hx en tejidos previos al floema sobre la alimentación de las distintas especies de áfidos. Debido a que en el caso de *R. maidis* el coeficiente de correlación para la recta es bajo en comparación con las otras especies y la pendiente es cercana a cero, se concluye que los

Tabla 4. Efecto de los Hx en las actividades alimentarias de *R. padi*.

Actividad del áfido (N=20)	Cultivares de trigo		
	Millaleu	Nobo	Maitén
Tiempo fuera de células (min)	16 a*	40b	56b
% del tiempo total	28	34	32
Tiempo de no contactos (min)	16 a	45b	47b
% del tiempo total	29	38	27
Tiempo dentro de células (min)	16a	16a	14a
% del tiempo total	29	14	8
Afidos que llegan al xilema	4	6	12
Tiempo en el xilema (min)	40a	57a	97b
% del tiempo total (min)	14	14	33
Afidos que llegan al floema	20	20	20
Tiempo para llegar al floema (min)	56a	118b	175c
Tiempo en el floema	355a	353a	363a
N° de no contactos (Nc)	18	13	15
Frecuencia de Nc (Nc/min)	0,32	0,11	0,08
N° de incursiones en células vivas (Npd)	223a	206a	212a
Frecuencia de Npd (Npd/min)	4,0	1,8	1,2

* Letras iguales en la misma fila quiere decir que los promedios no son significativamente distintos ($p > 0,05$; ANOVA/prueba de DUNCAN)

Hx de esos tejidos no logran afectar a esta especie de áfido. El orden para las pendientes de los gráficos de la Fig. 11 es: *R. padi* > *S. graminum* > *S. avenae* > *M. dirhodum* > *R. maidis*.

A medida que la concentración de Hx aumenta en plantas, el tiempo de ingestión desde el xilema también aumenta (Fig. 12). Los valores promedio de ingestión xilemática consideran sólo los individuos que desarrollaron dicha actividad. Los gráficos de ingestión xilemática vs. Hx en plantas correlacionan lineal, positiva y significativamente para todas las especies excepto para *R. maidis*. Las pendientes en este caso pueden ser definidas análogamente a las pendientes de la Fig. 11. El orden obtenido con estas pendientes es el mismo obtenido en el caso de los tiempos para llegar al floema.

Al graficar las pendientes de la Fig. 11 vs. aquellas de la Fig. 12, se obtiene una correlación lineal, positiva y significativa (Fig. 13).

Finalmente, para cada especie de áfido el tiempo en ingestión floemática no muestra diferencias significativas con respecto a la concentración de Hx en la planta. Sin embargo, al comparar los valores promedio de ingestión floemática, se encuentran diferencias entre las especies (Fig. 14).

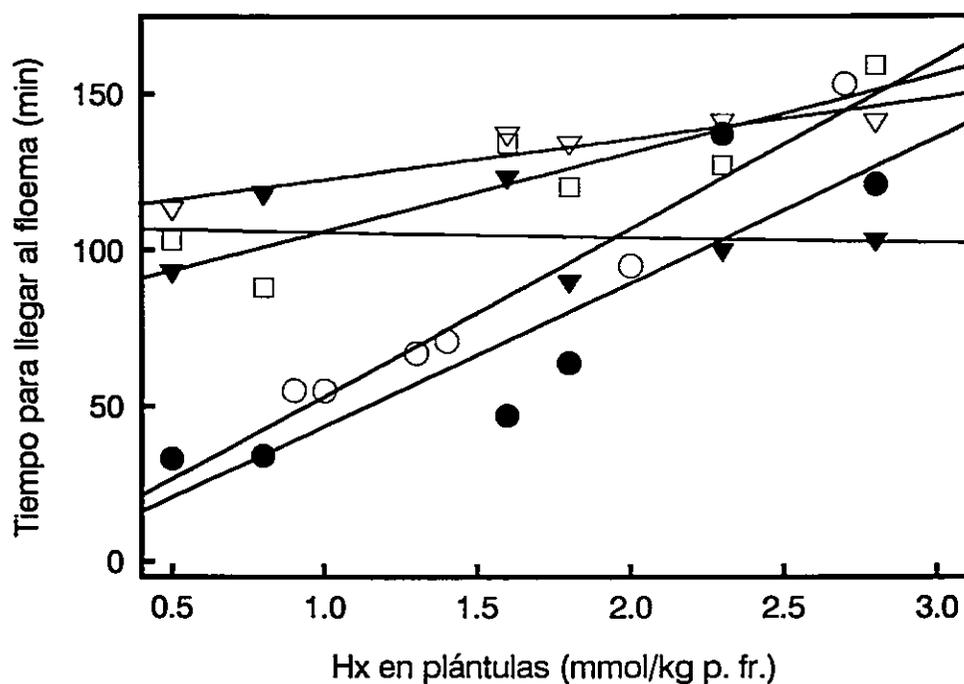


Fig. 11. Efecto de la concentración de Hx en plántulas de trigo sobre el tiempo para llegar al floema que toman cinco especies de áfidos de los cereales. Pendientes:

□	<i>Sitobion avenae</i>	25,1 (r=0,88)
○	<i>Rhopalosiphum padi</i>	53,7 (r=0,98)
●	<i>Schizaphis graminum</i>	46,1 (r=0,88)
▽	<i>Metopolophium dirhodum</i>	13,1 (r=0,94)
▼	<i>Rhopalosiphum maidis</i>	-1,6 (r=-0,10)

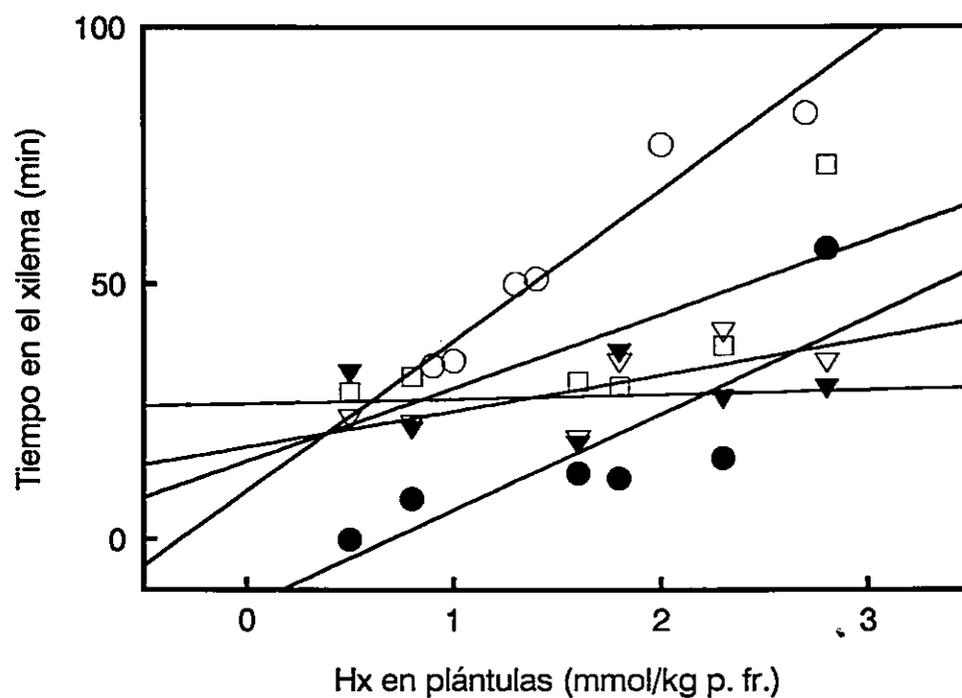


Fig. 12. Efecto de la concentración de Hx en plántulas de trigo sobre el tiempo de ingestión xilemática que invierten cinco especies de áfidos de los cereales. Pendientes:

□	<i>Sitobion avenae</i>	14,4 (r=0,73)
○	<i>Rhopalosiphum padi</i>	29,4 (r=0,97)
●	<i>Schizaphis graminum</i>	18,9 (r=0,82)
▽	<i>Metopolophium dirhodum</i>	7,1 (r=0,73)
▼	<i>Rhopalosiphum maidis</i>	-0,2 (r=-0,03)

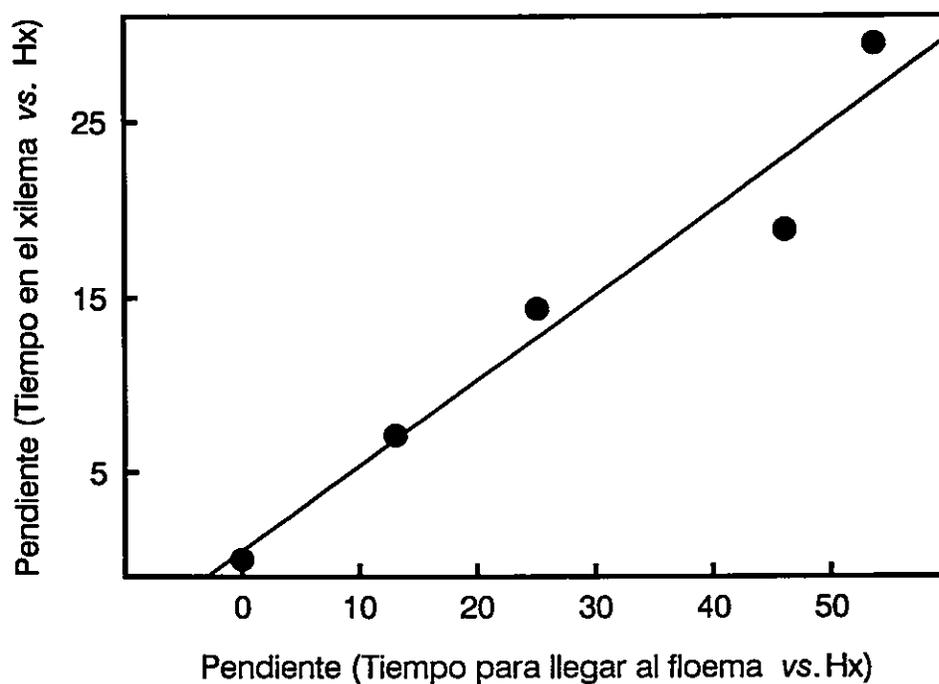


Fig. 13. Sensibilidad de cinco especies de áfidos de los cereales a los Hx presentes en plántulas de trigo. Correlación entre las pendientes de los gráficos de las Figs. 11 y 12. Coef. correl. = 0,97.

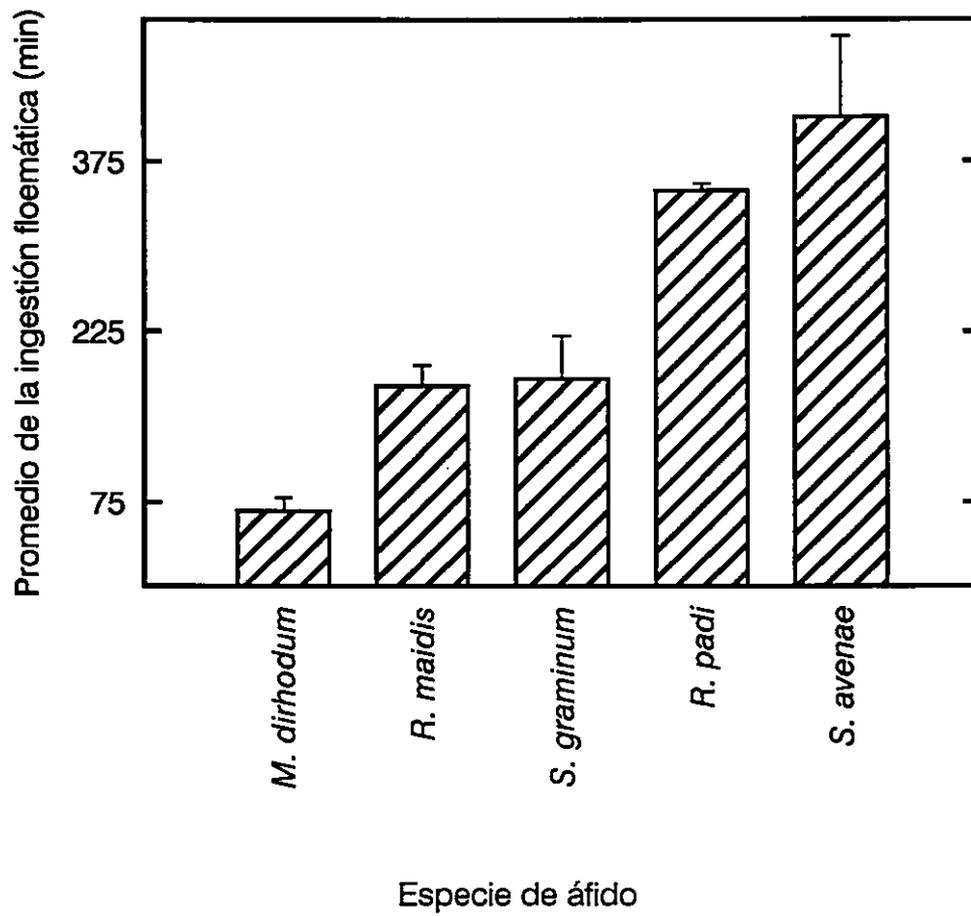


Fig. 14. Promedios del tiempo de ingestión floemática de cinco especies de áfidos de los cereales alimentándose en trigos.

Influencia de los Hx sobre el comportamiento de distintas especies de áfidos de los cereales alimentándose en dietas artificiales

Los gráficos en las Figs. 15 y 16 muestran que a medida que aumenta la concentración, tanto de DIMBOA como de su glucósido, en la dieta, se reduce el tiempo de ingestión de todas las especies de áfidos estudiadas. Cada pendiente de las líneas de correlación de las Figs. 15 y 16 puede ser definida como la sensibilidad directa de la especie de áfido al Hx presente en la dieta. Las pendientes son todas significativas y el orden obtenido, de acuerdo al valor absoluto de la pendiente, es para DIMBOA: *R. maidis* > *M. dirhodum* > *S. graminum* > *R. padi* > *S. avenae*; y para DIMBOA glucósido: *R. maidis* = *M. dirhodum* > *S. graminum* > *R. padi* > *S. avenae*.

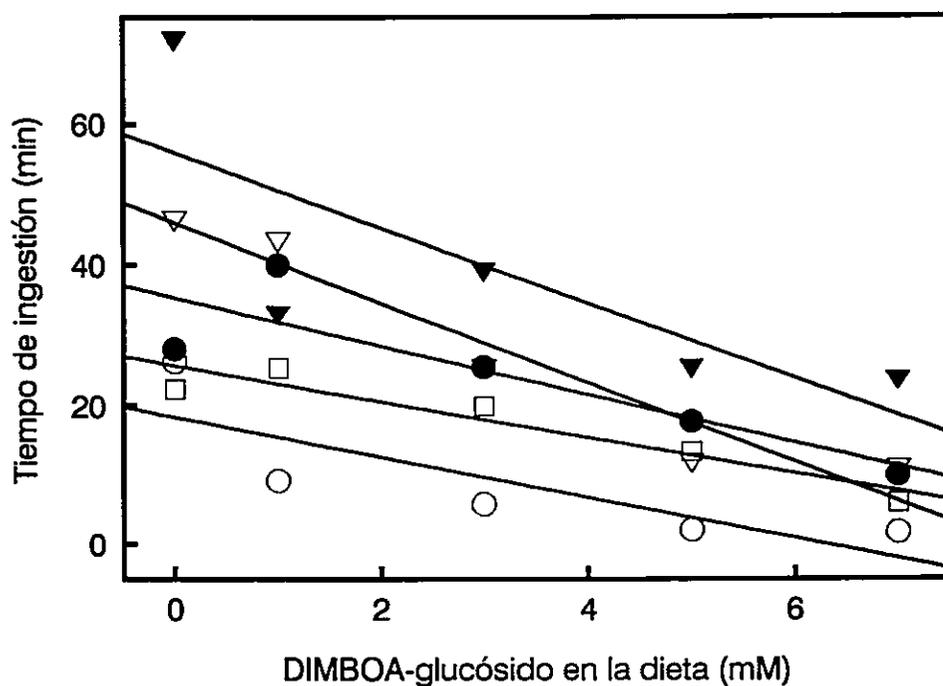


Fig. 15. Reacción de las cinco especies de áfidos de los cereales a la presencia de DIMBOA-glucósido en una dieta artificial. Pendientes:

- *Sitobion avenae* -2,6 ($r=-0,95$)
- *Rhopalosiphum padi* -2,9 ($r=-0,82$)
- *Schizaphis graminum* -3,5 ($r=-0,87$)
- ▽ *Metopolophium dirhodum* -5,7 ($r=-0,97$)
- ▼ *Rhopalosiphum maidis* -5,7 ($r=-0,83$)

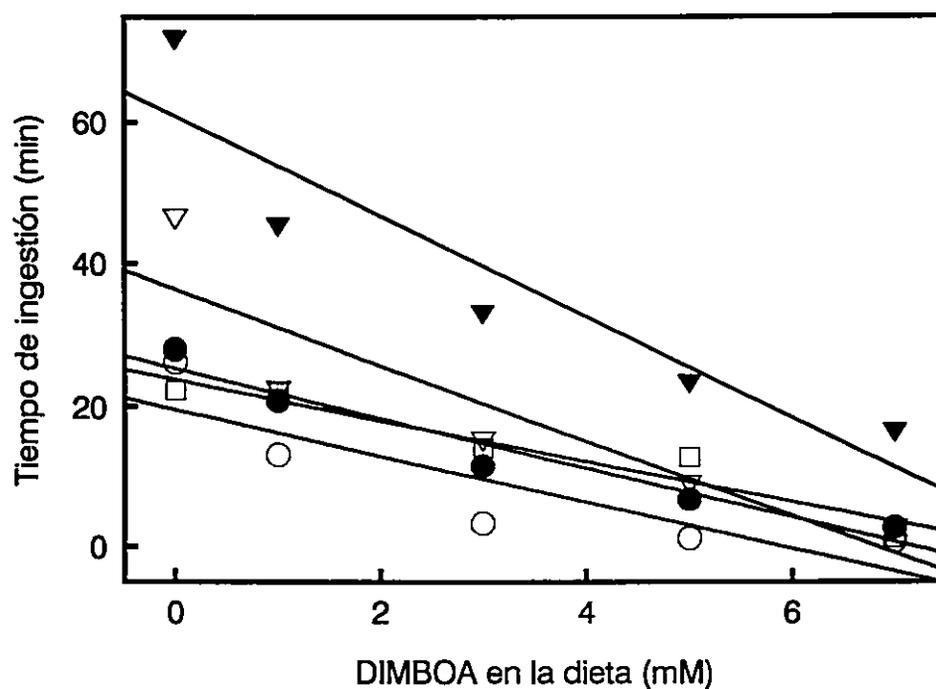


Fig. 16. Reacción de cinco especies de áfidos de los cereales a la presencia de DIMBOA en una dieta artificial. Pendientes:

- | | |
|---------------------------------|----------------|
| □ <i>Sitobion avenae</i> | -2,9 (r=-0,96) |
| ○ <i>Rhopalosiphum padi</i> | -3,3 (r=-0,87) |
| ● <i>Schizaphis graminum</i> | -3,6 (r=-0,97) |
| ▽ <i>Metopolophium dirhodum</i> | -5,3 (r=-0,90) |
| ▼ <i>Rhopalosiphum maidis</i> | -7,1 (r=-0,93) |

DISCUSION

Los resultados obtenidos en las pruebas de elección (Tabla 1) apoyan la idea que los áfidos prefieren aquellas plantas que contienen bajas concentraciones de Hx, sugiriendo que este compuesto ejerce su efecto antialimentario en las plántulas de trigo. Los registros EPG en la Tabla 2 muestran que este efecto es percibido por el áfido durante el periodo entre la inserción del estilete en la planta y la llegada al tejido floemático.

Por otro lado, el tiempo de ingestión promedio en el floema no difiere entre los cultivares, lo que sugiere, o que los Hx no estarían presentes en la savia floemática, o que su concentración en ella estaría por debajo de aquella que provoca efecto antialimentario. Como se discute más adelante, la primera explicación pudo ser descartada, y demostrada la segunda.

Tanto la frecuencia con que aparecen las incursiones intracelulares como la proporción del tiempo ocupado en ellas, antes de la primera ingestión floemática sostenida, disminuyen significativamente con el aumento de la concentración de Hx en los cultivares de trigo (Tabla 4). Al parecer, cuando un áfido está sobre trigos con concentraciones mayores de Hx, prefiere evitar la penetración de las células vivas. Este

hecho se relacionaría con la presencia de Hx en las células del mesófilo (Argandoña y col., 1987), cuyo contacto provocaría en el áfido el efecto antialimentario de estos compuestos. Más aún, el áfido tendería a invertir más tiempo en tejidos que no contienen Hx, pero que al mismo tiempo contribuyen a satisfacer sus necesidades fisiológicas, como es el xilema (Tabla 4).

Por el momento no es posible determinar si el total de Hx detectados previamente en los haces vasculares (Argandoña y col., 1987) está sólo en la savia floemática o parte se encuentra en el tejido vascular. Además, el estudio minucioso de las señales obtenidas de los EPGs con *R. padi* (Tabla 4), no permite diferenciar las caídas de potencial debidas a incursiones del estilete en las células del parénquima o en las del floema, debido a que tienen un origen eléctrico similar. Estos hechos indican la dificultad de determinar que el incremento observado en el tiempo que el insecto toma para llegar al floema sea debido sólo a los Hx presentes en las células del mesófilo o también a cortas incursiones en el tejido floemático.

Debido a que el floema es la fuente de alimentación de los áfidos (Pollard, 1973; Mullin, 1986), la presencia del DIMBOA-glucósido en la mielcilla de *R. padi* sugirió que estos compuestos estarían circulando en la savia floemática. La ausencia de la aglucona en la mielcilla sugiere la ausencia de una β -glucosidasa adecuada en el tracto digestivo de *R. padi* o la presencia de una glucosiltransferasa detoxificante eficiente (Leszczynski y col., 1992). Cabe destacar que Molyneux y col. (1990) no lograron detectar MBOA en la mielcilla de *S. graminum* alimentado en un trigo que contenía Hx. Este resultado

apoya el hecho de que el glucósido es el único Hx presente en la excreta de los áfidos, que bajo las condiciones experimentales de Molyneux y col. (1990) no se descompondría a MBOA.

La relación entre la concentración del glucósido presente en la mielcilla y la concentración global de Hx en la hoja describe un patrón bifásico (Fig. 8B). Ello sugiere la ingestión pasiva desde el floema a bajas concentraciones del Hx en la hoja y, por encima de cierta concentración, la acción del efecto antialimentario de los Hx, percibido posiblemente cuando ocurre la penetración del estilete en células del mesófilo. Este efecto induciría al áfido a la ingestión desde tejidos sin DIMBOA-glucósido o con baja concentración de esta sustancia, por ejemplo el xilema, como fue determinado por EPG (Tabla 2). Se observó también un comportamiento bifásico al confrontar la producción de mielcilla con el contenido de Hx en la hoja (Fig. 8A). Sobre la base de la evidencia expuesta, se puede proponer que la correlación negativa observada en el rango de altas concentraciones de Hx en las plantas se debe a su acción antialimentaria. La correlación positiva obtenida en el rango de bajas concentraciones puede ser atribuida a un aumento de la tasa de ingestión con el aumento de Hx, con consecuentes altas tasas de excreción, debido a una necesidad del áfido de compensar el efecto tóxico del incremento de Hx en la ingesta. Este efecto puede estar relacionado con la capacidad de los Hx de inhibir reacciones enzimáticas de los áfidos (Leszczynski y col., 1992; Leszczynski y Dixon, 1992; Cuevas y Niemeyer, 1993). Un resultado que apoya esta idea es la tasa de

producción de mielcilla en avena, que es comparable con aquella en trigos con bajo contenido de Hx.

La presencia de DIMBOA-glucósido en el floema fue determinada por análisis de HPLC de las muestras de savia floemática (Fig. 9), las cuales fueron obtenidas mediante estiletos cortados de áfidos que habían estado alimentándose en diferentes trigos. Así, como era de esperar, una fuente importante de los Hx detectados en la mielcilla es la savia floemática.

Las concentraciones de DIMBOA-glucósido determinadas en la savia floemática (Fig. 10) no alcanzan los niveles necesarios para provocar su efecto antialimentario. De esta forma se explica que el tiempo de ingestión en el floema no sea afectado por variaciones en la concentración de Hx en la planta (Tabla 2).

Por otro lado, se puede observar que plantas con concentraciones totales de Hx similares, pueden mostrar distintas concentraciones de DIMBOA-glucósido en la savia. En ausencia de variaciones en las condiciones experimentales que puedan explicar esta variabilidad, puede pensarse en la existencia en una misma planta de vasos floemáticos con concentraciones distintas de Hx circulante.

Zúñiga y Massardo (1991) propusieron que la translocación de Hx sería a través del fluido apoplástico. La presencia de Hx en la savia floemática permite proponer el floema como una ruta alternativa de translocación de los Hx desde tejidos no diferenciados a tejidos diferenciados.

El estudio comparativo por EPG de las especies de áfidos de los cereales, muestra que las diferentes especies pueden ser ordenadas de acuerdo a su sensibilidad hacia los Hx presentes en tejidos encontrados en su camino hacia el floema. Esta ordenación se obtiene considerando las pendientes de los gráficos de la Fig. 11. A mayor valor absoluto de la pendiente, el efecto de los Hx sobre la especie es mayor. De este modo podemos ordenar las especies en tres grupos. *R. padi*, *S. graminum* y *S. avenae* pueden ser considerados como los más afectados por los Hx presentes en tejidos no vasculares. En cambio, *M. dirhodum* es menos afectado y *R. maidis* parece no ser sensible, ya que su pendiente es prácticamente cero.

En general, la presencia de una mayor concentración de Hx en las plantas retardaría a los áfidos en su búsqueda del floema (Fig. 11). Parte del tiempo que se demoran es dedicado a ingerir desde el xilema (Fig. 12). Esto es confirmado por la positiva y altamente significativa correlación entre las pendientes de los gráficos de las Figs. 11 y 12 (Fig. 13). Una posible explicación de este hecho es que el áfido requeriría revertir el estrés hídrico producido por no poder llegar a su sitio de alimentación habitual (Spiller y col., 1990).

Consecuentemente con lo observado en la Tabla 2 para *R. padi*, el tiempo de ingestión floemática para cada especie no varía con la variación de Hx en las plántulas (Fig. 14), lo cual se debería a que el bajo contenido de DIMBOA-glucósido en la savia floemática no afecta ninguna de las especies estudiadas. Al comparar los valores promedio de ingestión floemática, se observa una variación intrínseca entre las especies,

lo cual podría guardar relación con factores nutricionales u otros metabolitos estimulantes o inhibitorios de la alimentación.

Los estudios hechos en dietas muestran que la sensibilidad de las especies al DIMBOA-glucósido agrupa a *R. maidis* y *M. dirhodum* como las especies más sensibles y con sensibilidades comparables entre sí (Fig. 15). Al determinar la reacción hacia el DIMBOA, se mantiene el mismo orden entre las especies de áfidos, aunque las dos especies ya mencionadas difieren entre sí (Fig. 16).

R. maidis y *M. dirhodum* muestran la menor sensibilidad hacia los Hx en las plantas, pero la mayor sensibilidad hacia los Hx en dietas. Una explicación posible es que *R. maidis* no encuentre los Hx durante su búsqueda del floema, por no romper o romper muy pocas células del mesófilo (Bing y col., 1991), en donde encontraría los Hx. Al seguir una ruta principalmente intercelular, se alarga el camino hasta el floema y debe invertir más tiempo en llegar a él. Se puede observar que los promedios de los tiempos ocupados en llegar al floema por *R. maidis* son altos en comparación con otras especies (Fig. 11), y no se correlacionan con las concentraciones de Hx en las plantas. De esta forma, *R. maidis* evitaría naturalmente los Hx presentes en las células del mesófilo. Una explicación similar puede ser dada para *M. dirhodum*. El evitar romper ciertas células puede ser una estrategia desarrollada naturalmente por algunas especies sensibles a los Hx para evitar el contacto con estas toxinas.

Los comportamientos alimentarios de *R. padi*, *S. graminum* y *S. avenae* en trigos y en dietas, son comparable entre sí. Aunque estas especies son sensibles a los Hx en dietas, esta sensibilidad es relativamente menor a la de las dos especies precedentes.

R. maidis resultó ser el áfido menos afectado por los Hx presentes en dietas artificiales (Corcuera y col., 1982). Ya que el efecto antibiótico de los Hx disminuye por la acción del efecto antialimentario (Corcuera y col., 1985), la mayor sensibilidad de *R. maidis* al efecto antixenótico de los Hx (Figs. 15 y 16) lo protegería del efecto tóxico de los Hx.

Sobre la base de los resultados expuestos, se puede sugerir el siguiente mecanismo de acción de los Hx en plántulas de trigo sobre los áfidos: cuando el áfido inserta su estilete en el tejido foliar, en busca del floema, incursiona en células del mesófilo y provoca la hidrólisis de los glucósidos de Hx. Las agluconas actúan como compuestos antialimentarios. Una vez que el áfido logra establecerse en el floema, sufre pasivamente la acción antibiótica de los Hx-glucósidos. Las concentraciones de éstos en el floema no permiten que se manifieste su actividad antialimentaria.

Los resultados de los EPGs sugieren que el período umbral para la transmisión del VEAC (Scheller y Shukle, 1986), podría ser modificado por variaciones en la concentración de Hx en la planta, ya que estos compuestos representarían una barrera para el áfido antes de alcanzar el floema. Es así como los resultados de la Tabla 3 sugieren que altas concentraciones de Hx en el trigo interferirían con la transmisión del VEAC. La Fig. 7 ilustra la relación entre el aumento del tiempo para llegar al floema

y la disminución de la transmisión del VEAC, con la variación de las concentraciones de Hx en las plántulas de trigo. En analogía con las proposiciones generales de Gibson y Plumb (1977) para compuestos antixenóticos de plantas, los Hx serían un factor de resistencia en el trigo que incrementaría la proporción de áfidos que, buscando un substrato de alimentación adecuado, probarían pero no se alimentarían, y eventualmente morirían o emigrarían, sin haber llegado a transmitir virus.

El VEAC pertenece al grupo de virus denominados luteovirus, que se caracterizan por ser transmitidos en forma persistente, es decir, el áfido vector lleva el virus incorporado a sus glándulas salivales y su inoculación necesita el contacto con la savia floemática (Gildow y Rochow, 1980). Los resultados de Scheller y Shukle (1986) sugieren que tan solo el contacto con el floema puede ser el requerimiento necesario para la inoculación del VEAC. La situación sería entonces análoga con los virus no persistentes (Powell, 1991), salvo que en este caso la inoculación se produce por penetración intracelular a nivel de la epidermis o de tejidos vecinos a ésta. Un mayor número de penetraciones aumenta la transmisión de un virus no persistente, como el virus Y de la papa (PVY) (Powell, 1991), en analogía también con el VEAC, donde el número de rupturas que realiza el vector *S. avenae* en los haces conductores aumentaría la transmisión viral (Scheller y Shukle, 1986).

La relación entre el aumento del tiempo para llegar al floema y la disminución de la transmisión de VEAC con el aumento de la concentración de Hx en la planta (Fig. 7) sugiere que el establecimiento del vector en el floema sería condición para la

inoculación del virus. Alternativamente, la Tabla 4 muestra que un aumento en la concentración de Hx en la planta conlleva una disminución de la frecuencia de incursiones intracelulares y, si se supone que la proporción de incursiones en células floemáticas con respecto a incursiones en células vivas fuera constante, se obtendría que a concentraciones mayores de Hx ocurrirían menos incursiones en células floemáticas y por lo tanto menor transmisión. Actualmente está en estudio el origen de la onda EPG denominada E_1 , y se postula que, cuando ésta se presenta a nivel intracelular, esto es, dentro de una caída de potencial o al comienzo de la ingestión floemática, estaría relacionada con el primer contacto del estilete del áfido con el haz vascular (Tjallingii, comunicación personal).

Las diferencias observadas en el efecto de los Hx en plantas sobre el comportamiento de las diferentes especies de áfidos, pueden guardar relación con la capacidad de estas especies de transmitir el VEAC. Sin embargo, es necesario tener presente que existen numerosos parámetros que influyen sobre la transmisión viral. Aunque muchos de éstos son independientes de los Hx, es posible postular que algunos de ellos pueden ser un reflejo de la acción de los Hx en el proceso de transmisión viral. Por otro lado, la existencia de otros factores que influyen negativamente sobre la transmisión viral, pueden complementar a los Hx en prevenir dicho proceso.

Entre los factores que afectan la transmisión del VEAC, está la habilidad intrínseca diferente de cada especie de áfido para inocular este virus (Osler y col., 1990; Power y col., 1991). Se ha demostrado que *R. padi* transmite el VEAC más

eficientemente que *S. avenae* (Power y col., 1991). Una posible explicación puede ser que *S. avenae* permanece realizando actividades extrafloemáticas por más tiempo que *R. padi* (Shukle y col., 1987). Los resultados mostrados en la Fig. 11 podrían apoyar este hecho, ya que, salvo en los cultivares de trigo de mayores concentraciones de Hx, *R. padi* llega al floema en un tiempo más corto que *S. avenae*.

La baja eficiencia de *S. avenae* en la transmisión del VEAC ha sido atribuida a la alta tasa de movilidad de esta especie (Power, 1991). Esta alta movilidad puede ser relacionada en el caso de trigo con diferentes concentraciones de Hx en las plantas. Esta idea puede ser avalada por el hecho que adultos alados de *S. avenae*, puestos frente a trigos con contenidos diferentes de Hx, prefieren aquellos de menor concentración (Nicol y col., 1992).

Otro factor que afecta la transmisión del VEAC está relacionado con la adquisición del virus desde fuentes infectadas. El título de virus en la planta influye sobre la habilidad, tanto de *R. padi* como de *S. avenae*, para transmitir la raza PAV del VEAC (Gray y col., 1991). Como ya se ha destacado, el VEAC requiere contacto con el floema para ser transmitido (Scheller y Shukle, 1986) y los resultados indican que el contacto floemático sería influenciado por la presencia de Hx en tejidos previos (Tabla 2, Fig. 11). Así, los Hx podrían actuar en prevenir la adquisición del VEAC.

Las gramíneas silvestres constituyen fuentes de virus y son usadas por los áfidos como hospederos alternantes durante los períodos en que no se cultivan los cereales. Las migraciones primaverales tempranas permiten que los áfidos repartan el virus en los

cultivos de cereales (Eagling y col., 1989; Conti y col., 1990). Por otra parte, se ha determinado que los Hx están presentes en numerosas gramíneas silvestres (Copaja y col., 1991; Niemeyer y col., 1992), pudiéndose inferir que privilegiando la proliferación de pastos con altas concentraciones de Hx se podría disminuir la diseminación del virus por parte de áfidos migrantes.

Cuando se compara la eficiencia intrínseca en la transmisión viral de tres especies de áfidos en *Avena sativa*, se observa que sigue el orden *R. padi* > *M. dirhodum* > *S. avenae* (Osler y col., 1990). Los resultados comparativos entre estas especies muestran que *M. dirhodum* es el menos afectado por la presencia de Hx en plantas (Fig. 11). Así, los Hx tendrían baja incidencia en la transmisión del VEAC cuando *M. dirhodum* es el vector. Afortunadamente, en condiciones de campo esta especie tiene importancia como vector solamente cuando existen altas poblaciones en tempranos estados de desarrollo de las plantas, lo que ha sido observado que ocurre en Inglaterra en aquellos años cuando los inviernos son templados (McGrath y Bale, 1989).

R. maidis no es afectado por los Hx en el trigo (Figs. 11 y 12), por lo que tampoco se vería disminuida su capacidad de transmitir virus. Afortunadamente, la preferencia alimenticia de esta especie no muestra al trigo como hospedero habitual (Bing y col., 1990).

Finalmente, se debe tener en consideración que los resultados fueron obtenidos con plantas de trigo en el estado de una hoja. Se sabe que a medida que la planta se desarrolla la concentración global de Hx disminuye (Argandoña y col., 1981; Thackray

y col., 1990). Sin embargo, éstos permanecerían en concentraciones relativamente altas en la hoja bandera (Thackray y col., 1990; Leszczynski y col., 1989). Por otro lado, en los campos chilenos ha sido observado que las mayores poblaciones de áfidos ocurren cuando las plantas están en el estado de segundo nudo visible (Herrera y Quiroz, 1988). Para proyectar estos resultados en condiciones óptimas a situaciones en el campo, es necesario desarrollar cultivares que posean altas concentraciones de Hx durante la vida de la planta, o al menos hasta los estados de crecimiento en los cuales las poblaciones de áfidos comienzan a dejar de ser económicamente importantes. Para ello, los mayores esfuerzos en futuras investigaciones acerca del tema deben ser orientados a dilucidar la biosíntesis de los Hx. Con ello determinado y utilizando herramientas de biología molecular, se podrían encontrar los medios para desarrollar plantas con altas concentraciones de Hx sostenidas en el tiempo.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio sugieren que los Hx jugarían un papel importante en la resistencia de la planta contra los áfidos. Los efectos de los Hx dependerían de su ubicación en la planta. Una alta concentración de Hx en el mesófilo provocaría un efecto antialimentario durante la penetración del estilete del áfido, mientras que la presencia en la savia floemática provocaría antibiosis.

Además, se demostró la disminución en la transmisión del VEAC a trigos con altas concentraciones de Hx.

La utilización de los Hx como agentes controladores de la población de los áfidos depende de la sensibilidad de las distintas especies hacia los Hx. Se detectaron tres grupos de áfidos: *R. padi*, *S. graminum* y *S. avenae* muy sensibles; *M. dirhodum* sensible y *R. maidis* insensible a los Hx presentes en las plantas. De este modo, un incremento de la concentración de Hx en la planta estaría justificado para controlar poblaciones de *R. padi*, *S. graminum* y *S. avenae*. En cambio, el uso de Hx en el control de *M. dirhodum* debería ser complementado con otros métodos, y el uso de Hx en el caso de *R. maidis* no estaría justificado sobre la base de la evidencia presentada.

BIBLIOGRAFIA

- Argandoña, V.H. y Corcuera, L.J. (1985) Distribution of hydroxamic acids in *Zea mays* tissues. *Phytochemistry* 24: 177-178.
- Argandoña, V.H., Corcuera, L.J., Niemeyer, H.M. y Campbell, B.C. (1983) Toxicity and feeding deterency of hydroxamic acid from gramineae in synthetic diets against the greenbug, *Schizaphis graminum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 34: 134-138.
- Argandoña, V.H., Luza, J.G., Niemeyer, H.M. y Corcuera, L.J. (1980) Role of hydroxamic acids in the resistance of cereals to aphids. *Phytochemistry* 19: 1665-1668.
- Argandoña, V.H., Niemeyer, H.M. y Corcuera, L.J. (1981) Effect of content and distribution of hydroxamic acids in wheat on infestation by *Schizaphis graminum*. *Phytochemistry* 20: 673-676.
- Argandoña, V.H., Peña, G.F., Niemeyer, H.M. y Corcuera, L.J. (1982) Effect of cysteine on stability and toxicity to aphids of a cyclic hydroxamic acid from Gramineae. *Phytochemistry* 21: 1573-1574.
- Argandoña, V.H., Zúñiga, G.E. y Corcuera, L.J. (1987) Distribution of gramine and hydroxamic acids in barley and wheat leaves. *Phytochemistry* 26: 1917-1918.
- Barría, B.N., Copaja, S.V. y Niemeyer, H.M. (1992) Occurrence of DIBOA in wild *Hordeum* species and its relation to aphid resistance. *Phytochemistry* 31: 89-91.
- Beck, D.L., Dunn, G.M., Routley, D.G. y Bowman, J.S. (1983) Biochemical basis of resistance in corn to the corn leaf aphid. *Crop Science* 23: 995-996.
- Beck, S.D. y Stauffer, J.F. (1957) The European corn borer, *Pyrausta nubilalis* (Hubn.), and its principal host plant. III. Toxic factors influencing larval establishment. *Annals of the Entomological Society of America* 50: 166-170.
- Bing, J.W., Novak, M.G., Obrycki, J.J. y Guthrie, W.D. (1991) Stylet penetration and feeding sites of *Rhopalosiphum maidis* (Homoptera: Aphididae) on two growth stages of maize. *Annals of the Entomological Society of America* 84: 549-554.

- Bing, J.W., Novak, M.G., Obrycki, J.J. y Guthrie, W.D. (1991) Stylet penetration and feeding sites of *Rhopalosiphum maidis* (Homoptera: Aphididae) on two growth stages of maize. *Annals of the Entomological Society of America* 84: 549-554.
- Bohidar, K., Wratten, S.D. y Niemeyer, H.M. (1986) Effects of hydroxamic acids on the resistance of wheat to the aphid *Sitobion avenae*. *Annals of Applied Biology* 109: 193-198.
- Bravo, H.R. y Niemeyer, H.M. (1986) A new product from the decomposition of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA), a hydroxamic acid from cereals. *Heterocycles* 24: 335-337.
- Brendenberg, J.B.-son, Honkanen, E. y Virtanen, A.I. (1962) The kinetics and mechanism of the decomposition of 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one. *Acta Chemica Scandinavica* 16: 135-141.
- Carter, N., McLean, I.F.G., Watt, A.D. y Dixon, A.F.G. (1980) Cereal aphids: a case study and review. *Applied Biology* 5: 271-348.
- Conti, M., D'Arcy, C.J., Jedlinski, H. y Burnett, P.A. (1990) The "yellow plague" of cereals, barley yellow dwarf virus. En Burnett, P.A. (ed.) *World Perspectives on Barley Yellow Dwarf*, CIMMYT, México, D.F., pp. 1-6.
- Copaja, S.V., Barria, B.N. y Niemeyer, H.M. (1991) Hydroxamic acid content of perennial Triticeae. *Phytochemistry* 30: 1531-1534.
- Copaja, S.V., Bravo, H.R. y Niemeyer, H.M. (1986) Quantitation of N-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-glyoxylohydroxamic acid, a reactive intermediate in reactions of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one. *The Journal of Organic Chemistry* 51: 3542-3544.
- Corcuera, L.J., Argandoña, V.H. y Niemeyer, H.M. (1982) Effect of cyclic hydroxamic acids from cereals on aphids. En Kehl, H. (ed.) *Chemistry and Biology of Hydroxamic Acids*, Karger, Basel, pp. 111-118.
- Corcuera, L.J., Queirolo, C.B. y Argandoña, V.H. (1985) Effects of 2-β-D-glucosyl-4-hydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one on *Schizaphis graminum* (Rondani) (Insecta: Aphididae) feeding on artificial diets. *Experientia* 41: 515-516.
- Cuevas, L. y Niemeyer, H.M. (1993) Role of aphid cholinesterases as target of hydroxamic acids, a resistance factor in wheat against *Rhopalosiphum padi*. *Phytochemistry* (en prensa).

- Cuevas, L., Niemeyer, H.M. y Jonsson, L.M.V. (1992) Partial purification and characterization of hydroxamic acid glucoside β -D-glucosidase from maize. *Phytochemistry* 31: 2609-2612.
- Cuevas, L., Niemeyer, H.M. y Pérez, F.J. (1990) Reaction of DIMBOA, a resistance factor from cereals, with α -chymotrypsin. *Phytochemistry* 29: 1429-1432.
- Eagling, D.R., Cunningham, P.J., Sward, R.J. y Halloran, G.M. (1989) The incidence of barley yellow dwarf virus isolates in perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in south-western Victoria. *Plant Pathology* 38: 408-413.
- Gibson, R.W. y Plumb, R.T. (1977) Breeding plants for resistance to aphids. En Harris, K.F. y Maramorosch, K. (eds.) *Aphids as Virus Vectors*, Academic Press, New York, pp. 474-500.
- Gildow, F.E. y Rochow, W.F. (1980) Role of the accessory salivary gland in aphid transmission of barley yellow dwarf virus. *Virology* 104: 97-108.
- Gray, S.M., Power, A.G., Smith, D.M., Seaman, A.J. y Altman, N.S. (1991) Aphid transmission of barley yellow dwarf virus: Acquisition access periods and virus concentration requirements. *Phytopathology* 81: 539-545.
- Griffiths, D.C., Pickett, J.A., Smart, L.E. y Woodcock, C.M. (1989) Use of insect antifeedants against aphid vectors of plant virus diseases. *Pesticides Science* 27: 269-276.
- Grombacher, A.W., Russell, W.A. y Guthrie, W.D. (1989) Resistance to first-generation European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and DIMBOA concentration in midwhorl leaves of the BS9 maize synthetic. *Journal of the Kansas Entomological Society* 62: 103-107.
- Guthrie, W.D., Tseng, C.T., Russell, W.A., Coats, J.R., Robbins, J.C. y Tollefson, J.J. (1986) DIMBOA content at seven stages of plant development in a maize synthetic cultivar. *Journal of the Kansas Entomological Society* 59: 356-360.
- Herrera, G.M. y Quiroz, C. (1988) Pérdidas de rendimiento en trigo causadas por la infección natural del VEAC, en ensayos realizados desde 1976 a 1985. Santiago. *Agricultura Técnica* 48: 75-80.
- Hofman, J. y Hofmanova, O. (1969) 1,4-Benzoxazine derivatives in plants. Sephadex fractionation and identification of a new glucoside. *European Journal of Biochemistry* 8: 109-112.

- Kimmins, F.M. y Tjallingii, W.F. (1985) Ultrastructure of sieve element penetration by aphid stylet during electrical recording. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 39:135-141.
- Klun, J.A. y Robinson, J.F. (1969) Concentration of two 1,4-benzoxazinones in dent corn at various stages of development of the plant and its relation to resistance of the host to the European corn borer. *Journal of Economic Entomology* 62: 214-220.
- Klun, J.A., Tipton, C.L., Robinson, J.F., Ostren, D.L. y Beroza, M. (1970) Isolation and identification of 6,7-dimethoxy-2-benzoxazolinone from dried tissues of *Zea mays* (L) and evidence of its cyclic hydroxamic acid precursor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 18: 663-665.
- Leszczynski, B. y Dixon, A.F.G. (1992) Resistance of cereals to aphids: the interaction between hydroxamic acids and the glutathione S-transferases in the grain aphid *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae). *Journal of Applied Entomology* 113: 61-67.
- Leszczynski, B., Matok, H. y Dixon, A.F.G. (1992) Resistance of cereals to aphids: the interaction between hydroxamic acids and UDP-glucose transferases in the aphid *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae). *Journal of Chemical Ecology* 18: 1189-1200.
- Leszczynski, B., Wright, L.C. y Bakowski, T. (1989) Effect of secondary plant substances on winter wheat resistance to grain aphid. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 52: 135-139.
- Lister, R.M. y Rochow, W.F. (1979) Detection of barley yellow dwarf virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology* 43: 649-654.
- Long, B.J., Dunn, G.M., Bowman, J.S. y Routley, D.G. (1977) Relationship of hydroxamic acid content in corn and resistance to the corn leaf aphid. *Crop Science* 17: 55-58.
- Lyons, P.C., Hipskind, J.D., Wood, K.V. y Nicholson, R.L. (1988) Separation and quantification of cyclic hydroxamic acids and related compounds by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 57-60.
- McGrath, P.F. y Bale, J.S. (1989) Cereal aphids and the infectivity index for barley yellow dwarf virus (BYDV) in northern England. *Annals of Applied Biology* 114: 429-442.

- Molyneux, R.J., Campbell, B.C. y Dreyer, D.L. (1990) Honeydew analysis for detecting phloem transport of plant natural products. Implications for host-plant resistance to sap-sucking insect. *Journal of Chemical Ecology* 16: 1899-1909.
- Mullin, C.A. (1986) Adaptative divergence of chewing and sucking arthropods to plant allelochemicals. En Brattsten, L.B. y Ahmad, S. (eds.) *Molecular Aspects of Insect-Plant Associations*, Plenum, New York, pp. 175-209.
- Nicol, D., Copaja, S.V., Wratten, S.D. y Niemeyer, H.M. (1992) A screen of worldwide wheat cultivars for hydroxamic acid levels and aphid antixenosis. *Annals of Applied Biology* 121: 11-18.
- Niemeyer, H.M. (1988) Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the Gramineae. *Phytochemistry* 27: 3349-3358.
- Niemeyer, H.M. (1992) Aspectos ecológicos y moleculares de la interacción entre áfidos y sus plantas hospederas. *Revista Chilena de Historia Natural* 65: 103-114.
- Niemeyer, H.M., Bravo, H.R., Peña, G.F. y Corcuera, L.J. (1982) Decomposition of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-one, a hydroxamic acid from Gramineae. En Kehl, H. (ed.) *Chemistry and Biology of Hydroxamic Acids*, Karger, Basel, pp. 22-28.
- Niemeyer, H.M., Copaja, S.V. y Barria, B.N. (1992) The Triticeae as sources of hydroxamic acids, secondary metabolites in wheat conferring resistance against aphids. *Hereditas* 116: 295-299.
- Niemeyer, H.M., Pesel, E., Copaja, S.V., Bravo, H.R., Franke, S. y Francke, W. (1989a) Changes in hydroxamic acid levels of wheat plants induced by aphid feeding. *Phytochemistry* 28: 447-449.
- Niemeyer, H.M., Pesel, E., Franke, S. y Francke, W. (1989b) Ingestion of the benzoxazinone DIMBOA from wheat plants by aphids. *Phytochemistry* 28: 2307-2310.
- Osler, R., Milani, N., Talotti, C. y Carraro, L. (1990) Transmission characteristics of a nonspecific isolate of barley yellow dwarf virus isolated from maize. En Burnett, P.A. (ed.) *World Perspectives on Barley Yellow Dwarf*, CIMMYT, México, pp. 172-175.
- Pérez, F.J. y Niemeyer, H.M. (1985) The reduction of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one by thiols. *Phytochemistry* 24: 2963-2966.

- Pérez, F.J. y Niemeyer, H.M. (1989a) Reaction of DIMBOA with amines. *Phytochemistry* 28: 1831-1834.
- Pérez, F.J. y Niemeyer, H.M. (1989a) Reaction of DIMBOA, a resistance factor from cereals, with papain. *Phytochemistry* 28: 1597-1600.
- Plumb, R.T. (1983) Barley yellow dwarf virus- a global problem. En Plumb, R.T. y Thresh, J.M. (eds.) *Plant Virus Epidemiology*, Blackwell, Oxford, pp. 185-198.
- Pollard, D.G. (1973) Plant penetration by feeding aphids (Hemiptera, Aphidoidea): a review. *Bulletin of Entomological Research* 62: 631-714.
- Powell, G. (1991) Cell membrane punctures during epidermal penetrations by aphids: consequences for the transmission of two potyviruses. *Annals of Applied Biology* 119: 313-321.
- Power, A.G. (1991) Virus spread and vector dynamics in genetically diverse plant populations. *Ecology* 72: 232-241.
- Power, A.G., Seaman, A.J. y Gray, S.M. (1991) Aphid transmission of barley yellow dwarf virus: inoculation access periods and epidemiological implications. *Phytopathology* 81: 545-548.
- Queirolo, C.B., Andreo, C.S., Niemeyer, H.M. y Corcuera, L.J. (1983) Inhibition of ATPase from chloroplasts by a hydroxamic acid from the Gramineae. *Phytochemistry* 22: 2455-2458.
- Quiroz, C. (1990) Barley yellow dwarf virus in Chile. En Burnett, P.A. (ed.) *World Perspectives on Barley Yellow Dwarf*, CIMMYT, México, D.F., pp. 34-34.
- Ramírez, I.A. (1990) A review of barley yellow dwarf virus in the southern cone countries of South America. En Burnett, P.A. (ed.) *World Perspectives on Barley Yellow Dwarf*, CIMMYT, México, D.F., pp. 29-31.
- Scheller, H.V. y Shukle, R.H. (1986) Feeding behavior and transmission of barley yellow dwarf virus by *Sitobion avenae* on oats. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 40: 189-195.
- Schepers, A. (1989) Chemical control. En Minks, A.K. y Harrewijn, P. (eds.) *Aphids, Their Biology, Natural Enemies and Control, Vol 2C*, Elsevier, Amsterdam, pp. 89-122.

- Shukle, R.H., Lampe, D.J., Lister, R.M. y Foster, J.E. (1987) Aphid feeding behavior: relationship to barley yellow dwarf virus resistance in *Agropyron* species. *Phytopathology* 77: 725-729.
- Spiller, N.J., Koenders, L. y Tjallingii, W.F. (1990) Xylem ingestion by aphids- a strategy for maintaining water balance. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 55: 101-104.
- Tarn, T.R. and Adams, J.B. (1982) Aphid probing and feeding, electronic monitoring, and plant breeding. En Harris, K.F. y Maramorosch, K. (eds.) *Pathogens, Vectors and Plant Diseases: Approaches to Control*, Academic Press, Inc., New York, pp. 221-246.
- Thackray, D.J., Wratten, S.D., Edwards, P.J. y Niemeyer, H.M. (1990) Resistance to the aphids *Sitobion avenae* and *Rhopalosiphum padi* in Gramineae in relation to hydroxamic acid levels. *Annals of Applied Biology* 116: 573-582.
- Tipton, C.L., Wang, M.-C., Tsao, F.H.-C., Lin Tu, C.-C. y Husted, R.R. (1973) Biosynthesis of 1,4-benzoxazin-3-ones in *Zea mays*. *Phytochemistry* 12: 347-353.
- Tjallingii, W.F. (1985) Membrane potentials as an indication for plant cell penetration by aphid stylets. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 38: 187-193.
- Tjallingii, W.F. (1990) Continuous recording of stylet penetration activities by aphids. En Campbell, R.K. y Eikenbary, R.D. (eds.) *Aphid-Plant Genotype Interactions*, Elsevier, Amsterdam, pp. 89-99.
- Tottman, D.R., Makepeace, R.J. y Broad, H. (1979) An explanation of the decimal code for the growth stages of cereals, with illustrations. *Annals of Applied Biology* 93: 221-234.
- Unwin, F.M. (1978) A versatile high frequency microcautery. *Physiological Entomology* 3: 71-73.
- Virtanen, A.I. y Hietala, P.K. (1955a) An anti-fungi factor in rye seedlings. *Suomen Kemistilehti* B28: 165-166.
- Virtanen, A.I. y Hietala, P.K. (1955b) 2(3)-Benzoxazolinone, an antifusarium factor in rye seedlings. *Acta Chemica Scandinavica* 9: 1543-1544.
- Virtanen, A.I. y Hietala, P.K. (1959) On the formation of benzoxazolinone in rye seedlings. Isolation of the precursor. *Suomen Kemistilehti* B32: 38-38.

Virtanen, A.I., Hietala, P.K. y Wahlroos, O. (1956) An antifungal factor in maize and wheat plants. *Suomen Kemistilehti* B29: 143.

Wahlroos, O. y Virtanen, A.I. (1959) The precursors of 6-methoxybenzoxazolinone in maize and wheat plants, their isolation and some of their properties. *Acta Chemica Scandinavica* 13: 1906-1908.

Weibull, J., Brishammar, S. y Pettersson, J. (1986) Amino acid analysis of phloem sap from oats and barley: a combination of aphid stylet excision and high performance liquid chromatography. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 42: 27-30.

Woodward, M.D., Corcuera, L.J., Schnoes, H.K., Helgeson, J.P. y Upper, C.D. (1979) Identification of 1,4-benzoxazin-3-ones in maize extracts by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Plant Physiology* 63: 9-13.

Zadoks, J.C., Chang, T.T. y Konzak, C.F. (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14: 415-421.

Zúñiga, E. (1986) Control biológico de los áfidos (Hom.;Aphididae) de los cereales en Chile. I. Revisión histórica y líneas de trabajo. *Agricultura Técnica* 46: 475-477.

Zúñiga, G.E., Argandoña, V.H. y Corcuera, L.J. (1989) Presencia del biotipo C del áfido *Schizaphis graminum* en la región metropolitana y su conducta alimentaria. *Agricultura Técnica* 49: 45-49.

Zúñiga, G.E. y Massardo, F. (1991) Hydroxamic acid content in undifferentiated and differentiated tissues of wheat. *Phytochemistry* 30: 3281-3283.

APENDICE A

Lista de publicaciones

Givovich, A. (1990) BYDV transmission to wheat by *Rhopalosiphum padi* is affected by hydroxamic acids in plants. En Peters, D.C., Webster, J.A. and Chlouber, C.S. (eds.) *Aphid-plant interactions: populations to molecules*, USDA/Agricultural Research Service, Oklahoma State University, pp. 313.

Givovich, A. y Niemeyer, H.M. (1991) Hydroxamic acids affecting barley yellow dwarf virus transmission by the aphid *Rhopalosiphum padi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 59: 79-85.

Givovich, A. y Niemeyer, H.M. (1991) Effect of hydroxamic acids in wheat on BYDV transmission by *Rhopalosiphum padi* L. *CIMMYT. BYDV Newsletters* 4: 75-77.

Givovich, A., Morse, S., Cerda, H., Niemeyer, H.M., Wratten, S.D. y Edwards, P.J. (1992) Hydroxamic acids glucosides in honeydew of aphids feeding on wheat. *Journal of Chemical Ecology* 18: 841-846.

Niemeyer, H.M., Copaja, S.V., Givovich, A., Cuevas, L. y Barría, B.N. (1992) Involvement of hydroxamic acids in resistance of cereals to aphids. *Aphid Research Newsletter* 6: 10-11.

Niemeyer, H.M., Givovich, A. y Copaja, S.V. (1993) Hydroxamic acids chemical defences in wheat against aphids. En Corey, S.A., Dall, D.J. y Milne, W.M. (eds.) *Pest Control and Sustainable Agriculture*, CSIRO Publications, pp. 37-41.

Givovich, A. y Niemeyer, H.M. (1993) Presence of hydroxamic acids in the honeydew of aphids feeding on wheat seedlings, and its consequence for plant resistance and virus transmission. En Menken, S.B.J., Visser, J.H. y Herrewijn, P. (eds.) *Proceedings of the 8th International Symposium. Insect-Plant Relationships*, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, pp. 307-308.

Givovich, A. y Sandström, J., Niemeyer, H.M. and Pettersson, J. (1993). Hydroxamic acid glucosides in phloem sap affecting performance of *Rhopalosiphum padi* L. feeding on wheat. Manuscrito en preparación.

Givovich, A. y Niemeyer, H.M. (1993) Comparison of cereal aphids reaction to feeding deterency of hydroxamic acids in wheat. Manuscrito en preparación.

Givovich, A. y Niemeyer, H.M. (1993) Use of EPG on studies of the influence of hydroxamic acids on cereal aphid feeding behaviour and BYDV transmission. Manuscrito en preparación.

APENDICE B

Lista de presentaciones a congresos

Givovich A. (1987) Host-plant resistance to aphids. *EPG, Summer School*, Wageningen, Holanda. 23-29 de Agosto.

Givovich, A. y Niemeyer, H.M. (1989) The role of hydroxamic acids from wheat in pest and disease resistance. *7th International Symposium on Insect-Plant Relationships*. Budapest, Hungría. 3-8 de Julio.

Niemeyer, H.M., Givovich, A. y Copaja, S. (1989) Chemical basis of wheat defense against pest and diseases. *Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology*. Gotemburgo, Suecia. 7-11 de Agosto.

Givovich, A. (1989) Feeding preferences and behavior of *Rhopalosiphum padi* L. in wheat with different hydroxamic acid levels. *IFS Workshop on Chemical Interactions Between Organisms*. Santiago, Chile. 12-17 de Noviembre.

Givovich, A. (1990) Hydroxamic acids affecting barley yellow dwarf virus transmission by aphids. *IFS Regional Meeting on Plant Viruses*. Córdoba, Argentina. 5-9 de Marzo.

Givovich, A. (1990) Hydroxamic acids in wheat affecting BYDV transmission by the aphid *Rhopalosiphum padi*. *International Symposium on Aphid-Plant Interactions: Populations to Molecules*. Stillwater, Oklahoma, USA. 12-17 de Agosto.

Givovich, A. y Niemeyer, H.M. (1990) Efecto de los ácidos hidroxámicos de trigo sobre el áfido *Rhopalosiphum padi* L. y su habilidad como vector del VEAC. *XLI Congreso Agronómico Anual*. Santiago, Chile. 8-11 de Octubre.

Givovich, A. (1990) Los ácidos hidroxámicos afectando el comportamiento de los áfidos. *II Encuentro Nacional de Estudiantes de Postgrado en Química*. Valparaiso, Chile. 18-19 de Octubre.

Givovich, A. y Niemeyer, H.M. (1990) Estudio del efecto de los ácidos hidroxámicos de trigo sobre la habilidad del áfido *Rhopalosiphum padi* L. como vector del VEAC. *XII Congreso Nacional de Entomología*. Valparaíso, Chile. 27-30 de Noviembre.

Givovich, A. y Niemeyer, H.M. (1991) Effect of hydroxamic acids from wheat on aphid performance and BYDV transmission. *XII International Plant Protection Congress*. Rio de Janeiro, Brasil. 11-16 de Agosto.

Givovich, A. y Niemeyer, H.M. (1991) Efecto de los ácidos hidroxámicos de trigo sobre el áfido *Rhopalosiphum padi* L. (Homoptera: Aphididae) y su depredador *Eriopis connexa* Germar (Coleoptera: Coccinellidae). *XIII Congreso Nacional de Entomología*. Concepción, Chile. 26-29 de Noviembre.

Givovich, A. y Niemeyer, H.M. (1992) Aphid behaviour and BYDV transmission in wheat lines containing different levels of hydroxamic acids. *VIII International Symposium on Insect-Plant Relationships*. Wageningen, Holanda. 9-13 de Marzo.

Niemeyer, H.M. y Givovich, A. (1992) Aphid feeding deterency by hydroxamic acids in wheat seedling decreases virus transmission. *XIX International Congress of Entomology*. Beijing, China. 28 de Junio-4 de Julio.

Givovich, A. y Niemeyer, H.M. (1992) Efecto de los ácidos hidroxámicos de trigo sobre diferentes especies de áfidos de los cereales. *XLIII Congreso Agronómico Anual*. Santiago, Chile. 2-6 de Noviembre.