

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO



Identificación y caracterización de la resistencia a *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemíptera: Aphididae) y a *Diuraphis noxia* (Hemíptera: Aphididae) en cebada cervecera (*Hordeum vulgare*).

Doctorando

Ing. Agr. ERICA FERNANDA TOCHO

para optar al grado de Doctora en Ciencias Naturales

Directora

Dra. Ana María Castro

Codirectora

Dra. Ana María Marino de Remes Lenicov

2010

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

Identificación y caracterización de la resistencia a *Schizaphis graminum*
(Rondani) (Hemíptera: Aphididae) y a *Diuraphis noxia* (Hemíptera:
Aphididae) en cebada cervecera (*Hordeum vulgare*).

Doctorando

Ing. Agr. ERICA FERNANDA TOCHO

Directora

Dra. Ana María Castro

Codirectora

**Dra. Ana María Marino
de Remes Lenicov**

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar un profundo y sincero agradecimiento a mi Directora de Tesis la Dra. Ana María Castro, por su ayuda constante y su paciencia. Por haber sido el pilar más importante en mi formación científica y por confiar en mí, aún más de lo que yo misma confiaba. Por su acompañamiento y dedicación durante todos estos años.

A mi Codirectora la Dra. Ana María Marino de Remes Lenicov, por su valiosa colaboración y sus observaciones críticas que han sido de mucha utilidad en la redacción de una parte de esta Tesis. Por su afectuoso trato en los momentos que he recurrido a ella.

Al Ing. Agrónomo Daniel Giménez por su buena predisposición y colaboración cuando lo he necesitado.

A todos mis compañeros de trabajo, a los que permanecen y a los que se han ido. A Mónica Collado por compartir conmigo sus conocimientos de Genética y muchos años juntas. A Mónica Ricci por ser tan solícita y generosa conmigo. Por compartir tantos ratos en el insectario, ser tan amistosa y transmitir buena energía. A Mirna Ricciardi por su enorme colaboración en aquellos días interminables de mediciones de peso seco y área foliar, mucho más llevaderos en compañía. A Luciana Saldúa. A mis amigas María Silvia Tacaliti, Carolina Sgarbi y Mariana Barragán, con quienes, no sólo he compartido la época de estudios universitarios, sino que la vida nos ha reunido en la Cátedra de Genética para compartir nuestro desempeño docente.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el apoyo financiero al haberme cedido una Beca para la realización de esta Tesis. Al Instituto de Fisiología Vegetal y a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales por brindarme todos los recursos, instalaciones y equipos para llevar adelante mi trabajo de investigación. A la Facultad de Ciencias Naturales por permitirme realizar el Doctorado.

A mi país, la Argentina, porque a un país lo hace su gente y yo espero realizar con esta investigación un pequeño aporte al crecimiento, a la vez que una devolución por la posibilidad de formarme.

Y dejo para el final, pero no por ello de menor importancia, el agradecimiento más sentido a quienes ocupan el lugar primordial en mi corazón, MI FAMILIA, mi máximo orgullo. Me siento afortunada de tenerlos porque con ellos disfruto mis alegrías y lloro mis tristezas.

A mi esposo Mauro toda mi gratitud y amor por su inestimable apoyo y acompañamiento. Por su comprensión y sus consejos. Por tranquilizarme en los momentos tensos y mostrarme siempre “el medio vaso lleno”. Por quererme y cuidarme.

A mis adorados hijos, Isidro y Ulises, por ser lo más hermoso que me dio la vida, la alegría de todos mis días. Gracias porque esto también lo logré con su ayuda.

A mis papás Mabel y Osvaldo por brindarme un hogar cálido y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos. Por su generosidad y principalmente por su amor incondicional. Por ayudarme, sencillamente...en TODO.

A mis hermanas queridas, Laura y Vivien por un pasado hermoso, y un presente y futuro juntas, en las buenas y en las malas, siempre juntas. Gracias por estar al lado mío, escucharme y aconsejarme.

A mis sobrinos del alma, Pilar, Milena, Sol, Ian, Flor e Inés, por regalarme su frscura y alegría, y mientras se mantengan niños, los domingos siempre serán luminosos y divertidos.

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XIV
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN.....	1
GENERALIDADES DE LA CEBADA.....	2
Producción mundial y nacional de la cebada. Usos e importancia.....	2
Características morfológicas de la planta, taxonomía y origen filogenético.....	3
Morfología y desarrollo de la planta.....	5
Ciclo y Desarrollo.....	9
GENERALIDADES DE LOS ÁFIDOS.....	12
Taxonomía y Evolución.....	12
Caracterización, ciclo de vida, daños y alimentación de los áfidos.....	13
Características de <i>Schizaphis graminum</i>	18
Características de <i>Diuraphis noxia</i>	19
Concepto de biotipo.....	22
Antecedentes de resistencia a <i>Schizaphis graminum</i> y a <i>Diuraphis noxia</i>	23
INTERACCIÓN PLANTA-INSECTO.....	27
Generalidades de las respuestas de defensa.....	27
Control y Manejo Integrado de Plagas.....	35
Estudio de los mecanismos de resistencia de las plantas frente al ataque de insectos.....	36
Uso de los marcadores moleculares en el mejoramiento de las plantas.....	37
CAPÍTULO II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES.....	40
HIPÓTESIS.....	41
OBJETIVOS GENERALES.....	41
CAPÍTULO III ANTIXENOSIS.....	42
INTRODUCCIÓN.....	43
HIPÓTESIS.....	44
OBJETIVOS.....	44
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
Los áfidos.....	45

El material vegetal.....	45
Ensayo de antixenosis a <i>Schizaphis graminum</i> y a <i>Diuraphis noxia</i> en cuatro líneas de cebada no emparentadas.....	47
Ensayo de antixenosis a <i>Schizaphis graminum</i> y a <i>Diuraphis noxia</i> en líneas recombinantes dihaploides.....	48
Análisis génico-molecular de las líneas recombinantes dihaploides.....	48
Análisis de ligamiento.....	49
RESULTADOS.....	50
Ensayo de antixenosis a <i>Schizaphis graminum</i> y a <i>Diuraphis noxia</i> en cuatro líneas no emparentadas..	50
Ensayo de antixenosis a <i>Schizaphis graminum</i> y <i>Diuraphis noxia</i> en líneas recombinantes dihaploides.	51
Análisis de ligamiento.....	53
DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIONES.....	55
CAPÍTULO IV TOLERANCIA.....	56
INTRODUCCIÓN.....	57
HIPÓTESIS.....	60
OBJETIVOS.....	60
MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
Los áfidos.....	60
El material vegetal.....	60
Ensayo de Tolerancia a <i>Schizaphis graminum</i> y <i>Diuraphis noxia</i> en cuatro líneas de cebada no emparentadas.....	61
Ensayo de Tolerancia a <i>Schizaphis graminum</i> y <i>Diuraphis noxia</i> en líneas recombinantes dihaploides de cebada.....	62
Análisis de Ligamiento.....	64
RESULTADOS.....	65
Ensayo de Tolerancia a <i>Schizaphis graminum</i> y <i>Diuraphis noxia</i> en cuatro líneas de cebada no emparentadas.....	65
Ensayo de tolerancia a <i>Schizaphis graminum</i> y <i>Diuraphis noxia</i> en líneas recombinantes dihaploides....	66
Análisis de ligamiento.....	83
DISCUSIÓN.....	91
CONCLUSIONES.....	95
CAPÍTULO V ANTIBIOSIS.....	97
INTRODUCCIÓN.....	98
HIPÓTESIS.....	100

OBJETIVOS.....	100
MATERIALES Y MÉTODOS.....	101
Los áfidos.....	101
Material vegetal.....	101
Ensayo de antibiosis a <i>Schizaphis graminum</i> y a <i>Diuraphis noxia</i> en líneas recombinantes dihaploides	101
Análisis de ligamiento.....	103
RESULTADOS.....	104
Ensayo de antibiosis a <i>Schizaphis graminum</i> y a <i>Diuraphis noxia</i> en líneas recombinantes dihaploides	104
Análisis de Ligamiento.....	111
DISCUSION.....	112
CONCLUSIONES.....	113
CAPÍTULO VI HORMONAS.....	114
INTRODUCCIÓN.....	115
HIPÓTESIS.....	117
OBJETIVOS.....	118
MATERIALES Y MÉTODOS.....	118
Material vegetal.....	118
Solución de hormonas.....	118
Ensayo de tolerancia con tratamiento hormonal.....	119
Análisis de Ligamiento.....	119
RESULTADOS.....	120
Ensayo de tolerancia con tratamiento hormonal.....	120
Análisis de Ligamiento.....	124
DISCUSIÓN.....	127
CONCLUSIONES.....	129
CAPÍTULO VII CONCLUSIONES FINALES.....	130
CAPÍTULO VIII ACTIVIDADES DE INVESTIGACIÓN A REALIZAR EN EL FUTURO.....	133
ANEXO.....	135
CAPÍTULO IX REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	142

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
Ang	Angora
CM	Cuadrado medio
cM	Centimorgan
DMS	Diferencia mínima significativa
Dom	Dominante
ET	Etileno
HR	Respuesta de hipersensibilidad (<i>hypersensitive response</i>)
IP	Inhibidores de proteinasas
JA	Ácido jasmónico
LRD	Líneas recombinantes dihaploides
MAS	Selección asistida por marcadores (<i>Marker assisted selection</i>)
MIP	Manejo Integrado de Plagas
PCD	Muerte celular programada (<i>Programmed cell death</i>)
PR	Proteínas relacionadas con la patogénesis
PRT	Pulgón ruso del trigo
PVC	Pulgón verde de los cereales
QTL	Loci de caracteres cuantitativos (<i>Quantitative trait loci</i>)
Rec	Recombinante
RI	Resistencia inducida
ROS	Especies de oxígeno reactivo (<i>Reactive oxygen species</i>)
SA	Ácido salicílico
SAR	Resistencia sistémica adquirida (<i>Systemic acquired resistance</i>)
T	Testigo

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zonas de producción de cebada cervecera en la República Argentina.....	2
Figura 2. Porcentajes de producción total de cebada cervecera por provincia.....	3
Figura 3: Espigas de cebada.....	5
Figura 4. Plántula emergida mostrando su primera hoja desplegada.....	6
Figura 5. Partes de las hojas.....	6
Figura 6. Espiguilla uniflora.....	7
Figura 7. Vista lateral y superior de las espiguillas.....	8
Figura 8. Partes de la semilla.....	9
Figura 9. Crecimiento y desarrollo de una planta de cebada.....	11
Figura 10. Características morfológicas generales de los áfidos.....	13
Figura 11. Aparato bucal de los áfidos.....	14
Figura 12. Ciclo de vida de los áfidos.....	16
Figura 13. Sección de hoja que muestra la penetración del estilete.....	17
Figura 14. <i>Schizaphis graminum</i>	19
Figura 15. <i>Diuraphis noxia</i>	21
Figura 16. <i>Diuraphis noxia</i>	22
Figura 17. Búsqueda de una planta hospedadora por un áfido.....	28
Figura 18. Mantenimiento de las poblaciones de áfidos en macetas.....	45
Figura 19. Líneas parentales Dom y Rec.....	46
Figura 20. Descendencia obtenida de los progenitores Dom y Rec.....	47
Figura 21. Ensayo de antixenosis.....	48
Figura 22. Distribución de frecuencias de las LRD y los progenitores Dom y Rec, en relación al número de áfidos (<i>D. noxia</i>) por planta.....	52
Figura 23. Ensayo de tolerancia en bandejas.....	62
Figura 24. Ensayo de tolerancia cubierto con jaulas de boile.....	63
Figura 25: Distribución de frecuencias de las LRD y los progenitores Dom y Rec para el área foliar final.....	68

Figura 26. Distribución de frecuencias de las LRD y los progenitores Dom y Rec para el peso seco final.....	71
Figura 27. Distribución de frecuencias de las LRD y los progenitores Dom y Rec para el área foliar final (AF _f).....	75
Figura 28. Distribución de frecuencias de las LRD y los progenitores Dom y Rec para el peso seco final (PS _f).....	77
Figura 29. Distribución de frecuencias de las LRD y los progenitores Dom y Rec para el contenido de clorofila en el ápice (a) y en la base (b) de la hoja	79
Figura 30. Distribución de frecuencias de las LRD y los progenitores Dom y Rec para el contenido de clorofila apical (a) y basal (b) de la 3 ^{er} hoja.....	81
Figura 31. Mapa de ligamiento del cromosoma 2H de las líneas recombinantes dihaploides testigo.....	90
Figura 32. Mapa de ligamiento del cromosoma 2H de las líneas recombinantes dihaploides infestadas con A) PVC y B) PRT.....	90
Figura 33. Mapa de ligamiento del cromosoma 2H de las líneas recombinantes dihaploides Testigo.....	91
Figura 34. Ensayo de antibiosis realizado en maceta.....	103
Figura 35. Días hasta la madurez reproductiva (d) de <i>S. graminum</i>	106
Figura 36. Longevidad (L) de <i>S. graminum</i>	106
Figura 37. Fecundidad (F) de <i>S. graminum</i>	107
Figura 38. Días hasta la madurez reproductiva (d) de <i>D. noxia</i>	109
Figura 39. Longevidad (L) de <i>D. noxia</i>	110
Figura 40. Fecundidad de <i>D. noxia</i>	110
Figura 41. Tasa intrínseca de incremento poblacional (r_m) de <i>D. noxia</i>	111
Figura 42. Ensayo de tolerancia con tratamiento hormonal.....	120

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Biotipos de <i>Schizaphis graminum</i> , huésped y año de la primera referencia	23
Tabla 2. Nombre, fuente y localización cromosómica de los genes de trigo que otorgan resistencia a <i>Schizaphis graminum</i>	25
Tabla 3. Genes y fuentes de resistencia a <i>Diuraphis noxia</i>	27
Tabla 4. Análisis de la varianza del mecanismo de antixenosis.....	50
Tabla 5. Análisis de la resistencia por antixenosis, evaluando las medias del número de áfidos adultos y ninfas nacidas de PVC y PRT en líneas de cebada, realizado por el método de libre elección del hospedero.....	51
Tabla 6. Análisis de la varianza de antixenosis en líneas recombinantes dihaploides	52
Tabla 7. Análisis de la resistencia por antixenosis, evaluando el número de áfidos promedio de PVC y PRT en líneas recombinantes dihaploides de cebada y los progenitores Dom y Rec.....	52
Tabla 8. Análisis de la varianza del mecanismo de tolerancia al PVC y al PRT en líneas no emparentadas de cebada.....	65
Tabla 9. Análisis de medias en cuatro líneas de cebada.....	66
Tabla 10 Análisis de la varianza del área foliar final (AF _f) de las LRD.....	67
Tabla 11. Análisis de medias del área foliar final (AF _f) de las LRD.....	68
Tabla 12. Análisis de la varianza del peso fresco final (PF _f) de las LRD.....	69
Tabla 13 Análisis de medias del peso fresco final (PF _f) de las LRD.....	69
Tabla 14. Análisis de la varianza del peso seco final (PS _f) de las LRD.....	70
Tabla 15. Análisis de medias del peso seco final (PS _f) de las LRD.....	71
Tabla 16. Análisis de la varianza del contenido de clorofila en el ápice de la hoja (SPAD ^{apical}) y en la base (SPAD ^{basal}) en las LRD.....	71
Tabla 17. Análisis de medias del contenido de clorofila final apical y basal de las LRD.....	72
Tabla 18. Análisis de la varianza del área foliar final (AF _f) y de la variación de área foliar (VAF) en las LRD.....	74
Tabla 19. Análisis de medias del área foliar final (AF _f) y la variación de área foliar (VAF) en las LRD.....	75

Tabla 20. Análisis de la varianza del peso seco final (PS _f) y de la variación de peso seco (VPS) en las LRD.....	76
Tabla 21. Análisis de medias del peso seco final (PS _f) y la variación de peso seco (VPS) de las LRD.....	76
Tabla 22. Análisis de la varianza del contenido de clorofila final apical y basal (SPAD ^{apical} y SPAD ^{basal}) en las LRD.....	77
Tabla 23. Análisis de medias del contenido de clorofila final (SPAD _f) en el ápice y en la base de la hoja de las LRD.....	78
Tabla 24. Análisis de la varianza del contenido de clorofila final apical y basal en la 3 ^o hoja (SPAD _{3h} ^{apical} y SPAD _{3h} ^{basal}) en las LRD.....	79
Tabla 25. Análisis de medias de las LRD para: el contenido de clorofila en la 3 ^o hoja (SPAD _{3h}).....	80
Tabla 26: Análisis de la varianza de las LRD para el contenido de clorofila determinado por espectrofotometría.....	81
Tabla 27. Análisis de medias de las LRD para el contenido de clorofila final <i>a</i> , <i>b</i> y <i>total</i> (Cl <i>a</i> , Cl <i>b</i> y Cl(<i>total</i>)).....	82
Tabla 28. Parámetros asociados a los marcadores moleculares en las plantas infestadas con PVC (<i>S. graminum</i>).....	84
Tabla 29. Parámetros asociados a los marcadores moleculares en las plantas infestadas con PRT (<i>D. noxia</i>).....	85
Tabla 30 Parámetros asociados a los marcadores moleculares en el tratamiento Testigo.....	88
Tabla 31. Parámetros asociados a los marcadores moleculares en el tratamiento con PVC (<i>S. graminum</i>).....	89
Tabla 32. Parámetros asociados a los marcadores moleculares en el tratamiento con PRT (<i>D. noxia</i>).....	89
Tabla 33. Análisis de la varianza de los parámetros <i>d</i> , <i>Md</i> , <i>L</i> y <i>F</i> con <i>S. graminum</i>	104
Tabla 34. Análisis de la varianza de <i>r_m</i> , <i>pr</i> y <i>TRM</i> con <i>S. graminum</i>	104
Tabla 35. Antibiosis a <i>S. graminum</i> en las LRD y los progenitores Dom y Rec....	105
Tabla 36. Análisis de la varianza de los parámetros <i>d</i> , <i>Md</i> , <i>L</i> y <i>F</i> con <i>D. noxia</i>	108
Tabla 37. Análisis de la varianza de <i>r_m</i> , <i>pr</i> y <i>TRM</i> con <i>D. noxia</i>	108
Tabla 38. Antibiosis a <i>Diuraphis noxia</i> en las LRD y los progenitores Dom y Rec.	108

Tabla 39. Análisis de la varianza con tratamiento hormonal.....	120
Tabla 40. Análisis de medias del tratamiento con ácido jasmónico.....	121
Tabla 41. Análisis de medias del tratamiento con ácido salicílico.....	122
Tabla 42. Análisis de medias del tratamiento con etileno.....	123
Tabla 43. Análisis de medias del tratamiento con ABA.....	124
Tabla 44. Parámetros asociados a los marcadores moleculares en las plantas Testigo (T).....	124
Tabla 45. Parámetros asociados a los marcadores moleculares en las plantas con tratamiento de ácido jasmónico (JA).....	125
Tabla 46. Parámetros asociados a los marcadores moleculares en las plantas con tratamiento de ácido salicílico (SA).....	125
Tabla 47. Parámetros asociados a los marcadores moleculares en las plantas con tratamiento de etileno (E).....	126
Tabla 48. Parámetros asociados a los marcadores moleculares en las plantas con tratamiento de ABA.....	126

RESUMEN

Desde la introducción de cultivares transgénicos el empleo de pesticidas tradicionales ha sufrido una significativa merma. Sin embargo, los mecanismos en que se basa este control químico, así como el uso directo de muchos de los actuales biopesticidas específicos, distan aún de sustentabilizar las producciones. Cualquier intento de control extremo de una plaga históricamente ha demostrado, que selecciona los mayores niveles de la resistencia al plaguicida empleado permitiendo en las poblaciones sólo la permanencia de los genotipos más agresivos.

Existen sin embargo, otras herramientas que permiten manejar las plagas de un modo más eficiente y sustentable, aprovechando los efectos benéficos desarrollados por los hospedantes para defenderse de sus agresores. Mediante el análisis de las interacciones insecto-huésped, se puede lograr un eficiente manejo integrado de plagas (MIP). La estrategia de control más efectiva y ambientalmente sustentable del MIP es el mejoramiento genético vegetal.

La resistencia de las plantas a insectos ha sido caracterizada de acuerdo al tipo de mecanismo en que se basa en antixenosis, tolerancia y antibiosis. La antixenosis, expresa la capacidad de la planta de no compatibilizar con el parásito, evitando que actúe como hospedera, no dejando que el insecto la utilice para oviposición, alimento o refugio. La tolerancia representa la capacidad de la planta de superar el ataque de una plaga, de manera que no haya disminución significativa de la calidad y cantidad de su producción. La antibiosis, está determinada por aquellos efectos preventivos de daño o destructivos que el hospedero ejerce principalmente sobre el crecimiento, desarrollo o sobrevivencia del insecto. Estos mecanismos de resistencia pueden estar presentes en forma simultánea en una misma planta, dificultando la identificación de cada uno de ellos y la magnitud de su efecto.

Los áfidos pertenecen a un grupo de insectos suctores que se alimentan mediante la utilización de los estiletes, principalmente en el floema. Los daños que los áfidos provocan a sus huéspedes pueden ser de tipo directo, debido a su alimentación que producen pérdida de nutrientes y fotosintatos. Además, los daños indirectos que ocasionan, están relacionados a su capacidad de ser vectores de virus, o al desarrollo de ciertas micosis asociadas a los azúcares que excretan, junto con las deyecciones, reduciendo la biomasa fotosintetizante.

Los áfidos se encuentran distribuidos en todo el mundo con una mayor concentración de su diversidad específica en regiones templadas, debido a la abundancia de plantas hospederas. Además, son polimórficos, es decir, tienen más de una forma en su ciclo de vida con funciones específicas. Esta diversidad de formas, la habilidad de reproducirse partenogenéticamente o sexualmente y la alternancia entre hospederos, les permite desarrollar poblaciones numerosas en tiempos cortos y aprovechar las condiciones favorables para su desarrollo. Por todas estas características son considerados plagas de complejo control y por ello es de gran importancia la necesidad de identificar formas de resistencia que otorguen una mayor durabilidad y sustentabilidad a su control.

El pulgón verde de los cereales, *Schizaphis graminum* (Rondani) y el pulgón ruso del trigo, *Diuraphis noxia* (Kurdjumov), son dos plagas muy importantes que afectan los cultivos de cereales, entre ellos la cebada cervecera (*Hordeum vulgare* L.), en nuestro país.

Schizaphis graminum fue originariamente descrito en Italia, Rondani, 1852, estando en la actualidad ampliamente distribuido en Asia, África, Australia y América, siendo una plaga de gran importancia económica. Los daños que provoca en las zonas de infestación de las plantas son necrosis y clorosis debido al colapso celular causado por una alteración en la permeabilidad de las membranas celulares del núcleo, mitocondrias y cloroplastos del vegetal. Esta especie provoca la reducción del volumen radical y del crecimiento aéreo en distintos cereales. Se han identificado varios genes de resistencia a este áfido en trigo, y otros en cebada.

Diuraphis noxia es una especie originaria de Asia Central y Europa Oriental. Los daños que este áfido ocasiona se caracterizan por un estriado blanco en las hojas y el enrollamiento longitudinal de las mismas alrededor de la nervadura principal, formando un refugio tubular para los áfidos que impide el acceso de los predadores, parásitos e insecticidas de contacto. Sus ataques más frecuentes ocurren avanzado el ciclo de los cereales en etapa de encañazón, provocando mermas importantes en el rendimiento. En trigo se ha comunicado la identificación de más de nueve genes de tipo mendeliano no alélicos que permiten un variable grado de resistencia.

Las plantas utilizan diversas y sofisticadas estrategias para percibir e identificar el estrés y luego activar respuestas defensivas. Las fitohormonas juegan un rol importante en la respuesta de las plantas a varios estreses bióticos y abióticos, como son la presencia de patógenos, insectos herbívoros, sequía, heladas o estrés térmico. Todas las sustancias

encargadas de percibir y llevar las señales del estrés tienen acción hormonal (ácido jasmónico, metil salicílico, etileno, ABA), por ello si bien activan defensas, tienen además efectos sobre el crecimiento y en algunos casos conducen al envejecimiento precoz. Una vez que la planta detecta al patógeno o insecto, pone en funcionamiento distintos caminos de señalización, activando genes de defensa que sintetizan enzimas relacionadas con el metabolismo secundario, las que finalmente van a conducir a respuestas de tolerancia o susceptibilidad, dependiendo del genotipo, en la zona vecina al ataque o en forma sistémica a través de la planta.

Los avances de la biología molecular y la genética genómica en la comprensión de las respuestas al estrés, han facilitado la identificación de loci únicos de efecto mayor, o genes mendelianos, y otros loci de caracteres cuantitativos (QTL), relacionados con la tolerancia a distintos tipos de estrés, que serían altamente conservados en la mayoría de los grupos homeólogos y ortólogos de cereales. La selección asistida por marcadores moleculares (MAS), es una herramienta muy efectiva para acelerar la producción de cultivares con caracteres deseados en general, y en particular con resistencia a insectos. El empleo de marcadores moleculares en la mejora genética de especies vegetales ha permitido grandes avances y posee ciertas ventajas con respecto a los marcadores morfológicos, tradicionalmente empleados.

Uno de los objetivos de esta Tesis fue caracterizar los mecanismos de la resistencia a *Schizaphis graminum* y a *Diuraphis noxia* en cebada, así como localizar cromosómicamente los genes relacionados a estos mecanismos. Por otro lado, se analizó en los mismos materiales de cebada su comportamiento cuando se los expuso a inductores hormonales, tales como ácido jasmónico, ácido salicílico, etileno y ABA, en términos del crecimiento compensatorio. Posteriormente, se comparó la relación existente entre los genes que confieren resistencia a áfidos y aquellos que se activan ante la presencia de inductores hormonales relacionados con el estrés.

Se seleccionó a los padres contrastantes (Dom y Rec) para generar la población segregante y en ésta se analizó cada uno de los mecanismos de resistencia, que ocupan un capítulo cada uno.

Los progenitores Dom y Rec no mostraron diferencias en su nivel de antixenosis a *S. graminum*. Sin embargo, Rec fue antixenótico a *D. noxia* y varias líneas recombinantes dihaploides se comportaron como él ante la presencia de éste áfido. No hubo asociación entre la antixenosis y los marcadores mapeados en esta población de cebada.

Por otro lado, Dom resultó más susceptible a *D. noxia*, en tanto Rec fue más tolerante al mismo áfido. Las líneas recombinantes dihaploides mostraron distintos grados de tolerancia con comportamientos similares a uno u otro padre, incluso algunas líneas superaron al padre tolerante evidenciando herencia transgresiva. Muchos de los parámetros de crecimiento medidos se asociaron con marcadores moleculares ubicados en una misma región del cromosoma 2H. Esto podría indicar la presencia de un gen mayor relacionado con el crecimiento aéreo de la planta.

Además, Dom fue más antibiótico que Rec ante la presencia de *S. graminum* y varias líneas se comportaron como aquel padre. Frente a *D. noxia* los dos padres mostraron una baja antibiosis. Sin embargo, varias líneas presentaron un nivel de antibiosis superior al de sus padres. A su vez, se identificaron ocho líneas recombinantes dihaploides que fueron antibióticas a ambos áfidos. Los parámetros de crecimiento de los pulgones evaluados no estuvieron asociados con los marcadores moleculares mapeados.

Casi todos los genotipos evaluados, incluidos ambos padres, indujeron defensas de tolerancia ante el tratamiento con fitohormonas (ácido jasmónico, ácido salicílico, etileno y ABA) sin diferenciarse en los crecimientos con las plantas que no recibieron tratamiento hormonal. Algunas líneas mostraron una sobreexpresión en el contenido de clorofila ante la inducción con el ácido jasmónico, y muchas de ellas, también en presencia de etileno. Asimismo, se identificaron varios QTL en los cromosomas 3H y 5H, y un número menor en los cromosomas 2H y 7H.

A su vez, se encontró que la tolerancia a *Schizaphis graminum* y a *Diuraphis noxia*, estuvo asociada con los mismos marcadores moleculares del cromosoma 2H que algunos parámetros medidos bajo tratamiento con ácido jasmónico, indicando que los mismos genes fueron activados por ambos tratamientos.

Finalmente, cabe destacar que se han identificado ocho líneas recombinantes dihaploides que portan genes para los tres mecanismos de resistencia a ambos áfidos, y éstas mismas líneas presentaron crecimiento compensatorio por efecto de los tratamientos hormonales. La selección de éstas líneas podría permitir el desarrollo de cultivares comerciales de cebada con genes de resistencia a *Schizaphis graminum* y a *Diuraphis noxia*.

ABSTRACT

Since the introduction of transgenic cultivars, the use of traditional pesticides has decreased significantly. However, the mechanisms underlying this chemical control, as well as the direct use of many of the current specific biopesticides, are still far from being able to lead to a sustainable production.

It is very well known that any attempt of total control of a pest leads to the selection of highest levels of pesticide resistance, thus allowing the most aggressive genotypes to be the only ones remaining in the populations.

There are, however, other tools to manage pests in a more efficient and sustainable way, which take advantage of the strategies developed by hosts to defend themselves against their aggressors. Efficient integrated pest management (IPM) can thus be achieved by having a deep knowledge on the different insect-host interactions. The most effective and environmentally sustainable IPM known so far is plant breeding.

Plant resistance to insects has been characterized as antixenosis, antibiosis and tolerance, according to the type of mechanism on which it is based. Antixenosis expresses the ability of the plant to be incompatible for the parasite, so that the parasite cannot use it as a host, or for oviposition, food or shelter. Antibiosis is determined by the preventive or destructive effects that the host exerts primarily on growth, development or survival of the insect. Tolerance represents the capacity of the host plant to overcome the attack of a pest so that the quality and/or yield of its production are not significantly decreased.

Since these resistance mechanisms may be all present in one same plant, it is sometimes difficult to identify them and assess the magnitude of their effect.

Aphids belong to a group of sucking insects that feed mainly on the phloem using the stylus. The damage that aphids cause to their host can be either direct, because of the loss of nutrients and photosynthates caused by their feeding, or indirect, because of their ability to be vectors of viruses and/or develop certain fungal infections, which leads to a reduction of the photosynthesizing biomass.

Aphids are distributed worldwide, showing a higher species diversity in temperate regions due to the abundance of host plants. In addition, they are polymorphic, i.e., have more than one form with specific functions in their life cycle. This diversity of forms, their ability to reproduce either parthenogenetically or sexually and the alternation between hosts allow them to develop large populations in a short period of time and take

advantage of favorable conditions for their development. Because of all these features, they are considered pests difficult to control and is therefore of great importance to identify the forms of resistance that allow a longer and more sustainable control.

The cereal aphid *Schizaphis graminum* (Rondani) and the Russian wheat aphid *Diuraphis noxia* (Kurdjumov) are two important pests affecting cereal crops, including malting barley (*Hordeum vulgare* L.) in Argentina.

Schizaphis graminum was originally described in Italy (Rondani, 1852), but is now known to be widely distributed in Asia, Africa, Australia and America, and thus constitutes a pest of great economic importance. It causes chlorosis and necrosis by causing an alteration in the permeability of the membranes of the nucleus, mitochondria and chloroplasts of plant cells, and causes a reduction in the root volume and aerial growth in different cereals. Several different genes coding for resistance to this aphid have been identified in wheat and barley.

Diuraphis noxia is a species from Central Asia and Eastern Europe. The damage caused by this aphid is characterized by white streaking on the leaves and the longitudinal rolling of the leaves around the central vein, forming a tubular shelter for the aphids, which prevents the access of predators, parasites and contact insecticides. It most frequently attacks late in the cycle of the cereal, in the stem elongation stage, leading to significant declines in yield. More than nine nonallelic Mendelian genes that allow developing a variable degree of resistance have been identified in wheat.

Plants use diverse and sophisticated strategies to perceive and identify stress and then activate defensive responses. Phytohormones play an important role in the response of plants to various biotic and abiotic stresses, such as the presence of pathogens, herbivorous insects, drought, frost or thermal stress. Since all the substances responsible for sensing and transmitting stress signals (jasmonic acid, methyl salicylic acid, ethylene, ABA) have hormonal action, they not only activate the defense system but also exert effects on growth and in some cases lead to premature aging.

Upon the detection of a pathogen or insect, the plant activates various signaling pathways by activating defense genes that synthesize enzymes related to secondary metabolism, which ultimately lead to either tolerance or susceptibility responses, depending on the genotype, either in the area next to the attack or systemically through the plant.

Advances in molecular biology and genomic genetics in the understanding of the responses to stress have facilitated the identification of loci of higher effect, Mendelian genes, and other quantitative trait loci (QTL) associated with tolerance to different types of stress, which would be highly conserved in most orthologous and homeologous genes of cereals.

Molecular marker-assisted selection (MAS) is a very effective tool to accelerate the production of cultivars with desired traits in general, and with insect resistance in particular. The use of molecular markers in plant breeding has allowed great advances and has certain advantages over traditionally used morphological markers.

The aims of this thesis were: i) to characterize the mechanisms of resistance to *Schizaphis graminum* and *Diuraphis noxia* in barley and chromosomically localize genes related to these mechanisms; ii) to analyze in the same barley materials the behavior when exposed to hormonal inducers such as jasmonic acid, salicylic acid, ethylene and ABA, in terms of compensatory growth; iii) and to compare the relationship between the genes that confer resistance to aphids and those that are activated in the presence of stress-related hormonal inducers. To this end, contrasting parents (Dom and Rec) were selected to generate the segregating population, and each of the mechanisms of resistance was then analyzed.

The findings showed that Dom and Rec parents did not differ in their level of antixenosis to *S. graminum* and that both Rec and several recombinant dihaploid lines were antixenotic to *D. noxia*. No association was found between antixenosis and the markers mapped in this population of barley. On the other hand, Dom was more susceptible and Rec was more tolerant to *D. noxia*. Dihaploid recombinant lines showed different degrees of tolerance, with behaviors similar to either parent. A few lines even exceeded the tolerant parent, showing transgressive inheritance. Many of the growth parameters measured correlated with molecular markers located in the same region of chromosome 2H. This could indicate the presence of a major gene related to the aerial growth of the plant.

In addition, both Dom and several lines were more antibiotic against *S. graminum* than Rec. Both parents showed low antibiosis against *D. noxia*. However, several lines had higher level antibiosis than their parents. In turn, eight recombinant dihaploid lines were identified as antibiotic to both aphids. The growth parameters of the aphids evaluated did not associate with the mapped molecular markers.

Almost all the genotypes evaluated, including both parents, induced tolerance defenses with the treatment with phytohormones (jasmonic acid, salicylic acid, ethylene and ABA) and showed no differences in the growth when compared with non-treated plants.

Some lines showed overexpression in the chlorophyll content after the induction with jasmonic acid, whereas many of them also showed overexpression in the chlorophyll content in the presence of ethylene. Also, several QTL were identified on chromosomes 3H and 5H, and a smaller number on chromosomes 2H and 7H.

In addition, the tolerance to *S. graminum* and *D. noxia* was associated with the same molecular markers on chromosome 2H as some parameters measured under the treatment with jasmonic acid, thus indicating that these genes were activated by both treatments.

Finally, it is important to highlight that eight recombinant dihaploid lines that carry genes for the three mechanisms of resistance to both aphids were identified. In addition, these lines showed compensatory growth due to the hormonal treatments. The selection of these lines might thus enable the development of commercial cultivars of barley with genes resistant to *Schizaphis graminum* and *Diuraphis noxia*.

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES DE LA CEBADA

Producción mundial y nacional de la cebada. Usos e importancia

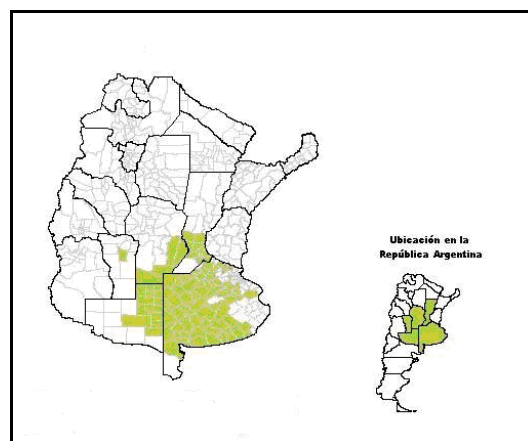
La cebada es uno de los cultivos más importantes del mundo ocupando el cuarto lugar en importancia luego del trigo, el maíz y el arroz. La mayor producción mundial de cebada cervecera le corresponde a Alemania, le siguen Canadá, Francia, España, Turquía, Reino Unido y Australia. En la Argentina, es usada casi exclusivamente para la fabricación de malta, a diferencia de Europa donde existe un mercado forrajero que absorbe el producto excedente o de mala calidad (SAGPyA 2010).

En la Argentina la producción de cebada cervecera ha crecido notablemente en los últimos 20 años. El aumento en el consumo de cerveza y el proceso de integración en el MERCOSUR han sido factores fundamentales al momento de la recuperación del cultivo en la Argentina (SAGPyA 2010).

En la campaña 2007/2008 se sembraron 436.215 hectáreas con una producción de 1.463.390 toneladas y un rendimiento de 3.546 kilogramos por hectárea.

En la Argentina existen cinco zonas de producción, las tres más importantes se encuentran ubicadas en la provincia de Buenos Aires, la cual concentra más del 90 % de la producción total (Figura 1).

Figura 1. Zonas de producción de cebada cervecera en la República Argentina

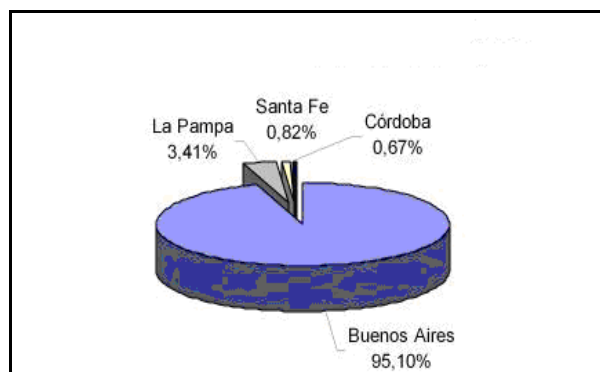


Fuente: SAGPyA

El sudeste bonaerense produce el 40 % y es la zona fuertemente definida como productora de cebada cervecera, favorecida por sus características de clima y suelos, aptas para su cultivo y por la presencia de una industria maltera que en los últimos años ha hecho importantes inversiones en la zona. El sudoeste bonaerense y La Pampa concentran

el 25 %; el área central de Buenos Aires el 30 % y el restante 5 %, el oeste de Córdoba y este de Santa Fé (Figura 2).

Figura 2. Porcentajes de producción total de cebada cervecera por provincia



Fuente: SAGPyA. Datos promedio del último quinquenio.

La cebada ha sido ampliamente estudiada por numerosos autores, destaco en particular la revisión del Dr. Molina Cano (1989) en la cual se abordan aspectos taxonómicos y culturales, que han servido de base para la profundización del tema.

Características morfológicas de la planta, taxonomía y origen filogenético

Hordeum vulgare

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Subfamilia: Pooideae

Tribus: Triticeae

Género: *Hordeum* L.

Especie: *Hordeum vulgare*

Subespecies: *H. vulgare* subsp. *Spontaneum*; *H. vulgare* subsp. *vulgare*

Todas las especies del género *Hordeum* son silvestres, excepto *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* que se caracteriza por tener espiguillas unifloras, usualmente con raquilla. Tres espiguillas unifloras forman un triplete que se inserta en el raquis en lugar opuesto a las adyacentes. La espiguilla central es siempre fértil, pero las laterales pueden ser total o parcialmente estériles o, por el contrario, fértiles. Cada espiguilla consta de dos glumelas,

llamadas lemma y pálea, que envuelven los órganos sexuales. El raquis de la espiga es articulado y se deshace al llegar la madurez en todas las especies de *Hordeum* excepto *H. bogdani* y *H. vulgare* subsp *vulgare*.

La especie *Hordeum vulgare* L. consta de tres subespecies: *vulgare* (cebadas hexásticas o de seis hileras), *distichum* (cebadas dísticas o de dos hileras) y *spontaneum* (cebadas de raquis frágil, en general silvestres) (Figura 3). Son todas plantas herbáceas, anuales y hermafroditas de fecundación autógama, y su cultivo se extiende por zonas templadas.

El número cromosómico de la especie *Hordeum vulgare* L. *sensu lato* es $2n=2X=14$, y en general todos los miembros de las tres subespecies mencionadas son interfértiles.

La cebada es uno de los primeros cultivos domesticados de la historia, existen indicios de su cultivo hace unos 10.000 años cuando el hombre neolítico seleccionó en las poblaciones silvestres de *Hordeum spontaneum* (cebada de dos hileras con raquis frágil que dispersa sus semillas a la madurez) plantas con raquis tenaz que no perdían sus semillas una vez maduras. Estos mutantes eran fácilmente reconocibles porque tenían sus espigas maduras intactas cuando el resto ya no las tenía. La zona geográfica en que se produjo este hecho fue entre los valles de los ríos Eufrates y Tigris, en Mesopotamia; posteriormente se estableció que la domesticación se extendió por una gran zona con límite occidental en Marruecos y oriental en las altiplanicies entre China, Nepal e India. También existen citas bíblicas en el antiguo testamento en el Libro de los Jueces que se remontan al año 650 a. C. Por otra parte su cultivo fue introducido en América (a Haití) en el segundo viaje de Colón alrededor de 1493.

Figura 3: Espigas de cebada

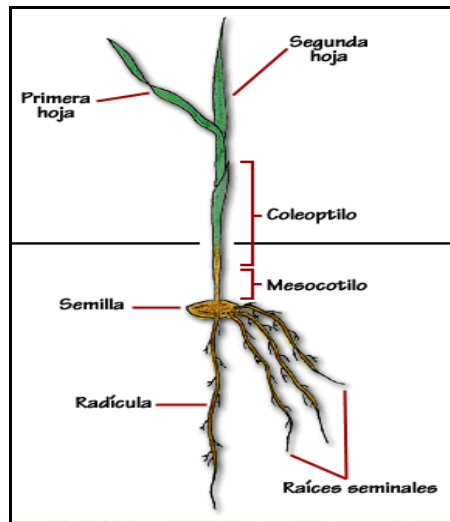


A) Espiga de cebada silvestre B) Espiga de cebada de dos hileras. C) Espiga de cebada de seis hileras

Morfología y desarrollo de la planta

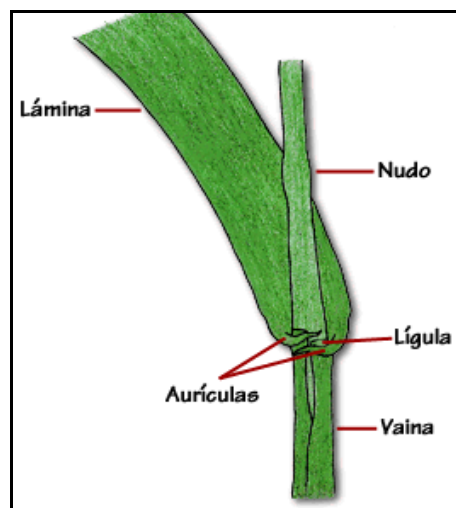
La cebada consta de raíces primarias que le sirven a la planta en las primeras semanas de vida para anclarse y absorber agua y nutrientes. De la semilla sale el mesocótilo que une a ésta con el nudo de ahijamiento cuya misión es transportar agua y nutrientes a la planta. El nudo de ahijamiento es el origen del tallo principal, de los secundarios y de las raíces adventicias. Estas, además del transporte de agua y nutrientes realizan la función de anclaje. El tallo es una caña con aproximadamente seis a nueve nudos, de los que salen las hojas que son opuestas, y entrenudos huecos. Se puede diferenciar el tallo principal de los secundarios en floración por su mayor precocidad y altura; aunque el tallo principal produce una espiga en su extremo, no todos los tallos secundarios lo hacen. El tallo principal procede directamente de la plúmula, mientras que los secundarios se derivan de yemas axilares producidas en el nudo de ahijamiento (Figura 4).

Figura 4. Plántula emergida mostrando su primera hoja desplegada



Las hojas están formadas por una vaina que se inserta en el nudo y envuelve al entrenudo situado sobre él, y la lámina que es divergente del tallo. En el punto de unión se encuentran la lígula, que es una fina membrana en contacto con el tallo, y las aurículas que lo envuelven (Figura 5).

Figura 5. Partes de las hojas

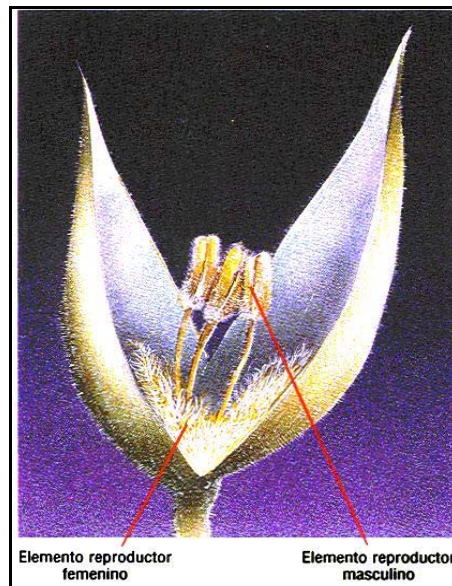


La espiga está situada en el extremo de cada tallo fértil y se compone de un eje articulado, el raquis, compuesto de una serie de entrenudos (generalmente más de treinta), cada uno de los cuales tiene una tríada de espiquillas unifloras (Figura 6). En la cebada silvestre *H. spontaneum*, el raquis se desarticula quedando unida a cada segmento la tríada de espiquillas. Cada flor tiene dos pequeñas glumas en la parte exterior, alargadas y estrechas terminadas en una arista; dos glumelas, la exterior o lemma y la interior o pálea, que luego serán las cubiertas del grano. La lemma se prolonga en un largo apéndice

dentado llamado arista, que presenta longitud variable. La palea tiene un surco en cuya parte inferior se inserta un filamento velludo llamado raquilla.

En el receptáculo formado por las glumelas están los órganos florales: tres estambres, un ovario con dos estigmas velludos y dos pequeños órganos llamados lodículas cuya función es la apertura de la flor en el momento de la antesis

Figura 6. Espiguilla uniflora



La cebada es una planta autógama. La polinización se produce en general cuando la espiga no ha emergido aún de la cubierta formada por la vaina de la hoja bandera, aunque puede haber variedades o circunstancias ambientales en las que esto no sucede produciéndose fecundación cruzada.

En relación con la fertilidad de las espiguillas laterales encontramos:

1) Tríada formada por tres flores hermafroditas completamente fértiles: variedades hexásticas o de seis hileras (Figura 7).

2) Tríada formada por una flor central hermafrodita y fértil y dos laterales de menor tamaño con estambres fértiles y ovario rudimentario: variedades dísticas o de dos hileras (Fig 7). Dentro de estas tenemos:

a. Espiguillas laterales engrosadas y ápice puntiagudo aristado, algunas veces fértiles: la F₁ del cruzamiento entre cebadas de dos y de seis hileras; tipos *intermedium*.

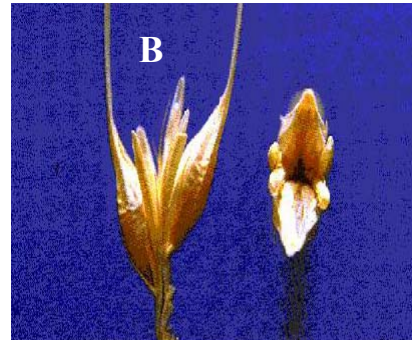
b. Espiguillas laterales ausentes: tipo *deficiens*

En las variedades de seis hileras los granos que vienen de las espiguillas laterales son más pequeños y de forma alabeada.

Figura 7. Vista lateral y superior de las espiguillas



A) Cebadas hexásticas o de seis hileras



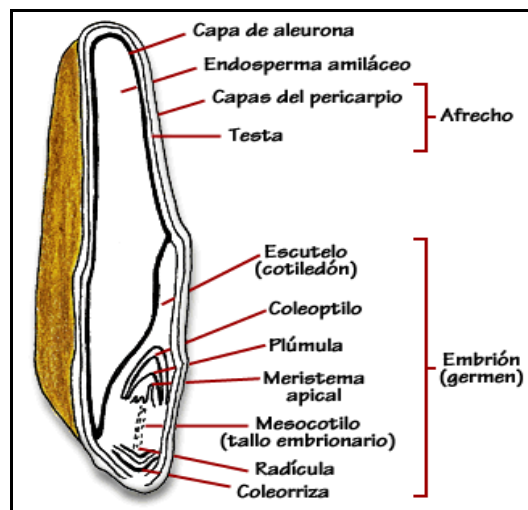
B) Cebadas dísticas o de dos hileras

Además de la función reproductora, la espiga tiene capacidad fotosintética contribuyendo en el llenado de granos. Las aristas constituyen órganos fotosintéticos de primera importancia en relación a otros órganos debido a su privilegiada posición en el ápice del dosel foliar y a su senescencia tardía, siendo las variedades aristadas más productivas que las místicas. Generalmente, un aumento en la longitud de las aristas suele ir acompañado de un incremento paralelo en el tamaño de los granos, ya que los asimilados de cada arista son destinados al grano que la soporta.

La semilla es un fruto seco indehisciente, o cariopse. Cuando el grano alcanza la madurez, y una vez seco, las paredes exteriores del ovario se funden íntimamente con las glumelas, esto es un grano normal “vestido”. En algunas variedades antiguas y de origen asiático, existen granos de cebada “desnuda”.

Los granos de las cebadas cerveceras de calidad son redondeados y gruesos, tienen cascarilla fina y rizada y su color es amarillo claro, síntoma de buena maduración en condiciones secas. Sus partes pueden observarse en la Figura 8.

Figura 8. Partes de la semilla



Ciclo y Desarrollo

Su ciclo vegetativo dura entre 100 a 130 días dependiendo de la variedad y de las condiciones externas (Figura 9). Primero sale la raicilla seminal y luego las siguientes. Más o menos sincrónicamente se desarrolla el tallito o plúmula, luego el coleóptilo, hasta lograr perforar el suelo. La emergencia de la primera hoja será tanto más rápida cuanto más elevada sea la temperatura del suelo.

A nivel del suelo se va formando un engrosamiento del falso tallo llamado **nudo de ahijamiento**. Se dice falso tallo porque aún en esta fase es solamente un conjunto de hojas enrolladas. A partir del nudo de ahijamiento comenzarán a salir hacia abajo las raíces adventicias. Cuando el tallo principal tiene tres o cuatro hojas desplegadas comienzan a producirse tallos secundarios a partir de yemas adventicias ubicadas en el nudo de ahijamiento. El primordio de la espiga ya está diferenciado con la aparición de la segunda hoja aunque la fase de **doble domo** no ocurre hasta que tiene tres hojas desplegadas. Junto con el ahijamiento comienza a desarrollarse la espiga del tallo principal. El final del ahijamiento generalmente coincide con la fase en que se alcanza el número máximo de primordios de espiguillas. En esta fase se determina el tamaño “potencial” de dos componentes de la cosecha: el número de espigas y el de granos por espiga.

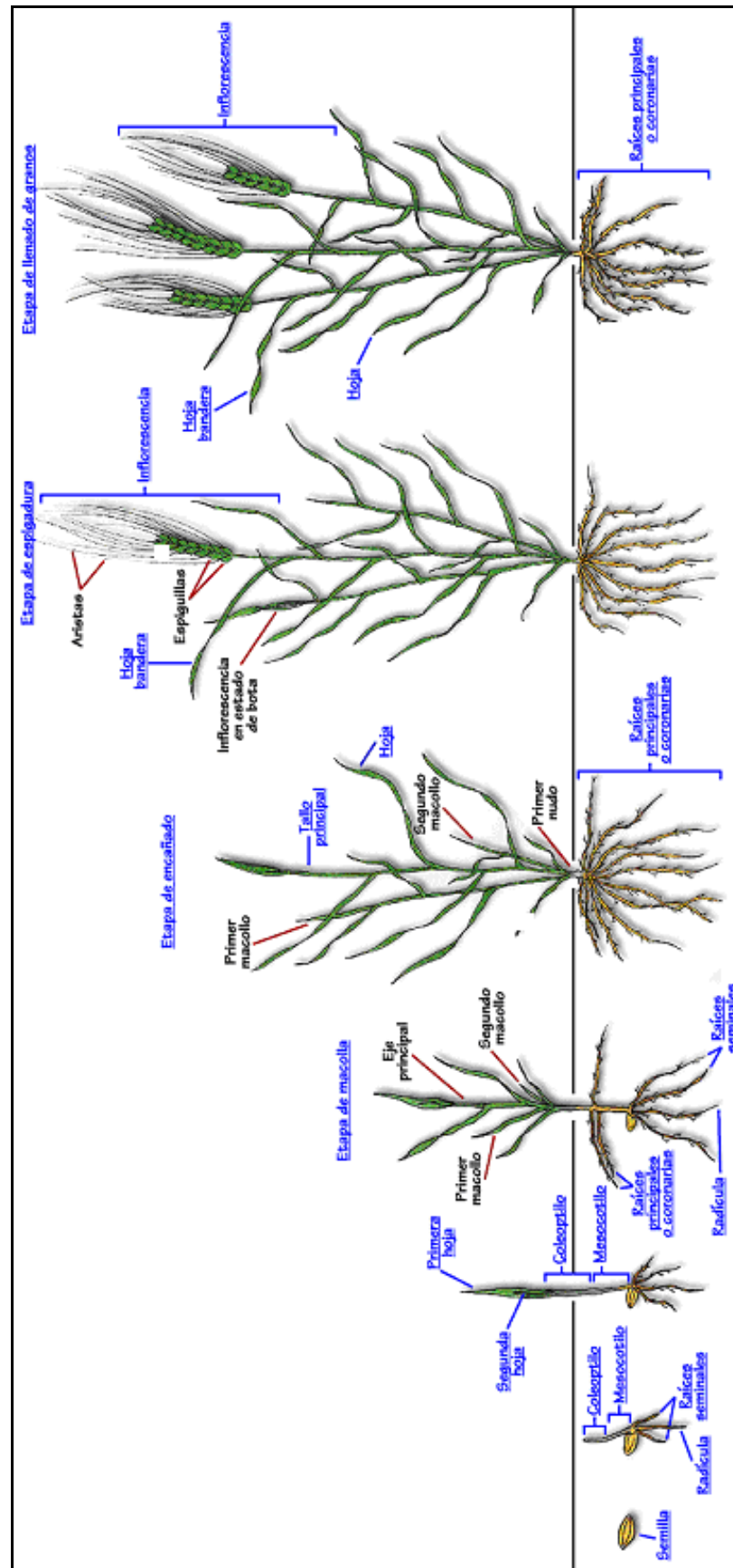
La aparición de la hoja bandera anuncia la llegada de la fase reproductiva. Cuando la lámina de ésta hoja se ha extendido completamente comienza a detectarse una incipiente hinchazón en su vaina, debida al engrosamiento de la espiga. El inicio de la

fase de espigado se da cuando comienzan a emerger las aristas desde la vaina de la hoja bandera.

Los estambres y ovario se diferencian desde la fase de un nudo a la de dos y la formación de polen se da en el estadio de hinchazón de la vaina por el engrosamiento de la espiga y primera espiguilla visible al exterior.

Es importante que en el momento del espigado del tallo principal, los tallos hijos alcancen una altura de, al menos, un tercio de la de éste, sino no producirán espigas viables. La emergencia de la espiga y la antesis se dan en forma sincrónicas y se registra cuando la espiguilla apical ha emergido de la vaina de la hoja bandera. Luego de la fecundación el ovario aumenta su tamaño. Cuando el grano está lleno, su textura es aún blanda, casi acuosa, esta es la **fase de grano lechoso**. Desde este momento comienza a incrementar el grosor y la densidad del grano llegando a la llamada **fase de grano pastoso**, hasta alcanzar un máximo, a partir del cual no hay más acumulación de materia seca. A partir de este momento, se considera que el grano llegó a la **madurez fisiológica**, en la cual podría germinar inmediatamente si no fuera porque la semilla presenta un período de letargo. El grano pierde humedad, reduciendo su peso total, hasta llegar a un contenido de agua de 10-12%, momento que se conoce como **madurez comercial**, en el cual está listo para ser cosechado.

Figura 9. Crecimiento y desarrollo de una planta de cebada



GENERALIDADES DE LOS ÁFIDOS

Taxonomía y Evolución

Los áfidos son pequeños insectos de cuerpo blando, generalmente de forma ovoide o piriforme, cuyo tamaño es variable, desde 0,5 hasta 7 mm, succionadores de savia que se distribuyen por todo el mundo y la mayoría de las especies se concentran en las regiones templadas del planeta (Dixon 1990a).

Clasificación:

Orden: Hemiptera

Suborden: Sternorrhyncha

Superfamilia: Aphidoidea

Familia: [Aphididae](#)

Los hemípteros pueden ser identificados por las estructuras particulares del aparato bucal. Las mandíbulas y las maxilas son modificadas en estiletos de variable longitud y están envueltas por un labio multisegmentado. Las mandíbulas, externas, y las maxilas, yuxtapuestas por sus superficies externas forman los canales de salivación y alimentación. Dentro del Suborden Sternorrhyncha se reconocen cuatro grupos principales: Psylloidea, Aleyrodoidea, Aphidoidea y Coccoidea y dentro de Aphidoidea están incluidas tres familias: Phylloxeridae, Adelgidae y Aphididae, llamados comúnmente áfidos, con más de 4500 especies descritas (Forero 2008). El nombre Sternorrhyncha se refiere a la posición del rostro (complejo bucal), el cual tiene su base entre el primer par de coxas y en su posición de descanso es colocado a lo largo de la superficie ventral del cuerpo (Blackman y Eastop 1984).

Los registros fósiles datan de hace 250 millones de años en el Precámbrico, con una posterior diversificación mediante especiación intensa, relacionada con la evolución de las gimnospermas en el Triásico. Por último, ocurre un cambio más reciente que ha dado la enorme diversificación de las familias *Lachnididae* y *Aphididae* (Heie 1987)

La superfamilia *Arhescytnidae*, 200 millones de años atrás, habría sido autoécica (desarrolla todo su ciclo de vida en un hospedante o en un grupo taxonómicamente relacionado), sexuado, ovíparo y alado y posteriormente evolucionado hacia formas virgínoparas, partenogenéticas y ápteras. Debido a la aparición de nuevas especies vegetales el proceso evolutivo de estos insectos se direccionó a la generación de formas polífagas con alternancia de ciclos reproductivos. Debido a cambios climatológicos

habrían aparecido nuevas formas de reproducción partenogenética (Bodenheimer y Swirski, 1957; Eastop 1978).

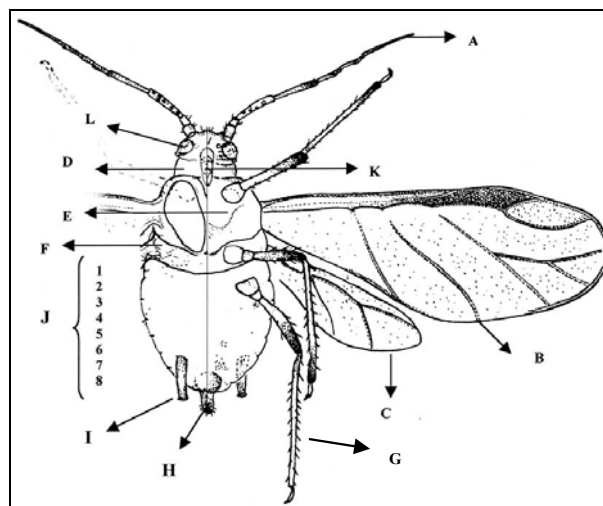
De todas las especies de áfidos, unas 250 se alimentan en plantas cultivadas y sólo 50 se consideran plagas agrícolas (Blackman y Eastop, 1984; Eastop 1978).

Caracterización, ciclo de vida, daños y alimentación de los áfidos

Para la clasificación entre los distintos áfidos, se utilizan diversas características morfológicas relacionadas con las tres grandes regiones que lo conforman, cabeza, tórax y abdomen, y cada una de sus partes específicas, tales como las antenas, particularidades de las alas, de los cornículos o sifones y de la cauda, entre otros (Figura 10). Es de nuestro interés profundizar en los aspectos del aparato bucal pues con él realizan los daños a las plantas.

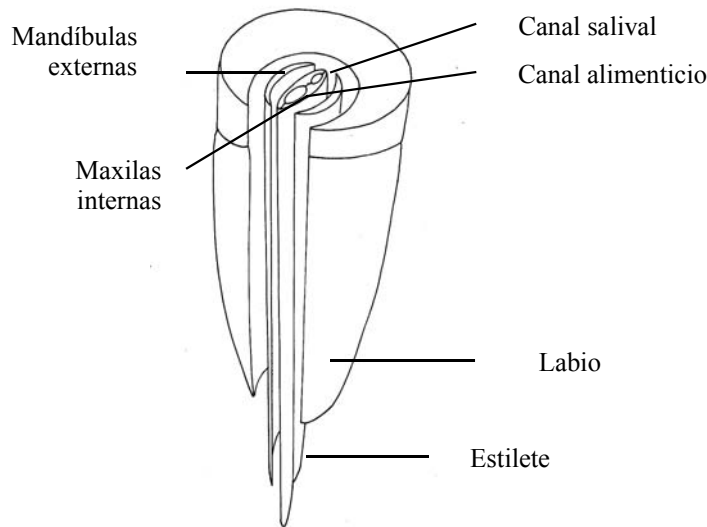
Los áfidos se caracterizan por tener un aparato bucal en forma de pico o *rostrum* formado por el labio multisegmentado, abierto a lo largo de la cara anterior en cuyo interior yacen dos pares de estiletos longitudinalmente con prominencias y depresiones en ambas superficies que le permiten moverse uno sobre otro, las mandíbulas externas y las maxilas internas que delimitan el canal alimenticio, mediante el cual el insecto adquiere el alimento, y el salival, por el cual sale la saliva durante la alimentación (Figura 11).

Figura 10. Características morfológicas generales de los áfidos.



A. antena, B. ala anterior, C. ala posterior, D. protórax, E. mesotórax, F. metatórax, G. patas, H. cauda, I. cornículo, J. segmentos abdominales (1-8), K. rostro, L. ojo compuesto.

Figura 11. Aparato bucal de los áfidos



Los áfidos son polimórficos, es decir, tienen más de una forma en su ciclo de vida con funciones específicas. Esta diversidad de formas, la habilidad de reproducirse partenogénicamente o sexualmente según las condiciones ambientales existentes, y la alternancia entre hospederos, les permite desarrollar poblaciones numerosas en tiempos cortos y aprovechar las condiciones favorables para su desarrollo (Cermeli 1987).

Los ciclos de vida más comunes se representan en la Figura 12 (Blackman 1973, Dixon 1973).

Holocíclicos: existe una fase de reproducción sexual que sucede a una serie de generaciones de hembras vivíparas partenogénicas. En climas con inviernos muy crudos, el huevo fertilizado es capaz de soportar bajas temperaturas. Del huevo nace, en la primavera siguiente, una hembra partenogénica áptera llamada fundatrix, que por partenogénesis da lugar a hembras que van a sucederse durante el resto de la primavera y el verano, formando colonias muy numerosas. Estas hembras se llaman fundatrigenas y pueden ser ápteras o aladas. Al comenzar el otoño, con el descenso de la temperatura y el acortamiento del fotoperíodo, la última generación de hembras partenogénicas produce individuos sexuados, que son hembras vivíparas, llamadas virginóparas, que se reproducirán sexualmente dando lugar al huevo de invierno que cierra así el ciclo.

Las hembras vivíparas que en el otoño producen sólo hembras, se llaman ginóparas y las que producen solamente machos son las andróparas.

Anholocíclicos: En climas tropicales no existe la fase de reproducción sexual desarrollándose todo el ciclo como una sucesión de generaciones de hembras partenogenéticas (ápteras o aladas).

El desarrollo embrionario de las hembras partenogenéticas y sexuadas es idéntico en sus inicios hasta la completa formación de sus respectivos ovarios (germarios). Luego el desarrollo de los embriones es distinto, como respuesta a ciertos estímulos ambientales sufridos por la madre, entre los cuales el más crítico es el **fotoperíodo** y en menor grado la **temperatura** (Kawada, 1987). Muchos experimentos apoyan la hipótesis (Mittler *et al.*, 1979) de que los niveles de hormona juvenil son los que controlan el proceso de determinación del sexo en áfidos. Esta hormona activa o reprime determinados conjuntos de genes dando lugar a pautas de desarrollo alternativas (Nijhout y Wheeler 1982).

Según sus hábitos alimenticios y la alternancia entre hospederos se clasifican en:

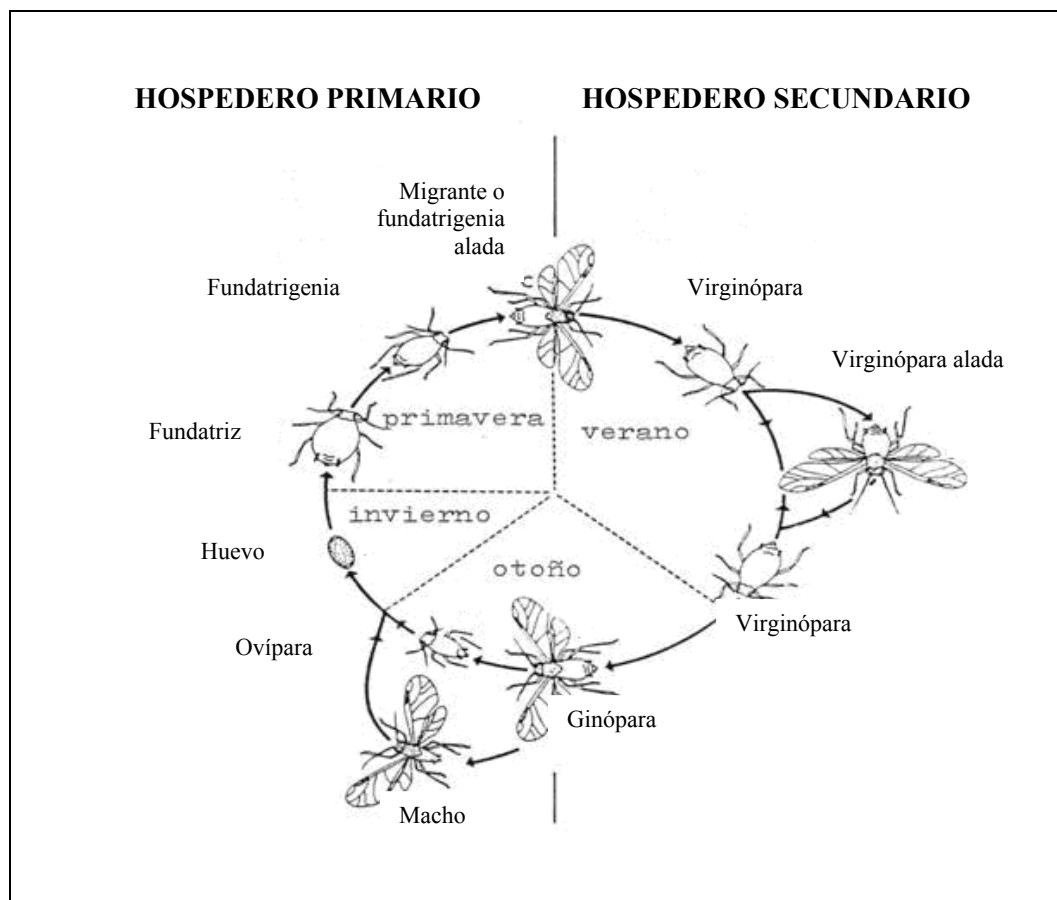
Ciclo autoico o monoico: Cuando los insectos desarrollan todas las fases del ciclo sobre un único huésped o sobre un grupo de huéspedes relacionados.

Ciclo heteroico o dioico: Cuando la fase sexual del ciclo tiene lugar sobre un huésped (huésped primario) que no está relacionado taxonómicamente con aquel en el que se desarrollan el resto de las fases (huésped secundario). Generalmente el huésped primario es una planta leñosa y el secundario una planta herbácea.

Ancestralmente los áfidos poseían un ciclo bastante sencillo; eran autoicos, sexuales, ovíparos y alados, posteriormente habrían evolucionado todos los polimorfismos hacia las formas virginóparas (hembras partenogenéticas que suceden a la primera generación de hembras partenogenéticas procedentes de un huevo fecundado y que se reproducen vivíparamente), partenogenéticas y ápteras (Mordvilko 1928).

Generalmente los áfidos presentan una alta especificidad por su huésped. La mayoría de los pulgones actuales son autoicos sobre una especie o un grupo de especies vegetales taxonómicamente relacionados; sin embargo existen algunas especies heteroicas como *Myzus persicae* y *Aphis fabae* (Scopoli); sólo unas pocas especies son realmente polífagas (Dixon 1987).

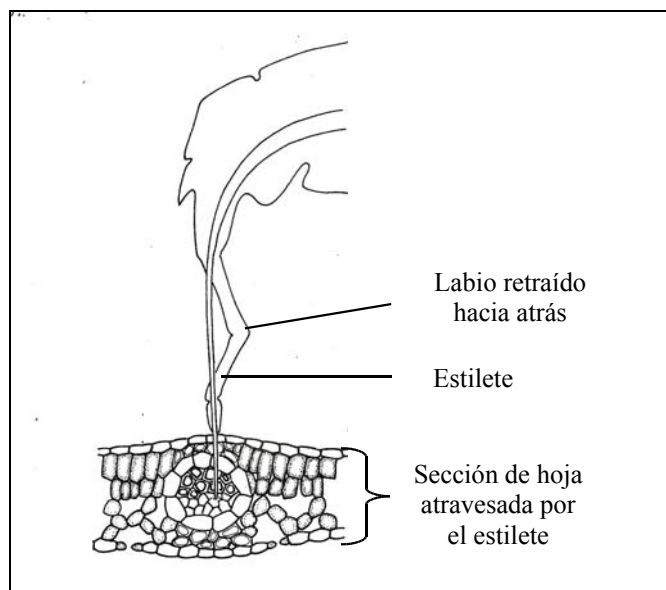
Figura 12. Ciclo de vida de los áfidos



Los áfidos se alimentan de la savia floemática que obtienen de los vasos floemáticos que se encuentran en las plantas, mediante la utilización de los estiletes (Fujimaki *et al.*, 2000) (Figura 13). Dentro del canal de alimentación y de la epifaringe del insecto, se encuentran localizados quimiorreceptores responsables de detectar la composición química adecuada del fluido para su alimentación (Anderson y Bromley 1987, Klingauf 1987b). Esta savia es rica en azúcares, pero relativamente pobre en aminoácidos esenciales, especialmente en aquellos que son necesarios para el desarrollo (Dixon 1998). Para compensar estos bajos niveles de nitrógeno disponible, los áfidos tienen, al menos, dos estrategias para suplir su dieta: la endosimbiosis con bacterias productoras de aminoácidos, por ejemplo la bacteria *Buchnera aphidicola* Buchner (Douglas 1998, Rahbé *et al.*, 2002) y mediante la inducción de cambios en la planta huésped (similar a los procesos de senescencia de órganos) que influyen en el contenido de aminoácidos del floema.

En el momento de la penetración del estilete y durante la alimentación activa del áfido, son excretadas, al menos, dos tipos de saliva: una que gelifica rápidamente compuesta principalmente de proteínas, fosfolípidos y carbohidratos conjugados, que sería de protección, y otra acuosa, saliva digestiva. Cuando el insecto perfora la célula la saliva de protección se polimeriza alrededor del estilete para formar una capa protectora limitando el contacto directo del estilete con el apoplasto (espacio intercelular) de las plantas. La composición de la saliva digestiva es más compleja y contiene un grupo amplio de enzimas que incluyen pectinasas, celulasas, amilasas, proteasas, lipasas, fosfatasas alcalinas y ácidas y peroxidasa, y otros compuestos capaces de inducir las defensas de la planta (Miles 1999).

Figura 13. Sección de hoja que muestra la penetración del estilete



Los áfidos pueden ocasionar daños directos a las plantas al extraer savia en grandes cantidades, debido a las altas poblaciones que alcanzan. También, causan cambios fisiológicos que inducen modificaciones en el metabolismo de las plantas a favor de ellos, exteriorizándose en forma de agallas, amarillamiento o deformaciones (Cermeli, 1987).

Al succionar más savia de la que le permite la capacidad de su cuerpo, excretan el exceso de azúcar en forma de melaza, que cubre las plantas afectadas, desluciendo su aspecto y tornándolas pegajosas, atrayendo hormigas y permitiendo el desarrollo de

hongos, que además de interferir con la función clorofiliana y respiratoria, le quita valor comercial a las partes comestibles (Cermeli 1987).

El mayor daño lo causan los áfidos al transmitir patógenos de plantas, casi exclusivamente virus, al estar adaptados para su transmisión desde el punto de vista morfológico, fisiológico y de comportamiento (Cermeli 1987). De unas 228 especies conocidas como vectoras de virus, 200 pertenecen a la subfamilia Aphididae (Sethi y Swenson 1968).

Características de *Schizaphis graminum*

Schizaphis graminum (Rondani) fue originariamente descrito en Italia, Rondani 1852, estando en la actualidad ampliamente distribuido en Asia, África, Australia y América, siendo una plaga de gran importancia económica. En la Argentina se identificó por primera vez en el año 1914 en la provincia de La Pampa, observándose desde 1937 daños severos sobre cereales finos en la región pampeana subhúmeda y semiárida. Últimamente este áfido ha ampliado su zona de distribución, encontrándose ataques intensos y frecuentes en el centro de la provincia de Santa Fé, Córdoba, La Pampa y sudoeste de la provincia de Buenos Aires. (Noriega *et al.*, 2000). El pulgón verde se distribuye entre los 24° 40' LS hasta 43° 28' LS y entre las isoterma 18-20 °C y 8-10 °C e isohietas 400-600 mm y > a 1200 mm (Clúa *et al.*, 2004)

El cuerpo mide entre 1,7 y 2 mm de largo, de color verde claro brillante con una franja color verde oscuro longitudinal en el dorso del abdomen (Figura 14). Sus ojos son negros, así como también las antenas que son cortas y están dirigidas hacia atrás; los dos primeros antenitos y la porción basal del tercero son amarillentos. Las patas también son amarillentas y los tarsos negros. Los cornículos o sifones son cortos, cilíndricos, no reticulados y convergentes hacia la cauda que es piriforme, algo constreñida en la parte media y con dos cerdas negras de cada lado.

Figura 14. *Schizaphis graminum*



Schizaphis graminum se alimenta del floema de la planta y durante su alimentación inyecta enzimas tóxicas produciendo clorosis y un aumento en la concentración de aminoácidos libres alrededor del sitio de alimentación (Dorschner *et al.*, 1987). La clorosis y necrosis producidas, se deben al colapso de las células por alteración de la permeabilidad de las membranas de cloroplastos, mitocondrias y núcleo (Al-Mousawi *et al.*, 1983). Todos los disturbios ocasionados parecen relacionarse con alteraciones en la fotosíntesis, en la cadena de transporte activo de electrones (Ryan *et al.*, 1987). También se han detectado en los cultivares susceptibles reducción del volumen radical en trigo (Burton, 1986), cebada (Arriaga 1969; Gerloff y Ortman, 1971; Castro *et al.*, 1988), avena y sorgo (Castro *et al.*, 1987, 1990) y la reducción en el crecimiento aéreo de trigo (Burton 1986), cebada (Castro y Rumi, 1987) y centeno (Arriaga, 1956), siendo la causa de esas alteraciones la inhibición que se produce en los ápices caulinares (Castro y Rumi, 1987; Castro *et al.*, 1987, 1989) con reducción de los índices mitóticos (Tacaliti *et al.*, 2002).

Características de *Diuraphis noxia*

Diuraphis noxia (Kurdjumov 1913) conocido como Pulgón Ruso del Trigo, es una especie originaria de Asia Central y Europa Oriental (Jones *et al.*, 1989). El primer registro de *D. noxia* fue en el año 1900 en el sur de Rusia (Ucrania) por Mordvilko (Kazemi 2001). En Sudáfrica fue detectado por primera vez en el año 1978 (Durr 1983) y fue reportado como plaga en trigo en el año 1978 (Walters *et al.*, 1980). En Estados Unidos fue identificado en 1986 (Stoetzel 1987). Es una de las plagas del trigo y de la cebada económicamente más importantes y ampliamente distribuída en el mundo

(Stoetzel, 1987). En Sudamérica fue hallado por primera vez en Chile en 1987 (Zerene *et al.*, 1987) y el primer registro en la Argentina data del año 1991 en la provincia de Mendoza (Ortego y Delfino, 1992), colonizando principalmente plantas de centen, otros cereales de invierno y pastos nativos. Algunas hipótesis suponen el ingreso a nuestro país desde Chile con la ayuda del viento zonda que se origina en el Océano Pacífico (Ortego 1994). Fuera de Mendoza, se lo registró en el año 1992 en el sur de Buenos Aires (Ortego y Delfino 1994). En la actualidad *D. noxia* se distribuye entre los 26° 50' LS y 43° 28' LS limitado por las isoterma 20-22 °C y 8-10 °C y las isohietas de los 400 - 600 mm y 2000 mm de precipitaciones (Clúa *et al.*, 2004).

Diuraphis noxia es un pulgón de pequeño tamaño (aproximadamente 2,3 mm), de color verde grisáceo. Su cuerpo es alargado y puede estar cubierto de cera. Se caracteriza por tener antenas cortas y del mismo color que el cuerpo. Presenta cornículos pequeños, poco desarrollados, de forma cónica y su longitud es aproximadamente igual a su anchura. La cauda es alargada y posee tres pares de setas laterales. Tiene un proceso supracaudal de aproximadamente la misma longitud que la cauda en individuos ápteros y en los alados aparece como una pequeña protuberancia (Stoetzel 1987) (Figura 15 y Figura 16).

Esta especie presenta cinco estadios de desarrollo. En condiciones de laboratorio se ha observado que la fecundidad de *D. noxia* es de 4 ninfas por día, pudiendo nacer 70 ninfas por hembra durante el período reproductivo (Robinson 1992). El número medio de ninfas nacidas por día aumenta al incrementarse la temperatura de 5 a 20° C, y disminuye de 20 a 30°C (Michels y Behle 1988), encontrándose que la temperatura óptima de desarrollo está entre 18 y 21° C (Girma *et al.*, 1990).

Se alimenta de la base de las hojas jóvenes de las plantas. El daño principal se debe a una fitotoxina inyectada por el áfido durante la alimentación. Esta toxina ocasiona ruptura de cloroplastos y membranas celulares en plantas susceptibles. Las variedades resistentes pueden compensar la alimentación del áfido (Heng-Moss *et al.*, 2003), sin embargo, para la compensación la planta necesita estrategias de defensas efectivas y la activación de rutas de señalización que activen los mecanismos de tolerancia al estrés. Como consecuencia de la alimentación, se producen estrías longitudinales de color blanco o amarillo en las hojas y en climas fríos pueden presentar coloraciones roja o púrpura (Miller *et al.*, 1994) debido a la presencia de pigmentos antociánicos. Si la alimentación ocurre en la hoja bandera, las aristas de las espigas pueden ser atrapadas por la hoja

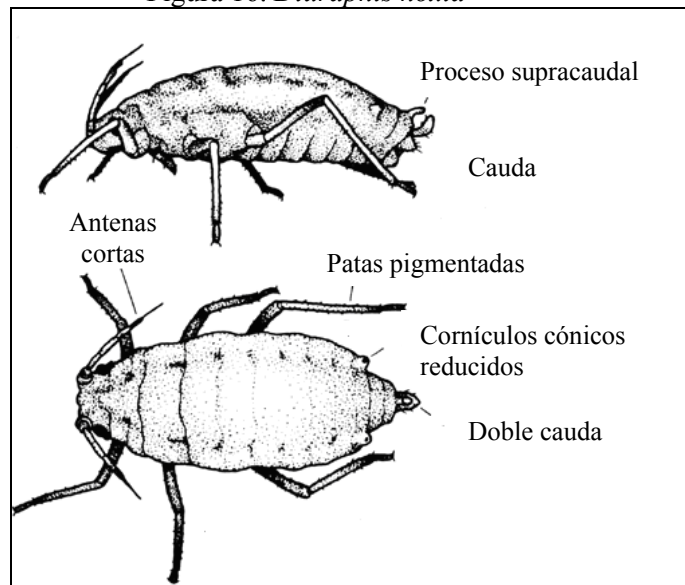
fuertemente enrollada, provocando la distorsión y deformación de la misma (Peairs 1990) afectando la autopolinización y la producción de semillas (Smith *et al.*, 1992). Además, inyecta enzimas, junto con la saliva, en el interior de los tejidos de las plantas (Fouché *et al.*, 1984) ocasionando el enrollamiento longitudinal de las hojas alrededor de la nervadura principal, formando un refugio tubular para los áfidos que impide el acceso de los predadores, parásitos e insecticidas (Webster *et al.*, 1987) dificultando, de esta forma, el control biológico y químico respectivamente.

Su importancia como vector se evidencia a través de la transmisión de virus tales como el BYD (Virus enanizante de la cebada), BMV (Mosaico de la cebada) y el SMV (Mosaico de la caña de azúcar) (Damsteegt *et al.*, 1992), entre otros.

Figura 15. *Diuraphis noxia*



Figura 16. *Diuraphis noxia*



Concepto de biotipo

“**Biotipo**” es un término complejo, para el cual no existe unanimidad de criterios en cuanto a su definición. Painter (1951) definió a un **biotipo** como una variedad subespecífica, morfológicamente indistinta, de una especie de insecto que manifiesta respuestas únicas a huéspedes resistentes genéticamente estables.

Los **biotipos** de una especie particular son designados según varias razones, incluyendo resistencia a herbicida (Wagner *et al.*, 2002) o insecticida (Teetes *et al.*, 1975), los mecanismos para superar plantas resistentes (Eastop 1973, Porter *et al.*, 1997), la habilidad competitiva (Solbrig y Simpson 1974), la habilidad para transmitir virus (Eastop 1973) u otros factores. Por lo tanto, los **biotipos** o **razas fisiológicas** son entidades biológicas que tienen una adaptación específica a genotipos particulares del hospedante, y que se definen por parámetros diferentes en función de la toxicidad o no de los insectos (Puterka y Peters, 1990).

Se considera que la aparición de los biotipos de *S. graminum*, se debe a la presión de selección que ejercen los cultivares resistentes (Eisenbach y Mittler 1987). Sin embargo, Porter *et al.*, (1997) modificó este enfoque al considerar que los biotipos son oportunistas, que existen en la naturaleza y que sólo son observables cuando se utiliza y desarrolla un determinado cultivar.

Para la determinación de biotipos, en general, se emplea el método propuesto por Puterka y Peters (1988), el cual emplea cultivares testigos y en comparación con la respuesta de éstos se evalúa el comportamiento de los insectos a investigar, midiendo el

nivel de clorosis. Si se comparan junto con otros componentes de la tolerancia, la altura de plantas y el área foliar total, se verá que el nivel de clorosis dependerá de la capacidad de ese cultivar de producir una mayor o menor biomasa frente a una infestación (Castro 1994).

El único criterio utilizado para identificar a los biotipos de *S.graminum* y de *D. noxia*, ha sido la habilidad del insecto para producir daño en un grupo de plantas resistentes (virulencia). Es decir, sólo se consideró la respuesta fenotípica de las plantas (ejemplo: clorosis foliar) como un resultado directo de la alimentación del áfido (Burd *et al.*, 2006).

En Estados Unidos fueron diferenciados diez biotipos para *S. graminum* (Tabla 1) (Burd y Porter 2006). Por otro lado, Puterka *et al.*, (1992) reconoció, al menos, 8 biotipos de pulgón ruso del trigo en todo el mundo.

Teniendo en cuenta el concepto de biotipo, se sabe que la resistencia va siendo superada frecuentemente, y de esta forma van apareciendo nuevas razas.

Tabla 1. Biotipos de *Schizaphis graminum*, huésped y año de la primera referencia

Biotipos	Planta huésped	Autor/Año
A	Trigo	Wood 1961
B	Trigo	Wood 1961
C	Sorgo	Harvey y Hackerott 1969
E	Trigo	Porter <i>et al.</i> , 1982
F	Pasto azul de Kentucky	Kindler y Spomer 1986
G	Trigo	Puterka <i>et al.</i> , 1988
H	Trigo	Puterka <i>et al.</i> , 1988
I	Sorgo	Harvey <i>et al.</i> , 1991
J	Trigo	Beregovoy y Peters 1995
K	Sorgo (Resistente al biotipo I)	Harvey <i>et al.</i> , 1997

Antecedentes de resistencia a *Schizaphis graminum* y a *Diuraphis noxia*.

En trigo se han identificado varios genes relacionados con algún tipo de resistencia a *S. graminum*. A estos genes se los designa con la abreviatura *Gb*, proveniente de *greenbug*, seguida por un número que indica el orden de descubrimiento cronológico.

Algunos de estos genes son: el gen recesivo *gb1* proveniente de *Triticum durum*, del cual no se citan referencias. El gen *Gb2* proveniente de *Secale cereale*, aporta resistencia a los biotipos A, B y C (Sebesta *et al.*, 1995) y fue transferido a la

translocación 1AL/1RS (Hollenhorst y Joppa 1983). El gen de resistencia *Gb3* derivado de *Ae. tauschii*, presenta resistencia a los biotipos C y E (Joppa *et al.*, 1980) y fue mapeado sobre el cromosoma 7D (Hollenhorst y Joppa 1983). Este fue el único gen, incorporado a un cultivar comercial de trigo llamado TAM110 que confiere resistencia a los biotipos más frecuentes de pulgón verde de los cereales (Lazar *et al.*, 1997). El gen *Gb4* derivado de *Ae. tauschii*, presenta resistencia al biotipo C (Harvey *et al.* 1980) y fue localizado en el cromosoma 7D (Martin *et al.*, 1982). El gen *Gb5*, derivado de *T. speltoides* (L) y localizado en el cromosoma 7AL (Dubcovsky *et al.*, 1998), manifiesta resistencia al biotipo E (Tyller *et al.*, 1985). El gen *Gb6* proveniente de *S. cereale* fue mapeado en la translocación 1AL/RS (Porter *et al.*, 1991) otorga resistencia al biotipo E. Además, existen genes no designados. El gen *Gbx* es alélico a *Gb3* o está estrechamente ligado (Weng y Lazar 2002). El gen *Gby* fue mapeado sobre el cromosoma 7A (Boyko *et al.*, 2004) y *Gba*, identificado en una línea de trigo sintético creada por el CYMMYT (TA4152L94), expresa un alto nivel de resistencia al biotipo I (Smith y Starkey 2003). El gen *Gbz* proveniente de *Ae. Tauschii*, fue transferido al cultivar de trigo pan “Wichita” por retrocruzamiento para desarrollar el germoplasma de trigo resistente KSU97-85-3 (Gill y Raupp 1987). En el 2001 Flinn *et al.*, observaron que *Gbz* confería tolerancia al biotipo I, que es el que prevalece en Estados Unidos (Tabla 2).

Tabla 2. Nombre, fuente y localización cromosómica de los genes de trigo que otorgan resistencia a *Schizaphis graminum*

Gen	Fuente de germoplasma	Origen	Localización cromosómica	Referencia
<i>Gb1</i>	DS28A	<i>T. durum</i>	?	-
<i>Gb2</i>	Amigo	<i>S. cereale</i>	1AL/1RS	Hollenhorst y Joppa 1983
<i>Gb3</i>	Largo (CI17895)	<i>Ae. tauschii</i>	7D	Hollenhorst y Joppa 1983; Weng y Lazar 2002
<i>Gb4</i>	CI17959	<i>Ae. tauschii</i>	7D	Martín <i>et al.</i> , 1982; Fritz unpublished
<i>Gb5</i>	CI17882	<i>T. speltoides</i>	7AL	Dubcovsky <i>et al.</i> , 1998
<i>Gb6</i>	GRS1201	<i>S. cereale</i>	1AL/1RS	Porter <i>et al.</i> , 1991
<i>Gba</i>	TA4152L94	<i>Ae. tauschii</i>	?	Smith y Starkey 2003
<i>Gbx</i>	KS89WGRC4	<i>Ae. tauschii</i>	7D	Weng y Lazar 2002
<i>Gby</i>	Sando's 4040	<i>T. aestivum</i>	7A	Boyko <i>et al.</i> , 2004
<i>Gbz</i>	TA1675	<i>Ae. tauschii</i>	7D	Zhu <i>et al.</i> , 2004

En líneas de adición disómicas de *Triticum aestivum/ Hordeum chilense* de especies silvestres, se encontraron cuatro cromosomas involucrados con la antixenosis (1H^{ch}), antibiosis (4H^{ch}, 5H^{ch}, 7H^{ch}) y tolerancia (7H^{ch}) al pulgón verde de los cereales (Castro *et al.*, 1996b).

En lo que concierne a *D. noxia*, hay al menos once genes de resistencia a dicho áfido, provenientes de *Triticum tauschii* (Coss.) Schmal., centeno y trigo. Se los denomina con la abreviatura *Dn* seguida por un número, que representa el orden de descubrimiento del gen (Tabla 3).

La resistencia genética en trigo fue reportada por primera vez en el año 1989 por Du Toit en dos líneas de trigo duro. A partir de éste momento la resistencia a dicho áfido fue identificada en varias líneas de trigo y especies relacionadas. Como ejemplos de ello, Du Toit en 1989 encontró que la resistencia a pulgón ruso en dos líneas de trigo estaba dada por genes simples dominantes: *Dn1*, posteriormente localizado en el cromosoma 7D (Schroeder-Teeter *et al.*, 1994) y *Dn2* localizado en el mismo cromosoma (Ma *et al.*, 1998). En *T. tauschii*, Nkongolo *et al.*, (1991) reportó un gen recesivo de resistencia a dicho áfido, *dn3* y en la línea PI372129 un gen dominante, *Dn4*, localizado en el cromosoma 1DL (Ma *et al.*, 1998). Otros dos genes de resistencia dominante, *Dn5* (Saidi, 1994) y *Dn6* (Saidi 1996), fueron ubicados en plantas monosómicas de trigo en el cromosoma 7D (Du Toit 1995). El gen *Dn7* es un gen derivado de centeno que fue transferido del cromosoma 1RS a la translocación 1RS/1BL de trigo (Marais *et al.*, 1994).

Dn8 y *Dn9* son genes que se coexpresan junto a *Dn5* en la línea PI294994 (Liu *et al.*, 2001). Los genes *Dnx* y *Dny* aun no están nominados. El primero de ellos se ubica en el cromosoma 7D de trigo y del segundo se desconoce su localización.

“Halt” fue el primer cultivar de trigo comercial resistente a *D. noxia* liberado en Estados Unidos en el año 1996 (Quick *et al.*, 1996).

Castro *et al.*, (2001) han indicado que los mayores niveles de antibiosis a *D. noxia* y a *S. graminum* en trigo son atribuidos a diferentes cromosomas de trigo ‘Synthetic’, sugiriendo que algunos genes independientes pudieran estar involucrados en este proceso.

En cebada se mapeó un gen de resistencia a *S. graminum* en la región centromérica del cromosoma 1 (7H) (Gardenhire *et al.*, 1973). Una segunda fuente de resistencia identificada en la línea PI426756 (Webster y Stark, 1984), también controlada por un gen dominante simple (Merkle *et al.*, 1987) no alélico al anteriormente mencionado. Estos genes fueron identificados con la simbología *Rsg1a* y *Rsg2b* (Merkle *et al.*, 1987). Estos dos genes de resistencia proveen protección contra varios biotipos de pulgón verde de los cereales (C, E, F, G y H) (Webster y Stark 1984; Puterka *et al.*, 1988) y fueron las únicas fuentes de resistencia identificadas en cebada.

Nieto-Lopez y Blake (1994) mapearon dos QTL que hacen a la resistencia a *D. noxia* en los cromosomas 2 y 5 (1H) de cebada. En tanto Mittal *et al.*, (2008) detectaron otro QTL más sobre el cromosoma 3H. La primera línea de cebada liberada con resistencia a *D. noxia* (STARS-9301B) (Mornhinweg *et al.*, 1995 a), presentaba dos genes, *Rdn1* y *Rdn2*, originalmente llamados *Dnb1* y *Dnb2* (Mornhinweg *et al.*, 1995b) como los responsables de controlar dicha resistencia.

Otros autores han encontrado genes de resistencia a *D. noxia* (Clement y Lester 1992) y *S. graminum* (Castro 1994) en especies silvestres del género *Hordeum*. También es importante señalar que los genes *Dn* no confieren resistencia a *Rhopalosiphum padi* al no observarse diferencias en la biomasa de las plantas atacadas por ese áfido (Tao *et al.*, 2004a).

Tabla 3. Genes y fuentes de resistencia a *Diuraphis noxia*

Gen	Fuente de germoplasma	Referencia
<i>Dn1</i>	PI 137739	Du Toit 1987
<i>Dn2</i>	PI 262660	Du Toit 1987
<i>dn3</i>	CO 03810	Nkongolo <i>et al.</i> , 1989
<i>Dn4</i>	Yumar	Quick <i>et al.</i> , 1991
<i>Dn5</i>	CO 950043	Du Toit 1988
<i>Dn6</i>	CI 6501	Harvey y Martin 1990
<i>Dn7</i>	94M370	Marais <i>et al.</i> , 1998
<i>Dn8</i>	Karee- <i>Dn8</i>	Liu <i>et al.</i> , 2001
<i>Dn9</i>	Betta- <i>Dn9</i>	Liu <i>et al.</i> , 2001
<i>Dnx y Dny aun no están nominados</i>		

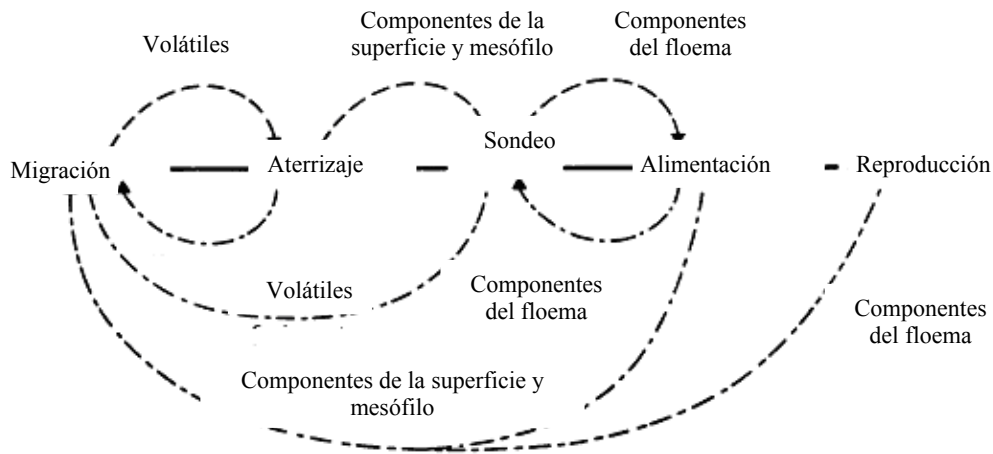
INTERACCIÓN PLANTA-INSECTO

Generalidades de las respuestas de defensa

El hallazgo de un hospedero por un áfido consiste en una serie de eventos que se resumen en la Figura 17 realizada por Niemeyer (1990). La primera fase que se identifica en la interacción planta-insecto corresponde a la llegada de los individuos a un área que contiene plantas huéspedes potenciales. La orientación visual y olfativa juega un rol decisivo. Los órganos olfativos, que están presentes en los antenitos, pueden detectar los químicos de las superficies de las plantas como lípidos epicuticulares (Dillwith y Berberet 1990) o componentes de los tricomas de algunas especies de plantas (Gibson y Pickett 1983; Avé *et al.*, 1987). Estos químicos son percibidos por los quimiorreceptores presentes en el ápice de sus antenas (Bromley *et al.* 1979) y por el extremo de la tibia y el tarso (Anderson y Bromley 1987).

La fase siguiente es la de “sondeo” y “degustación” de los componentes internos de la planta mediante papilas gustativas. El aparato bucal de los áfidos es de tipo picador-suctor y se caracteriza por presentar estiletes largos en forma de agujas que son introducidos dentro de los tejidos de la planta, en general, en forma intercelular, aunque se dan también incursiones intracelulares durante la búsqueda del floema (Pollard 1973). Esto define el establecimiento del insecto. Una vez que el áfido encontró un sitio de alimentación, normalmente el floema (Pollard 1973), sin compuestos tóxicos (Molyneux *et al.*, 1990), podrá reproducirse, dependiendo del valor nutricional de la savia, reflejado en su contenido de aminoácidos (Wiktelius *et al.*, 1990) y composición (Weibull, 1988).

Figura 17. Búsqueda de una planta hospedadora por un áfido.



Compuestos atrayentes o esímulos para su alimentación (— — —). Compuestos repelentes o antibióticos (— — —)

En su hábitat natural las plantas están expuestas a distintos tipos de estrés: abiótico, como por ejemplo, sequía, heladas, salinidad, etc., y estrés biótico por ataques de patógenos e insectos. Las plantas utilizan diversas y sofisticadas estrategias para percibir e identificar el estrés y luego activar una respuesta defensiva.

Las plantas tienen la habilidad de reconocer y responder ante el ataque de insectos. Esta característica innata que contienen las células vegetales, es una forma de inmunidad que le permite percibir el “peligro” y transmitir la información en forma sistémica para activar sus defensas (Howe and Jander 2008). Las plantas perciben el estrés de diversas maneras: a través de sensores, receptores, elevación de la concentración de calcio, cambios en la fluidez de la membrana, etc. Luego se producen reacciones bioquímicas, cambios metabólicos y alteraciones del estado fisiológico de la planta. De esta forma, desarrolla mecanismos que pueden aumentar la tolerancia contra los factores de estrés (Gang *et al.*, 1999; McDowell y Dangl 2000).

Las plantas utilizan sistemas de **defensa constitutivos o inducidos**, que pueden influir sobre el momento de establecimiento, alimentación, oviposición, crecimiento y desarrollo, fecundidad y/o fertilidad del insecto. Todas las defensas, ya sean expresadas constantemente o transitoriamente, son costosas metabólicamente (Staskawicz *et al.*, 1995; Baldwin y Preston 1999). Aunque ambos sistemas son diferentes entre sí, las plantas son capaces de defenderse con una combinación de los dos sistemas.

Las **defensas constitutivas** (también llamadas pasivas) pueden ser subdivididas en características morfológicas, estructurales, anatómicas y químicas. Las características anatómicas se refieren por ejemplo al color de hojas y flores, presencia o ausencia de tricomas, la textura de las cutículas, que debido a la presencia de cera, suberina o calosa, hacen que éstas sean rígidas y duras impidiendo el acceso o ingreso de los patógenos o herbívoros a las células. El espesor de la pared secundaria también puede influir en el comportamiento del insecto.

Algunas plantas contienen compuestos tóxicos en el interior o exterior, que fueron producidos con antelación a la infestación del insecto. También existen químicos inertes que se transforman rápidamente en tóxicos luego del ataque (Kelman y Sequeira 1972). Estos compuestos incluyen **inhibidores de proteinasas (IP)**, compuestos fenólicos, terpenoides y esteroides, entre otros. Los compuestos constitutivos, son sintetizados por las plantas en forma constante lo que significa un elevado costo fisiológico (Adler y Karban 1994). Estos compuestos varían en su toxicidad. Aquellos altamente tóxicos a bajas concentraciones (Ej. alcaloides) para la mayoría de los herbívoros, se los designa como “cualitativos” y los “cuantitativos” que deben ser ingeridos en altas dosis para que produzcan efectos nocivos (Feeny 1976).

Los mecanismos de **defensas inducidas** (o resistencia inducida, RI) pueden ser **directos o indirectos**. Los primeros están representados por compuestos químicos que actúan por la presencia del herbívoro, provocando su muerte o el retraso del desarrollo (Karban y Baldwin 1997; Lou y Baldwin 2003). En tanto, las **defensas indirectas** provocan un incremento en la mortalidad de los herbívoros por atracción de predadores y parasitoides (enemigos naturales), mediante la liberación de señales volátiles (Thaler 1999; Kessler y Baldwin 2001).

Las **defensas inducidas directas** actúan como una respuesta de la planta a la infección del patógeno o alimentación del insecto y es necesario un cierto tiempo posterior a la infección para que los efectos sean observables (Karban y Myers 1989). Una vez que la planta detecta al patógeno o insecto, pone en funcionamiento distintos caminos de señalización, activando genes de defensa que sintetizan (luego de la transcripción) enzimas relacionadas con el metabolismo secundario, las que finalmente van a sintetizar fitoalexinas en la zona vecina al ataque o en forma sistémica a través de la planta (Blechert et al 1995).

Uno de los mecanismos de resistencia inducida (**RI**) más estudiado en patógenos, es el llamado **Respuesta de hipersensibilidad (HR)**, del inglés *hypersensitive response*) o muerte celular programada (**PCD**, del inglés *programmed cell death*). Cuando un patógeno infecta unas pocas células de tejido vegetal, la planta reacciona provocando la muerte inmediata de éstas células rodeando la zona infectada e impidiendo que la infección avance hacia las células vecinas.

Para que las plantas puedan activar sus defensas necesitan reconocer al menos alguna molécula como resultado del ataque. Estas moléculas son llamadas “elicitors” (en inglés *elicitors* que significa *inductor*) (Baker *et al.*, 1997). Los elicitors son compuestos de bajo peso molecular producidos por el patógeno/insecto o el huésped, capaces de inducir una respuesta fisiológica o bioquímica de defensa en la planta (Kogel *et al.*, 1998). Como ejemplo de moléculas elicitoras encontramos polisacáridos, proteínas, glicoproteínas y ácidos grasos derivados (Dixon y Lamb 1990). Además, enzimas como las quitinasas, peroxidases y β 1-3 glucanasas fueron identificadas como compuestos inducidos por la acción de hongos (Benhamou 1996; Gelli *et al.*, 1997).

Además de las respuestas inducidas, existen mecanismos de defensa activados en forma sistémica (en una parte lejana al sitio de infección o alimentación del insecto) esta se conoce con el nombre de **Resistencia sistémica adquirida (SAR)**, del inglés *Systemic acquired resistance*) (Métraux *et a.*, 2002). Los elicitors endógenos de **SAR** comprenden a aquellos que inducen una **respuesta de hipersensibilidad (HR)**, el ácido salicílico (**SA**) aumenta marcadamente en las plantas (Glazebrook 2001; Métraux *et al.*, 2002), así como el ácido jasmónico (**JA**) (Walling 2000), etileno (**ET**) (Glazebrook 2001) y otros.

El sistema de **resistencia gen a gen** (en inglés *gene-for-gene*) definido por Flor (1971), plantea la selección de un gen de resistencia en una variedad de un cultivo, seguida por la evolución de un gen en la plaga considerada, de tal forma que supere la resistencia de la planta. Este tipo de interacción fue estudiada mayormente en los sistemas plantas-patógenos (De Wit 1997; Hulbert *et al.*, 2001).

Básicamente, la interacción gen a gen considera que las plantas resistentes portan un gen particular de resistencia (R) cuyo producto proteico es capaz de reconocer a los productos de los genes de avirulencia (avr) producidos por el parásito (Hammond-Kosack *et al.*, 1996; Glazebrook 2001). Este reconocimiento entre productos, considerado como incompatibilidad genética, (Hammond-Kosack *et al.*, 1996) dispara una serie de respuestas defensivas en la planta (Glazebrook 2001). Cuando el gen evoluciona

permitiendo que algunos individuos logren superar la resistencia de la planta, el gen se considera virulento (Harris y Frederiksen 1984). Por lo tanto, los productos proteicos de los genes de virulencia probablemente no sean reconocidos por los huéspedes, considerando a este tipo como compatibilidad genética (Hammond-Kosack *et al.*, 1996) desencadenando la enfermedad o daño. La resistencia monogénica (un gen simple) es considerada más vulnerable para la virulencia del parásito que la resistencia poligénica (varios genes) (Harris y Frederiksen 1984) debido a que la probabilidad de adquirir una mutación es mayor a la de adquirir varias mutaciones (Gould 1983).

Ensayos realizados en trigos resistentes a *D. noxia* mostraron cambios en la producción de etileno dentro de las primeras 24 horas luego de la infestación con éste áfido en trigos resistentes pero no en los susceptibles (Botha *et al.*, 1998). Además, hubo cambios en la expresión de los transcritos en dos fases, una de ellas, inmediata a las 24 hs luego de la infestación con *D. noxia*, que sería un respuesta de hipersensibilidad (**HR**) (Botha *et al.*, 1998; Matsioloko y Botha 2003), y una segunda respuesta, prolongada que permanece en los tejidos por un período más extenso, que sería un tipo de respuesta **SAR** (Van der Westhuizen *et al.*, 1998a, b). Esta respuesta **SAR** comienza a través de una cascada de pasos metabólicos mediada por el ácido salicílico y el ácido jasmónico, que permiten la expresión de genes que sintetizan proteínas relacionados con la patogénesis (**PR**), tales como quitinasas, β 1,3-glucanasa y peroxidasas (Van der Westhuizen 1998b), y genes necesarios para el mantenimiento de los cloroplastos, como ATPsintasas (Botha *et al.*, 2006). Las proteínas **PR** constituyen un grupo heterogéneo de proteínas constitutivas o inducidas, relativamente resistentes a la acción de proteasas, tóxicas para los patógenos, que se acumulan predominantemente en los espacios extracelulares.

También, se encontró que aplicaciones exógenas de etileno inducían la transcripción de genes que codifican quitinasas, glucanasas y otras PR. Se sabe además, que el daño mecánico induce la producción de etileno, que afecta las respuestas SAR, dado que esta hormona es antagónica del ácido salicílico (O'Donnell *et al.*, 1996).

Un estudio sobre el comportamiento de la alimentación de *D. noxia* confirma que el áfido prueba más y se alimenta menos sobre los cultivares resistentes, provocando un mayor número de lesiones en los cultivares resistentes que en las variedades susceptibles (Bahlmann *et al.*, 2003). Estos puntos necróticos serían la expresión de una respuesta de hipersensibilidad (HR), sumado a la expresión de SAR propuesta por Botha *et al.*, (2006).

En cambio, en las plantas susceptibles se activa una respuesta SAR, pero no existe una respuesta de hipersensibilidad.

Los inhibidores de proteinasas (**IP**) son un grupo de proteínas implicadas en las defensas de las plantas que se acumulan ante el ataque de insectos herbívoros, infección con hongos o daño mecánico. Algunas hormonas, tales como **ABA**, ácido jasmónico y ácido salicílico, actúan como elicitores de la activación de los **IP** (Casaretto *et al.*, 2004). Se sabe que en cebada el ácido jasmónico juega un rol importante en las defensas, promoviendo la síntesis de tioniina, una pequeña proteína que se encuentra principalmente en las semillas, ante la presencia de patógenos (Andresen *et al.*, 1992). Infestaciones con áfidos provocaron un aumento en la actividad de los inhibidores de tripsina y quimotripsina en semillas de cebada (Casaretto y Corcuera 1998).

Plantas de papa o tomate dañadas por herbívoros o mecánicamente, activan en forma sistémica los genes de los **IP** (Green y Ryan 1971; Farmer y Ryan 1990). Estos **IP** interfieren con el sistema digestivo del insecto, retardando el crecimiento y desarrollo larval (Broadway *et al.*, 1986). Este efecto negativo de los **IP** se pudo observar en varias interacciones de plantas con herbívoros (Ryan 1990).

Las plantas atacadas por herbívoros expresan rápidamente (dentro de una hora) sus defensas inducibles en hojas de la misma planta que no están dañadas. Esta respuesta de defensa sistémica, le da a la planta una resistencia para futuros ataques de insectos (Bostock R.M. 2005; Karban y Baldwin, 1997). Se hicieron experimentos en tomate en los cuales se encontró que la expresión sistémica de inhibidores de proteinasas (**IP**) dependía de la síntesis de **AJ** en el sitio de daño del insecto y de la percepción de los jasmonatos en hojas alejadas no dañadas. Como consecuencia de esto, Schillmiller y Howe (2005) propusieron un modelo en el cual el **AJ** actúa como una señal móvil en el floema.

En respuesta al daño o ataque provocado por herbívoros, las plantas liberan nectar extrafloral o una combinación compleja de compuestos orgánicos volátiles. Algunos de ellos sirven como defensa indirecta, atrayendo a los parásitos y predadores naturales de los herbívoros (Paré y Tumlinson 1999). La liberación de compuestos volátiles está influenciada por la especie del herbívoro y el estado de desarrollo; la especie de planta, genotipo y edad; y por el estrés ambiental (Dicke 1999; Paré y Tumlinson 1999). Las plantas liberan los volátiles en dos fases (McCall *et al.*, 1994): inmediatamente después del daño (dentro de la primera hora), y entre las 5 a 6 hs después del ataque, son

sintetizados nuevamente (en forma local o sistémica) otros volátiles (Paré y Tumlinson 1999).

Los volátiles actúan como una señal que permite que las plantas vecinas se preparen para la herbivoría. Este proceso llamado “priming” o estado de alerta, ofrece una respuesta más rápida o más intensa ante el ataque posterior de insectos (Arimura *et al.*, 2000; Engelberth *et al.*, 2004; Karban *et al.*, 2000).

El ácido jasmónico y sus derivados juegan un rol central en la respuesta de defensa de las plantas frente a la herbivoría. Además, los jasmonatos están implicados en la respuesta al daño mecánico, en las interacciones tritróficas, en el proceso “priming” de defensas directas e indirectas, en la resistencia a patógenos y en la transmisión sistémica de las señales de defensa, entre otros. Además de todos estos procesos relacionados con la defensa, los jasmonatos regulan varios aspectos del desarrollo de las plantas (Howe y Jander 2008). Por ello, esta hormona está involucrada en el “dilema de las plantas de crecer o defenderse” (Herms y Mattson 1992) ante un ambiente hostil.

Los metabolitos secundarios o aleloquímicos son compuestos de bajo peso molecular, que se encuentran en plantas sanas (constitutivos) y no sanas (inducidos o no constitutivos) y que tienen efectos tóxicos sobre los insectos herbívoros. Los constitutivos representan una primera barrera química para el ataque de insectos (Levin, 1971). Los productos del metabolismo primario son comunes a todas las especies de plantas y constituyen un número limitado de compuestos, en tanto, aquellos que provienen del metabolismo secundario son más numerosos y su distribución varía entre especies de plantas, pudiendo incluso limitarse a una única especie o a algunas especies relacionadas (Rhodes 1994). Estos compuestos generalmente se encuentran localizados en determinados órganos o tejidos de las plantas y muchas veces el lugar donde se acumulan no es el mismo en el que son biosintetizados (Hashimoto *et al.*, 1987). Los metabolitos no constitutivos son aquellos que se sintetizan como consecuencia del ataque de agentes externos y son liberados en el tejido dañado transportándose desde el lugar de síntesis.

Los metabolitos secundarios pueden desempeñar un importante papel en la interacción de la planta con otros organismos actuando como sustancias de defensa frente a patógenos, plagas y distintas formas de estrés ambiental (Levin, 1971). Los terpenoides son la clase más diversa. También están los alcaloides (cafeína, nicotina, morfina, estricnina y cocaína) que tienen efectos metabólicos sobre los mamíferos y que probablemente han evolucionado en sus defensas contra los insectos herbívoros. Otros,

son los taninos, glucosinolatos y glicósidos cianogénicos. Entre los metabolitos secundarios que han sido implicados en la resistencia natural de plantas a pulgones se encuentran algunos alcaloides, compuestos fenólicos y los ácidos hidroxámicos (**Hx**).

Otro de los indicadores de las defensas de la planta frente al estrés, es el aumento de especies de oxígeno reactivo (**ROS**) (del inglés, *reactive oxygen species*). El estrés oxidativo en los organismos aeróbicos es causado por la producción de ROS, tales como radicales superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxílicos (OH^\cdot), que pueden llevar a la célula a una destrucción oxidativa. En condiciones normales las ROS son formadas en baja concentración y como un subproducto de la fotosíntesis y la respiración, entre otros procesos. En cambio, su producción se incrementa cuando las plantas son expuestas a un estrés biótico o abiótico (Dirk y Marc 1995; Eva *et al.*, 2002; Mittler 2002). El aumento en la producción de ROS durante un estrés puede significar una amenaza para la célula, pero también actúan como señales en la activación de respuestas y mecanismos de defensas. La acumulación de ROS puede provocar la muerte celular derivada de procesos oxidativos como la peroxidación de lípidos de la membrana, oxidación de proteínas, inhibición enzimática y daño del ADN y ARN. Por lo tanto, las ROS pueden ser tóxicas pero a su vez participan en eventos de señalización, entonces las células de las plantas requieren al menos dos mecanismos diferentes para regular su concentración intracelular: uno de ellos es el que va a mantener los niveles de ROS bajos, sólo para fines de señalización; el otro, es el que permite la detoxificación de los excesos de ROS, especialmente durante un estrés. Un desbalance entre la producción de ROS y los mecanismos de defensa produce estrés oxidativo, con el consecuente daño celular.

Las plantas tienen mecanismos de protección enzimáticos y no enzimáticos que remueven las especies ROS evitando el estrés oxidativo (Dirk y Marc 1995). Las células de las plantas son protegidas contra las especies ROS por un sistema antioxidante enzimático que comprende a las enzimas superóxido dismutasas (SOD), catalasas (CAT), peroxidasas y ascorbato peroxidasas (APX) y no enzimático, ácido ascórbico, glutatión y compuestos fenólicos (Dirk y Marc 1995; Mittler 2002). Las SOD fueron encontradas en casi todos los compartimentos celulares. En contraste, las CAT están sólo presentes en peroxisomas y son indispensables en la detoxificación durante el estrés, (Willekens *et al.*, 1997). Los antioxidantes, tales como el ácido ascórbico y glutatión, fueron hallados en altas concentraciones en cloroplastos y otros compartimentos, y tienen un rol crucial en la defensa de las plantas contra el estrés oxidativo (Noctor y Foyer 1998). Las mitocondrias

también son un sitio celular de producción de especies ROS y un aumento en los niveles de estas especies puede producir la muerte celular programada (Lam *et al.*, 2001). Tanto los cloroplastos como las mitocondrias contienen mecanismos que remueven dichas especies. El óxido nítrico es un regulador clave en la respuesta a la patogénesis y participa junto con el ácido salicílico (SA) y el H₂O₂, producido durante el estrés, en la activación de defensas de la planta, incluida la muerte celular programada (Dangl 1996), que como vimos anteriormente, también se llama respuesta de hipersensibilidad (HR). La actividad de las enzimas APX y CAT es suprimida por la hormona SA de la planta y el NO. De esta manera, la planta produce más especies ROS y al mismo tiempo disminuye la propia capacidad de remover el H₂O₂. Esto resulta en una acumulación de ROS que provocan la muerte celular programada (Delledonne *et al.*, 2001).

Control y Manejo Integrado de Plagas

Un gran número de factores operan en el control de las poblaciones de áfidos en sus hospedantes naturales (Carter *et al.*, 1980). Condiciones ambientales adversas como temperaturas extremas o lluvias fuertes contribuyen a estos efectos.

El control biológico consiste en la manipulación de organismos vivos por el hombre, con el propósito de regular las poblaciones de las plagas, a niveles en los que el daño económico sea reducido significativamente; este se diferencia en la regulación natural en la que no hay intervención del hombre (Carballo y Quezada 1987).

Dentro de los enemigos naturales de los áfidos los parásitos himenópteros juegan un rol importante. Entre ellos podemos mencionar a organismos pertenecientes a las familias Aphididae, Aphelinidae, Braconidae y otras de menor importancia (Carballo y Quezada 1987). También, son importantes los insectos predadores, perteneciendo muchos de ellos a la familia de los Coccinellidos.

Los plaguicidas químicos han sido el principal método para el control de insectos y en algunos casos el único. Esta práctica es altamente costosa y provoca daños por contaminación y acumulación de residuos tóxicos en el ambiente, así como también ocasiona daños a los insectos benéficos como polinizadores y predadores (Dreyer y Campbell 1987). El uso indiscriminado e irracional de estos productos ha provocado una resistencia de las plagas a los mecanismos de acción de muchos plaguicidas, con lo cual surgió la necesidad de establecer métodos más eficientes para manejar a las plagas sin la necesidad de su eliminación total.

En el caso particular de *Diuraphis noxia*, el control químico resulta de escasa eficiencia debido a que los pulgones se protegen en el interior de las hojas enrolladas (Robinson *et al.*, 1992).

Surge a partir de estas consideraciones el concepto de “Manejo Integrado de Plagas” (MIP) el cual utiliza una serie de herramientas en forma conjunta y complementarias. Los componentes del MIP son: Control químico, Control biológico, Control cultural, Control genético y resistencia varietal y Umbrales económicos de daño. Con el MIP se busca lograr una resistencia estable (perdurable) ante condiciones ambientales variables y poblaciones genéticamente heterogéneas de plagas y patógenos.

El mejoramiento genético mediante la obtención de variedades resistentes es, quizás, la estrategia más efectiva y no contaminante para el control de plagas. La resistencia de las plantas a insectos representa la capacidad que tienen las mismas de restringir, retardar o sobreponerse a la infestación de una plaga.

Las características genéticas de las plantas son modificables por métodos de selección tradicional o asistida por marcadores moleculares (MAS, del inglés *Marker assisted selection*) y existe una gran variedad de procedimientos y estrategias para facilitar el flujo de genes entre plantas para aumentar su resistencia a los herbívoros.

Estudio de los mecanismos de resistencia de las plantas frente al ataque de insectos

Painter (1951) definió tres categorías de resistencia de las plantas a los insectos plagas:

- 1- Antixenosis o no preferencia: cuando una planta es menos seleccionada o elegida por una plaga para su alimentación, reproducción o protección que otras plantas.
- 2- Tolerancia: es la capacidad de las plantas de superar el ataque de una plaga sin que tenga una pérdida significativa de la calidad y cantidad de su producción.
- 3- Antibiosis: cuando una planta modifica la biología del insecto que se alimenta de ella, de esta forma afecta directa o indirectamente el potencial de reproducción del mismo.

Una misma planta puede poseer uno, dos o los tres tipos de resistencia. En general, cuando ella posee dos o tres tipos, estos son gobernados por diferentes genes, aunque existen casos en que un mismo gen presenta efecto pleiotrópico (actúa sobre más de un carácter). Al ser los diferentes mecanismos determinados por factores genéticos distintos,

éstos podrán ser acumulados en una misma planta piramidalizándolos y así aumentar su grado de resistencia.

El empleo de más de una categoría de resistencia en forma simultánea ofrece ventajas en el mejoramiento. La antixenosis es deseable por ayudar a evitar la dispersión de los virus por los áfidos, dado que al no alimentarse por un tiempo suficiente en un determinado hospedante, no transmitirá virus a la planta. Por otro lado, se cree que la tolerancia y la antixenosis ejercen una presión de selección menor sobre los áfidos, que previene el desarrollo de nuevos biotipos virulentos (Lage *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha indicado (Porter *et al.*, 1997) que los biotipos virulentos de *S. graminum* no se desarrollan como resultado del uso de cultivares resistentes, sino que están presentes antes de liberar esos materiales. No obstante, la tolerancia es un carácter deseable ya que si los áfidos están presentes en el cultivo, no causarán pérdidas significativas y se evitará el uso de pesticidas manteniendo una población de enemigos naturales (Smith, 1989). Sumado a lo anterior, una baja eficiencia reproductiva de los áfidos por antibiosis, podría ser ideal en los cultivos (Lage *et al.*, 2003).

Para poder evaluar el comportamiento de una determinada especie al ataque de áfidos se han conducido una gran diversidad de ensayos en distintas especies y cultivares que demuestran diferente comportamiento frente a su infestación (Arriaga 1975; Sebesta y Wood 1978; Painter y Peters 1956; Webster y Starks, 1984; Nkongolo *et al.*, 1991, Kindler *et al.*, 1991; Castro 1994; Flinn *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2001). Esto ha servido para profundizar el estudio de los diferentes mecanismos de resistencia identificados por Painter (1951) y permite el mejoramiento genético de la resistencia por vía tradicional y por la ubicación de marcadores moleculares asociados a genes de resistencia.

Existen antecedentes que confirman que la estabilidad de la resistencia a insectos en condiciones controladas y a campo depende del genotipo del cultivar. Se encontró que líneas de trigo portadores del gen Dn4, que otorga resistencia a PRT, expresaron en forma estable antibiosis. En cambio el genotipo residual condicionó la estabilidad de la tolerancia en ambos tipos de ensayos (Randolph *et al.*, 2005, Hawley *et al.*, 2003).

Uso de los marcadores moleculares en el mejoramiento de las plantas

El desarrollo de técnicas moleculares para el análisis genético ha permitido un aumento del conocimiento de la genética de cereales y un mayor entendimiento de la

estructura y comportamiento del genoma de las plantas. Entre las técnicas moleculares, los marcadores moleculares, han sido ampliamente usados para detectar variaciones en las secuencias de ADN en y entre especies, y para crear nuevas fuentes de variación genética por introducción de características favorables provenientes de especies silvestres (Costa *et al.*, 2001). Las técnicas convencionales de mejoramiento de cereales están muy influenciadas por el ambiente y consumen mucho tiempo hasta la obtención de variedades mejoradas. En cambio, con las técnicas que utilizan marcadores moleculares estas desventajas no se presentan (Costa *et al.*, 2001).

Para la correcta implementación de los marcadores moleculares en programas de mejoramiento, se requieren tres factores: la disponibilidad de marcadores moleculares fáciles de usar (baratos, confiables, etc), la validación de los marcadores cruzados con distintos fondos genéticos y la posibilidad de implementarlos dentro de un programa de mejoramiento (Costa *et al.*, 2001).

La cebada presenta ciertas ventajas para los estudios genéticos de su genoma: 1) es una especie diploide con siete cromosomas citológicamente distintos, que contienen aproximadamente $5,3 \times 10^9$ bp en su ADN (Bennett y Smith 1976); 2) los cromosomas son homeólogos a los del trigo (Moore *et al.*, 1995) lo que significa que la cebada puede servir como un sistema modelo de cereales poliploides más complejos y 3) las poblaciones de líneas doble haploides de cebada pueden producirse con relativa facilidad, permitiendo su repetición para generar mapas genéticos de caracteres cualitativos y cuantitativos (Chen y Hayes 1989).

Los avances de la biología molecular y la genética genómica en la comprensión de las respuestas al estrés, han facilitado la identificación de loci únicos de efecto mayor, o genes mendelianos, y otros **loci de caracteres cuantitativos (QTL**, del inglés *Quantitative trait loci*), relacionados con la tolerancia a distintos tipos de estrés (Mano y Takeda 1997; Otto et al, 2002) que serían altamente conservados en la mayoría de los grupos homeólogos y ortólogos de cereales.

La selección asistida por marcadores moleculares (**MAS**), es una herramienta muy efectiva para acelerar la producción de cultivares con caracteres deseados en general, y en particular con resistencia a insectos (Yencho *et al.*, 2000).

La **MAS** fue considerada muy promisoría en la aplicación de la genética molecular (Young 1999; Dekkers y Hospital 2002) pudiendo lograr mayor efectividad en los programas de mejoramiento de plantas. Un paso importante es encontrar marcadores

moleculares que estén localizados cerca de los genes que gobiernan los caracteres fenotípicos de interés. En la mayoría de los cultivos, los mapas de marcadores moleculares ya están disponibles y muchos genes de interés han sido mapeados y flanqueados, incluyendo loci de caracteres cuantitativos (QTL) (Kraakman *et al.*, 2006). Para el mapeo de QTL se cruzan dos genotipos contrastantes y la asociación entre los loci marcadores mapeados y los caracteres fenotípicos, permiten la localización de esos genes sobre el genoma.

Los loci de caracteres cuantitativos (QTL) se basan en el efecto de varios genes que contribuyen para un mismo carácter. Cada gen influye en la complejidad del carácter y en la manera de interactuar. El efecto de un locus es promediado como una contribución porcentual al carácter en su totalidad. El criterio que se utiliza para el ligamiento de un marcador con el QTL, es el valor de LOD (*likelihood odds ratio*). Este se define como $\text{Log}_{10} L/L_0$, en donde $\text{Log}_{10} L$ es la probabilidad de que la información correspondiente resulte del ligamiento y L_0 es la probabilidad que no resulte del ligamiento. Un valor alto de LOD representa un estrecho ligamiento del marcador con un QTL. La probabilidad de la existencia de un QTL es lo que decide si un locus tiene relevancia o no (Korzun V. 2003).

CAPÍTULO II HIPÓTESIS Y **OBJETIVOS GENERALES**

HIPÓTESIS

En *Hordeum vulgare* existirían genes ubicados en diferentes cromosomas que explicarían las distintas categorías de resistencia (antixenosis, tolerancia y antibiosis) a *Schizaphis graminum* y a *Diuraphis noxia*, y algunos de esos genes se ubicarían en las mismas regiones cromosómicas que aquellos inducidos por la aplicación de las hormonas ácido jasmónico, ácido salicílico, etileno y ABA, o serían los mismos genes.

OBJETIVOS GENERALES

Identificar genes de antixenosis, tolerancia y antibiosis frente al ataque de *Schizaphis graminum* y *Diuraphis noxia* en cebada cervecera.

Comprobar si esos genes de resistencia a áfidos son los mismos que se activan ante la inducción hormonal con ácido jasmónico, ácido salicílico, etileno y ABA, o son otros genes los que participan en la inducción

CAPÍTULO III ANTIXENOSIS

INTRODUCCIÓN

Una planta o variedad presenta una resistencia de tipo no preferencia (o antixenosis, según Kogan y Ortman, 1978) cuando ella es menos utilizada por el insecto, ya sea para alimentación, oviposición o refugio, que otra planta en igualdad de condiciones (Painter, 1951).

Los insectos, generalmente, **oviponen** en sustratos que garanticen el desarrollo de sus larvas asegurando la supervivencia de la especie. No obstante, existen casos en que los huevos no son colocados sobre los hospederos, debiendo las larvas distinguir las plantas adecuadas. Por lo tanto el comportamiento de oviposición y alimentación puede variar frente a distintos sustratos.

Existen varios mecanismos de antixenosis. Entre ellos, el color de las plantas, puede influir en la preferencia de los áfidos por un hospedero. La palatabilidad es otra característica, algunos áfidos pueden aceptar o rechazar una planta en base a sus compuestos secundarios. Luego de alcanzar el floema, por ejemplo, los ácidos hidroxámicos (Hx) en los cereales, están asociados con la antibiosis a los áfidos, pero también actúan como un compuesto disuasorio o deterrente que provoca antixenosis. La presencia de ceras epicuticulares también puede estar relacionada con la antixenosis a áfidos. La dureza de la superficie de la planta, es un tipo de resistencia mecánica muy frecuente para los insectos masticadores. En los áfidos, la causa más común de resistencia antixenótica mecánica, es la dificultad para alcanzar el floema, que puede relacionarse, por ejemplo, con la cantidad de pectina en la laminilla media de las células, o con la presencia de calosa en el floema. Los tricomas, también pueden actuar como barreras físicas, causando antixenosis a varios insectos pequeños, entre ellos, los áfidos (Van Emden y Harrington 2007).

La técnica de graficación por electropenetración (Tjallingii's 1988) es utilizada en el estudio de la evaluación de la conducta alimenticia, permite el continuo monitoreo de la penetración del áfido y su actividad de sondeo en las plantas muy relacionado con la aceptación del hospedante (Mentink *et al.*, 1984).

Gramina es uno de los metabolitos secundarios más abundante en plantas de cebada (Corcuera, 1984). Este compuesto es un indolalcaloide, cuyo contenido en las hojas ha sido correlacionado, por varios autores, con la resistencia a *Schizaphis graminum* (Zúñiga *et al.*, 1985) y a *Rhopalosiphum padi* (Zúñiga y Corcuera, 1986). Se considera

que actúa como una sustancia disuasoria durante la penetración del estilete y el sondeo de la hoja, antes de entrar en contacto con el floema. Se ha encontrado que a mayor contenido de gramina, mayor es la tolerancia de las plantas (Kanehisa *et al.*, 1990; Rustamani *et al.*, 1992; Zúñiga *et al.*, 1985). Se lo ha localizado en el mesófilo y en la epidermis, pero no en los haces vasculares (Argandoña *et al.*, 1987). En estudios previos se ha demostrado que varios factores como el fotoperíodo, la edad y la temperatura afectan el contenido de gramina (Hanson *et al.*, 1983; Salas y Corcuera 1991).

HIPÓTESIS

- La existencia de resistencia a *Schizaphis graminum* y a *Diuraphis noxia* en un grupo de cultivares de *Hordeum vulgare*, permitirá la identificación del mecanismo de antixenosis.
- En las líneas recombinantes dihaploides derivadas del cruzamiento entre progenitores puros contrastantes para la antixenosis, se podrán localizar cromosómicamente los genes involucrados con la no preferencia a *Schizaphis graminum* y a *Diuraphis noxia*.
- El mapeo cromosómico de genes de antixenosis se podrá realizar asociando marcadores moleculares contrastantes con los fenotipos de líneas recombinantes dihaploides en las que se han localizado cromosómicamente los marcadores.

OBJETIVOS

- Identificar en cebada los genotipos portadores de resistencia antixenótica, en cuatro líneas no emparentadas, progenitoras de recombinantes dihaploides.
- Evaluar líneas recombinantes dihaploides provenientes del cruzamiento entre progenitores contrastantes en su expresión de antixenosis a *Schizaphis graminum* y a *Diuraphis noxia*.
- Realizar el análisis genético de la variabilidad de la antixenosis en las líneas recombinantes dihaploides asociándola a marcadores moleculares mapeados para localizar cromosómicamente los genes responsables.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los áfidos

Se utilizó una población de pulgón verde de los cereales (*S. graminum*) (**PVC**), colectados entre los años 2004 y 2007, y otra población de pulgón ruso del trigo (*D. noxia*) (**PRT**), colectados entre los años 2004 y 2008, refrescando la composición de las poblaciones de trabajo en el insectario con las variantes presentes en el campo. La colecta de insectos se realizó en las regiones húmedas (Buenos Aires, Santa Fé) y subhúmedas (Córdoba, La Pampa, Mendoza, Neuquén) de Argentina.

Los áfidos fueron criados sobre cebada susceptible cv 'Maltería Eda' en insectario en condiciones de temperatura e iluminación controladas ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 16:8 hs D: N). Las poblaciones de pulgones fueron mantenidas en macetas plásticas cubiertas por una capucha (Figura 18) que evita la fuga de los insectos.

Figura 18. Mantenimiento de las poblaciones de áfidos en macetas



El material vegetal

Los padres de las líneas recombinantes dihaploides se seleccionaron por características de interés agronómico, empleándose en nuestros análisis solo aquellos progenitores no emparentados entre sí y con niveles de antixenosis contrastantes.

Se utilizaron 83 líneas recombinantes dihaploides (**LRD**) (de un total de 94) de cebada cervecera provenientes del cruzamiento de los progenitores contrastantes Dominante (Dom) y Recombinante (Rec) (Costa *et al.*, 2001) (Figura 19). Estas líneas

recombinantes fueron desarrolladas en el *Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research* (IPK) de Alemania en donde también se mapearon marcadores contrastantes entre ambos padres. Estas **LRD** mostraron diferencias muy grande en cuanto a ciclo, porte, tipo de cebada cervecera y forrajera, presencia o ausencia de aristas y pelos, variación en el color de las glumas y de aleuronas, entre otros caracteres de interés agronómico (Figura 20).

Una semilla por genotipo, previamente germinada en cajas de Petri, fue colocada en viales de 5 cm³ cubiertos con vermiculita estéril. Algunos genotipos tuvieron requerimientos de vernalización con muy bajo poder germinativo. Para estos casos, se debió exponer las semillas a luz artificial durante un día y luego colocarlas en heladera a 8°C durante 2 días. Las plantas fueron suplementadas con solución nutritiva Hoagland junto con el agua de riego. Las mismas fueron mantenidas en un invernáculo en condiciones de temperatura e iluminación controladas (20°C ± 2°C y 16:8 hs L:O).

Figura 19. Líneas parentales Dom y Rec



Figura 20. Descendencia obtenida de los progenitores Dom y Rec



Ensayo de antixenosis a *Schizaphis graminum* y a *Diuraphis noxia* en cuatro líneas de cebada no emparentadas.

Se probaron cuatro líneas parentales seleccionadas en ensayos previos por sus niveles de preferencia/no preferencia al PVC (Castro A.M. 2000, comunicación personal). Dominante (Dom), Recombinante (Rec), Angora (Ang) y W766 fueron probados nuevamente con PVC (dado los cambios permanentes en las poblaciones naturales de los áfidos) y con PRT. Al estado de segunda hoja expandida se realizó el ensayo de no preferencia siguiendo el método de libre elección del hospedero, del Dr. Petterson (com. personal), modificado por Castro *et al.*, (2001). Dicho método consistió en distribuir en forma de círculo una planta de cada genotipo, con la segunda hoja dirigida hacia el centro del mismo. Se colocó en el medio una cantidad de áfidos equivalente a 10 pulgones adultos por planta, permitiendo la libre elección de los hospederos.

El ensayo fue llevado a cabo en oscuridad para evitar que la luz actuara como estímulo de elección por parte de los áfidos (Castro *et al.*, 2001). La distribución de los genotipos fue totalmente al azar. A las 24 horas se registró el número de áfidos presente en cada planta y el número de ninfas neonatas. Se realizaron 8 repeticiones de todos los

genotipos con cada uno de los pulgones, utilizándose la misma metodología en ambos tratamientos.

Se utilizó un diseño de bloques al azar cuyo modelo es:

$$Y: G_i + T_j + R_k + E_n$$

Donde G: genotipo; T: tratamiento; R: repeticiones; E: error

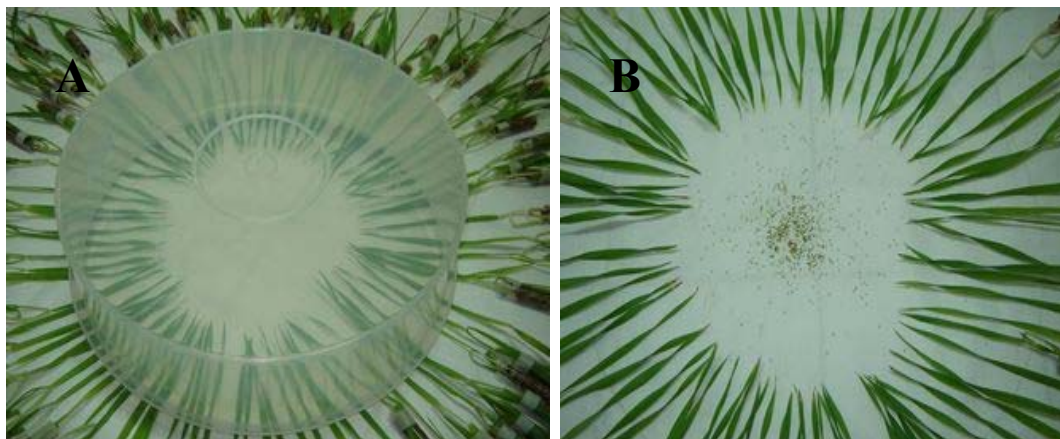
Previo al análisis de la varianza se analizó la normalidad de la distribución mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Snedecor y Cochran 1989) y la homogeneidad por la prueba de Barlett (Snedecor y Cochran).

El análisis de la varianza (ANOVA) fue realizado utilizando el PROC GLM procedente del paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1998). Los valores promedios de cada genotipo y tratamiento se analizaron por el test de LSD.

Ensayo de antixenosis a *Schizaphis graminum* y a *Diuraphis noxia* en líneas recombinantes dihaploides.

El ensayo de no preferencia fue similar al descrito anteriormente con la diferencia que se utilizaron las 85 **LRD** y los progenitores Dom y Rec (Figura 21). Se graficó la distribución de las LRD en base a dividir el rango por un número arbitrario de 10 clases.

Figura 21. Ensayo de antixenosis.



A. Líneas recombinantes dihaploides y ambos progenitores ubicados en círculo
B. Detalle de los pulgones en el centro del círculo.

Análisis génico-molecular de las líneas recombinantes dihaploides

Se mapeó una población de 94 líneas recombinantes dihaploides de cebada cervecera, provenientes del cruzamiento entre las líneas progenitoras Dom y Rec. La técnica de extracción de ADN, la determinación, e identificación de los distintos tipos de marcadores moleculares hallados, fue realizada por Costa *et al.*, (2001). El análisis de ligamiento de los marcadores morfológicos y moleculares para la construcción del mapa fue realizado usando el programa GMENDEL 3.0 (Holloway y Knapp 1994).

Análisis de ligamiento

Estos análisis fueron llevados a cabo por el Dr. Andreas Börner en el IPK de Alemania, asociando el valor fenotípico de la variable analizada en el hospedante con los marcadores moleculares. Se evalúa si el cambio alélico de cada uno de ellos, provoca una alteración significativa en la expresión del carácter analizado.

Se utilizaron los programas MapMaker y QGENE (Lander *et al.*, 1987; Nelson *et al.*, 1997) para establecer la existencia de asociación entre el mecanismo de resistencia de tipo antixenótica y los marcadores moleculares mapeados en los cromosomas de las LRD provenientes de Dom y Rec. Los polimorfismos observados en las líneas parentales fueron evaluadas y mapeadas utilizando la desnaturalización bajo cromatografía líquida de alta performance según describió, previamente, Kota *et al.*, (2001a). El mapa consenso fue preparado utilizando el programa JoinMap ver. 3.0, usando un valor de LOD superior a 2,5 (Stam 1993).

Esta población de líneas recombinantes continuó analizándose para identificar genes candidatos asociados a los diversos marcadores moleculares (Kota *et al.*, 2008).

RESULTADOS

Ensayo de antixenosis a *Schizaphis graminum* y a *Diuraphis noxia* en cuatro líneas no emparentadas.

Dominante (Dom), Recombinante (Rec), Angora (Ang) y W766 presentaron diferencias altamente significativas, tanto en el número de adultos como de ninfas nacidas con ambos áfidos (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de la varianza del mecanismo de antixenosis

Variable	PVC								PRT							
	Adultos				Ninfas				Adultos				Ninfas			
Fuente de variación	GL	CM	F	Pr>F	GL	CM	F	Pr>F	GL	CM	F	Pr>F	GL	CM	F	Pr>F
Genotipo	3	82,83	5,76	0,005	3	54	5,43	0,007	3	39	12,56	0,0002	3	68	8,86	0,0013
Error	19	14			19	9,87			15	3			15	8		

PVC: *S. graminum*. PRT: *D. noxia*.

La línea W766 se comportó como preferida frente a **PVC** (Tabla 5). Las otras tres líneas resultaron ser antixenóticas, dado el bajo número de insectos atraídos por las plantas. El número promedio de ninfas nacidas mantuvo un comportamiento similar al observado en la selección realizada por los adultos, por lo tanto en la línea W766 se registró el mayor valor de ninfas neonatas (Tabla 5).

En presencia del pulgón ruso, se observaron diferencias altamente significativas entre los genotipos probados, tanto en el número de adultos como de ninfas nacidas (Tabla 5). Las líneas más antixenóticas para el **PRT** fueron Dom y Rec, registrándose también el menor número de ninfas nacidas/planta (Tabla 5). En tanto, Ang y W766 fueron las líneas más preferida por el **PRT**, observándose también el mayor número de ninfas nacidas/planta (Tabla 5)

Como puede observarse los menores valores de ninfas neonatas (Tabla 5) para **PVC** y **PRT** se registraron en Dom y Rec. Este resultado podría indicar que en ambas líneas existiría antibiosis.

Debido al alto nivel de antixenosis, así como al bajo número de nacimientos de ninfas de ambos pulgones en Dom y Rec, a partir de este momento se comenzó a analizar las líneas recombinantes dihaploides provenientes del cruzamiento entre estos progenitores.

Tabla 5. Análisis de la resistencia por antixenosis, evaluando las medias del número de áfidos adultos y ninfas nacidas de PVC y PRT en líneas de cebada, realizado por el método de libre elección del hospedero

Genotipos	PVC		PRT	
	Adultos	Ninfas	Adultos	Ninfas
Rec	3.667b	4.83b	3.5b	3.5b
Dom	3.4b	5.4b	5.25b	5.25b
Ang	4.8b	5.2b	8.6a	10.52a
W766	11a	10.85a	9.66a	11,16a
DMS	4.728	3.918	2,46	3.874

PVC: *S. graminum*. PRT: *D. noxia*. Letras distintas en cada columna identifican diferencias significativas ($P>0,05$). DMS: Diferencia mínima significativa.

Ensayo de antixenosis a *Schizaphis graminum* y *Diuraphis noxia* en líneas recombinantes dihaploides.

El ANOVA reveló que en presencia del **PVC** no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, en presencia del **PRT** se observaron diferencias altamente significativas entre las LRD y entre ambos progenitores (Tabla 6).

Frente al ataque del pulgón verde de los cereales, no hubo diferencias significativas entre los progenitores ni entre ellos y el promedio de las LRD. Sin embargo, hubo una amplia variabilidad entre las líneas ante la presencia de este áfido (Tabla 7). Catorece de ellas fueron las menos preferidas por el PVC.

En presencia del **PRT** el padre **Rec** resultó ser antixenótico en relación al padre Dom que se comportó como preferido (Tabla 7). En tanto, el promedio de las **LRD** fue intermedio entre ambos progenitores sin diferenciarse estadísticamente de ninguno de ellos (Tabla 7). La mitad de las LRD, tuvieron el mismo nivel de antixenosis que el padre Rec, el menos preferido, (Figura 22). Otras 7 líneas resultaron ser altamente preferidas por el **PRT**, superando en el número de áfidos por planta al padre susceptible, Dom (Figura 22).

Tabla 6. Análisis de la varianza de antixenosis en líneas recombinantes dihaploides

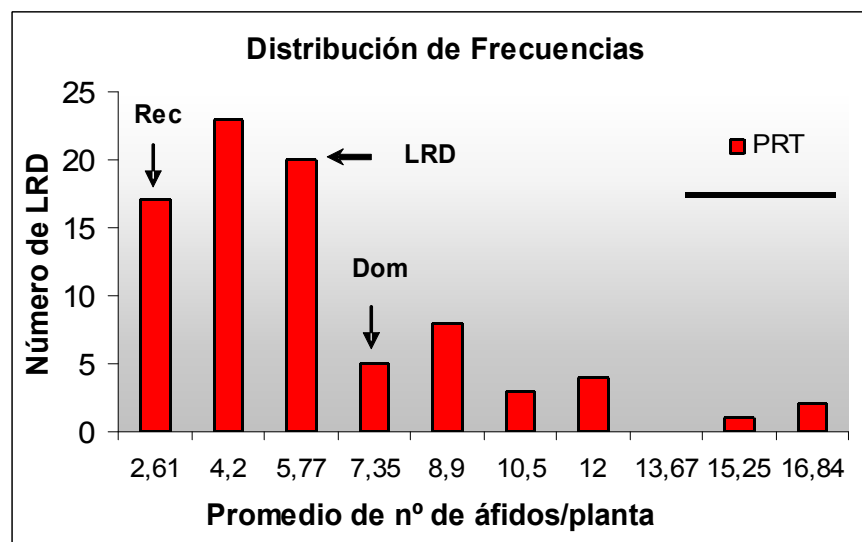
Variable	PVC				PRT			
	GL	CM	F	Pr>F	GL	CM	F	Pr>F
Fuente de variación								
Genotipo	84	51,89	1,09	0,28	84	78,45	2,29	0,0001
Error	584	47,55			584	34,3		

PVC: *S. graminum*. PRT: *D. noxia*.

Tabla 7. Análisis de la resistencia por antixenosis, evaluando el número de áfidos promedio de PVC y PRT en líneas recombinantes dihaploides de cebada y los progenitores Dom y Rec.

Genotipos	PVC	PRT
Dom	6,14a	7,22a
Rec	3,83a	2,28b
LRD	6,29a	5,92ab
Mínimo	1,4	1,83
Máximo	18,5	17,63
DMS	3,21	3,24

PVC: *S. graminum*. PRT: *D. noxia*. Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas ($P > 0,05$). DMS: Diferencia mínima significativa

Figura 22. Distribución de frecuencias de las LRD y los progenitores Dom y Rec, en relación al número de áfidos (*D. noxia*) por planta

La barra horizontal indica el desvío estándar.

Análisis de ligamiento

Se localizaron 713 marcadores moleculares y 12 marcadores morfológicos con los que se construyó el mapa de ligamiento. Los marcadores moleculares se distribuyeron en, 87 RFLP, 5 RAPD, un STS, un IFLP, 33 SSR y 586 AFLP, en los 7 cromosomas. Los marcadores AFLP tendieron a agruparse sobre las regiones centroméricas y fueron más abundantes en el cromosoma 7H.

Al aplicar los programas estadísticos para evaluar el posible ligamiento entre los marcadores moleculares identificados en los cromosomas de ambos progenitores y el mecanismo de antixenosis, se determinó que no están asociados significativamente a ningún marcador mapeado, en los tratamientos con **PVC** y **PRT**.

DISCUSIÓN

La media de las **LRD** bajo infestación con **PRT** estuvo entre el valor de ambos padres, de los que no se diferenció significativamente, indicando que existe un efecto aditivo entre los genes aportados por aquellos. Este hecho es de gran importancia dado que en los planes de mejora genética sólo es heredable y mejorable el efecto aditivo de los genes, por lo cual podrán ser transferidos a materiales comerciales incrementando el nivel de resistencia de estos, a pesar de no haber encontrado aún marcadores asociados a este tipo de resistencia.

La variabilidad observada entre las **LRD** evaluadas, indicaría la presencia de genes relacionados con la antixenosis a **PRT**. El progenitor Rec mostró un nivel de antixenosis significativamente mayor que el padre Dom frente a este áfido, observándose 46 **LRD** con un nivel de no preferencia similar a la del padre resistente. Estas líneas serían las portadoras de éste mecanismo y podrían utilizarse como fuente de genes favorables para la resistencia en materiales comerciales de cebada. Sin embargo, no fue posible encontrar una asociación significativa entre este tipo de mecanismo de resistencia y los marcadores moleculares mapeados para los siete cromosomas de ésta población de cebada.

El empleo de una mezcla de genotipos de **PVC** y de **PRT** presente en las poblaciones naturales, implica trabajar con una amplia variación genética (Noriega *et al.*, 2000; Clúa *et al.*, 2004) en dichas plagas. Al probar las **LRD** con una población de áfidos y observar un significativo nivel de antixenosis, pero no encontrar una asociación significativa con los marcadores diagnósticos en los hospedantes, se podría inferir que

varios genes aportarían no preferencia a los diversos genotipos de estos insectos presentes en sus poblaciones. No se ha encontrado asociación, posiblemente por la acción múltiple de los genes de defensas activados simultáneamente por la infestación.

Como se expresó anteriormente, la antixenosis puede manifestarse en las plantas por la acción de varios mecanismos de defensa, tales como presencia de barreras físicas (ceras, tricomas, etc.) o sustancias que actúan disuadiendo la presencia de los insectos. En los materiales analizados en el desarrollo de ésta Tesis se ha observado en varias líneas recombinantes de cebada la presencia de pelos en el estado de plántula, que podrían haber condicionado su selección por los PRT.

Los metabolitos secundarios tienen un rol preponderante en la resistencia de tipo antixenótica, principalmente el alcaloide gramina, que es el más abundante en plantas de cebada (Corcuera 1984). Este compuesto ha sido correlacionado con la resistencia a *Schizaphis graminum* (Zúñiga *et al.*, 1985 encontrándose que a mayor contenido, mayor es la antixenosis de las plantas (Kanehisa *et al.*, 1990; Rustamani *et al.*, 1992; Zúñiga *et al.*, 1985).

Se sabe que la edad de las plantas, entre otros factores, afecta el contenido de gramina. A medida que la planta crece, el contenido de gramina va disminuyendo (Hanson *et al.*, 1983; Salas y Corcuera, 1991). En esta tesis sólo se han utilizado plántulas hasta la tercera hoja expandida de las **LRD**, estado en el cual se presenta la mayor concentración de este metabolito y al mismo tiempo, período de máxima sensibilidad de cebada al ataque de áfidos (Castro *et al.*, 1987 y 1988).

Si bien el objeto de esta Tesis no ha sido determinar las causas que ocasionan la antixenosis de estas plantas de cebada al PVC y al PRT, se podría inferir que las concentraciones de gramina no son lo suficientemente altas para inducir repelencia al **PVC**. Sin embargo, esas concentraciones sí serían efectivas para disuadir al **PRT** de alimentarse en algunas **LRD**.

Cuando fueron probadas las líneas progenitoras, Dom y Rec, resultaron significativamente menos preferidos que Ang y W766. Sin embargo, al evaluar las **LRD** descendientes de aquellos padres, no se observaron diferencias en la preferencia del **PVC**. Estos resultados son una consecuencia de la libre selección de hospederos que se ofertan al evaluar antixenosis, al cambiar las plantas ofrecidas puede modificarse el nivel de atracción del insecto (Castro *et al.*, 2001). Al determinar la antixenosis en las líneas

descendientes de Rec y Dom, junto a sus progenitores se ha podido dilucidar que los padres no tienen un nivel diferencial contrastante de no preferencia para el **PVC**.

CONCLUSIONES

- Se identificó a las líneas **Rec** y **Dom** como resistentes a ambos áfidos, en comparación con los otros progenitores. Posiblemente los mismos sistemas génicos provocan la repelencia y/o atracción de ambas especies de áfidos. W766 se comportó como atractiva o preferida para ambas especies de áfidos. En tanto, Ang es no preferida por el **PVC**, pero es preferida por el **PRT**.

- Rec y Dom no mostraron diferencias en su nivel de antixenosis al **PVC**.
- El padre **Rec** resultó antixenótico al **PRT** al ser expuesto junto a sus LRD.
- En un 25% de las **LRD**, se observó un significativo nivel de no preferencia al **PRT**.
- No se encontró asociación entre la antixenosis y los marcadores moleculares mapeados en esta población de **LRD**.
- El nivel de no preferencia detectado en una parte de las **LRD** puede ser empleado en materiales comerciales para mejorar la resistencia al **PRT**.

CAPÍTULO IV TOLERANCIA

INTRODUCCIÓN

Se dice que una planta es tolerante cuando sufre poco daño en relación a otras, con un mismo nivel de infestación de un insecto, sin alterar su comportamiento o su biología (Painter 1951). Una planta tolerante tiene capacidad de superar el ataque de un herbívoro, ya sea a través de la regeneración de los tejidos destruidos, emisión de nuevos macollos o de hojas, de manera que no haya disminución significativa de la calidad y cantidad de su producción. Los estudios de resistencia de plantas para encontrar fuentes de tolerancia requieren un buen conocimiento del modo de ataque del insecto y las reacciones fisiológicas que las plantas pueden poseer para evitar el daño causado (Lara 1991).

La tolerancia, en virtud de no actuar sobre la biología del insecto, reduce las posibilidades de aparición de razas fisiológicas del mismo (o biotipos), siendo por ello, un tipo de resistencia muy deseable. Por otro lado, está más sujeta a las variaciones ambientales que la no preferencia y antibiosis, lo que puede representar una desventaja de este tipo de resistencia (Lara 1991).

Para la selección de plantas tolerantes se utiliza la medición de parámetros de crecimiento tales como: el peso fresco y seco de las plantas, el área foliar, la longitud, el número de hojas expandidas, etc. Además, varios autores han utilizado la pérdida de clorofila provocada por la infestación de insectos. Para ello, se han adaptado diferentes métodos, por ejemplo un método directo y no destructivo es utilizando un medidor SPAD, o bien por espectofotometría empleando diferentes solventes.

Hay muchos factores que afectan las respuestas de la planta al daño provocado por los áfidos, entre ellos, el tiempo de infestación (estación o estado de crecimiento de la planta), la duración de la infestación, el estrés ambiental (especialmente sequía) y el estado nutricional del hospedante (Burd *et al.*, 1998). En el trigo, la principal respuesta de la planta al ataque de *D. noxia* implica un desbalance hídrico expresado como una pérdida de turgencia y reducción del crecimiento. Las plantas resistentes recuperan rápidamente las tasas de crecimiento cuando los áfidos son removidos de las mismas (Burd y Burton 1992).

La alimentación de los áfidos parece seguir un patrón tanto espacial como temporal (Weng *et al.*, 2002). En genotipos susceptibles de trigo, *S. graminum* se mueve preferencialmente hacia el tallo y hacia la primera hoja, a medida que la hoja se va deteriorando, el áfido avanzaba hacia las siguientes. Este proceso se repite hasta la muerte total de la planta. Es decir, el pulgón verde de los cereales ocasiona el daño más intenso

en las hojas viejas (las primeras en aparecer), con una pérdida intensa de clorofila, virando del color verde hacia el color marrón (Riedell y Blackmer 1999).

D. noxia produjo cambios similares, pero la mayor pérdida de clorofila y los síntomas típicos provocados por el daño de éste áfido, se observan en las hojas más nuevas (tercera y cuarta), con presencia de estriado blanco y enrollamiento de las hojas. La primera y la segunda hoja no presentan ningún daño (Riedell y Blackmer 1999).

Los síntomas de la alimentación de *D. noxia* sobre cultivares susceptibles de trigo incluyen bandas longitudinales blancas o amarillas (Burd y Elliott 1996), que en infestaciones severas producen una drástica reducción en el área foliar efectiva (Walters *et al.*, 1980).

El catabolismo de la clorofila se diferencia en dos tipos. Uno de ellos está asociado con la senescencia progresiva y natural de las plantas, mientras que el otro se debe a la clorosis provocada por la alimentación de herbívoros, deficiencias nutricionales o infecciones patógenas (Ni *et al.*, 2002).

En la degradación de la clorofila participan varias enzimas, entre ellas la clorofil oxidasa, clorofilasa y la Mg-dequelatasa (Janave, 1997; Matile *et al.*, 1999). Algunos ensayos *in vitro* mostraron un incremento considerable de la actividad de la enzima Mg-dequelatasa en extractos de plantas infestadas con *D. noxia* en comparación con plantas no infestadas o infestadas con *Rhopalosiphum padi*, demostrando la diferencia en la degradación de la clorofila por vía natural o por la alimentación de ciertos insecto (Ni *et al.*, 2001). En ensayos posteriores se observó una actividad menor de dicha enzima en los trigos susceptibles en comparación con los resistentes (Tao *et al.*, 2004) y mayor actividad de la clorofilasa en líneas de trigo infestadas con *R. padi* en relación a aquellas atacadas por *D. noxia*.

Todos los organismos fotosintéticos contienen uno o más pigmentos orgánicos capaces de absorber radiación visible que va a iniciar la reacción química de fotosíntesis (Blankenship 2002). El mayor grupo de pigmentos encontrados en plantas, bacterias y algas son las clorofilas (clorofila *a*, *b*, y *d*), bacterioclorofilas (*a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f* y *g*), carotenoides (beta caroteno, alfa caroteno y xantófilas, entre estas la luteína, violaxantina, anteraxantina, zeaxantina y neoxantina) y otras (Biswal 1995). Los pigmentos presentes en las plantas superiores son principalmente la clorofila *a*, *b* y la mayoría de los carotenoides (Blankenship 2002). Las clorofilas son capaces de absorber la radiación luminosa en la zona del azul y del rojo, por ello son de color verde, dando al reino vegetal

su color propio y característico. Los carotenoides absorben en la zona de la luz azul-verde, por ello los carotenoides de los cloroplastos son de color amarillo y anaranjado. Su función principal no es la absorción, sino la de proteger el aparato fotosensible mediante mecanismos de disipación y extinción de energía. Por ello, la reducción de la clorofila y/o de los carotenoides de las plantas provocada por la infestación de herbívoros, podría afectar negativamente la capacidad fotosintética de las plantas.

Muchos investigadores han estudiado los cambios fotosintéticos provocados por la alimentación de herbívoros en plantas de cereales resistentes y susceptibles y los efectos sobre la eficiencia fotosintética de las plantas (Miller *et al.*, 1994; Ni *et al.*, 2002; Macedo *et al.*, 2003). La eficiencia fotosintética puede ser alterada por la infestación causando la reducción en el contenido de clorofila (Riedell 1989; Gellner *et al.*, 1991), por reducción en el área foliar, provocada por el enrollamiento de hojas (Miller *et al.*, 1994) y por bloqueo en el transporte de electrones en el fotosistema II (Burd y Elliott. 1996).

Schizaphis graminum y *Diuraphis noxia* provocan pérdida de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a* y *b* y carotenoides) por efecto de su alimentación. Se sabe que el daño ocasionado por *D. noxia* sobre plántulas de trigo es un proceso activado por la luz. En plantas expuestas a luz continua, se observó un mayor enrollamiento de hojas, una reducción en la altura y en el peso fresco, un menor intercambio gaseoso y contenido de clorofila, junto a un mayor número de ninfas (Macedo, *et al.*, 2003). Además, las plantas de trigo resistente mantuvieron el incremento de su biomasa durante el período de infestación a diferencia de las plantas susceptibles. La calidad del alimento también afectó el incremento poblacional de *D. noxia*, siendo mayor en los pulgones recolectados en plantas que no poseen genes de resistencia (*Dn*) (Tao *et a.*, 2004).

El contenido de pigmentos fotosintéticos puede determinarse por espectrofotometría. De esta forma, se logra cuantificar los cambios originados por la alimentación de los áfidos en plantas infestadas y testigos. Además, el contenido de clorofila puede ser determinado por un método rápido, fácil y no destructivo utilizando un clorómetro SPAD (SPAD-502, Medidor de clorofila, Cámara Minolta, Osaka, Japón). La pérdida de clorofila medida con el SPAD fue usada por Deol *et al.*, (1997) y Flinn *et al.*, (2001) como una medida para estimar la tolerancia. Las plantas necesitan clorofila para producir biomasa, por eso, si la planta no sufre una pérdida excesiva de clorofila como resultado de la alimentación del áfido, podría ser tolerante (Lage *et al.*, 2003). La inyección de enzimas salivales causa intensa clorosis en plantas susceptibles (Dorschner

et al., 1987). Aunque la pérdida de peso seco es considerada la medición óptima para estimar la tolerancia bajo la presencia de *Schizaphis graminum*, la medición de la clorofila provee una estimación de la habilidad de la planta de sobrevivir al ataque de áfidos y continuar su normal crecimiento cuando la presión de estos disminuye, situación comúnmente observada en el campo.

HIPÓTESIS

- En cebada existe variabilidad para sostener el crecimiento, desarrollo y producción, cuando las plantas son sometidas a la infestación con *Schizaphis graminum* y *Diuraphis noxia*.
- Mediante selección asistida por marcadores moleculares se podrá asociar genes de tolerancia a esos marcadores diagnósticos para su ubicación cromosómica, aportando una herramienta tecnológica que permita su transferencia a materiales comerciales.

OBJETIVOS

- Probar líneas no emparentadas de cebada con *Schizaphis graminum* y *Diuraphis noxia*, identificando fuentes de resistencia y genotipos susceptibles.
- Evaluar la tolerancia a *Schizaphis graminum* y *Diuraphis noxia* en líneas recombinantes dihaploides provenientes del cruzamiento entre los padres seleccionados.
- Asociar los parámetros de la tolerancia a marcadores moleculares mapeados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los áfidos

Las poblaciones de áfidos utilizadas y el mantenimiento de las mismas, fue igual al descrito en Materiales y Métodos del Capítulo III.

El material vegetal

El material vegetal utilizado para la selección de los progenitores, así como también las líneas recombinantes dihaploides (LRD), fueron las mismas que se detallaron en Materiales y Métodos del Capítulo III.

Ensayo de Tolerancia a *Schizaphis graminum* y *Diuraphis noxia* en cuatro líneas de cebada no emparentadas

Las líneas probadas fueron las mismas líneas mencionadas en el Capítulo III (Dom, Rec, Ang y W766). Las semillas fueron pregerminadas en cajas de Petri y posteriormente transplantadas a macetas cilíndricas de un litro de capacidad, con 8 repeticiones por cada genotipo. La totalidad de las plantas de todos los genotipos, se distribuyeron formando tres tratamientos: uno de ellos con las plantas destinadas como testigo, sin infestación (T) y los dos restantes correspondieron a las plantas infestadas con **PVC** y **PRT**. El ensayo fue llevado a cabo en un invernáculo bajo condiciones no controladas. En el estado de 2^{da} hoja expandida se realizó la infestación de las plantas. La misma consistió en colocar 10 pulgones adultos ápteros en la base de cada una de las plantas para ambos tratamientos (**PVC** y **PRT**). Para ello, se utilizó un pincel de cerdas finas y se extremaron los cuidados para evitar el daño a los insectos. Las plantas controles permanecieron sin infestación, como testigos. Día por medio se reinfestaron o se retiraron insectos de las plantas que así lo necesitaron para mantener una población de áfidos equivalentes. A los 10 días desde la infestación, se realizó la cosecha final de las plantas y la medición. Los parámetros considerados fueron:

- El área foliar (AF) determinada con un medidor Área Meter LI-3100, expresada en centímetros cuadrados (cm²).
- El peso fresco (PF) y seco aéreo (PS), que se determinó con una balanza de precisión Mettler Toledo, expresados en miligramos (mg).
- El contenido de clorofila en la parte basal de la 2^{da} hoja (SPAD), utilizando un medidor automático SPAD-502 Minolta, (Milton Keynes). Los valores de SPAD son expresados en unidades SPAD.

Se utilizó un diseño de bloques al azar cuyo modelo es: $Y: G_i + T_j + R_k + E_n$

Donde G: genotipo; T: tratamiento; R: repeticiones; E: error

Los datos hallados fueron analizados estadísticamente con el programa PROC GLM procedente del paquete estadístico SAS (SAS Institute 1998) y los valores promedios de cada variable en cada genotipo y tratamiento se analizaron por el test de t para medias múltiples mediante las diferencias mínimas significativas (LSD).

Ensayo de Tolerancia a *Schizaphis graminum* y *Diuraphis noxia* en líneas recombinantes dihaploides de cebada

Se realizaron dos repeticiones del ensayo de tolerancia en dos años diferentes, para absorber el efecto del ambiente se realizó una repetición en el año 2005 (RI), iniciada en el mes de junio y la segunda repetición en el año 2006, iniciada en el mes de abril (RII).

Se evaluó una población de 83 líneas recombinantes dihaploides (**LRD**) y los progenitores seleccionados, Dom y Rec, que dieron origen a esta población. Algunos genotipos presentaron problemas en la germinación, y en consecuencia dichas LRD no pudieron ser evaluadas como parte de los experimentos. Los ensayos fueron realizados en bandejas plásticas de 70x50x8 cm con un sustrato de tierra tamizada. La totalidad de las plantas de todos los genotipos, se distribuyeron en cuatro tratamientos: uno de ellos con las plantas destinadas para la medición inicial; otro grupo como testigo con plantas sin infestación (T) y los dos restantes correspondieron a aquellas infestadas con **PVC** y **PRT**. Las bandejas fueron protegidas con un capuchón de tela fina (voile), para evitar la contaminación de insectos (Figura 23 y Figura 24). La infestación fue igual a la explicada anteriormente en éste mismo Capítulo.

Figura 23. Ensayo de tolerancia en bandejas



Figura 24. Ensayo de tolerancia cubierto con jaulas de boile



Los parámetros evaluados fueron medidos en dos momentos, uno previo a la infestación con áfidos (inicial) y el otro a los 10 días (final). Sin embargo, hubo leves modificaciones en los parámetros medidos y calculados entre ambas repeticiones, en función de los resultados encontrados.

En la **RI** los parámetros evaluados fueron:

- El área foliar inicial y final (AF_i y AF_f).
- El peso fresco aéreo inicial y final (PF_i y PF_f) y el peso seco aéreo inicial y final (PS_i y PS_f).
- El contenido de clorofila inicial y final en la parte apical ($SPAD_i^{apical}$ y $SPAD_f^{apical}$) y basal ($SPAD_i^{basal}$ y $SPAD_f^{basal}$) de la 2^{da} hoja.

Con los datos hallados se calcularon las variaciones en el crecimiento de las plantas, considerando las mediciones iniciales y finales de los testigos y ambos tratamientos para el área foliar, el peso fresco y seco, y el contenido de clorofila.

En la **RII** se midieron los mismos parámetros a excepción del peso fresco. Además, en el tratamiento con **PRT** se realizó la medición del contenido de clorofila en el ápice ($SPAD_{3h}^{apical}$) y en la base ($SPAD_{3h}^{basal}$) de la 3^{ra} hoja expandida. Debido a que en la **RI** pudo observarse que la 3^{ra} hoja era la elegida por el PRT para su alimentación, y en consecuencia la hoja más dañada visualmente, en la **RII** se incluyó una medición del contenido de clorofila en esta zona para cuantificar el principal daño producido por el PRT.

También se calcularon las variaciones del crecimiento en el área foliar, pesos y contenidos de clorofila, pero sólo fueron presentadas las tasas del área foliar ($VAF = AF_f -$

AF_i) y del peso seco (VPS= PS_f - PS_i), debido a que estos parámetros fueron los únicos que resultaron asociados a los marcadores moleculares.

Por otro lado, se incorporó la determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos por un método espectrofotométrico. Para ello se realizó un ensayo en bandejas con el mismo diseño que el ensayo de tolerancia previamente detallado. De las 83 LRD, sólo se probaron 75 debido a problemas en la germinación de 8 de ellas. Se hicieron 7 repeticiones de cada genotipo y de ambos progenitores. El contenido de clorofila se determinó en dos momentos: el primero previo a la infestación con los insectos y el otro a los 10 días desde la misma (finalización del ensayo). Las muestras consistieron en 2 cm² de tejido foliar, extraído en la zona media de la 2^{da} hoja de cada una de las plantas infestadas y testigos. Dichas muestras fueron inmersas en el solvente dimetil formamida y el contenido de pigmentos fotosintéticos fue determinado por espectrofotometría y calculado según el método de Wellburn (1994). La clorofila *a* (Cl_a) y la clorofila *b* (Cl_b) se evaluaron por su absorbancia en la longitud de onda de 663,8 nm y 646,8 nm. El contenido de carotenoides total se midió en una longitud de onda de 480 nm. Las ecuaciones para determinar las concentraciones de clorofila y carotenoides expresadas en µg ml⁻¹ fueron las siguientes:

$$Cl_a = 12 \times A_{663,8} - 3,11 \times A_{646,8}$$

$$Cl_b = 20,78 \times A_{646,8} - 4,88 \times A_{663,8}$$

$$\text{Carotenoides} = (1000 \times A_{480} - 1,12Cl_a - 34,07 Cl_b)/245$$

$$Cl_{(a+b)} = Cl_a + Cl_b (\text{clorofila total})$$

Los resultados fueron expresados en µg de clorofila por cm² de superficie foliar.

Los promedios de las variables analizadas fueron volcados en gráficos mediante distribuciones de frecuencias halladas en base a dividir el rango por un número arbitrario de 10 clases.

Análisis de Ligamiento

Con el propósito de establecer la asociación entre los parámetros de la tolerancia evaluados y los marcadores moleculares mapeados en los cromosomas de las LRD, se utilizaron los programas MapMaker y QGENE (Lander *et al.*, 1987; Nelson *et al.*, 1997). Se consideró como límite de significancia un LOD de 2,5. Asociaciones con LOD entre 2,5 y 3 fueron consideradas significativas, en tanto, un LOD superior a 3, fue altamente significativo. Un efecto aditivo positivo indica al padre Dom como el proveedor de los

alelos con valor positivo en el carácter en cuestión. En tanto, un valor negativo indica en forma similar al padre Rec (Kota 2008).

RESULTADOS

Ensayo de Tolerancia a *Schizaphis graminum* y *Diuraphis noxia* en cuatro líneas de cebada no emparentadas.

Los análisis estadísticos evidenciaron diferencias significativas en el área foliar, el peso fresco y seco y el contenido de clorofila, en estos genotipos, así como también entre los distintos tratamientos (**PVC**, **PRT** y Testigos). Sin embargo, no se encontró interacción significativa entre los genotipos y los tratamientos (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de la varianza del mecanismo de tolerancia al PVC y al PRT en líneas no emparentadas de cebada

Variables	AF				PF				PS				SPAD			
	G L	CM	F	Pr>F	G L	CM	F	Pr>F	G L	CM	F	Pr>F	G L	CM	F	Pr>F
Genotipo	3	82	12,2	0,0001	3	0,13	24,2	0,0001	3	0,002	41,6	0,0001	3	487,9	94,9	0,0001
Tratamiento	2	94,7	14,1	0,0002	2	0,05	9,1	0,0004	2	0,0008	12,8	0,0001	2	29,9	5,8	0,0048
Gen x Trat	5	7,1	1	0,4112	6	0,004	0,8	0,55	6	0,0001	1,9	0,091	6	10,3	2	0,069
Error	18	6,7			48	0,005			48	0			48	5,1		

PVC: *S. graminum*. PRT: *D. noxia*. AF: área foliar. PF: peso fresco. PS: peso seco. SPAD: contenido de clorofila.

En presencia del **PVC** ninguna línea mostró diferencias significativas entre las plantas infestadas y sus respectivos testigos, en todos los parámetros evaluados (Tabla 9).

Frente al ataque de **PRT**, las líneas Dom y Ang mostraron diferencias significativas en relación a sus testigos, en el área foliar, el peso fresco y peso seco. Estos resultados indican que Dom y Ang tienen un grado de susceptibilidad mayor que las líneas Rec y W766 (Tabla 9). Sin embargo, este comportamiento no pudo evidenciarse en el contenido de clorofila, donde ninguna línea presentó diferencias significativas en relación a sus testigos.

Las líneas W766 y Rec fueron similares a sus testigos en todos los parámetros medidos. Este comportamiento demostró el mayor grado de tolerancia de estas líneas en comparación con Dom y Ang.

Dom y Rec fueron seleccionados como progenitores de las líneas recombinantes dihaploides (LRD) dado su comportamiento contrastante frente a PVC y PRT.

Tabla 9. Análisis de medias en cuatro líneas de cebada.

Genotipos	AF			PF			PS			SPAD		
	T	PVC	PRT	T	PVC	PRT	T	PVC	PRT	T	PVC	PRT
W766	16,09b	14,00b	12,47b	0,519ab	0,437b	0,456ab	0,059b	0,047b	0,050a	41,12a	37,91a	36,99a
Ang	23,84a	22,33a	17,12a	0,662a	0,599a	0,513a	0,086a	0,073a	0,061a	38,81a	37,19a	38,05a
Dom	16,62b	15,52b	11,28b	0,497b	0,402b	0,357b	0,055b	0,045b	0,039b	31,99b	31,49b	30,27b
Rec	22,58a	22,88a	18,14a	0,633a	0,617a	0,517a	0,060b	0,059b	0,052a	31,2b	31,41b	31,25b
DMS	4,7134			0,1148			0,01474			4,2804		

T: testigo. PVC: *S. graminum*. PRT: *D. Noxia*. AF: área foliar. PF: peso fresco. PS: peso seco. SPAD: contenido de clorofila. Letras distintas indican diferencias significativas dentro de las columnas ($P > 0,05$). **Negrita** indica diferencias con sus testigos. DMS: diferencia mínima significativa.

Ensayo de tolerancia a *Schizaphis graminum* y *Diuraphis noxia* en líneas recombinantes dihaploides.

A. REPETICIÓN I

Visualmente pudieron observarse diferencias en la distribución espacial de los áfidos en la planta.

El **PVC** eligió la base del tallo para su alimentación y reproducción. Como consecuencia de ello, el daño comenzó a observarse en esta región con una coloración amarillenta marronada que continuó hasta la base de la primera hoja y desde la base se expandió hacia la parte media de la misma. La vaina de la 2^{da} hoja también comenzó a cambiar su coloración y de esta manera los síntomas del daño avanzaron en forma basípeta (desde la base hacia el ápice de la planta). Casi todas las plantas, independientemente de su genotipo, fueron perdiendo turgencia progresivamente, a medida que transcurrían los días de ataque. Las plantas se tornaron frágiles, sin poder mantener su porte erecto, con la inminente caída de las mismas. Las hojas perdieron el color verde intenso casi en su totalidad, predominando un color verde pálido o amarillo en las zonas más cloróticas.

El **PRT** se comportó de una manera diferente, seleccionó la base de la última hoja, aun no desplegada, para alimentarse y protegerse. Dicho comportamiento indicó una preferencia por la parte vegetal más tierna. Con el tiempo de infestación se fueron

trasladando, siempre con el mismo criterio de selección, hasta establecerse en la base de la 3^{er} hoja provocando, en muchos casos, el enrollamiento casi total. El daño típico de este áfido se observó con un marcado estriado blanco cuyas estrías, en muchos casos, se unieron formando manchas blancas uniformes desde la nervadura central hacia los bordes de las hojas.

A diferencia de las plantas con PVC, el tallo conservó su color normal sin mostrar ningún tipo de daño. Tampoco se observaron modificaciones en la turgencia de las plantas, las cuales estuvieron erguidas durante todo el período de infestación, en forma similar a sus testigos.

Los valores calculados de las variaciones en el crecimiento de las plantas (considerando las mediciones iniciales y finales de los testigos y ambos tratamientos para el área foliar, el peso fresco y seco, y el contenido de clorofila) no fueron presentados, por no mostrar diferencias significativas entre plantas infestadas y testigos.

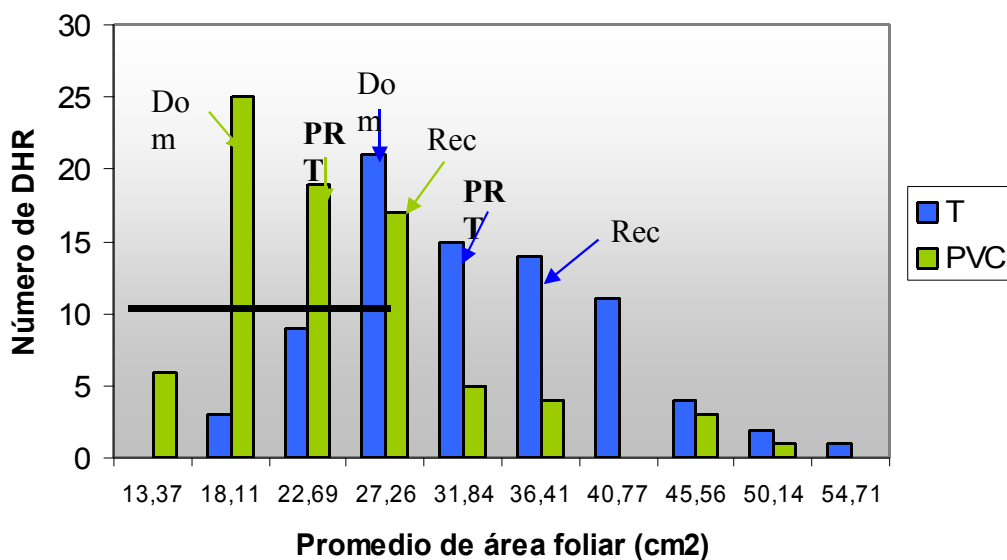
El análisis de la varianza reveló diferencias altamente significativas entre los genotipos, entre los tratamientos y en la interacción en el AF_f (Tabla 10).

Tabla 10 Análisis de la varianza del área foliar final (AF_f) de las LRD

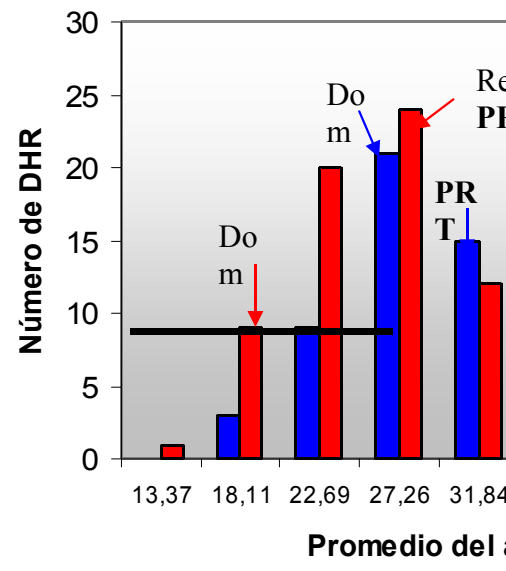
Variable	AF _f			
	GL	CM	F	Pr>F
Genotipo	81	379,68	11,32	0,0001
Tratamiento	2	4749,05	141,61	0,0001
Gen x Trat	238	407,81	12,16	0,0001
Error	416	33,53		

LRD: líneas recombinantes dihaploides.

Distribución de Frecuencias del Área Foliar con PVC



Distribución de Frecuencias del Área Foliar con T



fue intermedio entre los presentados por ambos progenitores bajo infestación, lo que indicaría un efecto aditivo (Tabla 11).

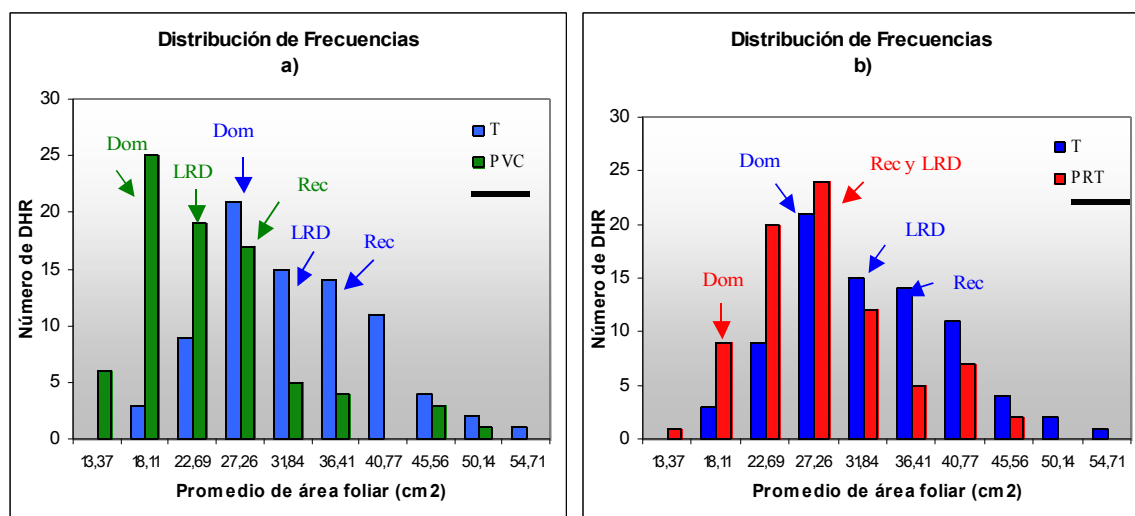
Dentro del grupo de **LRD** existió una amplia variabilidad en su AF_f . Treinta y cinco **LRD** fueron similares al padre susceptible Dom (Figura 25), y el resto de las LRD tuvieron un área foliar similar al de sus testigos, comportándose como el padre **Rec**, ante el daño del **PVC**. Con el tratamiento de **PRT**, más del 50% de las LRD no mostraron diferencias significativas con sus testigos, evidenciando un comportamiento similar al padre **Rec** (Figura 25).

Tabla 11. Análisis de medias del área foliar final (AF_f) de las LRD

Genotipo	AF_f		
	T	PVC	PRT
Dom	27,50a	18,37 b	17,21b
Rec	35,23a	27,26a	29,21a
LRD	32,72a	23,95ab	27,81a
Mínimo	18,29	11,25	12,69
Máximo	56,99	49,39	44,95
DMS	8,45		

T: testigo. PVC: *S. graminum* y PRT: *D. noxia*. LRD: Líneas recombinantes dihaploides. Letras distintas indican diferencias significativas dentro de las columnas. **Negrita** indica diferencias con sus testigos. DMS: diferencia mínima significativa.

Figura 25: Distribución de frecuencias de las LRD y los progenitores Dom y Rec para el área foliar final



Infestación con: a) PVC (*S. graminum*) y b) PRT (*D. noxia*). T: plantas testigo. LRD: Líneas recombinantes dihaploides. Las flechas representan las medias. La barra horizontal indica el desvío estándar.

Los análisis de la varianza para el peso fresco final (PF_f) indicaron diferencias altamente significativas entre los genotipos, entre los tratamientos y en la interacción entre ellos (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis de la varianza del peso fresco final (PF_f) de las LRD

Variable	PF _f			
	GL	CM	F	Pr>F
Genotipo	81	0,31	11,15	0,0001
Tratamiento	2	3,51	123,02	0,0001
Gen x Trat	238	0,075	2,62	0,0001
Error	397	0,028		

LRD: Líneas recombinantes dihaploides.

El PF_f del padre **Dom** en presencia del **PVC** no fue significativamente distinto que el de sus testigos, aunque el valor se encontró cercano al límite de la no significancia (Tabla 13). El padre **Rec** se comportó como tolerante al no observarse diferencias significativas entre las plantas infestadas y sus testigos. El promedio de las **LRD** tampoco presentó diferencias con sus testigos (Tabla 13).

Ante la infestación con **PRT**, el padre **Rec** mostró ser tolerante no presentando diferencias significativas en el PF_f en relación a sus testigos (Tabla 13). Contrariamente, **Dom** se comportó como susceptible evidenciando diferencias altamente significativas con sus testigos y con **Rec**. En tanto, la media de las **LRD** y más del 70 % de ellas, tuvieron un valor similar al padre tolerante **Rec**.

Tabla 13 Análisis de medias del peso fresco final (PF_f) de las LRD

Genotipo	PF _f		
	T	PVC	PRT
Dom	0,611a	0,409a	0,370b
Rec	0,783a	0,636a	0,723a
LRD	0,780a	0,544a	0,705a
Mínimo	0,403	0,254	0,370
Máximo	1,375	1,243	1,369
DMS	0,230		

T: testigo. PVC: *S. graminum*. PRT: *D. noxia*. LRD: Líneas recombinantes dihaploides. Letras distintas indican diferencias significativas dentro de la columna. **Negrita** indica diferencias significativas con los respectivos testigos. DMS: diferencia mínima significativa.

El **peso seco final (PS_f)** mostró diferencias significativas entre los genotipos y altamente significativas entre los tratamientos y en la interacción Gen x Trat (Tabla 14). Esto indicaría que la mayor fuente de variabilidad se debe a la infestación con los áfidos en cuestión.

Tabla 14. Análisis de la varianza del peso seco final (PS_f) de las LRD

Variable	PS _f			
	GL	CM	F	Pr>F
Genotipo	81	0,0014	12,45	0,0001
Tratamiento	2	0,0023	19,8	0,0001
Gen x Trat	238	0,0009	9,57	0,0001
Error	482	0,0001		

LRD: Líneas recombinantes dihaploides.

El padre **Dom** tuvo diferencias significativas en su PS_f en relación a sus respectivos testigos, en presencia de uno u otro áfido, lo que indicó un comportamiento susceptible del mismo. En tanto, Rec se mostró como tolerante al no diferenciarse de sus testigos sin infestación (Tabla 15). Lo expuesto anteriormente tiene coherencia con los resultados expresados en el área foliar. Es decir, el daño de los insectos altera la superficie de las hojas, y esto como consecuencia trae aparejado una disminución en el peso de la planta. Sin embargo, puede ocurrir que el peso fresco no refleje las consecuencias del daño provocado por los insectos, debido al contenido de humedad de las plantas, que alterarían los resultados, como se vio en el peso fresco del padre **Dom** atacado con **PVC** (Tabla 13).

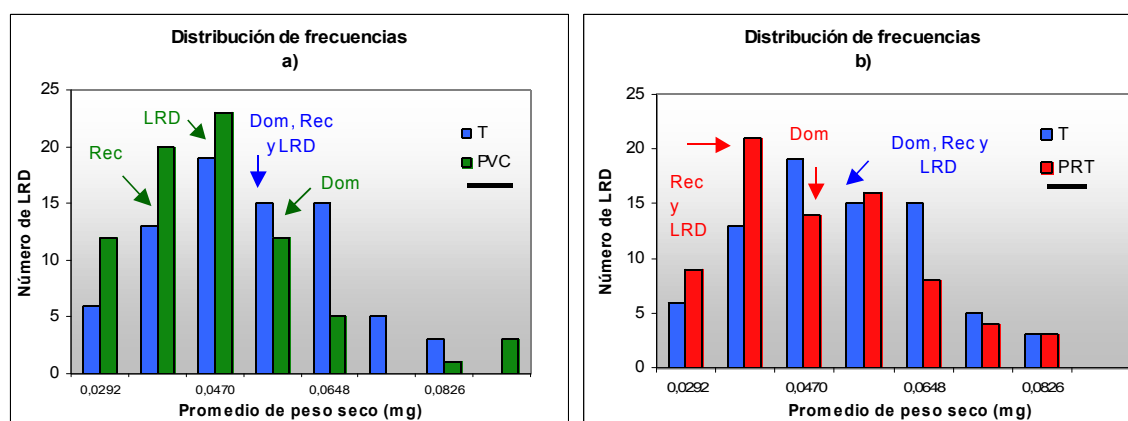
El promedio de las **LRD** tomó valores intermedios entre la media de ambos padres para el PS_f, sin diferenciarse estadísticamente de ellos ante la injuria de ambos áfidos. Bajo la infestación de **PVC** la mayoría de las **LRD** no se diferenciaron de sus testigos en su peso seco, en tanto, 12 líneas tuvieron un peso seco significativamente menor que sus testigos. La Figura 26a indica la variabilidad que ha existido entre las LRD. Frente al **PRT**, 2 **LRD** superaron el peso seco de sus respectivos testigos mostrando un comportamiento más tolerante, en tanto, otras 10 LRD tuvieron un peso seco inferior a sus testigos. El resto de las líneas tuvieron un peso seco similar a sus testigos sin diferenciarse estadísticamente de ellos. En la Figura 26b se puede observar la variabilidad entre las LRD.

Tabla 15. Análisis de medias del peso seco final (PS_f) de las LRD

Genotipo	PS _f		
	T	PVC	PRT
Dom	0,0524a	0,0377a	0,0348a
Rec	0,0587a	0,0525a	0,0497a
LRD	0,0518a	0,0458a	0,0488a
Mínimo	0,0240	0,0260	0,0250
Máximo	0,0860	0,0950	0,0910
DMS	0,0144		

T: testigo. PVC: *S. graminum*. PRT: *D. noxia*. LRD: Líneas recombinantes dihaploides. Letras distintas indican diferencias significativas dentro de la columna. **Negrita** indica diferencias significativas con los respectivos testigos. DMS: diferencia mínima significativa.

Figura 26. Distribución de frecuencias de las LRD y los progenitores Dom y Rec para el peso seco final



Infestación con: a) PVC (*S. graminum*) y b) PRT (*D. noxia*). T: plantas testigo. LRD: Líneas recombinantes dihaploides. Las flechas representan las medias. La barra horizontal indica el desvío estándar.

Los análisis estadísticos indicaron diferencias altamente significativas entre los genotipos, los tratamientos y en la interacción de ambos, en el contenido de clorofila en ambas regiones foliares evaluadas (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis de la varianza del contenido de clorofila en el ápice de la hoja (SPAD^{apical}) y en la base (SPAD^{basal}) en las LRD

Variables	SPAD ^{apical}				SPAD ^{basal}			
	GL	CM	F	Pr>F	GL	CM	F	Pr>F
Genotipo	82	87,28	4,73	0,0001	82	82,09	4,98	0,0001
Tratamiento	2	3201	173,72	0,0001	2	2288	138,89	0,0001
Gen x Trat	245	84,81	4,6	0,0001	245	68,65	4,16	0,0001
Error	614	18,42			784	16,47		

LRD: Líneas recombinantes dihaploides.

El contenido de clorofila final (SPAD_f) tuvo resultados similares en la parte apical y basal de las hojas (Tabla 17). El PRT provocó un leve deterioro en el contenido de

clorofila final en el padre **Dom**, comparativamente con sus testigos, pero no tuvo diferencias en presencia del **PVC** (Tabla 17). Por otro lado, **Rec** se comportó como tolerante ante la injuria de ambos áfidos. Las líneas recombinantes dihaploides tuvieron una amplia variabilidad en cuanto al contenido de clorofila. La media de las **LRD** en presencia de **PVC** presentó diferencias significativas con los testigos en la parte apical y basal (a pesar de que ambos padres no se diferenciaron estadísticamente de sus testigos). Esto se debe al bajo contenido de clorofila que se registró en algunas líneas. Puntualmente, una de ellas mostró valores de 3,5 y 2,33 en la parte apical y basal, respectivamente (valores mínimos de la Tabla 17).

Tabla 17. Análisis de medias del contenido de clorofila final apical y basal de las LRD

Genotipo	SPAD _f ^{apical}			SPAD _f ^{basal}		
	T	PVC	PRT	T	PVC	PRT
Dom	23,30a	22,46a	18,45a	21,77a	22,52a	17,28a
Rec	19,35a	21,30a	19,52ab	19,02a	17,78b	19,40ab
LRD	23,15a	17,92a	23,41b	20,71a	16,62b	21,44b
Mínimo	13,83	3,50	14,80	13,02	2,33	12,55
Máximo	32,33	25,74	30,86	28,23	26,00	28,15
DMS	4,56			4,06		

T: testigo. PVC: *S. graminum* y PRT: *D. noxia*. LRD: Líneas recombinantes dihaploides. Letras distintas indican diferencias significativas dentro de la columna. **Negrita** indica diferencias significativas con los respectivos testigos. DMS: diferencia mínima significativa

La mitad de las **LRD** perdieron una significativa cantidad de clorofila en ambas regiones en relación a sus testigos frente al **PVC**. No ocurrió lo mismo frente al **PRT** dado que la mayoría de las **LRD** no mostraron pérdidas significativas en relación a sus testigos, inclusive 2 líneas los superaron en la parte apical y otras 4 en la parte basal. Es decir, todas estas líneas se comportaron como el padre Rec.

A. REPETICIÓN II

Todas las plantas, testigos e infestadas, presentaron un mayor crecimiento que las plantas de la **RI**. Posiblemente, esto se debió al adelanto del ensayo al mes de abril con un consecuente aumento en la temperatura ambiental, que afectó el crecimiento de las plantas.

Las plantas infestadas con **PVC** mostraron un menor daño que en la **RI** y la distribución de los insectos también fue algo diferente al ensayo previo. El daño clorótico

se vio principalmente distribuido en el tallo y en la primera hoja, pero no se observó deterioro significativo en la segunda y tercera en la mayoría de las plantas evaluadas, durante los diez días que duró la infestación, como ocurrió en la **RI**. Sin embargo, en pocas líneas, el daño se extendió hacia la segunda y tercera hoja.

Las modificaciones incluidas en esta repetición serían la causa de la falta de diferencias significativas en el contenido de clorofila entre los testigos y aquellas plantas infestadas. La zona de medición fue la parte basal y apical de la segunda hoja y no de la primera, que resultó la más afectada por la presencia del áfido. Además, las plantas presentaron un buen porte durante la infestación, situación diferente a la del ensayo de 2005, dado que aquellas se caracterizaron por la pérdida de turgencia y dificultad para mantenerse erguidas en muchos de los genotipos. La falta de turgencia fue específica del daño del **PVC**, este es un hecho importante de señalar, que no se registró durante la infestación con **PRT**, a pesar del fuerte deterioro ocasionado por este insecto.

En el tratamiento con **PRT**, se ha observado un comportamiento de selección del insecto idéntico a lo descrito en la **RI**. Los pulgones colocados en la base del cuello de las plantas, buscaron rápidamente la parte vegetal más tierna para alimentarse y protegerse. A medida que la planta fue creciendo, fueron trasladándose hacia las hojas nuevas hasta establecerse en la base de la 3^{er} hoja, provocando el enrollamiento de la misma en muchos de los genotipos. El daño típico de este áfido pudo observarse con un fuerte y marcado estriado blanco, que en ciertos casos, se unieron formando manchas blancas uniformes, desde la nervadura central hacia los bordes de las hojas. Para cuantificar el principal daño producido por el **PRT**, se realizó la medición del contenido de clorofila en la 3^{er} hoja. A pesar del abundante estriado y el acartuchamiento de las hojas, las plantas mantuvieron un porte erguido y un gran crecimiento que se vio reflejado en el peso de las mismas.

Se evaluó el contenido de clorofila en la 2^{da} hoja mediante espectrofotometría. En ese momento el deterioro de la misma era muy escaso a nulo (debido al criterio de selección foliar seguido por los insectos, explicado anteriormente), por ende este contenido no reflejó el daño de los mismos.

El **área foliar final** (AF_f) tuvo diferencias estadísticas entre los genotipos, los tratamientos y en la interacción genotipo x tratamiento. Sin embargo, en la **variación de área foliar** (VAF) no hubo diferencias significativas entre los genotipos pero sí entre los tratamientos y en la interacción entre ellos (Tabla 18).

Tabla 18. Análisis de la varianza del área foliar final (AF_f) y de la variación de área foliar (VAF) en las LRD

Variables	AF_f				VAF			
	GL	CM	F	Pr>F	GL	CM	F	Pr>F
Genotipo	79	465,41	1,83	0,0001	79	281,17	1,48	0,0131
Tratamiento	2	5050,18	19,86	0,0001	2	5098,7	26,89	0,0001
Gen x Trat	233	254,24	3,91	0,0001	233	189,55	2,29	0,0001
Error	361	64,96			361	82,65		

LRD: Líneas recombinantes dihaploides. $VAF = AF_f - AF_i$

Bajo la infestación de **pulgón verde de los cereales** ninguno de los padres se diferenció estadísticamente de sus testigos, ni entre ellos (Tabla 19), si bien los valores observados resultaron muy distintos. La razón que explica esta falta de significancia se debe al alto valor de la diferencia mínima significativa (DMS). La elevada DMS es consecuencia de los valores extremos registrados en algunos genotipos. A su vez, esto podría explicar la diferencia que existió en el AF_f de Dom en relación a su testigo entre la **RI** y la **RII**, mostrando en el primer ensayo diferencias significativas pero no en el segundo.

La media de las **LRD** y la mayoría de ellas, tampoco se diferenciaron de los progenitores. Sólo 6 líneas los superaron en su AF_f (Figura 27a). Sin embargo, dentro de las **LRD** hubo una amplia variabilidad en el desarrollo de su área foliar ante el daño del **PVC**. Treinta y tres de ellas vieron reducida intensamente su AF_f por la presencia del pulgón verde en relación a sus testigos (Figura 27a), pero la mayoría no mostró diferencias significativas. Similares resultados se observaron en la **VAF**. El amplio rango observado entre los valores mínimos y máximos, también es un indicador fehaciente de cómo afectó el PVC el crecimiento de las plantas (Tabla 19).

Bajo la infestación del **PRT**, el progenitor **Dom** tuvo diferencias significativas en el AF_f y en la **VAF**, en relación a sus testigos y a **Rec** (Tabla 19). La notable reducción en estos parámetros, evidencia un comportamiento susceptible de **Dom** al daño ocasionado por el **PRT**. La media de las **LRD** fue similar a la del padre tolerante (**Rec**), es decir, muchas líneas no presentaron cambios acentuados en su AF_f en relación a sus testigos. Por otro lado, aproximadamente 35 **LRD**, fueron significativamente afectadas en su AF_f , en relación a sus testigos, con valores próximos a los del padre susceptible (Dom) (Figura

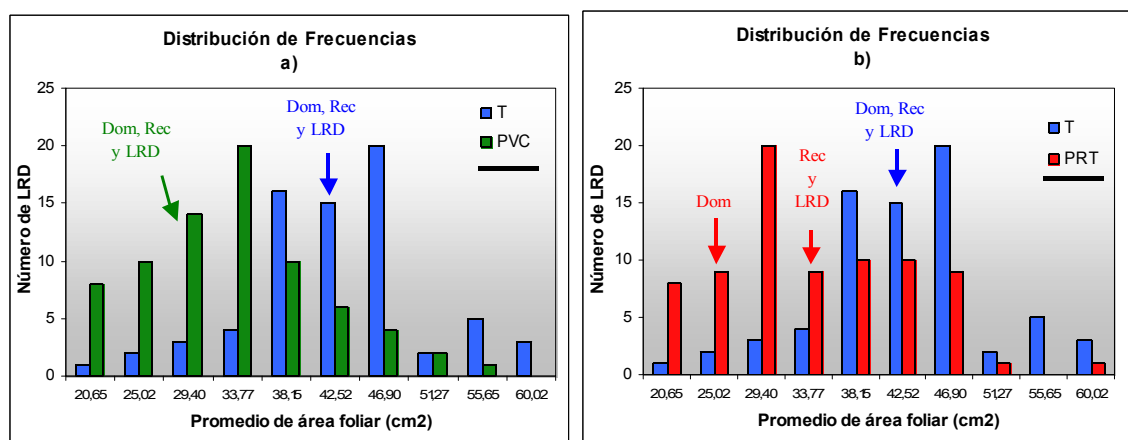
27b). El padre Rec demostró una mayor tolerancia al **PRT**, a pesar de evidenciar una importante pérdida de AF_f .

Tabla 19. Análisis de medias del área foliar final (AF_f) y la variación de área foliar (VAF) en las LRD

Genotipo	AF_f			VAF		
	T	PVC	PRT	T	PVC	PRT
Dom	40,43a	33,52a	25,84b	27,30a	20,40a	12,71b
Rec	43,93a	35,79a	35,27a	29,80a	21,67a	21,15a
LRD	41,74a	33,02a	33,82ab	25,99a	17,76a	18,69ab
Mínimo	21,12	18,46	18,15	-15,27	5,09	3,95
Máximo	62,2	54,64	58,39	46,04	35,14	42,23
DMS	9,21			8,17		

T: testigo. PVC: *S. graminum* y PRT: *D. noxia*.LRD: Líneas recombinantes dihaploides. VAF= $AF_f - AF_i$. Letras distintas indican diferencias significativas dentro de la columna. **Negrita** indica diferencias significativas con los respectivos testigos. DMS: diferencia mínima significativa

Figura 27. Distribución de frecuencias de las LRD y los progenitores Dom y Rec para el área foliar final (AF_f)



Infestación con: a) PVC (*S. graminum*) y b) PRT (*D. noxia*). T: plantas testigo. LRD: Líneas recombinantes dihaploides. Las flechas representan las medias. La barra horizontal indica el desvío estándar.

El análisis de la varianza indicó diferencias altamente significativas entre los genotipos y en la interacción en el **peso seco final** (PS_f), y diferencias no significativas entre los tratamientos. En la **VPS** hubo diferencias significativas para todas las fuentes de variación (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis de la varianza del peso seco final (PS_f) y de la variación de peso seco (VPS) en las LRD

Variables	PS _f				VPS			
	GL	CM	F	Pr>F	GL	CM	F	Pr>F
Genotipo	79	0,0018	2,36	0,0001	79	0,1	208,3	0,0001
Tratamiento	2	0,0011	1,44	0,2390	2	0,1	208,3	0,003
Gen x Trat	231	0,0008	4,22	0,0001	231	0,0005	2,4	0,0001
Error	95	0,0002			92	0,0002		

LRD: Líneas recombinantes dihaploides. VPS= PS_f-PS_i

Dom, **Rec** y las **LRD** fueron tolerantes al daño del **PVC** al no presentar diferencias significativas en su **PS_f** y en su **VPS**, en relación a sus testigos y entre ellos (Tabla 21). Sólo dos líneas tuvieron un **PS** significativamente mayor que sus testigos. Hubo 12 **LRD** que presentaron valores mínimos extremos de **PS_f**, y otras 10 valores máximos significativamente distintos de los progenitores y de la media de las **LRD** (Figura 28a).

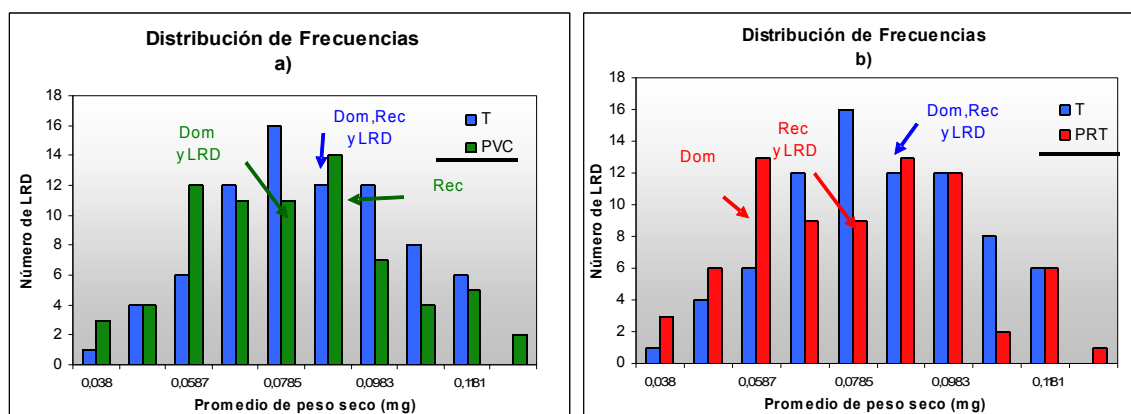
El daño provocado por el **PRT**, provocó una significativa disminución del **PS_f** y de su **VPS** en el padre **Dom** en relación a sus testigos sin infestación. Sin embargo, el progenitor **Rec** y el promedio de las **LRD**, no presentaron diferencias significativas con sus testigos ni entre ellos, en ninguno de los dos parámetros mencionados anteriormente (Tabla 21). Dentro de las **LRD**, casi todas, excepto dos, tuvieron un **PS_f** similar a sus testigos, sin poder identificar, distintos grados de tolerancia entre ellas (Figura 28b).

Tabla 21. Análisis de medias del peso seco final (PS_f) y la variación de peso seco (VPS) de las LRD

Genotipo	PS _f			VPS		
	T	PVC	PRT	T	PVC	PRT
Dom	0,0922a	0,0766a	0,0623a	0,0581a	0,0425a	0,0282a
Rec	0,0892a	0,0845a	0,0740a	0,0582a	0,0535a	0,0430a
LRD	0,0843a	0,0796a	0,0795a	0,0484a	0,0426a	0,0427a
Mínimo	0,0398	0,0400	0,034	0,008	-0,046	-0,0216
Máximo	0,118	0,1320	0,125	0,084	0,093	0,078
DMS	0,02			0,017		

T: testigo. PVC: *S. graminum* y PRT: *D. noxia*. LRD: Líneas recombinantes dihaploides. VPS= PS_f-PS_i. Letras distintas indican diferencias significativas dentro de la columna. **Negrita** indica diferencias significativas con los respectivos testigos. DMS: diferencia mínima significativa.

Figura 28. Distribución de frecuencias de las LRD y los progenitores Dom y Rec para el peso seco final (PS_f)



Infestación con: a) PVC (*S. graminum*) y b) PRT (*D. noxia*). T: plantas testigo. LRD: Líneas recombinantes dihaploides. Las flechas representan las medias. La barra horizontal indica el desvío estándar.

Se observaron diferencias significativas entre los genotipos, los tratamientos y la interacción entre ellos en el contenido de clorofila final en la parte apical y basal ($SPAD^{apical}$ y $SPAD^{basal}$) de la 2^{da} hoja (Tabla 22).

Tabla 22. Análisis de la varianza del contenido de clorofila final apical y basal ($SPAD^{apical}$ y $SPAD^{basal}$) en las LRD

Variables	$SPAD^{apical}$				$SPAD^{basal}$			
	GL	CM	F	Pr>F	GL	CM	F	Pr>F
Genotipo	79	49,76	2,31	0,0001	79	46,48	1,45	0,0001
Tratamiento	2	15,05	0,69	0,0001	2	376,4	11,75	0,0001
Gen x Trat	239	21,52	4,54	0,0001	238	32,03	3,37	0,0001
Error	352	4,73			349	9,49		

LRD: Líneas recombinantes dihaploides.

El contenido de clorofila **apical** no fue diferente en los progenitores y sus testigos bajo la infestación de los dos áfidos (Tabla 23). Sin embargo, entre las LRD hubo una amplia variabilidad (Figura 29a y Figura 29b). La mayoría de ellas no se diferenciaron estadísticamente de sus respectivos testigos sin infestación. Incluso, varias de ellas superaron a sus testigos en el contenido de clorofila apical, ante la presencia de ambos áfidos. Bajo infestación de **PVC** fueron 12 LRD las que superaron a sus testigos y en presencia de **PRT** fueron 6 líneas.

En la parte **basal** de la hoja ninguno de los padres se diferenció de sus testigos ante el daño del **PVC**. Lo mismo ocurrió en la mayoría de las **LRD**, a excepción de 26 LRD que superaron significativamente a sus testigos. Estas líneas podrían ser tolerantes,

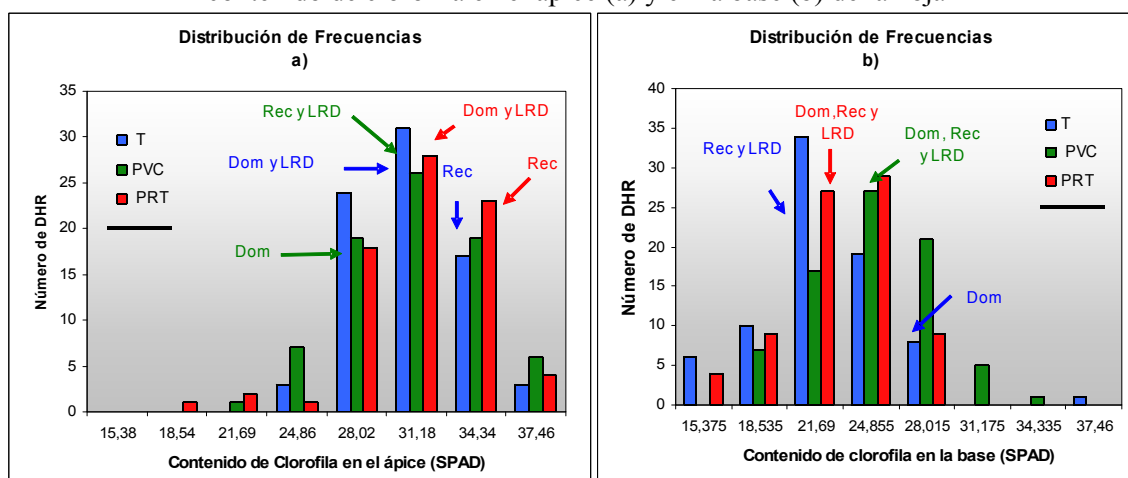
sin embargo los valores bajos de unidades SPAD detectados en los testigos, pueden deberse a un canopeo más desarrollado que provoca sombreado en la zona basal. Esto podría generar las diferencias a favor de las 26 LRD que superaron significativamente a sus testigos. El padre **Dom** bajo infestación con **PRT** tuvo una pérdida de clorofila **basal** significativamente mayor a la de sus testigos (Tabla 23). Por el contrario, el padre **Rec** y la media de las **LRD** no fueron afectadas por el ataque de este áfido (Figura 29b). La mayoría de las LRD no mostraron una pérdida significativa de clorofila en relación a sus testigos y otras 14 LRD los superaron.

Tabla 23. Análisis de medias del contenido de clorofila final (SPAD_f) en el ápice y en la base de la hoja de las LRD.

Genotipo	SPAD _f ^{apical}			SPAD _f ^{basal}		
	T	PVC	PRT	T	PVC	PRT
Dom	31,88a	29,43a	30,83a	26,73b	25,30a	20,87a
Rec	34,88a	32,63a	33,99a	23,25a	26,08a	21,65a
LRD	30,83a	30,95a	31,36a	22,47a	24,83a	22,88a
Mínimo	25,06	21,93	17,20	15,93	17,77	13,80
Máximo	36,83	39,00	37,70	36,53	34,53	29,50
DMS	3,19			3,43		

T: testigo. PVC: *S. graminum*. PRT: *D. noxia*. LRD: Líneas recombinantes dihaploides. Letras distintas indican diferencias significativas dentro de la columna. **Negrita** indica diferencias significativas con los respectivos testigos. DMS: diferencia mínima significativa.

Figura 29. Distribución de frecuencias de las LRD y los progenitores Dom y Rec para el contenido de clorofila en el ápice (a) y en la base (b) de la hoja



Infestación con: a) PVC (*S. graminum*) y b) PRT (*D. noxia*). T: plantas testigo. LRD: Líneas recombinantes dihaploides. Las flechas representan las medias. La barra horizontal indica el desvío estándar.

No hubo diferencias significativas entre los genotipos en el contenido de clorofila de la 3^{er} hoja, sin embargo, sí existieron diferencias entre los tratamientos y en la interacción (Tabla 24).

Tabla 24. Análisis de la varianza del contenido de clorofila final apical y basal en la 3^o hoja ($SPAD_{3h}^{apical}$ y $SPAD_{3h}^{basal}$) en las LRD

Variables	$SPAD_{3h}^{apical}$				$SPAD_{3h}^{basal}$			
	GL	CM	F	Pr>F	GL	CM	F	Pr>F
Genotipo	79	61,49	1,31	0,0628	79	68,91	0,58	0,9960
Tratamiento	1	1591,43	34,14	0,0001	1	7443,83	63,49	0,0001
Gen x Trat	239	46,61	3,07	0,0001	158	117,23	9,05	0,0001
Error	388	15,15			222	12,95		

LRD: Líneas recombinantes dihaploides.

En ambos padres, el **contenido de clorofila**, tanto apical como basal, en la 3^{er} **hoja** de las plantas infestadas con **PRT**, fueron significativamente inferiores a las de sus testigos (Tabla 25). Además, la pérdida de clorofila fue mucho mayor en la región **basal** que en la **apical** para ambos progenitores, debido a que esa es la zona de alimentación elegida por el **PRT**. La media de las **LRD** en el $SPAD_{3h}^{basal}$ fue similar a la de los progenitores y se diferenció de sus respectivos testigos (Tabla 25). En las plantas infestadas de ambos padres, el $SPAD_{3h}^{basal}$ fue un 50% menor al de sus testigos, con valores inferiores en Dom. (Tabla 25). En las LRD ocurrió algo similar a lo

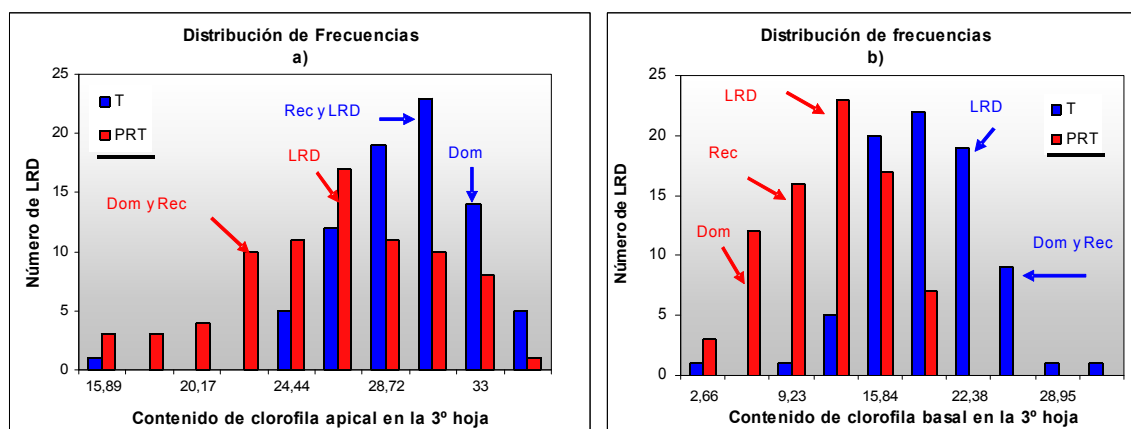
anteriormente mencionado. En el ápice de la hoja, muchas **LRD** perdieron más clorofila que sus testigos, pero más notoria fue la pérdida de clorofila en la base de la hoja. En dicha región 53 LRD, tuvieron una pérdida significativamente menor a la de sus testigos. Esto indica que el **PRT** ejerce su mayor daño en la 3^{er} hoja. Los valores mínimos de la Tabla 25 dan prueba de ello. Tal como se indica, en la Figura 30b se observa una acumulación de la mayoría de las líneas con valores de contenido de clorofila más bajos (izquierda de la curva) en comparación a los testigos.

Tabla 25. Análisis de medias de las LRD para: el contenido de clorofila en la 3^o hoja (SPAD_{3h})

Genotipo	SPAD _{3h} ^{apical}		SPAD _{3h} ^{basal}	
	T	PRT	T	PRT
Dom	31,88a	22,53a	25,44a	6,80a
Rec	30,48a	22,68a	24,23a	10,15a
LRD	29,90a	26,29a	19,58a	11,76a
Mínimo	23,77	14,83	10,70	1,033
Máximo	36,20	35,57	33,90	20,57
DMS	4,18		5,85	

T: testigo. PRT: *D. noxia*. LRD: Líneas recombinantes dihaploides. Letras distintas indican diferencias significativas dentro de la columna. **Negrita** indica diferencias significativas con los respectivos testigos. DMS: diferencia mínima significativa

Figura 30. Distribución de frecuencias de las LRD y los progenitores Dom y Rec para el contenido de clorofila apical (a) y basal (b) de la 3^{er} hoja



Infestación con: PRT: *D. noxia*. T: plantas testigo T. LRD: Líneas recombinantes dihaploides. Las flechas representan las medias. La barra horizontal indica el desvío estándar

El análisis del contenido de clorofila determinado por espectrofotometría (CI) indicó que existieron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipo, entre los tratamientos y en la interacción de ellos en la clorofila *a* y total (*total*). Sin embargo, no existieron diferencias en la interacción de los genotipos con los tratamientos para la clorofila *b* (Tabla 26). En el contenido de carotenoides sólo hubo diferencias significativas en la interacción (Tabla 26), por ello, este análisis no va a ser tenido en cuenta en el resto de la Tesis.

Tabla 26: Análisis de la varianza de las LRD para el contenido de clorofila determinado por espectrofotometría

Fuente	Clorofila <i>a</i>		Clorofila <i>b</i>		Clorofila total		Carotenoides	
	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	35,50	1,40**	16,24	1,65**	112,08	1,10**	45765,06	0,99 n/s
Tratamiento	1201,4	47,44***	85,29	8,70**	1882,13	11,64***	47481,66	1,03 n/s
Gen*Trat	25,32	4,63***	9,80	0,55n/s	101,54	8,28***	0,65	52,47***
Error	5,46		16,26		12,25		46208,36	

LRD: Líneas recombinantes dihaploides. ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$, n/s: no significativo

El contenido de **clorofila a** fue significativamente menor en el progenitor Rec infestado con **PVC**, en relación a sus testigos y al padre **Dom** (Tabla 27). La media de las líneas recombinantes tuvo un valor similar al padre Rec. Aproximadamente 43 LRD tuvieron un contenido de clorofila igual al de sus testigos sin diferenciarse estadísticamente de ellos. Sólo dos **LRD** superaron a sus testigos en el contenido de clorofila *a*. En presencia de **PRT** no hubo diferencias significativas en el contenido de

clorofila *a* en los padres y sus testigos, así como en más del 50% de las LRD. Sólo cuatro líneas tuvieron un contenido de clorofila *a* mayor a sus respectivos testigos.

No hubo diferencias significativas en el contenido de **clorofila *b*** entre los padres y sus respectivos testigos y en la mayoría de las líneas recombinantes, bajo la infestación de ambos áfidos (Tabla 27). Solamente una línea superó a sus testigos en el contenido de clorofila *b* frente al ataque de pulgón verde de los cereales y otras ocho líneas difirieron frente al ataque de pulgón ruso de los cereales.

El contenido de clorofila total, **Cl(*total*)**, no presentó diferencias significativas entre las plantas testigos de ambos padres y aquellas infestadas (Tabla 27). Frente al ataque del **pulgón verde de los cereales** la **Cl(*total*)** fue significativamente distinta entre ambos progenitores, pero no entre estos y sus respectivos testigos, **Rec** tuvo mayor pérdida de clorofila en comparación a **Dom** (Tabla 27). La media de las LRD fue similar al padre Rec. Probablemente, esto se debió a la pérdida de clorofila *a*, sufrida por **Rec** y las LRD. Ante el ataque de **PRT**, casi todas las **LRD** fueron iguales a sus testigos y en 5 de ellas se observó una mayor expresión.

Tabla 27. Análisis de medias de las LRD para el contenido de clorofila final *a*, *b* y *total* (Cl*a*, Cl*b* y Cl(*total*)).

Genotipo	Cl <i>a</i>			Cl <i>b</i>			Cl(<i>a+b</i>)		
	T	PVC	PRT	T	PVC	PRT	T	PVC	PRT
Dom	17,21a	19,23a	17,46a	5,30a	6,01a	5,44a	22,51a	25,24a	22,90a
Rec	17,51a	13,63b	16,24a	5,76a	4,39a	5,40a	23,27a	18,01b	21,64a
LRD	17,87a	14,05b	16,44a	5,84a	4,77a	6,38a	23,07a	18,5b	22,12a
Mínimo	5,84	1,33	7,35	2,94	0,69	3,53	8,74	7,1	7,35
Máximo	25,75	20	21,78	7,91a	8,54a	20,26	33,35	26,31	42,05
DMS	3,62			1,96			5,25		

T: testigo. PVC: *S. graminum*. PRT: *D. noxia*. LRD: Líneas recombinantes dihaploides. Letras distintas indican diferencias significativas dentro de la columna. **Negrita** indica diferencias significativas con los respectivos testigos. DMS: diferencia mínima significativa

Análisis de ligamiento

REPETICIÓN I

Hasta el momento fueron identificados 713 marcadores moleculares y 12 marcadores morfológicos en esta población recombinante de cebada. La distribución y localización de los mismos ha sido publicada por Costa *et al.*, (2001).

El análisis de ligamiento entre los marcadores moleculares y los parámetros de la tolerancia permitió identificar asociaciones significativas en varios de ellos. Se identificaron 7 **QTLs** para los cuatro caracteres que resultaron asociados en las plantas infestadas con **PVC** (Tabla 28). Estos **QTLs** se localizaron en cuatro cromosomas distintos (2H, 3H, 5H y 7H). En el caso de las plantas infestadas con **PRT** se detectaron 9 **QTLs** asociados a dos caracteres (Tabla 29). Estos **QTLs** se distribuyeron en 3 cromosomas (1H, 2H y 3H).

En las plantas infestadas con **PVC**, el **área foliar final** (AF_f) estuvo asociada en forma altamente significativa al marcador *ABC 302*, ubicado en el cromosoma 5H (a 157,7 cM). El **peso fresco final** (PF_f) estuvo asociado significativamente al marcador *Vrs1* ubicado en el cromosoma 2H (a 102,1 cM). Para ambos caracteres fue el padre Dom quien aportó los alelos significativos (Tabla 28).

El **peso seco inicial** (PS_i) y **final** (PS_f) en plantas infestadas con ambos áfidos, estuvieron asociados significativamente a tres marcadores mapeados en el cromosoma 2H (*Vrs1*, *BmAc0144f*, *BmAc0125*) (Tabla 28 y Tabla 29). Para estos parámetros también fue **Dom** el progenitor que aportó los alelos con efecto positivo. El PS_i asoció, además, con *BCD907* localizado en el cromosoma 3H, tanto en el tratamiento con **PVC** como con **PRT**. Para el PS_i , más del 60% de la variación total (R^2) fue explicada por los marcadores mencionados.

Se observó que el contenido de clorofila final en el ápice ($SPAD_f^{apical}$) y en la base ($SPAD_f^{basal}$) de las plantas infestadas con **PVC**, estuvo ligado significativamente a un mismo marcador (*Ris44*) ubicado en el cromosoma 7H (a 58 cM). Dado el valor negativo del efecto aditivo, para estos parámetros, fue el padre **Rec** el que aportó los alelos con efecto positivo (Tabla 28).

El contenido de clorofila final apical ($SPAD_f^{apical}$) en las plantas dañadas con **PRT** tuvo una asociación altamente significativa con cinco marcadores moleculares ubicados sobre el cromosoma 1H (*WMC1E8*, *MWG912*, *ABC261*, *Blp*, *MWG2028*) (Tabla 29). El

padre **Rec** aportó los alelos que contribuyeron a dicho carácter, dado el valor aditivo con signo negativo. Además, el **SPAD_f^{apical}** asoció con un marcador ubicado en el cromosoma 2H (*BmAc0144f*). Un poco más del 80% de la variación del contenido de clorofila, fue explicada por los marcadores mencionados (Tabla 29). El contenido de clorofila final en la base (**SPAD_f^{basal}**) estuvo asociado a tres de los seis marcadores mencionados anteriormente. Dos de ellos ubicados sobre el cromosoma 3H (*WMC1E8*, *MWG912*) y el restante sobre el 2H (*BmAc0144f*). Este último marcador explicó parte de la variación de los pesos secos inicial y final, siendo el padre **Dom** el que aportó los alelos de efectos positivos (Tabla 29).

Tabla 28. Parámetros asociados a los marcadores moleculares en las plantas infestadas con PVC (*S. graminum*)

PVC					
Parámetros	Marcador molecular	Cromosoma	Valor aditivo	LOD	Variación explicada (R ²)
AF _f	<i>ABC302</i>	5H	3,37	3,61	0,64
	<i>ABC253</i>	7H	-2,85	2,52	
PF _f	<i>Vrs1</i>	2H	0,07	2,73	
	<i>Vrs1</i>	2H	0 [#]	3,28	
PS _i	<i>BmAc0144</i>	2H	0	3,14	
	<i>f</i>				
	<i>BCD907</i>	3H	0	2,85	
PS _f	<i>BmAc0125</i>	2H	0	2,59	
	<i>Vrs1</i>	2H	0	3,27	
	<i>BmAc0144</i>	2H	0	3,12	
	<i>f</i>				
SPAD _f ^{apical, basal}	<i>Ris44</i>	7H	-2,9	4,68	

[#] Valor aditivo 0 indica 1×10^{-6}

Tabla 29. Parámetros asociados a los marcadores moleculares en las plantas infestadas con PRT (*D. noxia*)

Parámetros	PRT				Variación explicada (R ²)
	Marcador molecular	Cromosoma	Valor aditivo	LOD	
PS _i	<i>Vrs1</i>	2H	0 [#]	3,33	0,65
	<i>BmAc0144</i>	2H	0	3,21	
	<i>f</i>	2H	0	2,89	
	<i>BCD907</i>	3H	0	2,69	
PS _f	<i>BmAc0125</i>	2H	0	2,69	
	<i>BmAc0144</i>	2H	0	3,71	
	<i>f</i>	2H	0	3,13	
SPAD _f ^{apical}	<i>WMC1E8</i>	1H	-1,64	4,18	0,81
	<i>MWG912</i>	1H	-1,44	3,2	
	<i>ABC261</i>	1H	-1,36	2,8	
	<i>Blp</i>	1H	-1,34	2,67	
	<i>MWG2028</i>	1H	-1,34	2,64	
	<i>BmAc0144</i>	2H	1,5	2,57	
SPAD _f ^{basal}	<i>f</i>	2H	1,5	2,57	0,51
	<i>WMC1E8</i>	1H	-1,49	3,84	
	<i>MWG912</i>	1H	-1,32	2,98	
	<i>BmAc0144</i>	2H	1,29	2,71	

[#] Valor aditivo 0 indica 1×10^{-6}

REPETICIÓN II

El análisis genético mostró asociación significativa entre los marcadores moleculares diagnósticos y varios de los parámetros de la tolerancia, medidos en las plantas testigos e injuriadas. La mayoría de los QTLs estuvieron localizados sobre el cromosoma 2H.

En los **testigos**, el análisis de ligamiento detectó 22 **QTLs** asociados significativamente ($LOD > 2,5$) a los marcadores empleados. De estos, 18 QTLs estuvieron localizados en el cromosoma 2H. (Tabla 30). Un QTL se localizó en el cromosoma 3H, dos en el cromosoma 4H y el restante en 6H.

En el tratamiento con **PVC**, se detectaron 7 QTLs, de éstos, seis QTLs se ubicaron en el cromosoma 2H y el restante en el 6H (Tabla 31).

En las plantas infestadas con **PRT**, se detectaron 16 QTLs. Trece de estos QTLs se localizaron sobre el cromosoma 2H y los restantes en 1H, 6H y 7H (Tabla 32).

El análisis de QTLs mostró claramente que el padre Dom fue el que contribuyó con el mayor aporte de alelos de efecto positivo en los distintos parámetros medidos, para todos los tratamientos (T, PVC, PRT). En el caso del SPAD_{fapical} en las plantas testigo y SPAD_{fbasal} en el tratamiento con PRT, fue el padre Rec el que aportó los alelos con efecto positivo (Tabla 30, Tabla 31 y Tabla 32).

El **área foliar** inicial (AF_i) estuvo ligada a cuatro marcadores moleculares ubicados en el cromosoma 2H en todos los tratamientos. Gráficamente, se puede observar en las Figura 31 y Figura 32. La variación total explicada para este parámetro fue superior al 50% en los tres tratamientos (Tabla 30, Tabla 31 y Tabla 32).

El **área foliar** final (AF_f) en los testigos, estuvo significativamente asociada a dos de esos marcadores (*Vrs1* y *BmAc0144f*) ubicados en el cromosoma 2H. En forma similar, el primero de esos marcadores estuvo asociado al AF_f en las plantas atacadas con **PVC**. En el tratamiento con **PRT** el AF_f presentó ligamiento con los mismos marcadores localizados en el cromosoma 2H, existiendo una distancia extrema de 30 cM entre ellos. La mayor asociación se detectó a 102,1 cM (LOD 5,75) al marcador *Vrs1* (Figura 32). El total de la variación explicada para el AF_f en plantas infestadas con **PRT** fue superior al 80% (Tabla 32). Como puede observarse en la Tabla 32, otros dos marcadores asociaron con este carácter en el tratamiento con PRT.

Además de los caracteres mencionados, la variación de área foliar (**VAF**) en plantas injuriadas con **PRT**, resultó asociada con dos de los marcadores que explicaron el área foliar final en estas plantas. Todos los alelos con efecto positivo para AF_i, AF_f y VAF fueron provistos por el padre Dom.

El **peso seco**, inicial y final, (PS_i y PS_f) y la variación de peso seco (VPS), de las plantas **testigo**, estuvieron ligados a varios marcadores ubicados en el cromosoma 2H (Tabla 30) (Figura 33). Sin embargo, en las plantas infestadas con ambos pulgones, estos parámetros no presentaron asociación significativa con ningún marcador. La variación del peso seco (VPS), resultó explicada en forma altamente significativa por los marcadores *Vrs1*, *BmAc0144f* y *BmAc0125*, y en forma significativa por *KFP203* y *MWG844E*, observándose que los alelos que aportan a ambos caracteres provienen del padre Dom, dado el valor positivo de sus efectos aditivos (Tabla 30). Estos caracteres han sido explicados por una región cromosómica limitada a 20 cM, si sólo consideramos la

asociación con valores altamente significativos. El total de la variación explicada del PSi por estos marcadores fue del 100% y la del PSf fue del 86%.

El contenido inicial de **clorofila b** ($Cl_i b$) tuvo asociación altamente significativa con un marcador molecular (*cnx1*) asentado en el cromosoma 2H, en las plantas testigos e infestadas (Tabla 30, Tabla 31 y Tabla 32). El resto de los parámetros evaluados por espectrofotometría, no presentaron asociación con los marcadores.

Por último, el **contenido de clorofila** medido con el SPAD en las distintas regiones foliares, presentó asociación con los marcadores de varios cromosomas. El contenido de clorofila final apical ($SPAD_f^{apical}$) en las plantas **testigo**, estuvo asociado a un marcador localizado en el cromosoma 3 y fue Rec, en este caso, el progenitor que aportó los alelos con efecto positivo para dicho carácter (Tabla 30). El contenido de clorofila inicial basal ($SPAD_i^{basal}$), estuvo asociado a un marcador del cromosoma 6H en todos los tratamientos (Tabla 30, Tabla 31 y Tabla 32). Sin embargo, el contenido de clorofila basal final ($SPAD_f^{basal}$) en las plantas infestadas con **PRT**, presentó asociación significativa con dos marcadores localizados en los cromosomas 2H (*Vrs1*) y 7H (*Ris44*). En dicho parámetros ambos padres proveyeron alelos con efecto positivo en el carácter (Tabla 32).

El contenido de clorofila en el ápice de la tercera hoja ($SPAD_{3h}^{apical}$) estuvo asociado al cromosoma 2H tanto en los **testigos** como en las plantas infestadas con **PRT** (Tabla 30 y Tabla 32). Fue el padre **Dom** quien aportó los alelos positivos para este carácter. El contenido de clorofila basal ($SPAD_{3h}^{basal}$) de las plantas testigo estuvo ligado a dos marcadores ubicados en el cromosoma 4H. Por otro lado, este parámetro en las plantas atacadas asoció a un marcador localizado en el cromosoma 1H (*MWG 837A*). Dom fue el padre que aportó los alelos de efecto positivo para este carácter (Tabla 32).

Tabla 30 Parámetros asociados a los marcadores moleculares en el tratamiento Testigo

Parámetros	T				Variación explicada (R ²)
	Marcador molecular	Cromosoma	Efecto aditivo	LOD	
AF _i	<i>BmAc0144f</i>	2H	1,77	4,26	0,72
	<i>Vrs1</i>	2H	1,54	3,12	
	<i>BmAc0125</i>	2H	1,51	2,97	
	<i>BmAg0113e</i>	2H	1,43	2,74	
AF _r	<i>Vrs1</i>	2H	3,53	3,09	
	<i>BmAc0144f</i>	2H	3,49	2,98	
PSi	<i>Vrs1</i>	2H	0,001	5,05	1
	<i>BmAc0144f</i>	2H	0,001	4,96	
	<i>BmAc0125</i>	2H	0,001	4,47	
	<i>KFP203</i>	2H	0,001	2,69	
	<i>MWG844E</i>	2H	0,001	2,69	
PS _r	<i>Vrs1</i>	2H	0,001	5,92	0,86
	<i>BmAc0125</i>	2H	0 [#]	3,93	
	<i>ABG356</i>	2H	0	3,18	
	<i>BmAc0144f</i>	2H	0	2,97	
VPS	<i>Vrs1</i>	2H	0	2,69	
SPAD _i ^{apical}	<i>HVM60</i>	3H	-1,1	2,82	
SPAD _i ^{basal}	<i>ABG458</i>	6H	1,33	3,21	
SPAD _{3h} ^{apical}	<i>BmAc0144f</i>	2H	1,32	3,07	
SPAD _{3h} ^{basal}	<i>BmAc0186</i>	4H	1,7	3,12	
	<i>BmAc0303B</i>	4H	1,59	2,98	
CL _i <i>b</i>	<i>cnx1</i>	2H	0,64	3,4	

Valor aditivo 0 indica 1x 10⁻⁶

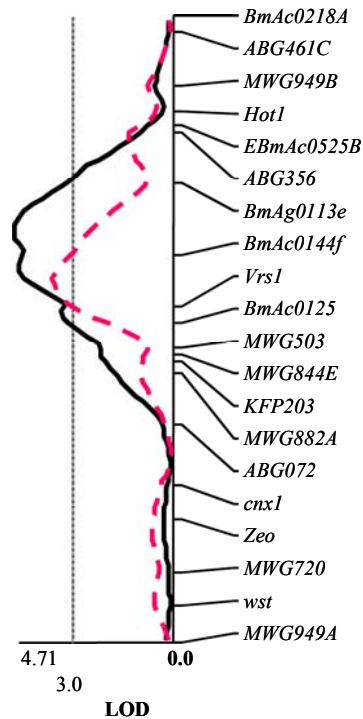
Tabla 31. Parámetros asociados a los marcadores moleculares en el tratamiento con PVC (*S. graminum*)

Parámetros	PVC				
	Marcador molecular	Cromosoma	Efecto aditivo	LOD	Variación explicada (R ²)
AF _i	<i>BmAc0144f</i>	2H	1,8	4,26	0,58
	<i>Vrs1</i>	2H	1,55	3,07	
	<i>BmAc0125</i>	2H	1,52	2,91	
	<i>BmAg0113e</i>	2H	1,4	2,51	
AF _r	<i>Vrs1</i>	2H	3,26	3,02	
SPAD _i ^{basal}	<i>ABG458</i>	6H	1,33	3,21	
Cl _i <i>b</i>	<i>cnx1</i>	2H	0,64	3,4	

Tabla 32. Parámetros asociados a los marcadores moleculares en el tratamiento con PRT (*D. noxia*)

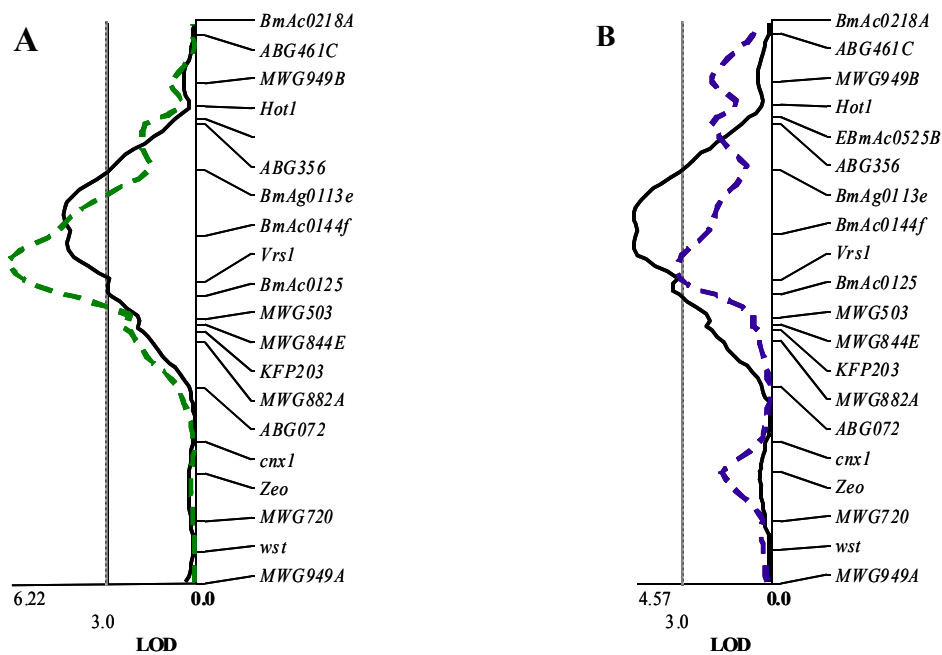
Parámetros	PRT				
	Marcador molecular	Cromosoma	Efecto aditivo	LOD	Variación explicada (R ²)
AF _i	<i>BmAc0144f</i>	2H	1,71	3,98	0,52
	<i>Vrs1</i>	2H	1,47	2,84	
	<i>BmAc0125</i>	2H	1,45	2,7	
	<i>BmAg0113e</i>	2H	1,37	2,51	
AF _r	<i>Vrs1</i>	2H	4,92	5,75	0,88
	<i>BmAc0125</i>	2H	4,33	4,13	
	<i>BmAc0144f</i>	2H	4,17	4,07	
	<i>MWG8441</i>	2H	3,56	2,52	
VAF	<i>Vrs1</i>	2H	3,44	4,08	
	<i>BmAc0125</i>	2H	2,88	2,67	
SPAD _i ^{basal}	<i>ABG458</i>	6H	1,33	3,21	
SPAD _f ^{basal}	<i>Vrs1</i>	2H	1,19	2,75	
	<i>Ris44</i>	7H	-1,19	2,59	
SPAD _{3h} ^{apical}	<i>BmAc0144f</i>	2H	2,16	2,52	
SPAD _{3h} ^{basal}	<i>MWG837A</i>	1H	2,23	2,7	
Cl _i <i>b</i>	<i>cnx1</i>	2H	0,64	3,4	

Figura 31. Mapa de ligamiento del cromosoma 2H de las líneas recombinantes dihaploides testigo.



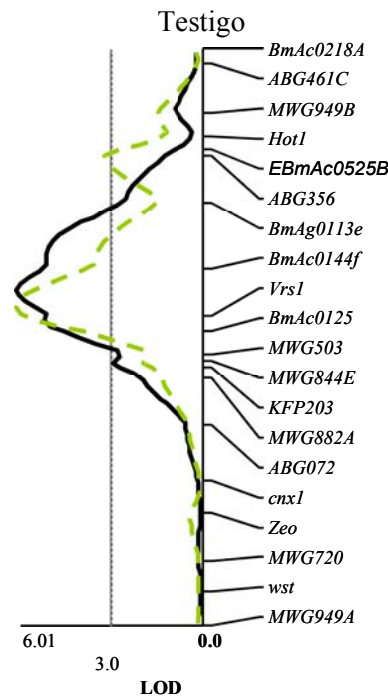
Área foliar inicial (Línea entera) y final (Línea punteada)

Figura 32. Mapa de ligamiento del cromosoma 2H de las líneas recombinantes dihaploides infestadas con A) PVC y B) PRT



Área foliar inicial (Línea entera) y final (Línea punteada), PVC: *S. graminum* y PRT: *D. noxia*

Figura 33. Mapa de ligamiento del cromosoma 2H de las líneas recombinantes dihaploides



Peso seco inicial (Línea entera) y final (Línea cortada)

DISCUSIÓN

Se sabe que en los cultivares de cebada susceptibles, la presencia del pulgón verde de los cereales produce una reducción en el crecimiento aéreo de las plantas (Castro y Rumi 1987). En el presente estudio se observó que existe un comportamiento diferencial del crecimiento aéreo de plantas susceptibles y tolerantes bajo infestación con pulgón verde de los cereales y pulgón ruso del trigo. Las plantas susceptibles disminuyeron su crecimiento en coincidencia con lo reportado por Castro *et al.*, (1990), quienes observaron que los daños sistémicos determinaron la falta total de crecimiento en esos tipos de cultivares. En cambio, los cultivares tolerantes no presentaron una disminución de las tasas de crecimiento, por el contrario aumentaron su ritmo de crecimiento y por ende su capacidad de soportar la presencia del insecto, en coincidencia con lo observado por otros autores (Castro 1994; Burton *et al.*, 1986). Si bien varias LRD no vieron modificada su área foliar ante el daño de ambos insectos, otras tuvieron una intensa reducción. Tal como lo había citado Walters *et al.*, (1980) en trigos susceptibles, en estas líneas de cebada también se vio afectada el área foliar ante el daño con el **PRT**.

Los resultados de los análisis biológicos de tolerancia fueron similares entre ambas repeticiones (RI y RII). Sin embargo, hubo ciertas variaciones debidas, probablemente, al cambio estacional en el que se llevó a cabo la RII, que condujo a un

leve acortamiento en el ciclo de las plantas. Como planteó Lara (1991), la tolerancia está más sujeta a las modificaciones ambientales que los otros dos tipos de resistencia (antixenosis y antibiosis), por ello al variar las condiciones de crecimiento de las plantas pueden haber cambiado la expresión de los parámetros estudiados. Por esta causa, algunas variables evaluadas en los dos años asociaron a unos marcadores moleculares en la RI y a otros diferentes en RII, por ejemplo, el peso seco inicial y final en ambos tratamientos asociaron con marcadores en la RI pero no en la RII.

Los progenitores **Dom** y **Rec**, resultaron contrastantes ante el daño del **PRT** en casi todos los parámetros evaluados. Sin embargo, el padre **Dom** frente al **PVC** no presentó un comportamiento estable en ambas repeticiones. Hecho que se contrapone con la expresión de las defensas de **Rec** frente a ambos áfidos, a pesar de los cambios ambientales, que incluyen diferentes composiciones en las poblaciones de los insectos. Como consecuencia de esta diferente estabilidad en la expresión de la tolerancia de ambos padres, las líneas recombinantes diahaploides segregaron mostrando comportamientos similares a uno u otro progenitor, y aún con expresión de tolerancia superior al padre más tolerante o inferior al padre más susceptible. Esta característica es común en muchas especies vegetales en la herencia de caracteres complejos (de base poligénica). Se reconoce como herencia transgresiva (que excede el rango de ambos padres) y puede basarse en la composición que reúne los mejores alelos de cada poligen para aportar al carácter en cuestión. Además, la expresión exacerbada del crecimiento frente al ataque de insectos, recibe el nombre de crecimiento compensatorio y es típico de los genotipos tolerantes (Castro *et al.*, 1988; Van Emden 2007).

Como se mencionó anteriormente, la eficiencia fotosintética puede ser alterada por la alimentación de los herbívoros causando, entre otros, la reducción en el área foliar, provocada por el enrollamiento de hojas (Miller *et al.*, 1994), y la disminución en el contenido de clorofila (Riedell 1989, Riedell y Blackmer 1999; Gellner *et al.*, 1991). Estos síntomas fueron observados en los ensayos realizados en esta Tesis. En ambas repeticiones se vio modificada el área foliar ante la infestación con uno u otro áfido, en el padre y en las líneas recombinantes dihaploides susceptibles. Actualmente, los planes de mejora de la resistencia a **PRT** utilizan como índice de selección la constancia en el área foliar fotosintetizante bajo infestación (Voothuluru *et al.*, 2006). En el trigo la principal respuesta de la planta al ataque del **PRT** involucra un desbalance hídrico expresado como una pérdida de turgencia y reducción del crecimiento (Burd y Burton 1992). En las

plantas de **cebada** estudiadas en esta Tesis no se observó tal pérdida de turgencia durante el período de infestación con **PRT**. Sin embargo, sí se vieron afectados varios parámetros de crecimiento como el peso fresco (RI) y seco (RI y RII). Probablemente esto se debió al breve período de infestación de las plantas (10 días). Un período de infestación más largo, podría evidenciar el mayor daño provocado por los áfidos.

En los experimentos realizados en esta Tesis se determinó el contenido de clorofila utilizando dos métodos, uno no destructivo y el otro destructivo. Con el primer método se pudo determinar la **susceptibilidad** del padre **Dom** y de varias LRD al **pulgón ruso del trigo**, en ambas regiones foliares de la 2^{da} hoja. Sin embargo, en la RII no se observaron éstos daños en la región apical de esa hoja. La preferencia por la base de la 2^{da} hoja para su alimentación, explicaría esa falta de daño en la región apical en Dom, posiblemente debido a la diferente composición genotípica de las poblaciones del **PRT** usadas en ambos años. En contraposición, el padre **Rec** mostró estabilidad en la expresión de la tolerancia en todos los casos. Estos resultados, no tuvieron relación con los datos obtenidos por el método destructivo. La evaluación espectrofotométrica del contenido de clorofila mostró pérdida de clorofila *a* en el padre Rec y en varias LRD sujetas al ataque de PVC. Simultáneamente, ninguno de los padres presentó variación en el contenido de clorofila *b* ni total.

La **pérdida de clorofila** en el ápice y en la base de la **3^{ra} hoja**, fue significativa para **ambos padres** y para la mayoría de las LRD. Estos resultados concuerdan con lo expuesto anteriormente en relación a la zona seleccionada por el **PRT** para su alimentación. Este áfido manifiesta una selección preferencial por las hojas más nuevas, y en consecuencia más tiernas, observándose en éstas los síntomas de daño más notorios, como un intenso estriado de color blanco y un enrollamiento de las hojas. Los resultados encontrados en esta Tesis se relacionan con lo expuesto por Riedell y Blackmer (1999) en trigo infestado con PRT.

El análisis de ligamiento indica que la tolerancia al pulgón verde de los cereales y al pulgón ruso del trigo, está dada por **múltiples genes** y no por un gen mayor, en esta población de cebada.

El análisis genético también tuvo ciertas diferencias entre las dos repeticiones. En la RI, el **área foliar** estuvo asociada a un marcador molecular ubicado en el cromosoma 5H frente al PVC, en tanto en la RII, este parámetro se asoció a varios marcadores del cromosoma 2H en todos los tratamientos (T, PVC y PRT). Por otro lado, el peso seco en

la RI se asoció con varios marcadores del cromosoma 2H en las plantas infestadas con ambos áfidos. En cambio en la RII este parámetro, si bien asoció a estos mismos marcadores y a otros del cromosoma 2H, sólo ocurrió en las plantas testigo.

El contenido de clorofila en unidades SPAD en las plantas atacadas con **PVC** asoció a un marcador localizado en el cromosoma 7H en la RI. Sin embargo, en la RII este parámetro se asoció al cromosoma 6H. En tanto en las plantas dañadas con **PRT**, la asociación ocurrió con los cromosomas 1H y 2H en la RI y con 1H, 2H, 6H y 7H en la RII. Esto está indicando la presencia de distintas regiones cromosómicas con posibilidad de respuestas ante condiciones ambientales diferentes, que como ya se explicó, incluye la variación en la composición de las poblaciones de ambos áfidos. Existen antecedentes de un gen de resistencia a PVC mapeado en la región centromérica del cromosoma 7H de cebada (Gardenhire *et al.*, 1973), que podría tratarse del mismo gen encontrado en los materiales utilizados en esta Tesis. Otros autores encontraron asociación de la resistencia al **PRT** (clorosis y enrollamiento de las hojas) con un marcador de la B-Hordeína, localizado en el brazo corto del cromosoma 1H (Nieto-Lopez y Blake 1994). En tanto, Mittal *et al.* (2008) encontraron asociación a este último marcador del cromosoma 1H, en otras líneas de cebada.

Por otro lado, el contenido de clorofila, el área foliar y el peso seco, estuvieron asociados a marcadores moleculares ubicados en una misma región sobre el cromosoma 2H. Inclusive, en el AF, estos marcadores explicaron el 88% de la variación en las plantas infestadas con **PRT**. Esto indicaría la presencia de un gen mayor, que podría coincidir con el QTL reportado previamente por Nieto-Lopez y Blake (1994). Estos autores indicaron la presencia de un QTL sobre el brazo corto del cromosoma 2H con el enrollamiento de las hojas provocado por el **PRT**. Por otro lado Mittal *et al.*, (2008) identificó un QTL con efecto menor cercano al QTL identificado por Nieto-Lopez y Blake (1994).

Otros autores encontraron asociaciones con marcadores localizados en el cromosoma 3H. Mittal *et al.*, (2008), identificaron un QTL asociado a la resistencia al **PRT** en el brazo largo de 3H. En tanto Cheung *et al.* (2010) encontraron un QTL asociado a la resistencia al pulgón de la avena (*Rhopalosiphum padi*, L.) localizado en el mismo cromosoma. Sin embargo, estos genes no serían los mismos ya que se encontrarían en regiones diferentes. No podríamos relacionar estos QTL con los encontrados en la presente Tesis.

En una misma planta puede haber distintos tipos de resistencia (Lara 1991). **Rec** se comportó como antixenótico ante el **PRT** y a su vez, fue tolerante. Frente al **PVC** los dos padres resultaron resistentes por **antixenosis** y por **tolerancia**. El padre **Dom**, que fue **preferido** por el **PRT**, es a su vez considerado como progenitor **susceptible** ante el mismo áfido. En este caso no se ha identificado ninguna categoría de resistencia en este padre.

Existen muchos beneficios relacionados con el uso de cultivares tolerantes a los insectos dentro de un manejo integrado de plagas (MIP). Como expresó Lage (2003), en la tolerancia no está implicada la respuesta de la planta frente a la alimentación del áfido. Además, evita el desarrollo de individuos más virulentos al no ejercer presión de selección. Todas estas características hacen que ésta sea una categoría de resistencia a tener en cuenta en los planes de mejora del cultivo de la cebada.

CONCLUSIONES

- Las líneas probadas para la selección de los progenitores, se comportaron como tolerantes frente al **PVC**.
- Ante la infestación del **PRT**, las líneas **Dom** y **Ang** fueron susceptibles. En tanto, **Rec** y **W766** tuvieron un comportamiento tolerante, similar al de sus testigos.
- Muchas **LRD**, en ambas repeticiones, no modificaron su turgencia ante el ataque del **PRT**, evidenciándose de esta forma, su mayor tolerancia a la presencia del áfido, a pesar de presentar abundante estriado blanco.
- En líneas generales, se observó una menor área foliar en todas las plantas de la **RI** que las de la **RII**, posiblemente esto se debió al adelanto en la fecha de realización de la **RII**.
- En la evaluación de la población de líneas recombinantes dihaploides provenientes del cruzamiento entre **Dom** y **Rec**, se encontró que el padre **Dom** fue susceptible al **PRT**, en tanto **Rec** se mostró tolerante al mismo áfido en dos años de ensayos. Dentro de las **LRD** hubo diferentes grados de tolerancia, muchas de ellas respondieron como uno u otro padre. Hubo otras que mostraron valores intermedios con un comportamiento aditivo. Algunas superaron al progenitor tolerante mostrando un crecimiento compensatorio, exhibiendo herencia transgresiva.

-
- Evaluada en unidades SPAD, tanto Rec como Dom mostraron pérdidas de clorofila en la tercera hoja, así como varias de las LRD.
 - Ante la infestación del **PVC Rec** fue tolerante. Sin embargo, Dom mostró distintas respuestas de tolerancia en ambas repeticiones. En RI tuvo un comportamiento susceptible en relación a sus testigos y en RII fue tolerante.
 - El método electrofotométrico para determinar el contenido de clorofila, no permitió discernir entre individuos con distintos grados de tolerancia.
 - Hubo varias diferencias en los resultados del análisis de ligamiento entre las dos repeticiones. Sin embargo, la mayoría de los parámetros medidos asociaron con marcadores ubicados en una misma región del cromosoma **2H**. Esto podría indicar la presencia de un gen mayor que hace a los parámetros relacionados con el crecimiento aéreo de la planta.
 - El ambiente podría ser el causante de la diferente asociación de los QTL entre ambas repeticiones.
 - Existen líneas recombinantes portadoras de un buen nivel de tolerancia a uno u otro áfido que podrían usarse como fuente de este tipo de resistencia en cebadas comerciales.

CAPÍTULO V ANTIBIOSIS

INTRODUCCIÓN

Se considera este tipo de resistencia cuando un insecto se alimenta normalmente de la planta y ella ejerce un efecto adverso sobre la biología del mismo (Painter, 1951). De esta forma, una planta resistente por antibiosis afecta directa o indirectamente el potencial de reproducción del insecto, la duración de su ciclo inmaduro, la mortalidad (o supervivencia) de las formas jóvenes, reducción en el tamaño y peso del individuo, reducción de fecundidad, alteración de proporciones sexuales, alteración en el tiempo de vida (Lara, 1991). La mortalidad de las formas jóvenes criadas sobre plantas resistentes, son observadas durante los primeros momentos de vida del insecto siendo uno de los parámetros más característicos de ocurrencia de antibiosis junto con la reducción de tamaño y peso de los individuos. Los individuos criados en plantas susceptibles tendrán un mejor desarrollo, presentando un peso mayor que aquellos criados en plantas resistentes.

Los efectos de un elevado grado de no preferencia para alimentación puede traducirse de la misma manera que los presentados para antibiosis, los individuos poco alimentados en consecuencia, pueden presentar alteraciones en su biología. De esta forma, para poder distinguir entre ambos mecanismos debe analizarse en forma separada la presencia o no de antixenosis.

El efecto adverso que la planta ejerce sobre la biología del insecto puede deberse a la presencia de sustancias tóxicas o inhibidoras del desarrollo, denominadas **antibióticas**, o a cualquier desbalance nutricional o a la ausencia de nutrientes esenciales (Lara 1991). Los ácidos hidroxámicos (Hx) presentes en los cereales, principalmente en el trigo, tienen características antibióticas ante los áfidos. Esto fue demostrado en varios ensayos en los cuales se encontró una correlación inversa entre los niveles de Hx, con tasas de incremento poblacional y tasas medias de crecimiento relativo de varias especies de áfidos, entre ellos el *S.graminum* y *D. noxia* (Argandoña *et al.*, 1980; 1981; Corcuera *et al.*, 1985). Los áfidos alimentados sobre trigos con altos niveles de Hx, demoraron más tiempo en alcanzar el floema (Ramírez *et al.*, 1999) y menos áfidos lograron alimentarse en forma sostenida en un tiempo dado (Givovich y Niemeyer 1995 y 1996)

Durante el desarrollo de las plantas se producen cambios biológicos y fisiológicos que pueden afectar la ecología, el crecimiento y la reproducción del áfido (Fisk 1978). El estado de crecimiento de la planta y la temperatura son ejemplos de estos cambios. Hawley *et al.*, 2003, demostró que la resistencia de las plantas, generalmente, se

incrementa con la edad, observando una menor antibiosis a *D. noxia* en plantas de trigo al estado de plántula que en los estadios posteriores.

Las tasas de crecimiento y desarrollo individual de los áfidos, son muy usadas debido a que sirven como indicadores del crecimiento poblacional futuro (Leather y Dixon, 1984; Acreman y Dixon, 1989) y además, para predecir el comportamiento de las poblaciones de áfidos en el campo. El crecimiento y desarrollo de los insectos son extremadamente altos, llegando rápidamente a niveles elevados de densidades poblacionales capaces de dañar los cultivos.

Los áfidos presentan desarrollo partenogenético con generaciones “telescópicas”, esto es, cada hembra tiene en su interior las dos generaciones siguientes. Se considera que bajo condiciones óptimas de crecimiento, los áfidos comienzan a reproducirse entre los 7 a 10 días posteriores al nacimiento (Dixon, 1998).

La tasa intrínseca de incremento poblacional r_m (Wyatt y White, 1977) relaciona la fecundidad de un individuo con el tiempo de desarrollo del mismo:

$$r_m = (\ln M_d \times 0,738)/d$$

donde d representa el tiempo requerido de una hembra recién nacida hasta que produce su primera descendencia.

M_d es el número de ninfas producidas por hembra en un tiempo igual a d .

La constante 0,738 es la pendiente media de regresión de M_d sobre d para cuatro especies de áfidos (Wyatt y White, 1977). Dicha constante es una aproximación de la fecundidad total producida por una hembra en un período d . Observando esta ecuación se puede destacar que pequeños cambios en el tiempo de desarrollo del insecto, van a provocar efectos mayores sobre la r_m , que un incremento en la fecundidad.

La r_m es una estimación del incremento poblacional en un ambiente ilimitado (Birch 1948) y fue usado en varios estudios de resistencia a *S. graminum* (Kerns *et al.*, 1989, Webster y Porter 2000, Flinn *et al.*, 2001). La r_m fue propuesta por Flinn *et al.*, (2001) como un método mejor para expresar el efecto antibiótico sobre la biología de *S. graminum*, en lugar de considerar sólo la fecundidad (Lage *et al.*, 2003).

Para determinar la antibiosis en el laboratorio y bajo condiciones controladas se usa, generalmente, un solo individuo. Las técnicas experimentales comunmente empleadas, utilizan pequeñas cajas clips que cubren unos pocos cm^2 de la hoja de la planta, en cuyo espacio interior queda confinado el áfido. Existen otras alternativas a éste método, como por ejemplo, la utilización de tubos plásticos que protegen a la planta

entera, abiertos en el extremo y cubiertos con una tela fina para permitir la aireación de la misma. Ambos métodos, presentan ventajas y desventajas que justifican la elección o el rechazo de ellos. Por otro lado, hay estudios que demuestran que estos dos métodos no reflejan el comportamiento real del insecto, en comparación con áfidos criados libremente sin cajas.

También hay ensayos que utilizan discos de hojas en lugar de utilizar la hoja entera. Existen antecedentes que demuestran que el crecimiento, la reproducción y el comportamiento alimenticio de los áfidos, mejora sobre hojas cortadas de plantas no aceptadas como hospedadores, que sobre hojas intactas (sin cortar) (MacKinnon 1961, van Emden y Bashford 1976, Schaefers y Montgomery 1973). Esto podría deberse a un incremento de los nutrientes, especialmente los aminoácidos, en las partes cortadas de las hojas (van Emden *et al.* 1969). También se sabe que en tejidos de hojas enfermas y senescentes (Beever 1976) hay altos niveles de carbohidratos solubles (Ferreter *et al.*, 1990) y aminoácidos, que mejoran el crecimiento de los áfidos (van Emden y Bashford 1976, Gildow 1980, Ferreter *et al.*, 1990).

HIPÓTESIS

- En las líneas recombinantes dihaploides provenientes del cruzamiento entre Dom y Rec existen genotipos con diferente nivel de antibiosis a *Schizaphis graminum* y a *Diuraphis noxia*. Estos genotipos modificarán el ciclo de crecimiento de los insectos, el ciclo reproductivo, la longevidad y fecundidad entre otros parámetros.
- Mediante selección asistida se podrá asociar genes de antibiosis con los marcadores diagnósticos, que permitirá su ubicación cromosómica.

OBJETIVOS

- Identificar en las líneas recombinantes dihaploides provenientes del cruzamiento entre Dom y Rec, genotipos con distintos niveles de antibiosis a *Schizaphis graminum* y *Diuraphis noxia*.
- Identificar y localizar genes ligados a los marcadores moleculares diagnósticos que confieren antibiosis a *Schizaphis graminum* y *Diuraphis noxia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los áfidos

Las poblaciones de áfidos utilizadas fueron las mismas que las descritas en Materiales y Métodos del Capítulo III.

Los pulgones que se utilizaron en el ensayo fueron criados por dos generaciones en una mezcla de los genotipos a evaluar, con el objetivo de evitar el efecto del hospedante previo (Dixon 1987).

Material vegetal

Se utilizó la misma colección de líneas recombinantes dihaploides (**LRD**) de cebada cervecera mencionada en Materiales y Métodos del Capítulo III. Las semillas de cada genotipo y ambos progenitores fueron germinadas en cajas de Petri y luego de dos días, colocadas en macetas de 200 cm³ con tierra estéril, perforadas en la base para lograr una buena irrigación.

Ensayo de antibiosis a *Schizaphis graminum* y a *Diuraphis noxia* en líneas recombinantes dihaploides

El ensayo se realizó en un insectario bajo condiciones controladas de temperatura (20°C +/- 2°C) y fotoperíodo (16h: 8h, luz: oscuridad), sobre plántulas sembradas individualmente. Se realizaron entre 5 y 10 repeticiones para cada **LRD** y ambos progenitores.

Se aplicó el método de Webster *et al.*, (1987) modificado por Castro (1994). Al estado de primera hoja expandida, las plantas fueron infestadas con dos ninfas del primer estadio utilizando un pincel de cerdas suaves para evitar dañar al insecto. Se utilizó un tubo transparente de plástico de 20 cm de largo con ventilación en el extremo superior y en uno de sus laterales, cubriendo la planta (Figura 34). Las ninfas fueron observadas cada 48h hasta alcanzar su período reproductivo. En ese momento se retiró una de ellas y se siguió el ciclo de la otra hasta la muerte o hasta pasados 3 días del final del ciclo reproductivo. La descendencia se contó y se removió en cada medición continuando hasta la finalización del período reproductivo de la hembra adulta. Con el propósito de

mantener las plantas en un estado fisiológico similar, al aparecer signos de clorosis, se las reemplazó por nuevas plantas del mismo genotipo.

Los parámetros medidos y calculados en los áfidos fueron:

- Longitud del ciclo de vida inmadura del insecto (d) (tiempo requerido de una hembra recién nacida hasta que produce su primera descendencia). Para ello se contabilizaron los días transcurridos desde el nacimiento de la hembra hasta el nacimiento de su primera ninfa.

- La fertilidad en un período igual al tiempo de desarrollo d (Md) o tasa reproductiva diaria. Para ello se contabilizó el número de ninfas nacidas en un tiempo igual a d y se las eliminó.

- La longevidad (L). Se consideró el período que media entre el día del nacimiento de la ninfa hasta la muerte de la hembra o hasta tres días posteriores a la finalización del período reproductivo.

- La fecundidad (F) que es el número de ninfas totales producidas por hembra. Se obtuvo mediante el registro diario de ninfas nacidas por hembra, durante todo su ciclo reproductivo.

- Tasa intrínseca de incremento poblacional, $r_m = (\ln Md \times 0,738)/d$

- Período reproductivo (pr). Días desde el comienzo del período reproductivo hasta el final del mismo.

- Número de ninfas por día o tasa reproductiva media (TRM= número de ninfas totales/ período reproductivo)

Se empleó el método de tubo circular que cubre la totalidad de la planta con la finalidad de que los áfidos seleccionen la parte vegetativa preferida por ellos, evitando confinar al insecto en una determinada área que, probablemente, no sea la elegida por él en condiciones naturales. Este método mejora la seguridad en la conservación del insecto, aunque no minimiza los disturbios ocasionados a los mismos y a la planta en lo que se refiere al manejo de ellos.

Por otro lado, se rechazó la utilización de discos de hojas por considerarse que no refleja la realidad, dado que el insecto en condiciones naturales interacciona con la planta entera y en pie. Además, el corte efectuado para la selección del disco, provocaría la inducción de compuestos de defensa, tales como los volátiles que podrían afectar el ciclo del áfido.

Figura 34. Ensayo de antibiosis realizado en maceta



El ensayo fue un diseño completamente al azar en el cual cada maceta fue la unidad experimental principal con 10 macetas para cada **LRD**.

$$Y = G_i + R_j + E_{n(i,j)}$$

G= genotipos; R= Repetición; E= error

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA con el programa PROC GLM (SAS 1989) y el Test de LSD, fue utilizado para determinar las diferencias entre las medias

Análisis de ligamiento

Para estos análisis se utilizaron los mismos programas citados en Materiales y Métodos de los Capítulos previos, con el objetivo de establecer la asociación entre el mecanismo de resistencia de tipo antibiótica y los marcadores moleculares mapeados en los cromosomas de las LRD provenientes de Dom y Rec.

RESULTADOS

Ensayo de antibiosis a *Schizaphis graminum* y a *Diuraphis noxia* en líneas recombinantes dihaploides

Antibiosis a *Schizaphis graminum*

Los análisis estadísticos indican diferencias altamente significativas en todos los parámetros evaluados de antibiosis a *S. graminum* (Tabla 33 y Tabla 34).

Tabla 33. Análisis de la varianza de los parámetros d, Md, L y F con *S. graminum*

Variables		d			Md			L			F		
Fuente de variación	GL	CM	F	Pr>F	CM	F	Pr>F	CM	F	Pr>F	CM	F	Pr>F
Genotipo	76	12,4	50,4	0,0001	174,2	14,2	0,0001	333,7	25,3	0,0001	1612,4	33,2	0,0001
Error	330	0,2			12,2			13,1			48,5		

d (días hasta la madurez reproductiva), Md (fertilidad en un período igual al tiempo de desarrollo d), L (longevidad), F (fecundidad).

Tabla 34. Análisis de la varianza de r_m , pr y TRM con *S. graminum*.

Variables		r_m			pr				TRM			
Fuente de variación	GL	CM	F	Pr>F	GL	CM	F	Pr>F	GL	CM	F	Pr>F
Genotipo	76	0,01	24,2	0,0001	76	307,4	23,97	0,0001	76	1,3	5,6	0,0001
Error	328	0			328	12,8			322	0,2		

r_m (tasa intrínseca de incremento poblacional), pr (período reproductivo), TRM (tasa reproductiva media).

Los análisis de medias indican diferencias significativas entre los progenitores Dom y Rec en todos los parámetros evaluados (Tabla 35).

S. graminum tuvo un período juvenil (d) mayor cuando fue criado sobre el padre Dom que cuando lo fue sobre el genotipo Rec (Tabla 35). El promedio de las LRD fue intermedio entre ambos padres sin diferenciarse estadísticamente de Rec. En cuanto a la fertilidad del áfido en un período igual a d (Md), Dom y la media de las LRD mostraron valores inferiores a **Rec**. Por otro lado, Dom tuvo una longevidad superior a **Rec**, pero la fertilidad total fue significativamente menor al otro padre, indicando un comportamiento antibiótico. Se pudo observar que **Dom** tuvo una r_m significativamente inferior a **Rec** (Tabla 35), producto de una menor fertilidad en un período d mayor, expresando un comportamiento más antibiótico de éste genotipo. Por otro lado, la tasa reproductiva

media (TRM), indicó una menor fertilidad diaria del **PVC** criado en el progenitor **Dom** en relación a **Rec**. Esta diferencia se debió a una menor fecundidad en un lapso de tiempo reproductivo mayor en **Dom** (Tabla 35).

En función de los datos observados, podemos inferir que **Dom** tiene un tipo de mecanismo antibiótico diferente a **Rec**. Este comportamiento se evidencia principalmente por una menor fecundidad (F), tasa reproductiva diaria (Md), r_m y tasa reproductiva media. En cambio, el padre Rec evidenció su efecto antibiótico afectando todos los parámetros relacionados con los ciclos de vida y desarrollo del insecto. De esta forma, el **PVC** tuvo un ciclo de vida más breve (L) sobre este padre, alcanzando la madurez más rápido (d), con un período reproductivo más corto.

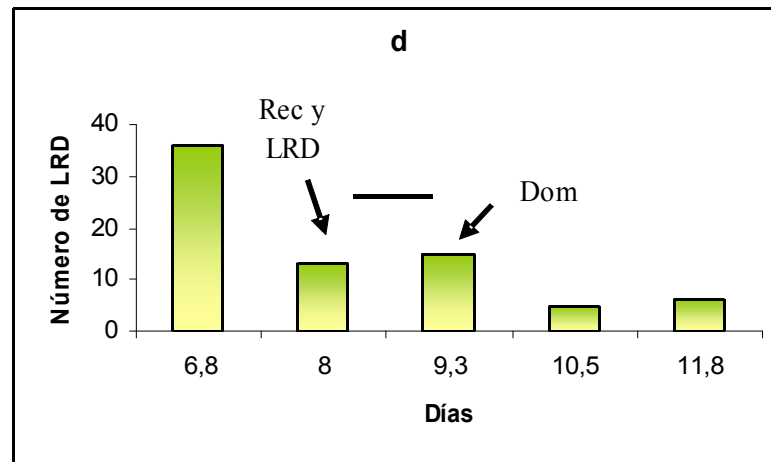
En todos los parámetros analizados anteriormente, el promedio de las LRD fue intermedio entre ambos padres, con valores similares a uno u otro (Tabla 35). Las líneas recombinantes condicionaron diferentes grados de antibiosis al **PVC**. En la mayoría de los parámetros la media de las LRD presentó valores similares al padre que mostró el mayor nivel de antibiosis. Estos resultados evidencian que existe independencia entre los mecanismos genéticos que regulan ambos parámetro principales de la antibiosis (la reproducción y los ciclos).

S. graminum tuvo una amplia variabilidad en alcanzar el período reproductivo (d) en las LRD. El rango de variación fue del doble, observándose herencia transgresiva en ambos sentidos (Tabla 35). Así hubo hembras en las que el lapso de tiempo hasta la primera postura ninfal fue de sólo 6 días. En cambio, algunas otras líneas condicionaron una duración del período juvenil de más de 12 días (Figura 35).

Tabla 35. Antibiosis a *S. graminum* en las LRD y los progenitores Dom y Rec.

Genotipos	<i>Schizaphi graminum</i>						
	d	Md	L	F	r_m	pr	TRM
Dom	9,00 a	21 b	47 a	60,25 b	0,25 b	38 a	1,61 b
Rec	7,78 b	26,44 a	36,66 b	72,22 a	0,31 a	28,88 b	2,59 a
LRD	8,23 b	21,96 b	33,82 b	52,66 b	0,28 c	25,78	2,08 ab
Mínimo	6,20	9,20	13,66	13,66	0,17	6,83	0,99
Máximo	12,40	37,20	55,00	93,00	0,38	51,60	3,41
DMS	0,60	4,27	4,43	8,5	0,02	4,38	0,6

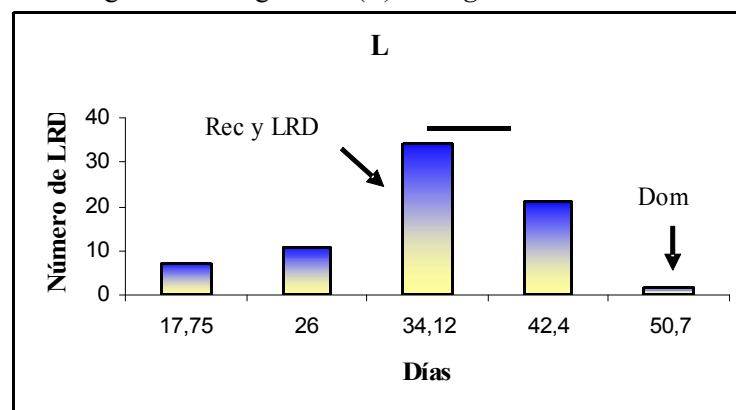
d (días hasta la madurez reproductiva), Md (fertilidad en un período igual al tiempo de desarrollo d), L (longevidad), F (fecundidad), r_m (tasa intrínseca de incremento poblacional), pr (período reproductivo), TRM (tasa reproductiva media). LRD: Líneas recombinantes dihaploides. DMS: Diferencia mínima significativa, letras distintas indican diferencias significativas dentro de la columna ($P > 0,05$).

Figura 35. Días hasta la madurez reproductiva (d) de *S. graminum*.

LRD: Líneas recombinantes dihaploides. La línea horizontal representa la diferencia mínima significativa (DMS)

El parámetro Md también fue variable entre las líneas recombinantes. Este parámetro mostró que el PVC alcanzó valores similares a Dom o a Rec, indicando variabilidad genética entre las LRD.

En cuanto a la **longevidad** de *S. graminum*, también hubo diferencias entre las distintas LRD. Treinta y cuatro de ellas fueron antibióticas condicionando valores similares a los registrados en **Rec**. Sólo 2 líneas se comportaron como Dom (Figura 36).

Figura 36. Longevidad (L) de *S. graminum*

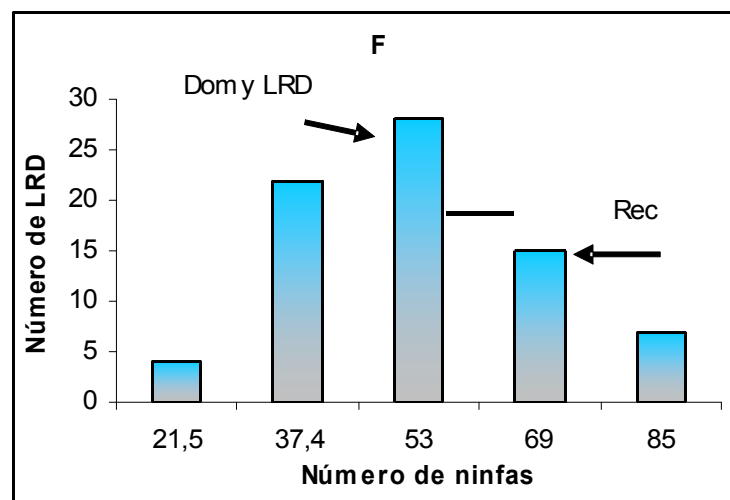
LRD: Líneas recombinantes dihaploides. La línea horizontal representa la diferencia mínima significativa (DMS)

La **fecundidad** (F) en las diferentes LRD fue muy variable mostrando distintos grados de antibiosis al PVC. Veintiséis líneas condicionaron una F significativamente menor que la determinada por Dom, evidenciándose herencia transgresiva con un alto

nivel de antibiosis (Figura 37). En cuatro de estas líneas la fertilidad resultó en valores promedios extremos de sólo 21,5 ninfas por hembra. Es interesante señalar, que además estas líneas condicionaron valores significativamente bajos de d , Md , L , r_m , pr y tasa reproductiva media, evidenciando un nivel de antibiosis superior al resto de las LRD.

Otras 28 líneas condicionaron una fecundidad similar a Dom, con un promedio de 53 ninfas por hembra. Las restantes LRD determinaron una fecundidad elevada similar a Rec (Figura 37).

Figura 37. Fecundidad (F) de *S. graminum*



LRD: Líneas recombinantes dihaploides. La línea horizontal representa la diferencia mínima significativa (DMS)

En cuanto a la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r_m), el promedio de las LRD fue intermedio entre ambos padres, diferenciándose estadísticamente de ellos (Tabla 35). Veinte líneas mostraron valores de r_m similares al padre Dom, que tuvo un alto valor de antibiosis. Además, once de esas líneas fueron más antibióticas en el resto de los parámetros medidos (d , Md , L , F , pr y TRM).

El **PVC** disminuyó su ciclo reproductivo en 47 LRD con valores similares a los ciclos desarrollados en el padre **Rec**. A pesar de este elevado número de líneas en las que el áfido acortó su ciclo, es importante resaltar, que 24 de esas líneas mostraron un elevado grado de antibiosis al áfido modificando los demás parámetros biológicos medidos. En tanto, la tasa reproductiva media (TRM) fue similar a la del padre Dom, en trece LRD con valores inferiores a 1,5 en todas ellas.

Antibiosis a *Diuraphis noxia*

Los análisis de la varianza indican que existieron diferencias altamente significativas en todos los parámetros biológicos del pulgón ruso del trigo evaluados (Tabla 36 y Tabla 37).

Tabla 36. Análisis de la varianza de los parámetros d, Md, L y F con *D. noxia*.

Variables	d				Md			L			F		
	GL	CM	F	Pr>F	CM	F	Pr>F	CM	F	Pr>F	CM	F	Pr>F
Genotipo	80	5,11	5,47	0,0001	102,6	3,42	0,0001	288,3	7,89	0,0001	1175,2	10,77	0,0001
Error	339	0,93			30			36,54			109,1		

d (días hasta la madurez reproductiva), Md (fertilidad en un período igual al tiempo de desarrollo d), L (longevidad), F (fecundidad). CM: cuadrado medio. *** = $P < 0,001$

Tabla 37. Análisis de la varianza de r_m , pr y TRM con *D. noxia*.

Variables	r_m				pr			TRM		
	GL	CM	F	Pr>F	CM	F	Pr>F	CM	F	Pr>F
Genotipo	80	0,0045	5,14	0,0001	243,62	6,07	0,0001	0,8	2,24	0,0001
Error	339	0,00089			40,1			0,35		

r_m (tasa intrínseca de incremento poblacional), de pr (período reproductivo) y TRM (tasa reproductiva media). CM: cuadrado medio. *** = $P < 0,001$

Si bien no existieron diferencias significativas en los parámetros de antibiosis evaluados entre ambos padres, ni de ellos con la media de las LRD (Tabla 38), se encontraron algunas líneas que mostraron valores significativamente distintos del resto.

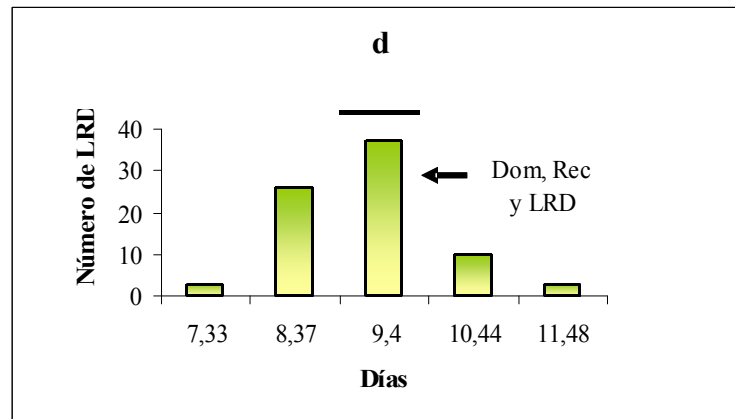
Tabla 38. Antibiosis a *Diuraphis noxia* en las LRD y los progenitores Dom y Rec.

Genotipos	<i>Diuraphis noxia</i>						
	d	Md	L	F	r_m	pr	TRM
Dom	9	23,33	36,5	65,83	0,25	27,5	2,39
Rec	9	21,86	35,3	57,85	0,25	26,28	2,21
LRD	9,12	20,33	34,6	49,47	0,24	25,4	2
Mínimo	6,82	11,4	18,2	17,4	0,180	9	1,47
Máximo	12	32	52	81,5	0,290	41,8	3,31
DMS	1,21	6,86	7,57	13,09	0,037	7,93	0,75

d (días hasta la madurez reproductiva), Md (fertilidad en un período igual al tiempo de desarrollo d), L (longevidad), F (fecundidad), r_m (tasa intrínseca de incremento poblacional), pr (período reproductivo), TRM (tasa reproductiva media). LRD: Líneas recombinantes dihaploides. DMS: diferencia mínima significativa

En *d* se encontraron 6 LRD significativamente más antibióticas que ambos padres (Figura 38) dado que prolongaron el período de maduración de los insectos criados en ellas. En cambio, sólo 2 líneas resultaron menos antibióticas que los progenitores, con un ciclo significativamente más corto que aquellos (Figura 38).

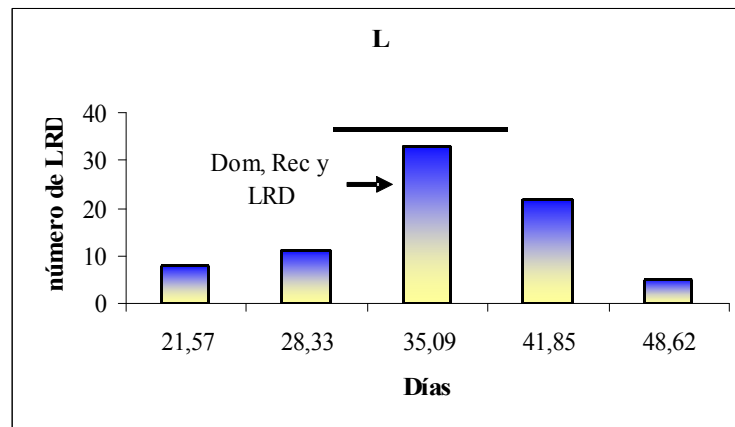
Figura 38. Días hasta la madurez reproductiva (*d*) de *D. noxia*.



LRD: Líneas recombinantes dihaploides. La línea horizontal representa la diferencia mínima significativa (DMS)

En *Md* se encontraron 11 líneas con una cantidad de ninfas significativamente menor a la registrada en los insectos criados sobre Dom y Rec. Solo 1 LRD presentó valores de *Md* superiores a los progenitores, indicando una falta de antibiosis en la misma.

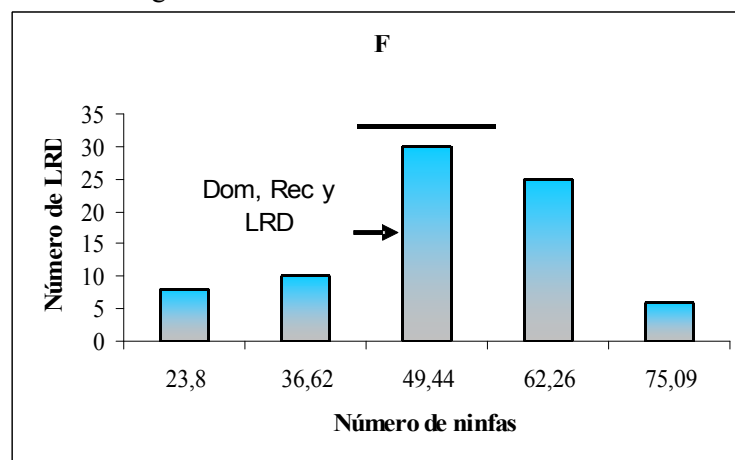
En 16 LRD la longevidad del PRT fue significativamente más breve que en sus progenitores, mostrándo un comportamiento antibiótico de las mismas (Figura 39). En otras 8 LRD el insecto extendió su ciclo, superando significativamente al ciclo producido sobre las líneas parentales. Sin embargo, la longevidad del áfido en la mayoría de las LRD fue similar a la determinada en sus padres (Figura 39).

Figura 39. Longevidad (L) de *D. noxia*

LRD: Líneas recombinantes dihaploides. La línea horizontal representa la diferencia mínima significativa (DMS)

La fecundidad del PRT no fue significativamente distinta entre Dom y Rec (debido al alto valor de la DMS), mostrando una tendencia no antibiótica ante este parámetro (Figura 40). Sin embargo, en Dom hubo un número de ninfas promedio considerablemente mayor que en Rec y sólo en 2 LRD, este promedio superó a aquel progenitor. En 23 LRD el pulgón ruso del trigo tuvo una fecundidad significativamente menor que en Rec. Dentro de estas 23 líneas hubo 13 líneas que fueron altamente antibióticas, con una F menor a 30 ninfas/hembra, es decir presentaron una fecundidad equivalente a la mitad, o cercana a ella, de la determinada en ambos padres (Figura 40).

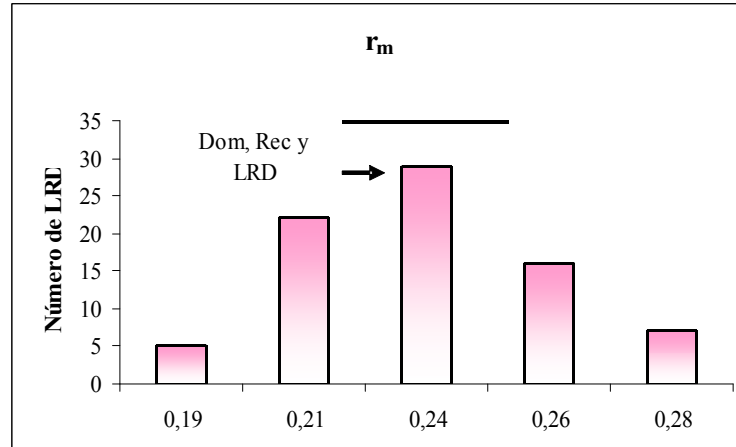
A su vez, en 10 de esas 13 líneas, el PRT tuvo una longevidad significativamente más corta que en el resto de las LRD, indicando un nivel de antibiosis.

Figura 40. Fecundidad de *D. noxia*

LRD: Líneas recombinantes dihaploides. La línea horizontal representa la diferencia mínima significativa (DMS)

La tasa intrínseca de incremento poblacional (r_m) no fue distinta entre ambos padres ni en la mayoría de las LRD. Sólo en 10 líneas la r_m fue significativamente menor a Dom y Rec (Figura 41).

Figura 41. Tasa intrínseca de incremento poblacional (r_m) de *D. noxia*



LRD: Líneas recombinantes dihaploides. La línea horizontal representa la diferencia mínima significativa (DMS)

El período reproductivo (**pr**) del pulgón ruso del trigo no fue diferente entre ambos padres. El áfido mostró un **pr** significativamente menor al de las líneas parentales en unas 14 LRD. Dentro de éstas líneas antibióticas hubo cinco en las que el **pr** fue reducido a la mitad del tiempo determinado en ambos padres, indicando un alto nivel de antibiosis en las **LRD** mencionadas.

La tasa reproductiva media (**TRM**) indicó a varias líneas con un grado de antibiosis al **PRT**. Sin embargo, sólo tres LRD presentaron diferencias significativas con los progenitores, en tanto el resto de las mismas no fueron distintas a Rec y Dom.

Análisis de Ligamiento

El análisis genético no evidenció asociación significativa entre los marcadores moleculares mapeados en las líneas recombinantes y los parámetros de antibiosis evaluados en ambos pulgones. Todos los valores de LOD fueron inferiores a 2, es decir, ninguno de ellos alcanzó o superó al valor límite (2,5).

DISCUSION

Los resultados demuestran que ambos progenitores presentaron algún grado de antibiosis a *S. graminum* y en consecuencia, las líneas recombinantes dihaploides tuvieron un comportamiento similar. Es interesante remarcar que los padres difirieron en los parámetros que otorgan este tipo de resistencia. La antibiosis al **pulgón verde de los cereales** afectó notablemente los parámetros relacionados con los ciclos de vida y desarrollo del insecto, cuando fue hospedado sobre **Rec (d, L y pr)**. En tanto que el padre **Dom** redujo las variables relacionadas con la reproducción del áfido (**Md, F, rm y TRM**). **Veintiséis** líneas heredaron las mejores características de ambos padres, siendo las más **antibióticas** y adecuadas para seleccionar.

Dieciséis líneas mostraron un alto nivel de antibiosis a *D. noxia*. A pesar de no existir diferencias significativas entre los padres.

A su vez, es fundamental mencionar que **ocho LRD** fueron **antibióticas** tanto a *S. graminum* como a *D. noxia*. Lo que pone de manifiesto que en esas líneas, se estarían activando los mismos sistemas génicos en presencia de ambos áfidos, afectando los parámetros biológicos de los insectos.

La mayoría de las **LRD** que resultaron **antibióticas** al **PVC**, mostraron niveles de **tolerancia** al mismo áfido. Estas líneas mantuvieron similares pesos secos, área foliar y contenido de clorofila, en relación a sus testigos, bajo la infestación de *S. graminum*. Esto indicaría la presencia de más de una categoría de resistencia en estas líneas. Las plantas hospedadoras que poseen diferentes categorías de resistencia, se consideran portadoras de defensas sustentables más beneficiosas para el medio ambiente, que las portadoras de sólo un mecanismo de las categorías de resistencia. Principalmente porque los mecanismos individuales incrementan la presión de selección sobre la plaga (Smith 1989). Hay autores que plantean que la aparición de nuevos biotipos se daría cuando la antibiosis es el componente más importante de la resistencia (Panda and Khush 1995).

La **tolerancia** es más compatible con el control integrado que la **antibiosis**. Esto se debe a que existen enemigos naturales, cuya subsistencia es totalmente dependiente de la presencia de los áfidos, que son su fuente de alimentación. Sin embargo, hay autores que plantean que elevados niveles de **antibiosis** en las plantas, ocasionan una alta mortalidad de los áfidos, reduciéndose la presencia de biocontroladores, y por ende perjudicando el control integrado (Flinn *et al.*, 2001).

Las líneas mencionadas que mostraron buenos niveles de **antibiosis** y de **tolerancia**, tienen a su vez, un cierto nivel de **antixenosis** a **ambos pulgones**. Si bien no todas ellas fueron las más antixenóticas, tampoco fueron las más preferidas, ubicándose en una situación intermedia. Esta característica sumada a las otras categorías de resistencia, hacen que esas líneas, sean materiales aptos para su selección y evaluación a campo.

Hay referencias que indican que habría relación entre la antixenosis a *S. graminum* y la fecundidad del áfido, en plantas tales como *Tritordeum amphiploids* (Castro *et al.*, 1998). Sin embargo, en el material empleado en esta Tesis no se encontró relación entre los mecanismos de antixenosis con antibiosis ni con tolerancia. Esto está indicando independencia entre los tres mecanismos que pueden ser seleccionados e incluidos en materiales comerciales.

En los planes de mejoramiento se prefiere la selección de materiales con más de una categoría de resistencia, que aquellas que expresen sólo una. La combinación de ellas a *S. graminum* y a *D. noxia* en una misma planta, disminuye la probabilidad que estos áfidos superen la resistencia, siendo más estable y duradera.

Comparativamente con el genoma de trigo, la mayoría de los genes de resistencia a *Schizaphis graminum* (*Gbr*) y a *Diuraphis noxia* (*Dn*) se encuentran sobre el cromosoma 7D. Varios autores, entre ellos Castro *et al.*, 2004, asociaron genes de antixenosis y antibiosis, a estos áfidos, a marcadores localizados en el cromosoma 7D de trigo. Sin embargo, en esta Tesis no se encontró asociación entre los marcadores y los genes de resistencia en la cebada.

CONCLUSIONES

- En función de los datos observados, podríamos inferir que **Dom** es más **antibiótico** que **Rec** ante el ataque de *S. graminum*.
- Ambos padres mostraron un bajo nivel de antibiosis a *D. noxia*.
- Al menos 26 LRD resultaron con un elevado grado de antibiosis a *S. graminum*, inclusive, superior al del padre **Dom**. Además, 16 líneas recombinantes fueron antibióticas a *D. noxia*. Por esa razón no se encontró asociación entre la antibiosis a *D. noxia* y los marcadores moleculares mapeados.
- Hubo ocho **LRD** que fueron antibióticas a ambos áfidos.

CAPÍTULO VI HORMONAS

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales caracteres en la mejora de los cultivos es la adaptación a condiciones ambientales y la tolerancia a estreses bióticos. Entre las **respuestas de defensas** de las plantas ante los diferentes tipos de estrés, pueden identificarse respuestas constitutivas o inducibles. Durante los últimos años se ha progresado mucho en el terreno de aislar los efectos de ambas clases de mecanismos (Baldwin *et al.*, 1999; Martín *et al.*, 2003), estableciendo los costos posibles de su presencia (Cipollini, 1998, 2002, 2003), las vías metabólicas en que se basan (Agrawal *et al.*, 2002; Shaoxing *et al.*, 2002), así como el impacto ambiental que tienen ambos grupos de respuestas de defensas en un planteo sustentable de producción (Cipollini *et al.*, 2003). Entre las respuestas de defensas inducibles se pueden identificar la **Resistencia Sistémica Adquirida (SAR)** y la **Resistencia Sistémica Inducida (SIR)**.

Existe un número de **señales hormonales** que incrementan su síntesis endógena en respuesta a diferentes tipos de eventos de estrés. Estos compuestos son importantes reguladores del crecimiento de la planta y están involucrados en la respuesta al estrés biótico y abiótico (Santner *et al.*, 2009). Las hormonas vegetales o fitohormonas, son compuestos naturales, no nutrientes, que tienen la capacidad de regular procesos fisiológicos en concentraciones muy bajas. Ellas pueden sintetizarse en un lugar de la planta y trasladarse a otro, por lo tanto actuar en el lugar de síntesis o lejos de él. Las hormonas tienen efectos pleiotrópicos, cada una de ellas actúa en numerosos procesos fisiológicos y se considera que ninguna tiene el control exclusivo de un determinado metabolismo. Su síntesis no se realiza en tejidos especializados, como ocurre en los animales, sino en toda la planta. Además, interactúan entre ellas según un efecto del tipo sinérgico-antagonista o según un balance cuantitativo. El control de la respuesta hormonal se lleva a cabo a través de cambios en la concentración y sensibilidad de los tejidos a las hormonas. Estos compuestos son moléculas potentes de señalización (Kramerll *et al.*, 1997) que activan genes de respuesta al daño.

Las fitohormonas juegan un rol importante en la respuesta de las plantas a varios estreses bióticos y abióticos, como son la presencia de patógenos, insectos herbívoros, sequía, heladas o estrés térmico (Glazebrook 2005).

El **ácido jasmónico (JA)** es un producto de la ruta de los ácidos octadecanoides. Probablemente la biosíntesis del JA sea constitutiva, pero además podría ser inducida por

el daño y la alimentación de insectos o presencia de patógenos (Dicke y van Poecke 2002). El **metil jasmonato (MeJA)** es un **volátil** derivado del JA y actúa como una molécula de señal en el aire. La función del JA fue determinada mediante distintos ensayos. La aplicación exógena de JA o MeJA inducen respuestas de defensas. Además, se encontró que el incremento de JA endógeno posterior al daño, estuvo correlacionado con la inducción de las defensas y, su inhibición también inhibió la inducción de las respuestas de defensa (Baldwin *et al.*, 1999).

A su vez, el **ácido absísico (ABA)**, el **etileno**, las **auxinas** y el **ácido salicílico (SA)** son reguladores adicionales diferentes de la ruta de los octadecanoides. El ABA tiene un rol temprano en la activación de las rutas de los octadecanoides (Carrera y Prat 1998). El papel del etileno es más complejo, por ejemplo, es esencial en la expresión de genes que responden al daño mecánico a través del JA (O'Donnell *et al.*, 1996), pero es antagonista de la producción de nicotina que induce JA (Kahl *et al.*, 2000). El SA también juega un rol central como molécula de señalización a nivel local, así como en la inducción de resistencia sistémica, y además, regula la expresión de varios genes relacionados con la patogénesis (PR). Plantas transgénicas con reducidos niveles de SA, por interrupción de la ruta de señalización, fueron susceptibles a virus (virus del mosaico del tabaco), hongos (*Phytophthora parasitica*, *Cercospora nicotianae*), y bacterias (*Pseudomonas syringae*). El **metil salicílico (MeSA)**, compuesto **volátil** derivado del SA, también actúa en la defensa de la planta (Reymond y Farmer 1998). El MeSa y el terpenoide β -farnesene son fuertes repelentes de áfidos (Hardie *et al.*, 1994). La presencia de ellos en las plantas impide que los insectos se establezcan con una alta densidad. Además, atraen a los enemigos naturales (microhimenópteros) y elicitan defensas inducidas. Todo esto indica condiciones no óptimas para la supervivencia de los áfidos.

Como se mencionó anteriormente, las plantas liberan una combinación compleja de volátiles como respuesta al daño mecánico o al producido por los herbívoros (Dicke 1999, Paré y Tumlinson 1999). Los volátiles tienen diversas estructuras y surgen de la actividad de muchas rutas bioquímicas. Las más comunes incluyen a los volátiles C₆, indol y metil salicílico (MeSA), terpenoides cíclicos y acíclicos, oximas y nitrilos (derivados de aminoácidos) (Dicke 1999; Paré y Tumlinson 1999).

La infestación con áfidos en plantas de cebada produjo la acumulación de IPs (inhibidores de proteinasas), especialmente inhibidores de quimotripsina (Casaretto y Corcuera 1998). El daño mecánico también provocó la actividad de los IPs, pero en una

menor concentración que la observada bajo infestación (Casaretto *et al.*, 2004). El ácido abscísico (ABA) fue citado como un regulador de la expresión de los inhibidores de proteinasas II en plantas de papa (Peña-Cortés *et al.*, 1995). El ácido jasmónico también es conocido por ser un inductor de los IP (Turner *et al.*, 2002).

El papel del ABA en las defensas de la planta parece ser más complejo que otras hormonas y varía entre los diferentes tipos de interacciones plantas/patógenos. En algunas interacciones tiene un rol negativo y en otras actúa como un regulador positivo de las defensas (Bari y Jones 2009; Melotto *et al.*, 2006). La información acerca de la función del ABA en las respuestas de la planta frente a la alimentación de los áfidos es insuficiente en la actualidad. Se sabe que el ABA actúa frente al estrés biótico (Audenaert *et al.*, 2002), y podría funcionar aguas arriba en la ruta de los ácidos octadecanoídes, posiblemente afectando la liberación de precursores del ácido jasmónico (Bostock, 1999).

Por otro lado, la inducción artificial de las defensas, que dependen de los jasmonatos, puede impedir la alimentación de insectos que se alimentan del floema, como los áfidos (Cooper y Goggin 2005).

Cultivares de cebada y trigo tolerantes a *S. graminum* mantuvieron su crecimiento al ser tratados exógenamente con etileno, aún con concentraciones exógenas cien veces superiores a los niveles inducidos por los áfidos (Castro *et al.*, 1995). En avena y cebada fue posible identificar genotipos que toleraron la infestación de áfidos y respondieron al tratamiento exógeno de etileno, sin mostrar diferencias de crecimiento o producción (Castro *et al.*, 1995). Ensayos previos demostraron que en trigos sintéticos, los cromosomas portadores de genes de tolerancia al *S. graminum* y a *D. noxia*, simultáneamente provocaron crecimiento compensatorio ante los tratamientos exógenos con hormonas (Castro *et al.*, 2008). Esta metodología ha permitido ubicar, los cromosomas portadores de genes de resistencia específica o inespecífica, un gen de antixenosis a **pulgón ruso del trigo** y tres genes de antibiosis a ambos áfidos en líneas recombinantes de trigo (Castro *et al.*, 2005).

HIPÓTESIS

- En las líneas recombinantes dihaploides provenientes del cruzamiento entre Dom y Rec existen genotipos portadores de defensas inducibles por las hormonas ácido jasmónico, ácido salicílico, etileno y ABA, que le permiten mantener su crecimiento y desarrollo bajo tratamiento exógeno con las mismas.

- Mediante selección asistida se podrá asociar genes de tolerancia inducibles por hormonas con los marcadores diagnósticos que permitirá su ubicación cromosómica.
- Estos genes, a su vez, tendrían relación con los genes de tolerancia a *Schizaphis graminum* y a *Diuraphis noxia*.

OBJETIVOS

- Identificar en las líneas recombinantes dihaploides provenientes del cruzamiento entre Dom y Rec, genotipos con defensas elicidadas por la aplicación exógena de las fitohormonas ácido jasmónico, ácido salicílico, etileno y ABA.
- Localizar cromosómicamente los sistemas génicos que otorgan tolerancia inducida por las hormonas mediante el empleo de programas específicos.
- Analizar la relación que existe entre los genes de resistencia a áfidos con los sistemas genéticos que otorgan tolerancia inducida por las hormonas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizó el mismo grupo de líneas recombinantes dihaploides (**LRD**) de cebada cervecera mencionado en Materiales y Métodos del Capítulo III. Debido a la falta de semilla o al bajo poder germinativo de algunos genotipos, sólo pudieron evaluarse 77 de un total de 83 líneas.

Las semillas de cada genotipo y ambos progenitores fueron germinadas en cajas de Petri y luego colocadas en viales de 20 cm³ de volumen, perforados en la base para una buena irrigación, utilizando vermiculita como sustrato estéril. Las plantas fueron acomodadas en bandejas y suplementadas con solución nutritiva Hoagland junto con el agua de riego. Las bandejas fueron mantenidas en un invernáculo en condiciones naturales de luz y temperatura.

Solución de hormonas

Las soluciones hormonales utilizadas fueron: ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA), etileno (ET) y ABA y fueron preparadas en agua destilada y Tween 20 (0,01%, P/V). Las dosis utilizadas para rociar las plantas fueron de 10⁻⁵ M de JA, 50 mM de SA, 50 mM de Ethrel y 10⁻⁵ M de ABA. Las plantas controles fueron tratadas sólo con

agua destilada y Tween 20 (0,01%, P/V). Las dosis elegidas se determinaron en ensayos previos (Castro *et al.*, 2003).

Ensayo de tolerancia con tratamiento hormonal

Las plantas de todos los genotipos y de ambos padres fueron separadas en 5 tratamientos con 10 repeticiones para cada uno de ellos. Los tratamientos fueron: las plantas controles sin hormonas (T) y aquellas con aplicación exógena de JA, SA, ET y ABA (Figura 42).

Los parámetros evaluados fueron registrados a las 72 hs desde la aplicación hormonal. Se realizaron las mismas determinaciones que en los Ensayos de Tolerancia del Capítulo IV, utilizando los mismos instrumentos y equipos, con algunas variantes. Se midió el área foliar (AF), el peso fresco aéreo (PF) y el peso seco aéreo (PS), el contenido de clorofila en la parte media de la 2^{da} hoja (SPAD). Además, se determinó el peso seco radical (PSR).

Debido a que sólo hubo un tratamiento testigo, las comparaciones se realizaron con éste, por eso, se repiten sus valores en todas las tablas.

Los datos de cada uno de los parámetros fueron analizados por un análisis de varianza (ANOVA) empleando el paquete estadístico SAS (1998), en los casos en que existieran diferencias entre genotipos o entre tratamientos se realizaron los análisis de medias por la prueba de medias múltiples de T, indicando en cada caso los valores de la Diferencia Mínima Significativa (DMS).

Análisis de Ligamiento

Con el propósito de establecer la asociación entre los parámetros evaluados de la tolerancia a hormonas y los marcadores moleculares mapeados en los cromosomas de las LRD, se utilizaron los programas MapMaker y QGENE (Lander *et al.*, 1987; Nelson *et al.*, 1997). Se consideró como límite de significancia un LOD de 2,5. Asociaciones con LOD entre 2,5 y 3 fueron consideradas como significativas. En tanto, un LOD superior a 3, fue tomado como altamente significativo. Un efecto aditivo positivo indica al padre Dom como el proveedor de los alelos que aportan significativamente al carácter en cuestión. En tanto, un valor negativo indica en forma similar al padre Rec.

Figura 42. Ensayo de tolerancia con tratamiento hormonal



RESULTADOS

Ensayo de tolerancia con tratamiento hormonal

El análisis estadístico muestra que existieron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y los tratamientos para todos los parámetros evaluados (Tabla 39).

Tabla 39. Análisis de la varianza con tratamiento hormonal.

Variable	AF		PF		PS		SPAD	
	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Genotipos	150,07	15,12***	0,16	25,07***	0,0015	5,12***	51,14	8,44***
Tratamientos	31,59	3,18***	0,04	7,27***	0,0008	2,76***	144,5	23,85***
Error	9,92		0,006		0,0003		6,06	

AF: área foliar. PF: peso fresco. PS: peso seco. SPAD: contenido de clorofila.

Los tratamientos hormonales provocaron diferencias no significativas en las medias de la mayoría de los parámetros evaluados, con algunas pocas excepciones que se detallan a continuación.

En el tratamiento con **ácido jasmónico** sólo hubo diferencias significativas en el contenido de clorofila ($SPAD_f$) del padre Dom en relación a sus testigos, y en relación a Rec (Tabla 40). En el resto de las mediciones (AF, PF, PSA y PSR), no se observaron diferencias significativas entre los padres y sus testigos.

Entre las LRD, el contenido de clorofila fue el parámetro que mayor variabilidad mostró entre los genotipos. Hubo 36 líneas que presentaron diferencias con sus respectivos testigos, 18 de ellas tuvieron un contenido de clorofila inferior. En tanto, otras 18 LRD mostraron un contenido superior al de sus testigos, con un color verde oscuro más intenso. Esto indicaría que, el **JA** estimula genes de defensa que protegen a la clorofila del estrés oxidativo, y aquellas líneas portadoras de los alelos adecuados son favorecidas en su capacidad fotosintetizadora en relación a otras no portadoras.

Por otro lado, la mayoría de las LRD no mostraron diferencias en el **área foliar** entre las plantas tratadas con **JA** y sus testigos, a excepción de 10 recombinantes que tuvieron un área foliar menor que éstos. Cinco líneas presentaron un menor **PF** que sus testigos y otras dos LRD tuvieron un menor **PS**. Además, 8 LRD presentaron un **peso seco radical** significativamente menor que el de sus testigos, aunque no fueron las mismas líneas que produjeron menor peso fresco o seco aéreo, por lo tanto estos caracteres tuvieron independencia en su expresión. Este último parámetro no resulta totalmente confiable, dado que para evaluarlo se debe extraer y lavar las raíces de las plantas, encontradas entre la tierra de las macetas con la consecuente pérdida o daño de muchas pequeñas raicillas.

A pesar de que los valores mínimos y máximos evidencian diferencias entre los distintos genotipos en cada uno de los parámetros medidos, estas diferencias no son significativas cuando se los relaciona individualmente con sus respectivos testigos, como se vio anteriormente en el análisis detallado de cada carácter (Tabla 40).

Tabla 40. Análisis de medias del tratamiento con ácido jasmónico.

Genotipos	AF	AF	PF	PF	PSA	PSA	PSR	PSR	SPAD	SPAD
	T	JA	T	JA	T	JA	T	JA	T	JA
Dom	19,57ab	20,61a	0,513a	0,540a	0,044a	0,043a	0,0174a	0,0163a	26,60a	29,76a
Rec	17,27b	19,03a	0,447a	0,504a	0,033a	0,037a	0,0089b	0,0107a	25,09a	26,70b
LRD	22,07a	20,45a	0,596a	0,544a	0,045a	0,043a	0,0165a	0,0160a	27,02a	27,28ab
Mínimo	8,92	13,64	0,220	0,329	0,0200	0,0257	0,0057	0,0051	18,36	21,42
Máximo	41,10	31,38	1,040	0,873	0,0855	0,0682	0,0317	0,075	32,43	35,36
DMS	4,60		0,140		0,012		0,0075		2,6	

AF: área foliar. PF: peso fresco. PSA y PSR: peso seco aéreo y radical. SPAD: contenido de clorofila. JA: ácido jasmónico. T: testigos. LRD: líneas recombinantes dihaploides. DMS: Diferencia mínima significativa. Letras distintas indican diferencias significativas dentro de la columna. **Negrita** indica diferencias significativas con los respectivos testigos.

En el tratamiento con **ácido salicílico (SA)** no se observaron diferencias significativas entre los padres y sus testigos en ninguno de los parámetros medidos (Tabla 41). Las LRD tratadas presentaron similares pesos fresco y seco aéreo y radical, que sus testigos, es decir, que el **SA** no afectó el crecimiento de las plantas. Sin embargo, en el contenido de clorofila, hubo cinco líneas que tuvieron una mayor concentración en sus hojas, a través de una coloración verde más oscuro. En cuanto al área foliar, sólo 3 genotipos mostraron menor superficie que la de sus testigos y otros 4 tuvieron una sobreexpresión, aunque estos valores no se correspondieron con un menor o mayor peso fresco o seco.

Por otro lado, los valores extremos máximos y mínimos (Tabla 41), ponen en evidencia la variabilidad existente entre los genotipos en todos los parámetros evaluados, aunque estas diferencias no resultan significativas cuando se traslada la comparación con sus respectivos controles. Esto indicaría que la aplicación exógena de **SA**, no afecta los parámetros en estudio al menos, a las 72 horas desde la aplicación.

Tabla 41. Análisis de medias del tratamiento con ácido salicílico.

Genotipos	AF T	AF SA	PF T	PF SA	PSA T	PSA SA	PSR T	PSR SA	SPAD T	SPAD SA
Dom	19,57ab	20,42a	0,513a	0,552a	0,0439a	0,0445a	0,0174a	0,0185a	26,60a	27,46a
Rec	17,27b	19,92a	0,447a	0,497a	0,0333a	0,0354a	0,0089b	0,0125a	25,09a	25,84a
LRD	22,07a	21,59a	0,596a	0,568a	0,0453a	0,0447a	0,0165a	0,0161a	27,02a	27,26a
Mínimo	8,92	14,35	0,220	0,260	0,0200	0,0265	0,0058	0,006	18,36	22,00
Máximo	41,10	35,73	1,040	1,020	0,0855	0,0915	0,0318	0,033	32,43	32,10
DMS	4,70		0,150		0,0140		0,0060		2,18	

AF: área foliar. PF: peso fresco. PSA y PSR: peso seco aéreo y radical. SPAD: contenido de clorofila. SA: ácido salicílico. T: testigos. LRD: líneas recombinantes dihaploides. DMS: Diferencia mínima significativa. Letras distintas indican diferencias significativas dentro de la columna.

En el tratamiento con **etileno (ET)** no se observaron diferencias significativas entre Dom y Rec con sus testigos, en ninguno de los parámetros medidos (Tabla 42). Sin embargo, las líneas recombinantes dihaploides mostraron una alta variabilidad en el contenido de clorofila de sus hojas. El 36% de las LRD mostraron **mayor contenido de clorofila** que sus testigos. Muchas de estas líneas fueron las mismas que manifestaron un mayor contenido de clorofila en el tratamiento con **JA**. En cuanto al peso fresco y seco aéreo, no hubo diferencias entre las plantas expuestas y no expuestas al ET.

Sería de esperar que las líneas con más cantidad de clorofila tengan una mayor capacidad fotosintética, hecho que se traduciría en un mayor crecimiento de la planta y en un mejor estado fisiológico para enfrentar algún tipo de estrés. Sin embargo, no se produjo este crecimiento esperado y por ello no se observaron cambios en los valores de pesos y áreas hallados. Por el contrario, 13 de las líneas que tuvieron mayor contenido de clorofila expresaron menor peso seco radical que sus testigos. Estos resultados indicarían que estas plantas han requerido mayor traslado de metabolitos y agua hacia la parte aérea bajo tratamiento de etileno que sus testigos.

Tabla 42. Análisis de medias del tratamiento con etileno.

Genotipos	AF T	AF ET	PF T	PF ET	PSA T	PSA ET	PSR T	PSR ET	SPAD T	SPAD ET
Dom	19,57ab	19,99a	0,513a	0,523a	0,0438a	0,0413a	0,0174a	0,0132a	26,60a	28,62a
Rec	17,27b	18,06a	0,447a	0,473a	0,0332a	0,0347a	0,0089b	0,0099a	25,09a	27,03a
LRD	22,07a	20,87a	0,595a	0,546a	0,0452a	0,0422a	0,0165a	0,0127a	27,02a	28,84a
Mínimo	8,92	10,88	0,220	0,190	0,0200	0,0242	0,0058	0,0053	18,36	22,72
Máximo	41,10	36,35	1,040	0,980	0,0855	0,0862	0,0318	0,0277	32,43	34,96
DMS	4,61		0,147		0,0131		0,0057		2,42	

AF: área foliar. PF: peso fresco. PSA y PSR: peso seco aéreo y radical. SPAD: contenido de clorofila. ET: etileno. T: testigos. LRD: líneas recombinantes dihaploides. DMS: Diferencia mínima significativa. Letras distintas indican diferencias significativas dentro de la columna.

El tratamiento con **ABA** tampoco ocasionó modificaciones significativas en el área foliar, el peso fresco y seco aéreos y radicales, ni en el contenido de clorofila entre Dom y Rec en relación a sus testigos (Tabla 43). Sin embargo, algunas **LRD** mostraron variabilidad en los parámetros evaluados ante la aplicación de esta hormona, y una vez más el contenido de clorofila fue el parámetro que más varió. Quince genotipos tuvieron una cantidad de clorofila significativamente distinta a la de sus testigos, 5 de ellos los superaron y los otros 10 tuvieron un menor contenido. Hubo 5 genotipos que expresaron menor peso fresco, peso seco radical y área foliar. Pero en otras líneas no se relacionó el área foliar con el peso, es decir, aquellas que tuvieron una mayor área foliar no fueron las mismos que presentaron mayores pesos. Por lo tanto, no podríamos discernir entre los genotipos tolerantes con la evaluación de sólo uno de los parámetros medidos. En cuanto al peso seco radical hubo varias líneas (18) que expresaron menor peso que sus testigos.

Tabla 43. Análisis de medias del tratamiento con ABA.

Genotipos	AF	AF	PF	PF	PSA	PSA	PSR	PSR	SPAD	SPAD
	T	ABA	T	ABA	T	ABA	T	ABA	T	ABA
Dom	19,57ab	22,11a	0,513a	0,611a	0,0438a	0,0521a	0,0174a	0,0131a	26,60a	26,79a
Rec	17,27b	20,03a	0,447a	0,527a	0,0332a	0,0407a	0,0089b	0,0075a	25,09a	25,88a
LRD	22,07a	21,00a	0,595a	0,562a	0,0452a	0,0462a	0,0165a	0,0137a	27,02a	27,09a
Mínimo	8,92	13,15	0,220	0,320	0,0200	0,0160	0,0058	0,0055	18,36	21,77
Máximo	41,11	35,50	1,040	0,930	0,0855	0,0882	0,0317	0,0210	32,43	33,23
DMS	4,63		0,140		0,0139		0,0055		2,14	

AF: área foliar. PF: peso fresco. PSA y PSR: peso seco aéreo y radical. SPAD: contenido de clorofila. ABA: ácido abscísico. T: testigos. LRD: líneas recombinantes dihaploides. DMS: Diferencia mínima significativa. Letras distintas indican diferencias significativas dentro de la columna.

Análisis de Ligamiento

El análisis genético evidenció asociación significativa entre los marcadores moleculares y los parámetros de crecimiento determinados en las plantas testigo y en aquellas tratadas con hormonas. Es importante mencionar que se presentan sólo aquellos QTLs cuyo LOD fue superior a 2,5. La mayoría de los QTLs estuvieron asentados en los cromosomas 3H y 5H. Un menor número se ubicó entre los cromosomas 2H y 7H.

El padre Dom aportó los alelos que contribuyeron en la expresión de todos los caracteres. Esta particularidad puede observarse en el valor positivo del efecto aditivo en todas las tablas presentadas a continuación.

En las plantas testigo hubo 5 QTLs asociados a los marcadores diagnósticos con un LOD superior a 2,5. Cuatro de ellos se localizaron en el cromosoma 5H ligados a 2 marcadores (*BMAG0113c* y *ABG391*) (Tabla 44). El QTL restante se ubicó en el cromosoma 3H y asoció con el marcador *ABC172*.

Tabla 44. Parámetros asociados a los marcadores moleculares en las plantas Testigo (T).

Carácter	T			
	Marcador molecular	Cromosoma	Efecto aditivo	LOD
AF	<i>BMAG0113c</i>	5H	2,04	2,85
	<i>ABG391</i>	5H	1,93	2,7
PFA	<i>ABC172</i>	3H	0,06	3,1
	<i>BMAG0113c</i>	5H	0,06	2,91
PSA	<i>BMAG0113c</i>	5H	0	2,91

En el tratamiento con JA, se detectaron 9 QTLs asociados con los marcadores moleculares (Tabla 45). Seis QTLs se localizaron en el cromosoma 5H y asociaron con tres marcadores. Los otros 3 QTLs se ubicaron en el cromosoma 2H y asociaron con otros

dos marcadores. Todos los caracteres presentaron resultados significativamente asociados al marcador *BMAG0113c*.

Tabla 45. Parámetros asociados a los marcadores moleculares en las plantas con tratamiento de ácido jasmónico (JA).

Carácter	JA			
	Marcador molecular	Cromosoma	Efecto aditivo	LOD
AF	<i>BMAG0113c</i>	5H	1,97	2,99
	<i>BmAc0125</i>	2H	1,86	2,66
PFA	<i>BMAG0113c</i>	5H	0,05	3,24
	<i>ABG391</i>	5H	0,04	2,71
PSA	<i>BMAG0113c</i>	5H	0	3,57
	<i>BmAc0125</i>	2H	0	3,15
	<i>Vrs1</i>	2H	0	2,96
SPAD	<i>BMAG0113c</i>	5H	1,47	4,35
	<i>MWG602A</i>	5H	1,28	3,47

El análisis genético en el tratamiento con ácido salicílico, indicó la presencia de 6 QTLs de los cuales cuatro estuvieron en el cromosoma 5H y ligados a los mismos dos marcadores mencionados anteriormente (*BMAG0113c* y *ABG391*) (Tabla 46). Los otros dos QTLs se localizaron en el cromosoma 3H ligados a otros dos marcadores diagnósticos.

Tabla 46. Parámetros asociados a los marcadores moleculares en las plantas con tratamiento de ácido salicílico (SA).

Carácter	SA			
	Marcador molecular	Cromosoma	Efecto aditivo	LOD
PFA	<i>HVM62</i>	3H	0,05	2,8
	<i>BMAG0113c</i>	5H	0,05	2,76
PSA	<i>BMAG0113c</i>	5H	0	3,22
PSR	<i>BMAG0113c</i>	5H	0	3,34
	<i>ABG391</i>	5H	0	3
SPAD	<i>ABG460</i>	3H	0,86	2,89

El análisis genético de las plantas tratadas con etileno mostró la presencia de 6 QTLs (Tabla 47) de los cuales 2 estuvieron localizados en el cromosoma 5H y ligados a un solo marcador, y los otros en el cromosoma 3H asociados a tres marcadores.

Tabla 47. Parámetros asociados a los marcadores moleculares en las plantas con tratamiento de etileno (E).

Carácter	ET			
	Marcador molecular	Cromosoma	Efecto aditivo	LOD
PFA	<i>BMAG0113c</i>	5H	0,05	3,22
	<i>ABC172</i>	3H	0,05	2,92
	<i>HVM62</i>	3H	0,05	2,61
PSA	<i>BMAG0113c</i>	5H	0	3,27
	<i>HVM62</i>	3H	0	2,5
SPAD	<i>ABC805</i>	3H	0,89	2,7

En el tratamiento con ABA se detectaron 4 QTLs ubicados todos ellos en cromosomas distintos y ligados también, a marcadores diferentes a los mencionados anteriormente, a excepción de *BMAG0113c* (Tabla 48).

Tabla 48. Parámetros asociados a los marcadores moleculares en las plantas con tratamiento de ABA

Carácter	ABA			
	Marcador molecular	Cromosoma	Efecto aditivo	LOD
PSA	<i>BMAG0113c</i>	5H	0	2,66
	<i>Nud</i>	7H	0	3,53
PSR	<i>ABC172</i>	3H	0	2,51
	<i>Zeo</i>	2H	0	2,5

El **área foliar** estuvo asociada con dos marcadores en el testigo y en el tratamiento con **JA**, uno de esos (el marcador *BMAG0113c*), resultó significativo en ambos tratamientos. Los otros fueron diferentes, probablemente debido a la influencia del ácido jasmónico (Tabla 44 y Tabla 45). Esta variable de crecimiento no asoció con ningún marcador en el resto de los tratamientos.

El **peso fresco aéreo**, estuvo asociado a marcadores diagnósticos en todos los tratamientos, a excepción del tratamiento con ABA. Estos QTLs asociaron con marcadores ubicados en los cromosomas 3H y 5H, de los cuales el marcador *BMAG0113c* fue común a todos los tratamientos (Tabla 44, Tabla 45, Tabla 46, Tabla 47).

El **peso seco aéreo** estuvo ligado a 4 marcadores en todos los tratamientos sin excepción. De estos marcadores, *BMAG0113c* nuevamente fue común a todos los tratamientos. Por otro lado, *BmAc0125* y *Vrs1*, localizados en el cromosoma 2H, solamente asociaron con el PSA en el tratamiento con **JA** (Tabla 45), lo que indicaría que

esta hormona estaría afectando diferencialmente la expresión de ese parámetro. De igual modo, el PSA de las plantas tratadas con **etileno** presentaron un QTL asociado al marcador *HVM62*, ubicado en el cromosoma 3H, que no se expresa en ningún otro tratamiento (Tabla 47).

DISCUSIÓN

Los tratamientos exógenos con hormonas vegetales no provocaron cambios de interés en la mayoría de los parámetros en ambos progenitores, a excepción de **Dom** que tuvo un **mayor contenido de clorofila** ante el tratamiento con **ácido jasmónico**. Al no haber una diferencia importante en el crecimiento entre los diferentes tratamientos y los testigos, se infiere que estas líneas no tienen ningún costo metabólico que afecte su comportamiento, a pesar de poseer defensas inducidas por fitohormonas. O sea, se comportarían como líneas **tolerantes**.

En la gran mayoría de las líneas recombinantes dihaploides se observó similar comportamiento. En éstas **LRD** los parámetros de crecimiento fueron similares en plantas tratadas y testigos, indicando, nuevamente, un grado de tolerancia en las mismas. Si bien se podría considerar que 72 hs es un período breve para observar alguna diferencia en el crecimiento, existen antecedentes que indican que en cebada ese lapso es adecuado para identificar plantas tolerantes de susceptibles. Luego de 72 hs se encontraron variaciones en el influjo de fósforo en plantas susceptibles sometidas al ataque de áfidos, hecho que no ocurre en aquellas tolerantes (Castro *et al.*, 1995). Del mismo modo en trigo se pudieron observar diferencias significativas de crecimiento a las 72 hs de la aplicación exógena de fitohormonas, con una clara sobreexpresión en las líneas tolerantes (Castro *et al.*, 2008).

Existen otros antecedentes que muestran que la mayor concentración de enzimas detoxificantes son un buen parámetro para identificar en cortos lapsos la expresión de tolerancia (Van der Westhuizen *et al.*, 1998a). Dado que cualquier tipo de estrés conduce al daño por estrés oxidativo, la concentración de especies ROS puede emplearse como un indicador de alto nivel de defensa (Dirk y Marc 1995). En trigo las líneas de sustitución para los cromosomas que portaron genes de tolerancia a áfidos, también presentaron genes de defensas inducibles por hormonas, observándose en éstos una mayor concentración de JA y ABA internos, que son otros metabolitos que evalúan el nivel de tolerancia de los genotipos (Castro *et al.*, 2003).

El etileno induce la expresión de genes de defensa a través de la síntesis del JA (O'Donnell *et al.*, 1996). Ambas hormonas actuarían como elicitores activando los mismos mecanismos de defensa. En los ensayos realizados en esta Tesis pudo encontrarse que ambas hormonas produjeron un aumento en el contenido de clorofila de varias líneas probadas. A su vez, muchas de ellas presentaron un menor peso seco de sus raíces. Esta situación se explicaría como un mayor costo de mantenimiento de la parte aérea de la planta en detrimento del crecimiento radical.

Al igual que en trigo, en nuestros ensayos se observó que las LRD respondieron, en general, sin mostrar diferencias significativas con sus testigos, por efecto de los tratamientos con SA y ABA (Castro, *et al.*, 2008). No existen antecedentes previos que relacionen las vías de defensas elicidadas por ABA con relación a la resistencia a áfidos.

La respuesta de la planta a la elicitación de las distintas hormonas, estuvo asociada con varios marcadores moleculares mapeados. La mayoría de los **QTL** asociaron con marcadores ubicados en los cromosomas **3H** y **5H** principalmente. Sin embargo, hubo algunas excepciones. En el tratamiento con ABA el peso seco de la raíz asoció a un marcador localizado en el cromosoma 2H y a otro ubicado en el 7H.

En el tratamiento con **JA** algunos parámetros, tales como el área foliar y el peso seco aéreo, estuvieron ligados a marcadores localizados en el cromosoma **2H**. Coincidentemente, estos marcadores fueron los mismos que asociaron con algunos QTLs relacionados con la expresión de tolerancia al PVC y al PRT. Incluso, si se amplía el límite de asociación a los marcadores hasta un LOD de 2, el peso fresco aéreo también resultaría asociado a dichos marcadores. Los genes de defensa que se estarían activando ante la presencia de áfidos, serían los mismos que se inducen en presencia de ácido jasmónico.

Como se planteó anteriormente el ácido jasmónico y el etileno activarían los mismos mecanismos de defensa. Por ello sería de esperar que los parámetros de crecimiento analizados bajo ambos tratamientos, asociaran a los mismos marcadores moleculares. Sin embargo, sólo coinciden aquellos QTLs ubicados en el cromosoma 5H, pero no los localizados en los cromosomas 3H y 2H, considerando un LOD superior a 2,5. Nuevamente, bajando a 2 el valor de LOD, aumenta el número de marcadores asociados a los QTLs que son coincidentes en ambos tratamientos hormonales.

CONCLUSIONES

- Los progenitores Dom y Rec indujeron defensas de tolerancia por el tratamiento con las fitohormonas.
- La mayoría de las líneas recombinantes dihaploides tuvieron un crecimiento similar en las plantas testigo y las tratadas con hormonas, mostrando un comportamiento de tolerancia.
- Varias líneas recombinantes mostraron una sobreexpresión en el contenido de clorofila ante la inducción con el ácido jasmónico. Muchas de ellas, tuvieron un aumento similar en presencia del etileno.
- El SA y el ABA no fueron hormonas adecuadas para distinguir distintos grados de tolerancia entre las LRD. Además, algunas líneas tuvieron expresiones diferenciales en el contenido de clorofila cuando fueron tratadas con estas hormonas.
- La mayoría de los QTLs estuvieron asentados en los cromosomas 3H y 5H.
- El ácido jasmónico sería el elicitor de los genes de defensa que se activan frente al daño provocado por los áfidos

CAPÍTULO VII CONCLUSIONES **FINALES**

- El progenitor **Dom** resultó resistente a *Schizaphis graminum* por poseer niveles aceptables de las tres categorías de resistencia.
- **Dom** expresó un alto grado de susceptibilidad en presencia de *Diuraphis noxia*.
- El padre **Rec** fue medianamente resistente a *Schizaphis graminum* y a *Diuraphis noxia*. Tuvo buenos niveles de antixenosis y tolerancia, pero sin antibiosis a ambos áfidos.
 - Se identificaron diferentes genes de resistencia para la antixenosis, la tolerancia y la antibiosis a *Schizaphis graminum* y a *Diuraphis noxia* en las líneas dihaploides de cebada.
 - La persistencia de la clorofila y de la biomasa aérea son los criterios más importantes para identificar materiales con tolerancia a los áfidos. Se determinaron líneas recombinantes dihaploides que superaron a ambos padres en su contenido de clorofila bajo infestación. Esto se explica por la presencia de segregación transgresiva, dada la interacción de los genes aportados por uno u otro progenitor que produjeron un efecto pleiotrópico.
 - La tolerancia a *Schizaphis graminum* estuvo asociada con los marcadores moleculares de los cromosomas 2H, 5H y 7H.
 - Casi todas las variables de la tolerancia, estuvieron asociadas a marcadores moleculares ubicados en una misma región sobre el cromosoma 2H en las plantas infestadas con *Diuraphis noxia*. Esto indicaría la presencia de un gen mayor en dicha región.
 - En el cromosoma 1H se localizaron **QTLs** de menor efecto asociados con la tolerancia a *Diuraphis noxia*.
 - La identificación de marcadores moleculares ligados a genes de defensa, o a **QTL** permite la utilización de técnicas de selección (MAS) para acelerar los procesos de mejoramiento de la resistencia a los áfidos en cebada. Los genes identificados en esta Tesis, permitirán ampliar la base genética de este cereal.
 - Las hormonas **AS**, **E** y **ABA** indujeron varios parámetros de crecimiento que asociaron a los cromosomas 3H y 5H. Además, el tratamiento con **ABA** asoció a marcadores de los cromosomas 2H y 7H.
 - El **JA** indujo crecimiento compensatorio en cebada que asoció con los marcadores de los cromosomas 2H y 5H.

- Esta es la primera referencia de asociación entre marcadores moleculares y variables de crecimiento inducidas por hormonas en cebada.
- La tolerancia a *Schizaphis graminum* y a *Diuraphis noxia* estuvo asociada con los mismos marcadores moleculares del cromosoma 2H que el área foliar y el peso seco bajo tratamiento con **JA**. Esto indicaría que los mismos genes fueron activados por ambos tratamientos.
- Como resultado de todo el trabajo de tesis se han podido identificar ocho líneas recombinantes dihaploides que portan genes para los tres mecanismos de resistencia a ambos áfidos. Estas mismas líneas presentaron crecimiento compensatorio por efecto de los tratamientos hormonales. Estas características pueden ser sumadas a otros aspectos de interés agronómico, dentro de un fondo genético adecuado, permitiendo el desarrollo de cultivares comerciales de cebada con genes de resistencia a *Schizaphis graminum* y a *Diuraphis noxia*.

**CAPÍTULO VIII ACTIVIDADES DE
INVESTIGACIÓN A REALIZAR EN
EL FUTURO**

Como una continuidad de la actividad realizada en mi Tesis Doctoral sería de mucho interés profundizar en el estudio de los genes de tolerancia a áfidos y un gen candidato identificado en el cromosoma 2H, relacionado con la tolerancia a la UV-B. La luz solar ultravioleta UV-B modula la interacción entre las plantas y los insectos fitófagos.

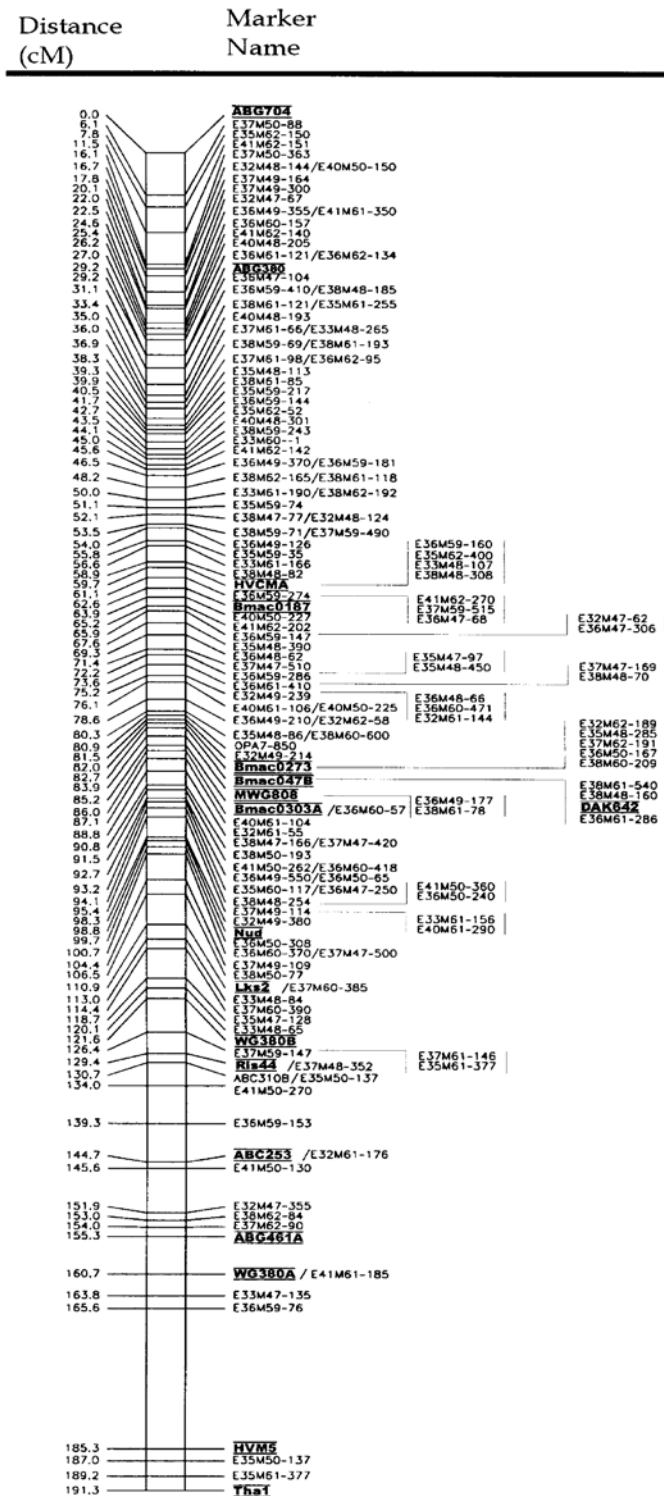
Se considera de importancia profundizar el estudio de la tolerancia al pulgón ruso en relación a genes que codifican un factor de transcripción MYB en el cromosoma 1H, donde mapean genes de tolerancia a este áfido. Los factores de transcripción MYB están involucrados con la protección de las plantas a estreses ambientales. En trigo estos genes otorgan tolerancia a salinidad y a sequía. Las proteínas MYB forman uno de los grupos más numerosos de los factores de transcripción de las plantas.

Se espera desarrollar marcadores moleculares específicos de los genes que inducen crecimiento compensatorio y persistencia de la clorofila bajo infestación con *D. noxia*. Esto permitirá una rápida transferencia de dichos genes a la producción.

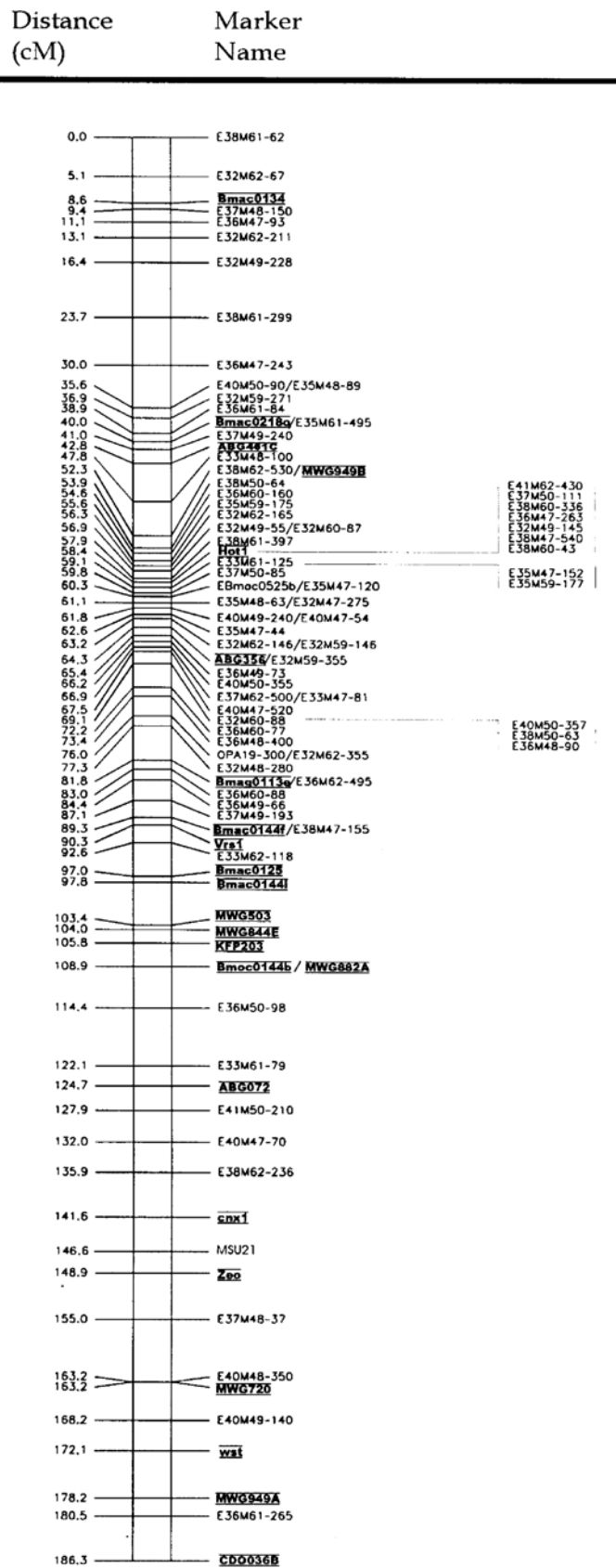
ANEXO

Mapa de la cebada con los marcadores moleculares y morfológicos ubicados en los 7 cromosomas, con el brazo corto hacia arriba. Extraído de *Costa et al.*, 2001

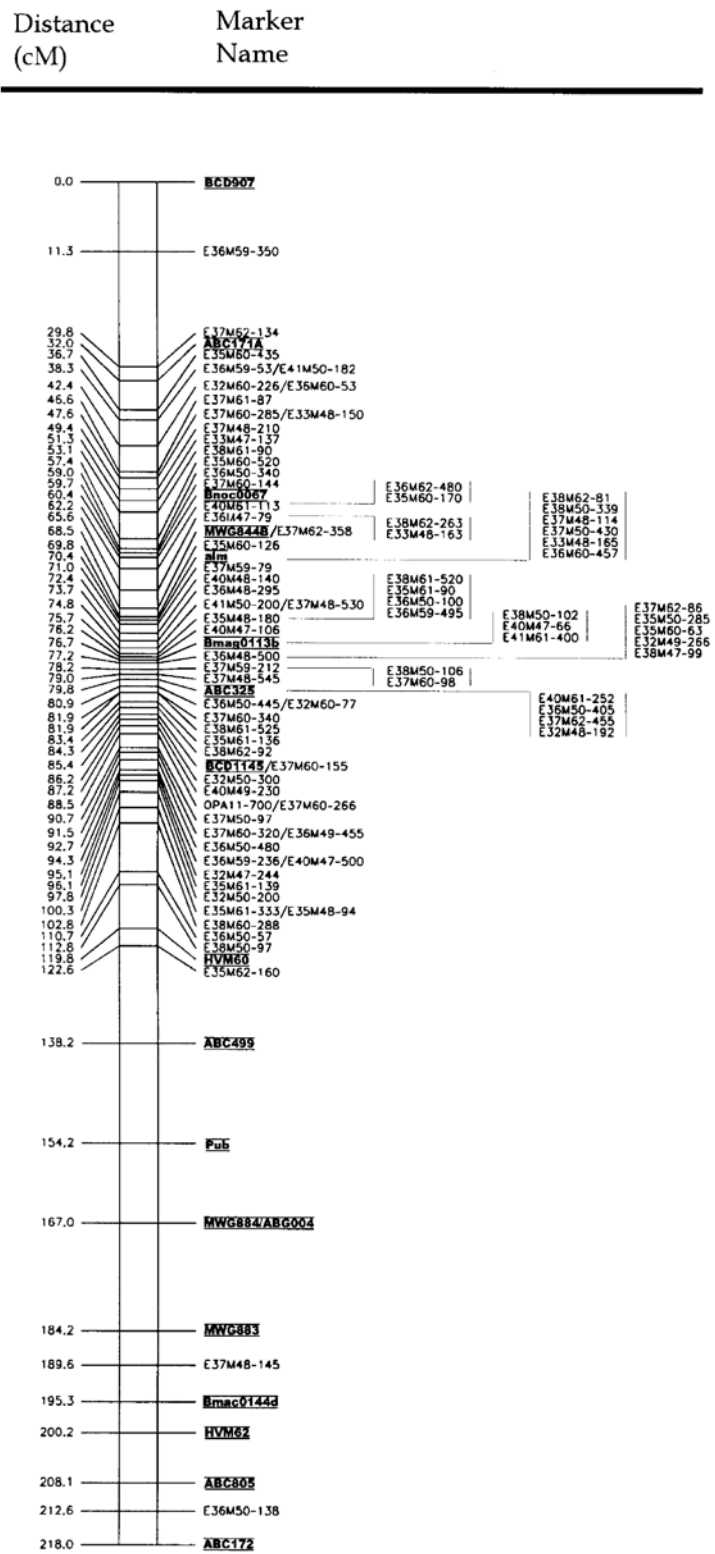
Cromosoma 1 (7H)



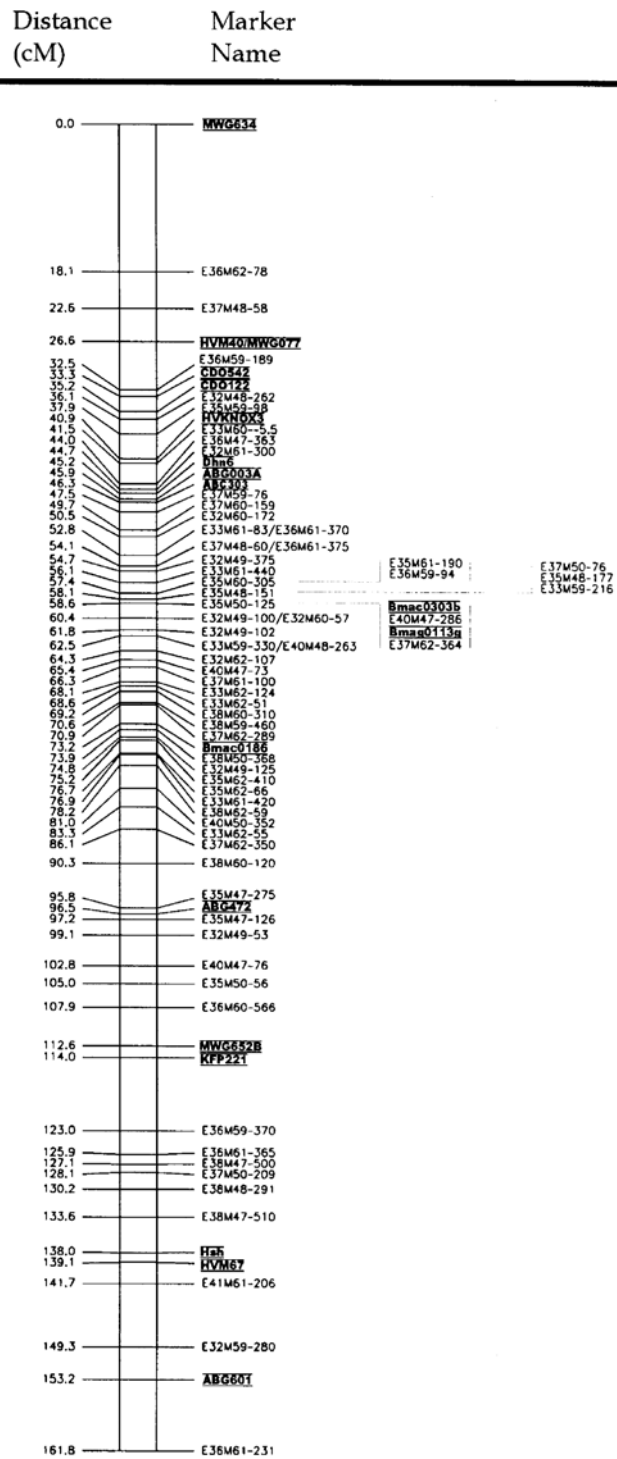
Cromosoma 2 (2H)



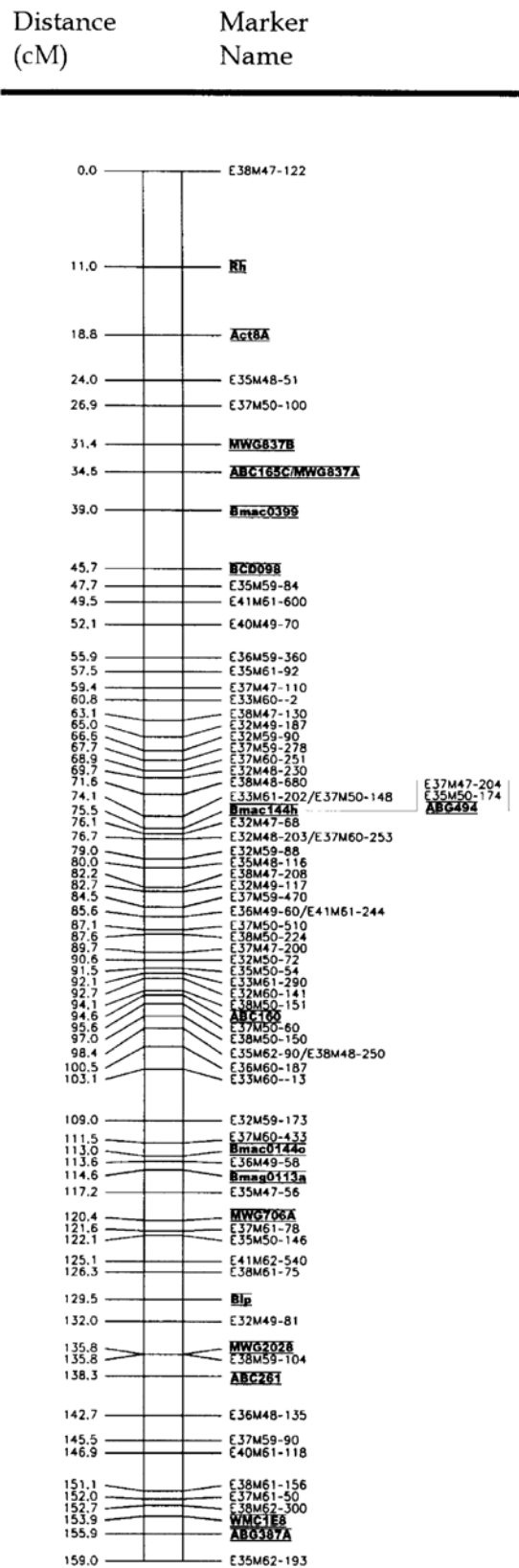
Cromosoma 3 (3H)



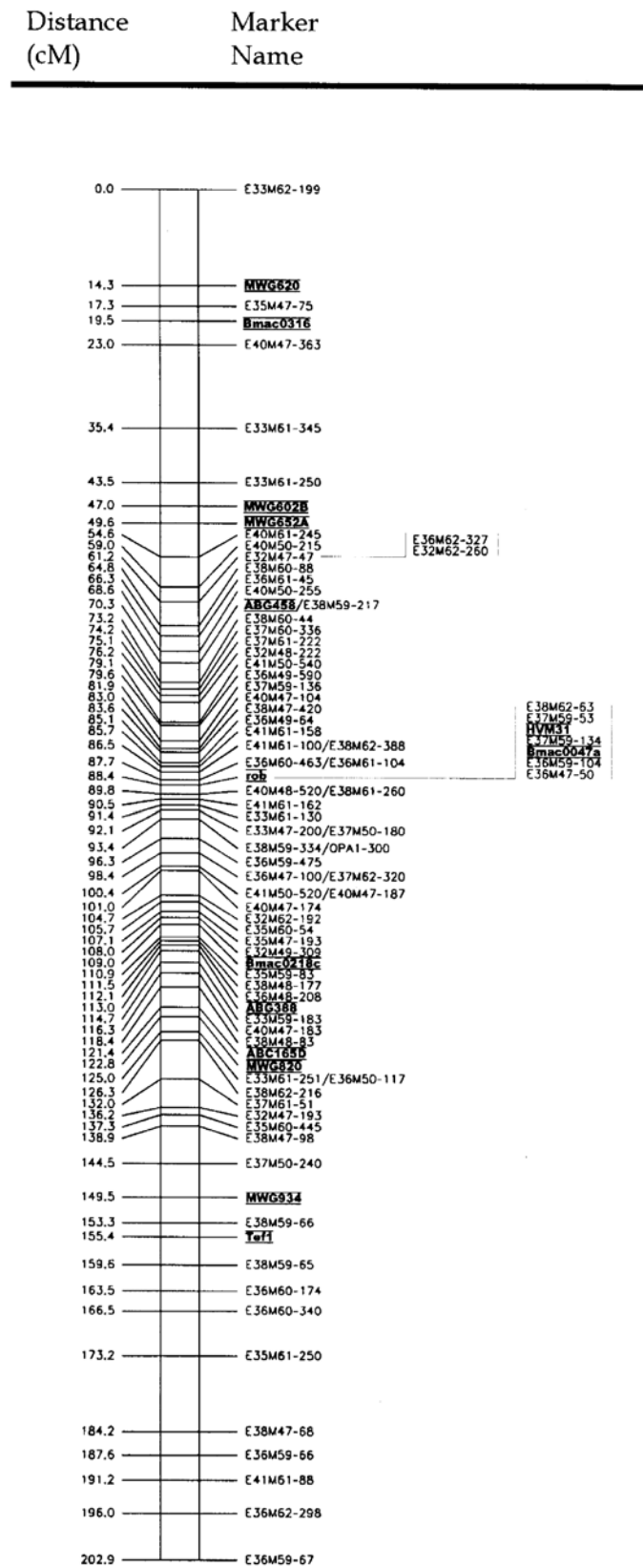
Cromosoma 4 (4H)



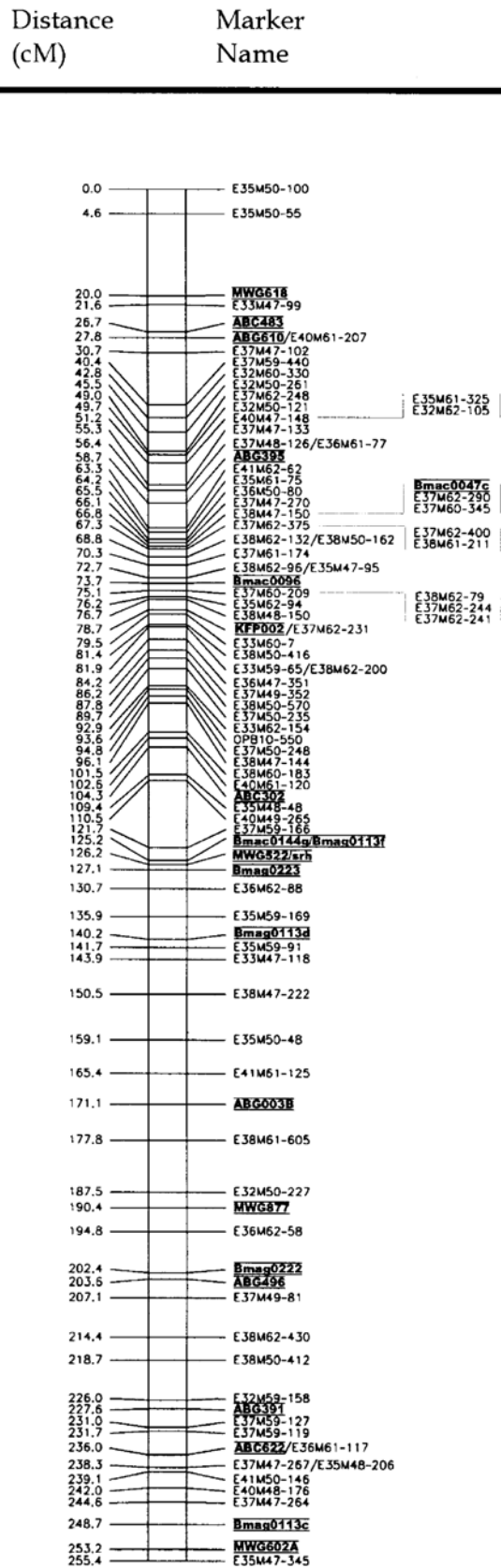
Cromosoma 5 (1H)



Cromosoma 6 (6H)



Cromosoma 7 (5H)



CAPÍTULO IX REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

- Acreman S.J. y Dixon A.F.G. 1989. The effects of temperature and host quality on the rate of increase of the grain aphid (*Sitobion avenae*) on wheat. *Annals of Applied Biology* 115: 3-9.
- Adler F.R. y Karban R. 1994. Defended fortresses or moving targets? Another model of inducible defenses inspired by military metaphors. *Am. Nat.* 144:813-832.
- Al-Mousawi A.H., Richardson P.E. y Burton R.L. 1983. Ultrastructural studies of greenbug (Hemiptera: Aphididae), feeding damage to susceptible and resistant wheat cultivars. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 76: 964-970.
- Anderson M. y Bromley A.K. 1987. Sensory system. In "Aphids, their biology, natural enemies and control". In Minks, A.K. y Herrewijn, P., eds. *Elsevier*, Amsterdam. 2A: 153-162
- Andresen I., Becker W., Schluter K., Burges J., Parthier B., Apel K. 1992. The identification of leaf thionin as one of the main jasmonateinduced proteins of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Mol Biol.* 19:193-204.
- 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 on infestation by the aphid *Schizaphis graminum*. *Phytochemistry.* 20: 673-676.
- Argandoña V.M., Zúñiga G.E. y Corcuera L.J. 1987. Distribution of gamine and hydroxamic acids in barley and wheat leaves. *Phytochemistry.* 26: 1917-1918
- Arimura G., Ozaea R., Shimoda T., Nishioka T., Boland W., Takbayashi J. 2000. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature.* 406: 512-515
- Arriaga H.O. 1956. El centeno 'Insave F.A.', híbrido sintético resistente a la toxemia del pulgón verde de los cereales *Rev. Fac. Agron.* XXXIX (3ª época), 35-50.
- Arriaga H.O. 1969. Resistance to greenbug toxemia. *Barley News* 13, 58-60
- Arriaga H.O. 1975. Cebada La Plata Bordeva F.A. resistente al pulgón verde de los cereales (*Schizaphis graminum*, Rondan). *Rev. Fac. Agr.* LI (3a época), entrega 1-2.

- Audenaert K., de Meyer G.B. y Hofte M.M. 2002. Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology* 128: 491-501
- Avé, D.A., Gregory, P. y Tingey, W.M., 1987. Aphid repellent sesquiterpenes in trichomes of *Solanum berthaultii* and *S. tuberosum*. *Entomol. Exp. Appl.* 44: 131-138.
- Bahlmann L., Govender P., Botha A.M. 2003. The leaf epicuticular wax ultrastructure and trichome presence on Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*) resistant and susceptible leaves. *Afr. Entomol.* 11: 59-64
- Baldwin I.T. y C.A. Preston, 1999. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. *Planta* 208: 137-145.
- Baker B., Zambryski P. y Dinesh-Kumar S.P., 1997. Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726-733.
- Bari R. y Jones J.D.G. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol.* 69: 473-488.
- Beevers L. 1976. Senescence. Bonner J. and Varner J.E. eds. New York. Academic Press. *Plant Biochemistry* 771-794.
- Benhamou N. 1996. Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Sciences* 1: 233-240.
- Bennett M.D., Smith J.B. 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos Trans R Soc London Biol* 274: 227-274.
- Beregovoy V.H. y Peters D.C. 1995. Biotype J, a unique greenbug (Homoptera: Aphididae) distinguished by plant damage characteristics. *J Kans Entomol Soc* 67: 248-252.
- Birch L.C. 1948. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *Journal of Animal Ecology* 17: 15-26.
- Biswal, B. 1995. Carotenoid catabolism during leaf senescence and its control by light. *Photochem. Photobiol.* 30: 3-13.
- Blackman R.L. 1973. Aphids. Ginn & Co. Ltd. London 175 pp.
- Blackman, R.L. y Eastop V.F. 1984. Aphids on the world's crop: an identification and information Guide, *Wiley*, 466 pp.
- Blankenship, R. E. 2002. Molecular mechanism of photosynthesis. Blackwell, Malden, MA.

- Blechert S., Brodschelm W., Hölder S., Kammerer L., Kutchan T.M., Vlueller M.J., Xia Z-Q. y Zenk M.H. 1995. The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc Natl Acad Sci. USA* 92: 4099-4105.
- Broadway, R.M., Duffey, S.S., Pearce F. y Ryan C.A. 1986. Plant proteinase inhibitors: a defense against herbivorous insects? *Entomol. Exp. Appl.* 41, 33.
- Bodenheimer F.S. y Swjrski E., 1957. The Aphidoidea of Middle East. Weizman Science Press of Israel. Jerusalén
- Bostock R.M. 1999. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 55: 99-109.
- Bostock R.M. 2005. Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 545-80.
- Botha A.M., Nagel MAC, van der Westhuizen A.J., Botha F.C. 1998. Chitinase isoenzymes in near-isogenic wheat lines challenged with Russian wheat aphid, exogenous ethylene and mechanical wounding. *Bot Bull Acad Sin* 39: 99-106.
- Botha A.M., Lacock L., van Niekerk C., Matsioloko M.T., du Preez F.B., Loots S., Venter E., Kunert K.J. y Cullis C.A. 2006. Is photosynthetic transcriptional regulation in *Triticum aestivum* L. cv. TugelaDN a contributing factor for tolerance to *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae)? *Plant Cell Rep* 25(1): 41–54.
- Boyko E.V., Starkey S.R., Smith C.M. 2004. Molecular genetic mapping of *Gby*, a new greenbug resistance gene in bread wheat. *Theor Appl Genet.* 109: 1230-1236.
- Bromley, A.K., Dunn, J.A. y Anderson, M. 1979. Ultrastructure of the antennal sensilla of aphids. I. Coeloconic and placoid sensilla. *Cell Tissue Res.* 203: 427-442.
- Burd, J. D. y Burton R. L. 1992. Characterization of plant damage caused by Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.* 85, 5: 2017-2022.
- Burd J.D. y Elliott N.C. 1996. Changes in chlorophyll a fluorescence induction kinetics in cereals infested with Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.* 89: 1332-1337
- Burd J.D., Butts R.A., Elliott N.C., y Shufran K.A. 1998. Seasonal development, overwintering biology, and host plant interactions of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) in North América. In S.S. Quisenberry, y F.B. Peairs (eds.). A response model for an introduced pest-the Russian wheat aphid. Thomas

- Say Proceedings: Publications in Entomology. Entomological Society of America, Lanham, MD. 65-69.
- Burd J.D., Porter, D.R. 2006. Biotypic diversity in greenbug (Hemiptera: Aphididae): characterizing new virulence and host associations. *J. of Economic Entomology*. 99, 3: 959-965.
- Burd J.D., Porter D.R., Puterka G.J., Haley, S.D., Peairs, F.B. 2006. Biotypic variation among North American Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) populations. *J. of Economic Entomology*. 99, 5: 1862-1866.
- Burton R.L. 1986. Effect of greenbug (Homoptera: Aphididae) damage on roots and shoot biomass in wheat seedlings. *J. Econ. Entomol.* 79: 633-636.
- Butts P.A. y Pakendorf K.W. 1984. Wheat breeding for resistance to *Diuraphis noxia*, methodology and progress. Pp. 47-52 In, Walters, M. C. (ed.), *Progress in Russian wheat aphid (Diuraphis noxia Mordv.) research in the Republic of South Africa*. Proc. of a Meeting of the *Russian Wheat Aphid Task Team*, Dept. Agric. Tech. Comm. 191. Govmt. Printer, Pretoria.
- Carballo M. y Quezada J. 1987. Uso de parásitos en el control biológico de áfidos. En: *Curso de áfidos. Artículos selectos sobre áfidos y su importancia económica en la Agricultura de Centroamérica*. CATIE. Panamá. 7-19.
- Carrera E. y Prat S. 1998. Expression of the Arabidopsis abi1-1 mutant allele inhibits proteinase inhibitor wound-induction in tomato. *Plant Journal* 15: 765-771.
- Carter N., Mc Lean I.F.G., Watt A.D. y Dixon A.F.G., 1980. Cereal aphid: a case study and review. In *Applied Biology V* (ed. T.H. Coaker). Academic, London. 271-348.
- Casaretto J.A., Corcuera L.J. 1998. Proteinase inhibitor accumulation in aphid-infested barley leaves. *Phytochemistry* 49: 2279-2286.
- Casaretto J.A., Zúñiga G.E. y Corcuera L.J. 2004. Abscisic acid and jasmonic acid affect proteinase inhibitor activities in barley leaves. *J. Plant Physiol.* 161: 389-396
- Castro A.M. y Rumi C.P., 1987. Greenbug damage on the aerial vegetative growth of two barley cultivars. *Env. Expt. Botany* 27,3: 263-271
- Castro A.M., Rumi C.P. y Arriaga H.O. 1987. Deterioro en la producción de avena susceptible a *Schizaphis graminum* (Rondan) sometidas a un período de infestación y su posterior recuperación. *Turrialba* 39: 97-105.
- Castro A.M., Rumi C.P. y Arriaga H.O., 1988. Influence of greenbug on root growth of resistant and susceptible barley genotypes. *Environ. Expt. Botany* 28: 61-72.

- Castro A.M., Rumi C.P. y Arriaga H.O., 1989. Efectos de la infestación del pulgón verde *Schizaphis graminum* en el ritmo de crecimiento de plántulas de sorgo granífero (*Sorghum bicolor*, Moench.) *Turrialba* 40: 292-298.
- Castro A.M., Rumi C.P. y Arriaga H.O., 1990. Alteraciones en el crecimiento radical de cultivares de sorgo infestado con pulgón verde. *Turrialba* 41: 166-171.
- Castro A.M. 1994: Characterization of greenbug population and clones from Argentina. In: *The importance of Hordeum chilense for breeding aphid resistance in cereals*. PhD. Thesis, 165 pp., University of Córdoba, Spain, pp. 98-128.
- Castro A.M., Martin L.M. y Dixon A.F.G. genetic variability in antibiotic resistance to *Schizaphis graminum* in *Hordeum chilense*. *Plant Breeding* 114: 510-514.
- Castro A.M., Giménez D., Brocchi G., Almaraz L., and Montaldi E., 1996. Ethylene: a new tool for breeding tolerance to aphids in cereals? In *Techniques in Plant-Insect Interactions and Biopesticides*, H.M. Niemeyer (ed.). International Foundation for Science (IFS), Stockholm, Sweden. ISBN 91 85798 42 8. 152-157.
- Castro, A.M., Martín A. y Marín L.M., 1996b. Location of genes controlling resistance against greenbug (*Schizaphis graminum*, Rond.) in *Hordeum chilense*. *Plant Breeding* 115: 335-338.
- Castro A.M., Vasicek A., Ramos S., Martin A., Martin L.M. y Dixon A.F.G. 1998 Resistance against greenbug (*Schizaphis graminum*, Rondani) and the Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*, Mordv.) in wheat. *Plant Breeding* 118: 113-137.
- Castro, AM, Ramos S., Vasicek A., Worland A., Giménez D., Clúa A.A., Suárez E., 2001. Identification of wheat chromosomes involved with different types of resistance against greenbug and Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*, Mordvilko) *Euphytica* 118, 3: 321-330.
- Castro A.M., Clúa A., Giménez D., Tocho E., Tacaliti S., Worland A., Sayers E., Chidichimo H., Snape J. 2003. Chromosomal effects on tolerance to the stress-induced hormones ethylene, jasmonic acid, salicylic acid and ABA in wheat (*Triticum aestivum*) substitution lines. In: Pogna N. Mugnozza G, Bianchi A (eds) *Proc Int Wheat Genet Symp Instituto Sperimentale per la Cerealicoltura*, Rome, Italy, 3: 1111-1114.
- Castro A.M., Vasicek A., Ellerbrook C., Giménez D.O., Tocho E., Tacaliti M.S., Clúa A. y Snape J.W., 2004. Mapping quantitative trait loci in wheat for resistance against

- greenbug and Russian wheat aphid. *Plant Breeding* 123: 361-365 (ISSN 0179-9541).
- Castro A.M., Vasicek A., Manifiesto M., Giménez D.O., Tacaliti M.S., Dobrovolskaya O., Röder M.S., Snape J.W. y Börner A. 2005. Mapping antixenosis genes on chromosome 6A of wheat to greenbug and to a new biotype of Russian wheat aphid. *Plant Breeding* 124: 229-233.
- Castro A.M., Tacaliti M.S., Giménez D., Tocho E., Dobrovolskaya O., Vasicek A. M. Collado, J. W. Snape, A. Börner. 2008. Mapping quantitative trait loci for growth responses to exogenously applied stress induced hormones in wheat. *Euphytica* 164: 719–727.
- Cermeli M. 1987. Control de áfidos plagas en Venezuela. En: Curso de áfidos. Artículos selectos sobre áfidos y su importancia económica en la Agricultura de Centroamérica. CATIE. Panamá. 20-35.
- Chen F y Hayes P.M. 1989. A comparison of *Hordeum bulbosum*–mediated haploid production efficiency in barley using in vitro floret and tiller culture. *Theor Appl Genet* 77: 701–704.
- Clement S.L. y Lester D.G. 1992: Screening wild *Hordeum* species for resistance to Russian Wheat Aphid. *Cereal Res. Comm.* 18: 173-177.
- Clúa A.A., Castro A.M., Ramos S., Giménez D.O, Vasicek A., Chidichimo H.O., y Dixon A.F.G., 2004. The biological characteristics and distribution of *Schizaphis graminum* and Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Hemiptera: Aphididae), in Argentina and Chile. *European Journal of Entomology* 101: 193-198..
- Cooper W.R. y Goggin F.L. 2005. Effects of jasmonate-induced defenses in tomato on the potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*. *Entomol. Exp. Appl.* 115: 107-115.
- Corcuera L.E. 1984. Effects of indole alkaloids from gramínea on aphids. *Phytochemistry* 23: 539541.
- Corcuera, L.J., C.B. Queirolo y V.H. Argandoña. 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: 514-516.
- Costa J.M., Corey A., Hayes P.M., Jobet C., Kleihofs A. *et al.*, 2001. Molecular mapping of the Oregon Wolfe Barleys: a phenotypically polymorphic doubled-haploid population. *Theor Appl Genet* 103: 415–424

- Damsteegt V.D., Gildow F.E., Hewings A.D., y Carroll T.W. 1992. A clone of the Russian Wheat Aphid (*Diuraphis noxia*) as a vector of the Barley Yellow Dwarf, Barley Stripe Mosaic, y Brome Mosaic Viruses. *Plant Dis.* 76, 11: 1155-1160
- Dangl J.L. 1996. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8: 1793-1807
- Dekkers J. C. M. y F. Hospital. 2002. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nat. Rev. Genet.* 3: 22-32
- Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C. 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:1 3454-13459.
- Deol G.S., Reese J.C. y Gill B.S. 1997. A rapid, nondestructive technique for assessing chlorophyll loss from greenbug (Homoptera: Aphidididae) feeding damage on sorghum leaves. *J. Kans. Entomol. Soc.* 70: 305-312.
- De Wit P.J.G.M. 1997. Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends Plant Sci.* 2: 452 – 458.
- Dicke M. 1999. Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods? *Entomol Exp Appl.* 91: 131–142.
- Dicke M. y Van Poecke R.M.P. 2002. Signaling in plant–insect interactions: signal transduction in direct and indirect plant defence. Plant signal transduction—Scheel D, Wasternack C, eds. Vol. 38. Oxford: Oxford University Press. 289-316.
- Dillwith J.W. y Berberet R.C. 1990. Lipids at the aphid- plant interface. In “Aphid-Plant Genotype Interactions”, Campbell, R.K. y Eikenbary, R.D., eds., *Elsevier*. 207-223.
- Dirk I. y Marc V.M. 1995. Oxidative stress in plants. *Curr. Opin. Biotechnology* 6: 153-158.
- Dixon A.F.G. 1973. Biology of aphids. E. Arnold. (Publ) *Ltd. London*. 58 pp
- Dixon, A.F.G, 1987. Parthenogenetic Reproduction Rate of Increase in Aphids. In Minks A.M. y P. Harrewijn (eds.), *Aphids: their Biology, Natural Enemies and Control, World Crop Pest*, Elsevier, Amsterdam2A: 269-287.
- Dixon A.F.G. 1990a. Ecological interactions of aphids and their host plants. En “Aphid-plant genotype interactions”. Editado por R.K. Campbell y R.D. Eikenbary. Elsevier. Amsterdam. 7-19.

- Dixon A.F.G y Lamb C.J., 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 339-367.
- Dixon A.F.G. 1998. *Aphid Ecology*. Chapman and Hall, London, 300 pp.
- Dorschner D.W., Ryan J.D., Johnson R.C. y Eikenbary R.D., 1987. Modification of host nitrogen levels by the greenbug (Homoptera: Aphididae): its role in resistance of winter wheat to aphids. *Environ. Entomol.* 16: 1007-1011.
- Douglas A.E. 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their Symbiotic Bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology* 43: 17-37.
- Dreyer D.L y Campbell, B.C. 1987. Chemical basis of host-plant resistance to aphids. *Plant, Cell and Environment* 10: 353-361.
- Durr H.J.R. 1983. *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Homiptera: Aphididae), a recent addition to the aphid fauna of South Africa. *Phytophylactica* 15: 81-83.
- Du Toit F. 1987. Inheritance of resistance in two *Triticum aestivum* lines to Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.* 82: 1251-1253.
- Du Toit F. 1988. Another source of Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*) resistance in *Triticum aestivum*. *Cereal Res. Commun.* 16: 105-106.
- Du Toit 1989. Inheritance of resistance in two *Triticum aestivum* line to Russian wheat aphids (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economics Entomology* 82: 1251-1253.
- Du Toit F., Wessels W.G. y Marais G.F., 1995. The chromosome arm location of Russian wheat aphid resistance gene *Dn5*. *Cereal Research Communications* 23: 299-203.
- Dubcovsky J., Lukaszewski A.J., Echaide M., Antonelli E.F., D.R. Porter. 1998. Molecular characterization of two *Triticum speltoides* interstitial translocations carrying leaf rust and greenbug resistance genes. *Crop Sci* 38: 1655-1600.
- Eastop V. F. 1973. Biotypes of aphids. *Bull. Entomol. Soc. New Zealand.* 2: 40 – 51.
- Eastop V.F., 1978. Diversity of the Sternorrhynca within major climatic zones. En Mound, L.A. y Waloff N. (eds), *Diversity of Insect Faunas. Symposia of the Royal Entomological Society of London* 9: 71-88.
- Eisenbach J. y Mittler T. E. 1987. Polymorphism of biotype E and C of the aphid *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae) in response to different scotophases. *Environ. Entomol.* 16: 519 – 523.
- Engelberth J., Alborn H.T., Schmelz E.A., Tumlinson J.H. 2004. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 1781-1785.

-
- Eva V., Dirk I. y Frank V.B. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53: 1227-1236.
- Farmer E.E. y Ryan C.A. 1990. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 7713.
- Feeny P. 1976. Plant apparency and chemical defense. In J. W. Wallace y R. L. Mansell (eds.), *Biochemical interaction between plants and insects. Recent advances in phytochemistry*. Plenum Press, New York, NY. 10: 1- 40.
- Fereres A., Ortego F., Castanera P. 1990. Dinamica de las poblaciones invernantes de pulgones cereales en la zona centro de la Peninsula Iberica. *Investigacion Agraria, Produccion y Proteccion Vegetales* 5: 447-462.
- Fisk J. 1978. Resistance of sorghum bicolor to *Rhopalosiphum maidis* and *Peregrinus maidis* as affected by differences in the growth stage of the host. *Entomol. Exp. Appl.* 23: 227-236.
- Flinn M, Smith C.M, Reese J.C., Gill B. 2001. Categories of resistance to greenbug biotype I in *Ae. Tauschii* germplasm. *J of Economic Entomology* Vol 94, 2: 558-563.
- Flor H.H. 1971 Current status of gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275-296.
- Forero Dimitri. 2008. The systematics of the Hemiptera. *Revista Colombiana de Entomología* 34, 1: 1-21.
- Fouché A., Verhoeven R.L., Hewitt P.H., Walters M.C., Kriel C.F., y De Jager J. 1984. Russian aphid (*Diuraphis noxia*) feeding damage on wheat, related cereal and a *Bromus* grass species, pp.22-33. In M. C. Walters (ed.), *Progress in Russian Wheat Aphid (Diuraphis noxia Mordw.) Research in the Republic of South Africa*, Republic of South Africa. Department of Agriculture Technical Communication 191.
- Fujimaki S., Fujiwara T., y Hayashi H. 2000. A new method for direct introduction of chemicals into a single sieve tube of intact rice plants. *Plant Cell Physiol.* 41: 124 – 128.
- Gang O.R., Kasahara M., Xia Z.Q., Mijnsbrugge K.V., Bauw G., Boerjan W., Montagu M.V., Davin L.B. y Lewis N.G. 1999. Evolution of plant defense mechanisms. Relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to

- pinoresinollariciresinol and isoflavone reductases. *J. Biol. Chem.* 274, 11: 7516-27.
- Gardenhire, J.H., Tuleen N.A. y Stewart D.W. 1973. Trisomic analysis of greenbug resistance in barley, *Hordeum vulgare* L. *Crop Sci.* 13:684-685.
- Gelli A., Higgins V.J., Blumwald E. 1997. Activation of plant plasma membrane Ca²⁺-permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiology* 113: 269–279.
- Gellner J.L., Kieckhefer R.W. y Riedell W.E. 1991. Seedling and mature plant response to aphid feeding in spring wheat, p. 303. In D.C. Peters, J.A. Webster, y C.S. Chlouber (eds.), Aphid-plant interactions-populations to molecules. Proceeding. OSU Centennial Event, 12-17 August 1990, Stillwater, OK, Okla. State Univ. Div. Agric., Agric. Res. Stn. Rep. MP-132.
- Gerloff E.D. y Ortman E.E. 1971. Physiological changes in barley induced by greenbug feeding stress. *Crop Sci.* 11: 174-176.
- Gibson R.W. y Pickett J.A., 1983. Wild potato repels aphid by release of alarm pheromone. *Nature* 302: 608-609.
- Gildow F.E. 1980 Increased production of alatae by aphids reared on oats infected by barley dwarf virus. *Annals of the Entomological Society of America* 73: 343-347.
- Gill B.S. y Raupp W.J. 1987. Direct genetic transfers from *Aegilops squarrosa* L. to hexaploid wheat. *Crop Sci* 27: 445-450.
- Girma M., Wilde G. y Reese J.C. 1990. Influence of temperature and plant growth stage on development, reproduction, life span, and intrinsic rate of increase of the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *Environ. Entomol.* 19: 1438-1442.
- Givovich A. y Niemeyer H.M. 1995. Comparison of the effect of hydroxamic acids from wheat on five species of cereal aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 74: 115-119.
- Givovich A. y Niemeyer H.M. 1996. Role of hydroxamic acids in the resistance of wheat to the Russian wheat Aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Homoptera: Aphididae). *Journal of Applied Entomology* 120: 537-539.
- Glazebrook J. 2001. Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis – 2001 status. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 301 – 308
- Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev. Phytopathol.* 43:205-207

- Gould F. 1983. Genetics of plant-herbivore systems: interactions between applied and basic studies, pp. 599 – 653. In R. F. Denno y M. S. McClure (eds.), *Variable plants and herbivores in natural and managed systems*, Academic Press, New York, NY.
- Green T.R. y Ryan C.A. 1971. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science*, 175- 776.
- Hammond-Kosack K.E., Jones D.A. y Jones J.D.G. 1996. Ensnaring microbes: the components of plant disease resistance. *New Phytol.* 133: 11 – 24.
- Hanson, A.D., K.M. Ditz, G.W. Singletary y T. J. Leland, 1983. Gramine accumulation in leaves of barley grown under high temperature stress. *Plant Physiol* 71: 896–904.
- Hardie J., Visser J.H. y Piton P.G.M., 1994. Perception of volatiles associated with sex and food by different adult forms of the black bean aphid, *Aphis fabae*. *Physiological Entomology* 19: 278-284.
- Harvey T.L. y Hackerott H.L. 1969. Recognition of a greenbug biotype injurious to sorghum. *Journal of Economic Entomology* 62: 776-779.
- Harvey T.L., Martin T.J. y Levers R.W., 1980. Resistance to biotype C greenbug in synthetic hexaploid wheats derived from *Triticum tauschii*. *Journal of Economic Entomology* 73: 387-389.
- Harvey T.L., Kofoid K.D., Martin T.J. y Sloderbeck P.E. A new greenbug virulent to E-biotype resistant sorghum. *Crop Sci* 1991. 31:1689–1691.
- Harvey T.L., Wilde G.E. y Kofoid K.D. Designation of a new greenbug, biotype K, injurious to resistant sorghum. *Crop Sci* 1997. 37: 989–991.
- Harris M.K. y Frederiksen R.A. 1984. Concepts and methods regarding host plant resistance to arthropods and pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 22: 247-272
- Hashimoto T., Kohno J. y Yamada Y, 1987. Epoxidation in vivo of hyoscyamine to scopolamine does not involve a dehydration step. *Plant Physiol.* 84: 144-147
- Hawley, Charles; Peirs Frank, y Randolph Terri, 2003. Categories of Resistance at Different Growth Stages in Halt, a Winter Wheat Resistant to the Russian Wheat Aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 96, 1: 214-219.
- Heie O.E., 1987. Paleontology and phylogeny. En “Aphids: their biology, natural enemies and control” Edit. A.K. Minks y P. Harrewijn. Elsevier. Amsterdam. 367-391.

- Heng-Moss T.M., Ni X., Macedo T., Markwell J.P., Baxendale F.P., Quisenberry S.S., Tolmay V. 2003. Comparison of chlorophyll and carotenoid concentrations among Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae)-infested wheat isolines. *J Econ Entomol* 96: 475–481.
- Herms D.A. y Mattson W.J. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Q. Rev. Biol.* 67: 283-335
- Hollenhorst, M.M. y Joppa, R.L. 1983. Chromosomal location of genes for resistance to greenbug in 'Largo' y 'Amigo' wheats. *Crop Sci* 23: 91-93.
- Holloway J. y Knapp S.J. 1994. GMENDEL 3.0 users guide. ([http:// www.css.orst.edu/Gmendel/Default.htm](http://www.css.orst.edu/Gmendel/Default.htm)).
- Howe G.A y Jander G. 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 41-66.
- Hulbert S.H., Webb C.A., Smith S.M. y Sun Q. 2001. Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Ann. Rev. Phytopathol.* 39: 285 – 312.
- Janave M.T. 1997. Enzymatic degradation of chlorophyll in cavendish bananas: *in vitro* evidence for two independent degradative pathways. *Plant Physiol. Biochem.* 35: 837-846.
- Jones J., Byers W.J.R., Butts R.A y Harris J.L. 1989. A new pest in Canada: Russian Wheat Aphids *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Homoptera: Aphididae). *Canadian Entomologist* 121,7: 623-624.
- Joppa L.R., Timian R.G. y Williams N.D., 1980. Inheritance of resistance to greenbug toxicity in an amphiploid of *Triticum turgidum*/*Triticum tauschii*. *Crop Sci* 20: 343-344.
- Kahl J., Siemens D.H., Aerts R.J., Gäbler R., Kühnemann F., Preston C.A., Baldwin I.T. 2000. Herbivore-induced ethylene suppresses a direct defense but not an indirect defense against an adapted herbivore. *Planta* 210: 336–342.
- Kanehisa K., Tsumuki H., Kawada K. y Rustamani M. T. 1990. *Applied Entomology and Zoology* 25: 251.
- Karban R. y Myers J.H. 1989. Induced plant responses to herbivory. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 20: 331 – 348.
- Karban R y Baldwin I.T. 1997. Induced responses to herbivory. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA. 330 pág.

- Karban R., Baldwin I.T., Baxter K.J., Laue G., Felton G.W. 2000. Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. *Oecologia* 125: 66-71.
- Kawada K. 1987. Polymorphism and morph determination. En “Aphids: their biology, natural enemies and control”. Edit. Por A.K. Minks y P. Harrewijn. Elsevier, Amsterdam. 255-268.
- Kazemi H. M., Talebi-Chaichi P., Shakiba M. R. y Mashhadi Jafarloo M. 2001. Biological responses of Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Homoptera: Aphididae) to different wheat varieties. *Journal of Agronomical Science and Technology* 3: 249-255.
- Kelman A. y Sequeira L. 1972. Resistance in plants to bacteria. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 181: 247 – 266.
- Kerns D.L., Puterka G.J. y Peters D.C. 1989. Intrinsic rate on increase for greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes E, F, G, and H on small grain and sorghum varieties. *Environ. Entomol.* 18: 1074-1078.
- Kessler A. y Baldwin I.T. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in natru. *Science* 291: 2141-2144.
- Kindler S.D. y Spomer S.M. 1986. Biotypic status of six greenbug (Homoptera: Aphididae) isolates. *Environmental Entomology* 15: 567-562.
- Kindler S.D., Breen J.P. y Springer T.L.. 1991. Reproduction and damage by Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) as influenced by fungal endophytes and cool-season turfgrasses. *J. Econ. Entomol.* 84:685-692.
- Klingauf F. A. 1987. Host plant finding and acceptance. In A.K. Minks y P. Harrewijn (eds.), Aphids: their biology, natural enemies, and control. Volume 2A. *Elsevier Science Publishers*, New York, NY. 209 – 223.
- Kogan M. y Ortman E.F. 1978. Antixenosis. A new term proposed to define Painter’s “Non-preference” modality of resistance. *Bull. Entomol. Soc. AMER.*, 24: 175-176.
- Kogel G., Beissman B., Reisener H.J. y Kogel K-H. 1998. A single glycoprotein from *Puccinia graminis* f. sp. *Tritici* cell walls elicits the hypersensitive lignification response in wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 33: 173-185.
- Korzun V. 2003. Molecular markers and their applications in cereals breeding. A paper presented during the FAO international workshop on “Marker assisted selection:

- A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding?" 17-18 October 2003, Turin, Italy.
- Kota R., Varshney R.K., Thiel T., Dehmer K.J., Graner A. 2001a. Generation and comparison of EST-derived SSR and SNPs markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Hereditas* 135: 141–151.
- Kota R., Varshney R.K., Prasad M., Zhang H., Stein N., Graner A. 2008. EST-derived single nucleotide polymorphism markers for assembling genetic and physical maps of the barley genome. *Funct Integr Genomics*. 8: 223-233.
- Kraakman A.T.W., Martínez F., Mussiraliev B., Van Eeuwijk F.A. y Niks R.E.. 2006. Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. *Molecular Breed*. 17: 41-58.
- Kurdjumov, N.V. 1913. The more important insects injurious to grains in Middle and South Russia. Citado de Kovalev *et. al.*, (1991).
- Lage J., Skovmand B. y Andersen S.B.. 2003. Expression and suppression of resistance to greenbug (Homoptera: Aphididae) in synthetic hexaploid wheats derived from *Triticum dicoccum* x *Aegilops tauschii* crosses. *J. Econ. Entomol*. 96: 202-206.
- Lam E., Kato N., Lawton M. 2001. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411: 848-853.
- Lander E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E. y Newburg I., 1987: MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Lara, F.M. 1991. Princípios de resistência de plantas a insetos. São Paulo, Ícone, 2 ed., 336p.
- Lazar M. D., Worrall W. D., Peterson G. L., Porter K. B., Rooney L.W., Tuleen N.A., Marshall D.S., McDaniel M.E., Nelson L.R.. 1997. Registration of TAM110. *Crop Sci* 37: 1978-1979.
- Leather S.R. y Dixon A.F.G. 1984. Aphid growth and reproductive rates. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 35: 137-140.
- Levin DA. 1971. Plant phenolics: An ecological perspective. *Am. Nat.*, 105: 157-181.

- Liu X.M., Smith C.M., Gill B.S., Tolmay V., 2001. Microsatellite markers linked to six Russian wheat aphid resistance genes in wheat. *Theoretical and Applied genetics* 102, 4: 504-510.
- Lou Y. y Baldwin I.T., 2003. *Manduca sexta* recognition and resistance among allopolyploid *Nicotiana* host plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 14581-14586
- Ma Z.Q., Saidi A., Quick J.S. y Lapitan N., 1998. Genetic mapping of Russian wheat aphid resistance genes *Dn2* and *Dn4* in wheat. *Genome* 41: 303-306
- Macedo, T.B., Higley L.G., Ni X. y Quisenberry S.S. 2003. Light activation of Russian wheat aphid-elicited physiological responses in susceptible wheat. *J. Econ. Entomol.* 96: 194-201.
- MacKinnon J. P. 1961. Preference of aphids for excised leaves to whole plants. *Can. J. Zool.* 39: 445-447.
- Mano Y. y Takeda K. 1997. Mapping quantitative trait loci for salt tolerance at germination and the seedling stage in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Euphytica* 94: 63-272.
- Marais, G.F., Horn M., y du Toit F. 1994. Intergeneric transfer (rye to wheat) of a gene(s) for Russian wheat aphid resistance. *Plant Breed.* 113: 265-271
- Marais, G.F., Wessels W.G., Horn M. y du Toit F. 1998: Association of a stem rust resistance gene (Sr45) and two Russian wheat aphid resistance genes (Dn5 and Dn7) with mapped structural loci in common wheat. *S. Afr. J. Plant Soil* 15: 67-71.
- Martin T.J., Harvey T.L. y Hatchett J.H. 1982. Registration of greenbug and Hessian fly resistant wheat germplasm. *Crop Sci.* 22: 1089
- Matile P., Hsteiner S. y Thomas H. 1999. Chlorophyll degradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 67-95
- Matsioloko M.T. y Botha A.M. 2003. cDNA-AFLP profiling in wheat upon Russian wheat aphid feeding. Proceedings of the 10th International Wheat Genetics Symposium, Paestum, Italy (1–6 September 2003), 3: 1275–1277.
- McCall P.J., Turlings T.C., Loughrin J., Proveaux A.T. y Tumilson J.H. 1994. Herbivore-induced volatile emissions from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings. *J. Chem. Ecol.*, 20: 3039.

- McDowell J.M. y Dangl J.L. 2000. Signal transduction in the plant innate immune response. *Trends Biochem Sci* 25: 79 -82.
- Melotto M., Unerwood W., Koczan J., Nomura K., He S.Y. 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969-980. doi:10.1016/j.cell.2006.06.054.
- Mentink P.J.M., Kimmins F.M., Harrewijn P., Dieleman F.L., Tjallingi W.F., van Rheenen, B. y Ennink A.H.1984. Electrical penetration graphs combined with stylet cutting in the study of host plant resistance to aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 35: 210–213.
- Merkle O.G., Webster J.A. y Morgan G.H., 1987. Inheritance of a second source of greenbug resistance in barley. *Crop Sci.* 27: 241-243.
- Métraux J., Nawrath C. y Genoud T. 2002. Systemic acquired resistance. *Euphytica*. 124: 237 – 243.
- Michels G.J.Jr. y Behle R.W. 1988. Reproduction and development of *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae) at constant temperatures. *J. Econ. Entomol.* 81: 1097-1101.
- Miles P.W. 1999. Aphid saliva. *Biol Rev* 74:41–85.
- Miller H., Porter D.R., Burd J.D., Mornhinweg D.W. y Burton R.L. 1994. Physiological effects of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) on resistant and susceptible barley. *J. Econ. Entomol.* 87: 493-499.
- Mittal. S., Dahleen L. y Mornhinweg D. 2008. Locations of quantitative trait loci conferring Russian wheat aphid resistance in barley germplasm STARS-9301B. *Crop Sci.* 48: 1452-1458.
- Mittler T.E.; Eisenbach J.B; Searle M.; Matsuda M. y Nassar S.G. 1979. Inhibition by kinoprene of photoperiod-induced male production by apterous and alate viviparae of the aphid *Myzus persicae*. *J. Insect Physiol.* 25: 219-226
- Mittler Ron, 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Review of Trends Plant Sci.* 1, 9: 405-410.
- Molina Cano José Luis. 1989. “La Cebada” Morfología, fisiología, genética, agronomía and usos industriales. 1ª Edición, ISBN 84-7114-263-5. Páginas 252.
- 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 insects. *J.Chem. Ecol.* 16: 1899-1909.

- Moore G., Devos K.M., Wang Z., Gale M.D. 1995. Cereal genome evolution: grasses line up and form a circle. *Curr Biol* 5: 737–739.
- Mordvilko A.K., 1928. The evolution of cycles and the origin of heteroecy (migrations) in plant lice. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 11: 570-582.
- Mornhinweg D. Porter D. y Webster J. 1995a. Registration of STARS-9310B Russian wheat aphid resistant barley germplasm. *Crop Sci.* 35: 602.
- Mornhinweg D. Porter D. y Webster J. 1995b. Inheritance of Russian wheat aphid resistance in spring barley. *Crop Sci.* 35: 1368-1371.
- Nelson J.C., 1997. QGENE: software for mapping – based genomic analysis and breeding. *Mol. Breed.* 3: 239-245.
- Ni X., S.S. Quisenberry, J. Markwell, T. Heng-Moss, L. Higley, F. Baxendale, G. Sarath, y R. Klucas. 2001. *In vitro* enzymatic chlorophyll catabolism in wheat elicited by cereal aphid feeding. *Entomol Exp. Appl.* 101: 159-166.
- Ni X., S.S. Quisenberry, T. Heng-Moss, J. Markwell, L. Higley, F. Baxendale, G. Sarath, y R. Klucas. 2002. Dynamic change in photosynthetic pigments and chlorophyll degradation elicited by cereal aphid feeding. *Entomol. Exp. Appl.* 105: 43-53.
- Niemeyer H.M. 1990 Secondary plant chemicals in aphid-host interactions. In Aphid-plant interactions: populations to molecules. Peters, D.C., Webster, J.A. & Chlouber, C.S., eds., USDA/Agricultural Research Service, Oklahoma State University. pp. 101-111.
- Nieto-Lopez R.M. y Blake T.K. 1994. Russian wheat aphid resistance in barley: inheritance and linked molecular markers. *Crop Sci.* 34: 655-659.
- Nijhout H. y Wheeler D.E. 1982. Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphisms. *Q. Rev. Biol.* 37; 109-133.
- Nkongolo K.K., Quick J.S., Meyer W.L., Peairs F.B. 1989 Russian wheat aphid resistance of wheat, rye, and triticale in greenhouse tests. *Cereal Res Commun* 17: 227–232
- Nkongolo K.K., Quick J.S., Meyer W.L. y Peairs F.B. 1991. Sources and inheritance of Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*, Mordv.) resistance in *Triticum* species, anphiploids and *Triticum tauschii*. *Can. J. Plant Sci.* 71: 703-708.
- Noctor G.Y, Foyer C. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 249-279.

- Noriega A., Chidichimo H. y Castro A.M. 2000. Determinación de biotipos en tres poblaciones de pulgón verde colectados en tres localidades de importancia cerealera en Argentina. *Rev. Fac. Agr. La Plata* 104, 2: 85-92.
- O'Donnell P.J., Calvert C., Atzorn R., Wasternack C., Leyser H.M.O., Bowles D.J. 1996. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 274: 1914-1917.
- Ogecha J., Webster J.A. y Peters D.C. 1992. Feeding behavior and development of biotypes E, G, and H of *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae) on 'Wintermalt' y 'Post'barley. *J. Econ. Entomol.* 85: 1522-1526.
- Ortego J. 1994. Nuevos conocimientos sobre el Pulgón Ruso del Trigo, *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Homoptera: Aphididae), en Mendoza, Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 25, 3: 23-33.
- Ortego J. y M. A. Delfino. 1992. Presencia de *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Homoptera: Aphididae) en la Argentina. VIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Paraná, Septiembre 1992. pp. 56
- Ortego J. y Delfino M.A. 1994. *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Homoptera: Aphididae) in Argentina. *Rev. Fac. of Agronomy* 70: 51-55.
- Otto C.D., Kianian S.F., Elias E.M., Stack R.W. y Joppa L.R. 2002: Genetic dissection of a major *Fusarium* head blight QTL in tetraploid wheat. *Plant Mol. Biol.* 48: 625—632.
- Painter R.H. 1951. Insect Resistance in Crop Plants. The McMillan Co. New York., 151.
- Painter, R.H. y Peters, D.C, 1956. Screening wheat varieties and hybrids for resistance to the greenbug. *J. Econ. Entomol.* 49: 546-548.
- Panda N. y Kush G.S. 1995. Host Plant Resistance to Insects. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Paré P.W. y Tumlinson J.H. 1999. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol* 121: 325–331.
- Peairs Frank B., 1990. Russian Wheat Aphid Management. Proceedings, Aphid-Plant Interactions: Populations to Molecules. USA. 233.
- Peña-Cortés H., Fisahn J. y Willmitzer L. 1995. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4106–4113.

- Pollard D.G. 1973. Plant penetration by feeding aphids (Hemiptera: Aphidoidea): a review. *Bull. Ent. Res.* 62: 631-714.
- Porter K.B., Peterson G.L., y Vise O. 1982. A new greenbug biotype. *Crop Sci.* 22: 847-850.
- Porter D.R., Webster J.A., Burton R.L., Puterka G.J. y Smith E.L. 1991. New sources of resistance to greenbug in wheat. *Crop Sci.* 31: 1502-1504.
- Porter D.R., Burd J.D., Shufran K.A., Webster J.A. y Teetes G.L. 1997. Greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes: selected by resistant cultivars or preadapted opportunists? *J. Econ. Entomol.* 90: 1055 – 1065.
- Puterka G.J. y Peters D.C. 1988. Inheritance of greenbug virulence to *Gb₂* and *Gb₃* resistance genes in wheat. *Genome* 32, 109-114.
- Puterka G.J., Peters D.C., Kerns D.L., Slosser J.E., Bush L, Worrall D.W. y McNew R.W. 1988. Designation of two new greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes G and H. *J. Econ. Entomol.* 81: 1754-1759.
- Puterka G.J. y Peters D.C. 1990. Sexual reproduction and inheritance of virulence in the greenbug *Schizaphis graminum* (Rondani). En R.K. Campbell y R.D. Eikenbary (eds.), *Aphid Plant Genotype Interactions*, Elsevier. 289-318.
- Puterka G.J., Burd J.D. y Burton R.L. 1992. Biotypic variation in a worldwide collection of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *J. Econ. Entomology.* 85: 1497-1506.
- Quick J.S., Nkongolo K.K., Meyer W., Peairs F.B. y Weaver B. 1991. Russian wheat aphid reaction and agronomic and quality traits of a resistant wheat. *Crop Sci.* 31: 50-53.
- Quick J.S., Ellis G.E. y R.M. Normann, 1996. Registration of “Halt” wheat. *Crop Sci.* 36: 210.
- Rahbé Y., Digilio M.C., Febvay G., Guillaud J., Fanti P. y Pennacchio F. 2002. Metabolic and symbiotic interactions in amino acid pools of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, parasitized by the braconid *Aphidius ervi*. *J. Insect Physiol.* 48: 507–516.
- Rhodes M.J.C. 1994. Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. *Plant Mol. Biol.* 24: 1-20.
- Ramírez C.C, Caballero P.P. y Niemeyer H.M. 1999. Effect of previous exposure to hydroxamic acids in the probing behavior of the aphid *Sitobion fragariae* (Walker) on wheat seedlings, *Journal of Chemical Ecology* 25, 4: 771-779.

- Randolph T., Pears F., Koch M., Walker C., Stubbs J. Quick J. y Haley S. 2005. Yield response and categories of resistance to Russian Wheat Aphid in four *Dn4* hard red winter wheat cultivars. *J. Econ. Entomol.* 98: 588-594.
- Reymond Philippe y Farmer Edward. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Plant Biology*, 1: 404-411.
- Riedell, W. E. 1989. Effects of Russian wheat aphid infestation on barley plant response to drought stress. *Physiol. Plant.* 77: 587-592.
- Riedell, W. E. y Blackmer Tracy. 1999. Leaf reflectance spectra of cereal aphid-damaged wheat. *Crop Sci.* 39: 1835-1840.
- Robinson J., Delgado, F., Vivar, ME. y Burnett, P.A. 1992. Inheritance of resistance to Russian wheat aphid in barley. *Euphytica* 62: 213-217
- Robinson, J. 1992. Russian wheat aphid - A growing problem for small-grain farmers. *Outlook on Agriculture*, 21: 57-62.
- Rondani, C. 1852. Sulla Specie d'insetto volante in gran quantità nella città di Parma. *Gazzetta de Parma, Appendice*, <http://www.itg-rondani.it/>
- Rustamani MA., Kanehisa K. y Tsumuki M. 1992a. Aconitic acid contents of some cereals and its effect on aphids. *Appl. Entomol. Zool.*, 27: 79-87.
- Ryan J.D., Johnson R.C., Eikenbary R.D. y Dorchner KW., 1987. Drought/greenbug interactions: photosynthesis of greenbug resistant and susceptible wheat. *Crop Sci.* 27, 283-288.
- Ryan C.A. 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insect and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 425.
- SAGPyA 2010. Secretaría de Agricultura, Ganadería y pesca de la Nación Argentina <http://www.minagri.gob.ar/site/index.php>.
- Saidi A. y Quick J.S. 1994. Inheritance of Russian wheat aphids resistance in three winter wheats. Proceedings of the 6th Russian wheat aphid conference, Fort Collins, Colorado USA (Pearis F.B., Kroening MK y Simmons CL eds): 126-132.
- Saidi A. y Quick J.S. 1996. Inheritance and allelic relationships among Russian wheat aphids resistance gene in winter wheat. *Crop Science* 36: 256-258.
- Salas M.L. y Corcuera L.J. 1991. Effect of environment on gramine content and susceptibility to the aphid *Schizaphis graminum*. *Phytochemistry* 10: 3237-3240.
- SAS, Institute, 1998. SAS/STAT guide for personal computers, version 6.03 carry NC.

- Shaoxing H., Sirikhachornkit A., Su X., Faris J., Gill B., Haselkorn R. y Gornicki P. 2002. 'Phylogenetic analysis of the acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase loci in wheat and other grasses'. *Plant Mol. Biol.* 48: 805-820.
- Schaefers G.A. y Montgomery M.E. 1973 Influence of cytokinin (N6 benzyladenine) on development and alary polymorphism in strawberry aphid, *Chaetosiphon fragaefolii*. *Annals of the Entomological Society of America* 66: 1115–1119.
- Schillmiller A.L. y Howe G.A. 2005. Systemic signaling in the wound response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 369-377
- Schroeder-Teeter S., Zematia R.S., Schotzko D.J., Smith C.M. y Rafi M. 1994. Monosomic analysis of Russian Wheat Aphid resistance in *Triticum aestivum* line PI 137739. *Euphytica* 74: 117-120
- Sebesta E.E, y Wood E.A. 1978. Transfer of greenbug resistance from rye to wheat with X-rays. *Agrs. Abstr.* 2: 184-201
- Sebesta E.E, y Wood E.A. jr, Porter D.R., Webster J.A. y Smith E.L. 1995. Registration of 'Amigo' wheat germplasm resistant to greenbug. *Crop Sci* 35: 293.
- Sethi S.L. y Swenson K.G. 1967. Formation of sexuparae in the aphid *Eriosoma pyricola*, on pear roots. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 10: 97–102.
- Smith C.M. 1989. *Plant Resistance to Insects: A Fundamental Approach*, Wiley, New York.
- Smith C.M., D.J. Schotzko, R.S. Zemetra & E.J. Souza, 1992. Categories of resistance in plant introduction of wheat resistant to the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *J Econ Entomol* 85: 1480–1484.
- Smith C.M. y S. Starkey. 2003. Resistance to greenbug (Homoptera: Aphididae) biotype I in *Aegilops tauschii* synthetic wheats. *J. Econ Entomol* 96:1571-1576.
- Snedecor G. y Cochran G.W. 1989. *Statistical methods*. 8 ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa. U.S.A. 703 p.
- Solbrig O.T. y Simpson B.B. 1974. Components of regulation of a population of dandelions in Michigan. *J. Ecol.* 62: 473 – 486.
- Stam P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant J.* 3: 739–744
- Staskawicz, B. J., F. M. Ausubel, B. J. Baker, J. G. Ellis, y J. D. G. Jones. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Sci.* 268: 661 – 667.

- Stoetzel, M.B. 1987. Information and identification of *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae) and other aphids colonizing leaves of wheat and barley in the United States. *J. Econ. Entomol.* 80: 696-704.
- Tacaliti, M.S., Molina M., Mari S., Acevedo A., Giménez D., Chidichimo H., Tocho E., Vasicek A., Barragán M., Kamlofski C., Clúa A. y Castro A., 2002. El Índice Mitótico como parámetro de evaluación de la tolerancia al estrés inducido por áfidos. XI Reunión Latinoamericana de Fisiología Vegetal. Punta del Este, Uruguay. 241
- Tao W., Quisenberry S.S., Ni X., y Tolmay V. 2004. Aphid (Hemiptera: Aphididae) Resistnace in wheat near-isogenic lines. *J. Econo. Entomol.* 97, 2: 646-653.
- Teetes G.L., Schaefer C.A., Gipson J. R., McIntyre R.C., y Latham E.E. 1975. Greenbug resistance to organophosphorous insecticides on the Texas High Plains. *J. Econ. Entomol.* 68: 214 – 216.
- Thaler J.S. 1999. Jasmonate-inducible plant defences cause increased parasitism of herbivores. *Nature* 399:686-688
- Tjallingii's W.F. 1988. Electrical recording of stylet penetration activities. In: Minks AK, Harrewijn P, eds. Aphids, their biology, natural enemies and control, Vol. 2B. Amsterdam: *Elsevier*, 95–108.
- Turner J.G., Ellis C. y Devoto A. 2002. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14: S153–S164.
- Tyller, J.M., Webster J.A. y Smith E.L., 1985. Biotype E greenbug resistance in wheat strek mosaic virus-resistant wheat germplasm lines. *Crop Sci* 25: 686-388.
- Van der Westhuizen AJ, Qian X.M., Botha A-M. 1998a. Differential induction of apoplastic peroxidase and chitinase activities in susceptible and resistant wheat cultivars by Russian wheat aphid infestation. *Plant Cell Rep* 8: 132–137
- Van der Westhuizen AJ, Qian X.M., Botha A.M. (1998b) β -1,3- glucanases in wheat and resistance to the Russian wheat aphid. *Physiol Plant* 103: 125–131.
- Van Emden H.F., Eastop V.F., Hughes R.D. y Way, M.J. 1969. The ecology of *Myzus persicae*. *Annu. Rev. Entomol.* 14: 197-270.
- Van Emden, H.F. y Bashford M.A. 1976. The effect of leaf excision on the performance of *Myzus persicae* and *Brevicoryne brassicae* in relation to the nutrient treatment of the plants. *Physiol. Entomol.* 1: 67-71.

-
- Van Emden H. y Harrington R. 2007 (editores). *Aphids as Crop Pests*. CABI Publishing. . 717 páginas. ISBN 978 0 85199 819 0.
- Voothuluru P., Meng J., Khajuria C., Louis J., Zhu L., Starkey S., Wilde G., Baker C., Smith M. 2006 Categories and inheritance of resistance to Russian Wheat Aphid (Homoptera: Aphididae) Biotype 2 in a selection from wheat cereal introduction 2401. *Journal of Economic Entomology* 99: 1854-1861 doi: 10.1603/0022-0493-99.5.1854.
- Wagner J., Haas H.H.U. y Hurle K. 2002. Identification of ALS inhibitorresistant *Amaranthus* biotypes using polymerase chain reaction amplification of specific alleles. *Weed Res.* 42: 280 – 286.
- Walters M.C., Penn, F., du Toit F., Botha. T.C., Aalbersberg K., Mewitt P.H. y Broodryk, S.W. 1980. The Russian wheat aphid. Farming in South Africa. *Leaflet Series, Wheat G3*: 1-6.
- Walling L.L. 2000. The myriad plant responses to herbivores. *J. Plant Growth Reg.* 19: 195– 216.
- Webster J.A., y Starks K.J., 1984. Sources of resistance in barley to two biotypes of greenbug *Schizaphis graminum* (Rondani). Homoptera: Aphididae. *Protect. Ecol.* 6: 51-55.
- Webster J.A., K.J. Starks, y R.L. Burton, 1987. Plant resistance studies with Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae), a new United States wheat pest. *J. Econ. Entomol.* 80: 944-949.
- Webster, J.A. y D.R. Porter. 2000. Plant resistance components of two greenbug (Homoptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.* 87: 231-240.
- Weibull J.1988. Free amino acids in the phloem sap from oats and barley resistant to *Rhopalosiphum padi*. *Phytochemistry* 27: 2069-2072.
- Wellburn 1994 A.R. The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution, *J. Plant Physiol.* 144: 307–313.
- Weng Y. y Lazar M.D. 2002. Amplified fragment length polymorphism- and simple sequence repeat-based molecular tagging and mapping of greenbug resistance gene Gb3 in wheat. *Plant Breed* 121:218-223

- Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Van Montagu M., Inzé D. y Van Camp W. 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants. *EMBO J.* 16: 4806-4816.
- Wikteliuss S., Weibull J. y Pettersson J. 1990. Aphid host plant ecology: the bird cherry-oat aphid as a model. In "Aphid-plant genotype interactions", Campbell, R.K. y Eikenbary, R.D., eds., *Elsevier*, pp. 21-36.
- Wood E.A. 1961. Biological studies of a new greenbug biotype. *J. Econ. Entomol.* 54: 1171-1173.
- Wyatt I.J. y White P.F. 1977. Simple estimation of intrinsic increase rates for aphids and tetranychid mites. *Journal of Applied Ecology* 14: 757-766.
- Yencho G.C., Cohen M.B. y Byrne P.F. 2000. Applications of tagging and mapping insect resistance loci in plants. *Annu Rev Entomol* 45: 393-422
- Young N.S. 1999. A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding. *Mol. Breeding* 5: 505-510
- Zerene M.Z., M.D. Gaglevic y I. A. Ramírez. 1987. Un nuevo áfido de los cereales detectado en Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 48: 60-61.
- Zhu L.C. Smith C.M., Fritz A., Boyko E.V. y Flinn M.B. 2004. Genetic analysis and molecular mapping of a wheat gene conferring tolerance to the greenbug (*Schizaphis graminum* Rondani). *Theor. Appl. Genet* 109: 289-293.
- Zúñiga G.E., Salgado M.S. y Corcuera, L.J. 1985. Role of an indole alkaloid in the resistance of barley seedlings to aphids. *Phytochemistry* 24: 945-947.
- Zúñiga G.E. y Corcuera L.J. 1986. Effect of gamic acid in the resistance of barley seedlings to the aphid *Rhopalosiphum padi*. *Entomol. Exp. Appl.* 40: 259-262.