

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EVALUACIÓN DE TOLERANCIA DE CEBADA
A *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae)**

por

**Ivana Paola CARDOZO OLIVERA
Lucía Valeria MENESES MEDINA**

**TESIS presentada como uno
de los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2017**

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. Mag. Silvana Abbate

Ing. Agr. Horacio Silva

QF Andrés López

Fecha: 1.º de agosto de 2017

Autores:

Ivana Paola Cardozo Olivera

Lucía Valeria Meneses Medina

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento está dedicado a nuestras familias por brindarnos su apoyo incondicional durante toda la carrera.

A nuestra directora de tesis la Ing. Agr. Silvana Abbate por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo del trabajo.

También un especial agradecimiento al co-tutor PhD. Guillermo Moyna por toda su confianza y ayuda recibida.

A los Ing. Agr Horacio Silva, Agustina Armand Pilon, Sebastián Bartaburu y Andrés Locatelli por sus valiosos aportes, junto al ayudante del laboratorio de entomología Señor Noel García.

A nuestros compañeros y amigos con quienes compartimos durante toda la carrera momentos de intenso trabajo y estudio.

Al Laboratorio del Departamento de Química del Litoral por permitirnos utilizar sus instalaciones y a todo el personal del mismo por su buena disposición especialmente una extensa gratitud a Andrés López por su paciencia, confianza y animo infundido durante las tareas realizadas.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1 OBJETIVO GENERAL	1
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	2
2.1 EL CULTIVO DE CEBADA A NIVEL MUNDIAL Y NACIONAL	2
2.2 LOS ÁFIDOS O PULGONES (HEMIPTERA: APHIDIDAE).....	2
2.2.1 <u>Ciclo de vida y reproducción</u>	2
2.2.2 <u>Daño e importancia económica</u>	3
2.2.3 <u>Medidas de manejo de los áfidos</u>	4
2.3 IMPORTANCIA DE LOS ÁFIDOS (HEMIPTERA: APHIDIDAE) EN LOS SISTEMAS AGRÍCOLAS PASTORILES DEL URUGUAY.....	5
2.4 “PULGÓN VERDE DE LOS CEREALES” <i>Schizaphis graminum</i> (RONDANI) .5	5
2.4.1 <u>Descripción morfológica</u>	6
2.4.2 <u>Ciclo y reproducción</u>	8
2.4.3 <u>Daño e importancia económica</u>	8
2.4.4 <u>Enemigos naturales</u>	8
2.4.5 <u>Control</u>	9
2.5 INTERACCIÓN PLANTA-INSECTO	9
2.6 ANÁLISIS METABOLÓMICO BASADO EN RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) Y SU APLICACIÓN AL ESTUDIO DE MATRICES DE INTERÉS AGROPECUARIO	11
2.6.1 <u>Antecedentes del estudio metabolómico mediante uso de RMN aplicado al efecto de plagas en cultivos</u>	11
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	12
3.1 TOLERANCIA	12
3.1.1 <u>Cría de insectos</u>	12
3.1.2 <u>Material vegetal</u>	12
3.1.3 <u>Tratamientos y diseño experimental</u>	13
3.1.4 <u>Determinaciones</u>	16
3.1.5 <u>Hipótesis</u>	17
3.1.5.1 Hipótesis biológica	17
3.1.5.2 Hipótesis estadística	17
3.1.6 <u>Análisis estadístico</u>	18

3.2 DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES METABÓLICOS DE LOS GENOTIPOS DE CEBADA	18
3.2.1 <u>Material vegetal</u>	18
3.2.2 <u>Metodología de extracción</u>	19
3.2.3 <u>Análisis por RMN</u>	20
3.2.4 <u>Determinaciones</u>	20
3.2.5 <u>Hipótesis</u>	21
3.2.5.1 Hipótesis biológica	21
3.2.5.2 Hipótesis estadística	21
3.2.6 <u>Análisis estadístico</u>	21
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	22
4.1 TOLERANCIA a <i>Schizaphis graminum</i>	22
4.1.1 <u>Índice de clorofila</u>	22
4.1.2 <u>Biomasa aérea (mg de materia seca)</u>	23
4.2 CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL METABÓLICO DE CEBADA ASOCIADO A ENSAYOS DE ANTIXENOSIS.....	27
5. <u>CONCLUSIONES</u>	32
6. <u>RESUMEN</u>	33
7. <u>SUMMARY</u>	34
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	35
9. <u>ANEXOS</u>	47

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Umbral de daño económico para tres especies de áfidos en trigo.....	4
2. Índice de clorofila basal y apical de las hojas de cebada para los diferentes genotipos evaluados medidos con SPAD.....	22
Figura No.	
1. Colonia de <i>Schizaphis graminum</i>	6
2. Hembras ápteras	7
3. Hembra alada	7
4. Unidad experimental	14
5. Diseño experimental en bloques al azar.....	14
6. Croquis del diseño experimental.....	15
7. Determinación de niveles de clorofila mediante SPAD.....	17
8. Diagrama de extracción vegetal con solventes	19
9. Comparación de medias de producción de biomasa aérea expresado como mg/MS según tratamiento y genotipo	24
10. Espectro de ¹ H (500 MHz) de un extracto acuoso de cebada en D ₂ O.....	27
11. Análisis de componentes principales a partir de datos de las fases orgánicas	28
12. Análisis de componentes principales de perfiles acuosos por ¹ HRMN de extractos de hojas de cebada.....	28
13. Análisis por PLS de perfiles acuosos por ¹ HRMN de extractos de hojas de cebadas	29
14. Análisis por O-PLS de perfiles acuosos por ¹ HRMN de extractos de hojas de cebadas	29

15. Valores de carga del O-PLS.....	30
-------------------------------------	----

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de cebada en Uruguay ha tenido en los últimos años un importante crecimiento con respecto al área sembrada, siendo en la actualidad el segundo cultivo de invierno luego del trigo. Su destino a nivel nacional es casi exclusivamente la producción de malta para la elaboración de cerveza. Para mantener la competitividad agrícola del cultivo es esencial contar con genotipos bien adaptados agronómicamente, capaces de expresar buena aptitud en el malteo y aptos para tolerar diversos factores reductores del rendimiento.

Entre los diferentes agentes que afectan la sanidad de la cebada, ciertos insectos fitófagos cumplen un rol clave en la determinación de la productividad y la calidad. El control químico es la práctica más utilizada por los productores para manejar las distintas especies de insectos plaga, lo que presenta una serie de desventajas debido a que es costosa, contaminante y genera una presión de selección de los individuos resistentes de la población. En este sentido, el uso de variedades resistentes resulta una estrategia eficaz y ambientalmente amigable, disminuyendo o incluso eliminando la necesidad de recurrir a las aplicaciones de insecticidas. De esta manera, se reduce el contenido de residuos tóxicos en los alimentos y en el medio ambiente, sin alterar el balance entre los insectos plaga y sus enemigos naturales y brindando medidas compatibles con el control biológico y cultural.

Los áfidos o pulgones (Hemíptera: Aphididae) son insectos frecuentes en el sistema agrícola uruguayo y se consideran plaga en el cultivo de cebada. Entre las especies presentes *Schizaphis graminum* (pulgón verde de los cereales) puede ocasionar daños directos e indirectos provocando mermas del rendimiento del cultivo. La magnitud de las pérdidas varía en función del estado fenológico al momento de la infestación, la presencia o no de enemigos naturales y la susceptibilidad o resistencia del material.

1.1 OBJETIVO GENERAL

Generar información necesaria para la identificación de genotipos de cebada resistentes a *Schizaphis graminum* con el fin de contribuir a un Manejo Integrado de Plagas (MIP) en dicho cultivo en Uruguay.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la tolerancia de los siguientes genotipos de cebada: Arrayán, Perún, Ceibo, Karl, F 183, F 329, C9614 y Ambev 59 para *Schizaphis graminum* (pulgón verde de los cereales).
- Caracterizar el perfil metabólico de los genotipos de cebada: Ceibo, Karl, F 183; F 329, C9614 y Ambev 59 con el fin de identificar posibles metabolitos asociados a los mecanismos de resistencia por antixenosis para *Schizaphis graminum*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 EL CULTIVO DE CEBADA A NIVEL MUNDIAL Y NACIONAL

La cebada cervecera (*Hordeum vulgare* L.) es un cultivo que se encuentra ampliamente difundido en todo el mundo, ocupando el cuarto lugar a nivel mundial en el área sembrada, después del trigo, el maíz y el arroz (FAO, 2015). A nivel nacional la cebada es el segundo cultivo de importancia invernal luego del trigo. El área sembrada en el año 2016 fue de 190.000 hectáreas aproximadamente y el rendimiento de 3568 kg/ha (MGAP. DIEA, 2016).

El destino de la producción de cebada a nivel nacional es casi exclusivamente la producción de malta, lo que impone varias y crecientes restricciones en términos de requerimientos de calidad por parte de la industria. Para mantener la competitividad agrícola del cultivo es esencial contar con genotipos bien adaptados agrónomicamente, capaces de expresar altas aptitudes en el malteo y aptos para tolerar diversos factores reductores del rendimiento durante su ciclo de desarrollo, como los son los insectos plaga.

2.2 LOS ÁFIDOS O PULGONES (HEMIPTERA: APHIDIDAE)

Los áfidos son insectos pequeños de cuerpo blando pertenecientes al orden Hemiptera, suborden Homóptera y familia Aphididae. Se caracterizan por la presencia en el abdomen de un par de cornículos o sifones y una cauda. Los cornículos se insertan dorso-lateralmente entre el quinto y el sexto segmento abdominal (Bentancourt y Scatoni, 2010). La cauda se encuentra en el extremo del abdomen, es muy variable en su forma y tiene valor sistemático, junto con los cornículos y otros caracteres (Blackman y Eastop, 1984). Pueden ser ápteros o alados y cuando las alas están presentes, las anteriores son de mayor tamaño que las posteriores y presentan pterostigma (celdilla oscura en el borde anterior del ala, ubicada entre el centro y extremo distal). Viven en colonias y se ubican en distintos lugares de las plantas según las especies (Ribeiro et al., 2013).

2.2.1 Ciclo de vida y reproducción

La reproducción en áfidos se caracteriza por ser vivípara y por alternar varias generaciones de reproducción asexual (partenogénicas, Bentancourt y Scatoni, 2010). Debido a su alta prolificidad y a su ciclo biológico corto, en condiciones favorables estos insectos desarrollan colonias numerosas en poco tiempo. Estas colonias están formadas por hembras aladas y ápteras y ninfas de diferentes tamaños (Bentancourt y Scatoni, 2010). Los individuos alados surgen en la colonia en condiciones desfavorables como la mala calidad del alimento y pueden volar centenas de kilómetros con la ayuda del viento, de esta forma logran diseminarse hasta colonizar nuevas plantas en busca de alimento

(Salvadori et al., 2009). En Uruguay donde los inviernos son benignos, el ciclo biológico es incompleto (anholocíclico) y no se manifiesta la etapa sexual (Bentancourt y Morelli, 2009). Los áfidos de cereales de invierno se desarrollan y multiplican mejor a temperaturas entre 20 y 22 °C. El clima frío prolonga su ciclo de vida y retardan su multiplicación. Existe una correlación muy importante entre algunos factores ambientales (baja humedad relativa del ambiente y falta de precipitaciones) y la ocurrencia de infestaciones más severas de estos insectos (Salvadori et al., 2009).

2.2.2 Daño e importancia económica

Los áfidos tienen gran importancia agronómica y económica porque comprometen la productividad de los cultivos. Esta plaga provoca daños directos e indirectos que provocan mermas de rendimiento. Los daños directos son ocasionados durante la alimentación al succionar el floema de las plantas introduciendo un estilete que les permite perforar el tejido epidérmico. Además incorporan saliva tóxica y extraen grandes cantidades de fotoasimilados lo que provoca manchas cloróticas, necrosis, desecación y muerte de plántulas (Ribeiro et al., 2013). Tanto las ninfas como los adultos extraen nutrientes de la planta y alteran el balance de las hormonas de crecimiento debilitándola y deteniendo su crecimiento (Dughetti, 2012).

Los daños indirectos de los áfidos sobre las plantas se generan por transmisión de virus, en forma persistente, durante la alimentación como por ejemplo el Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV), transmitido principalmente por *Metopolophium dirhodum* (Walker), y *Ropalosiphum padi* (Linneo) y Cereal Yellow Dwarf Virus (CYDV) (Salvadori et al., 2009). Otro de los daños indirectos está asociado a la producción de melaza, generada por la excreción del exceso de azúcar que provocan los áfidos al alimentarse, y que al depositarse sobre las hojas favorece el desarrollo de diversos hongos saprófitos como por ejemplo la fumagina (Bentancourt, 2004).

La severidad de los daños depende de la especie de áfido involucrada, la intensidad del ataque y el estado de desarrollo del cultivo (Ribeiro et al., 2013). Algunas especies son muy específicas, y se alimentan de una única especie de planta o cultivo (monófagas), mientras que otras se alimentan de un gran número de especies (polífagas, Ribeiro et al., 2013).

2.2.3 Medidas de manejo de los áfidos

El correcto manejo de áfidos debe realizarse implementando un programa de manejo integrado basado en diferentes estrategias de control. En Uruguay, los pulgones integran redes tróficas complejas en las que intervienen la mayoría de los cultivos y pasturas de los sistemas agrícola pastoriles (Ribeiro et al., 2013). Por lo tanto, el control químico en los diversos recursos debe ser muy cuidadoso, ya que puede tener consecuencias negativas sobre los controladores naturales.

El adecuado manejo de áfidos debería realizarse en base al seguimiento de las poblaciones y sus enemigos naturales a través de sucesivos muestreos. Además se deben tener en cuenta las condiciones climáticas y cómo éstas afectan tanto al cultivo como a los insectos plaga, ya que estos factores modifican el umbral de daño económico (UDE). En caso de superarse el UDE, se debería recurrir a insecticidas selectivos, procurando minimizar el impacto hacia los enemigos naturales. La selectividad del tratamiento se puede lograr también realizando aplicaciones de insecticidas georreferenciadas, procurando afectar solamente los focos de infestación (Ribeiro et al., 2013).

Los umbrales de daño que se utilizan en Uruguay para las tres especies de áfidos más frecuentes en el país (Cuadro No. 1) son adoptados de información generada en Brasil EMBRAPA (2011). Los mismos fueron realizados para el cultivo de trigo, pero son utilizados por los productores también en cebada dada la falta de información específica generada para dicho cultivo

Cuadro No. 1. Umbral de daño económico para tres especies de áfidos en trigo.

Especie de áfido	Estados de desarrollo del trigo		
	Emergencia-macollaje	Elongación-embuche	Espigazón grano masa
<i>Schizaphis graminum</i>	10% plantas infestadas		
<i>Metopolophium dirhodum</i>		10 pulgones/ macollo	
<i>Sitobion avenae</i>			10 pulgones/ espiga

Fuente: EMBRAPA (2011)

2.3 IMPORTANCIA DE LOS ÁFIDOS (HEMIPTERA: APHIDIDAE) EN LOS SISTEMAS AGRÍCOLAS PASTORILES DEL URUGUAY

En nuestro país, los pulgones comenzaron a causar problema en cereales de invierno a partir de 1937, cuando se constató la presencia de *Schizaphis graminum* (Rondani, Silveira Guido y Conde, citados por Ribeiro et al., 2013). Hasta la década de los ochenta las poblaciones de áfidos se mantuvieron por debajo de los umbrales de daño económico. Esto debido a la presencia de una amplia red de enemigos naturales introducidos con los programas de control biológico clásico, realizados en Brasil, Argentina y Chile, que luego colonizaron los sistemas agrícolas pastoriles uruguayos. Las especies que se encontraban en cultivos de invierno tradicionalmente dominaban diferentes etapas fenológicas: *Schizaphis graminum* (Rondani) predominaba en los estadios más tempranos del cultivo durante la implantación; *Metopolophium dirhodum* (Walker) se encontraba más frecuentemente durante el macollaje y encañazon y *Sitobion avenae* (Fabricius) aparecía en la etapa reproductiva.

A partir del surgimiento de la siembra directa, muchos productores adoptaron la práctica de aplicar piretroides en forma sistemática. Esto desbalanceó nuevamente el sistema y no solo ocurrieron infestaciones de las especies tradicionales sino que comenzaron a aparecer otras que antes eran muy esporádicas, a causa de la eliminación de sus controladores biológicos (Ribeiro et al., 2013). Estas especies fueron: *Rhopalosiphum padi* (Linneo), *Rhopalosiphum maydis* (Fitch) (Bentancourt y Scatoni, 1999) y más recientemente *Sipha maydis* (Passerini) en el litoral oeste uruguayo (Carballo, citado por Ribeiro et al., 2013).

2.4 “PULGÓN VERDE DE LOS CEREALES” *Schizaphis graminum* (RONDANI)

Schizaphis graminum fue descrito por primera vez en Italia en 1852 y en 1863 fue estudiado en el cultivo de sorgo en el mismo país, posteriormente en África, Europa y América (Cruz, 1986). A nivel mundial es una plaga importante en los cultivos de trigo, avena, cebada y centeno, habiendo sido identificado en más de 60 especies de gramíneas (Cruz, 1986). Es una especie cosmopolita que forman numerosas colonias (Figura No. 1) y se encuentra difundida en todo el Uruguay. Afectando avena, cebada, centeno, trigo y algunas gramíneas silvestres y es la principal plaga de avena y sorgo (Bentancourt y Scatoni, 2010).

2.4.1 Descripción morfológica

Los adultos ápteros (Figura No. 2) son pequeños, de cuerpo oval alargado que mide entre de 1,3 a 2,2 mm de longitud, presenta color verde esmeralda con una línea media más oscura en el dorso. Posee antenas castañas que no sobrepasan la base de los cornículos. (Ribeiro et al., 2013). Estos son moderadamente largos, del mismo color que el cuerpo y negros en su parte distal. La cauda es piriforme con dos cerdas negras a cada lado. Las patas son amarillas con los tarsos negros (Colazo et al., 2012).



Figura No. 1. Colonia de *Schizaphis graminum*
Fuente: Joshi y Poorani (2012)



Figura No. 2. Hembras ápteras
Fuente: Schwarting (2000)

Los alados (Figura No. 3) tienen la cabeza y el protórax amarillento parduzco, el abdomen verde amarillento a verde oscuro, con los lóbulos torácicos negros. Los sifones también son claros con los extremos oscuros, como en las formas ápteras. Tanto ápteros como alados son pequeños (Dughetti, 2012).



Figura No. 3. Hembra alada
Fuente: Nuessly (2014)

2.4.2 Ciclo y reproducción

En Uruguay la mayor abundancia de *Schizaphis graminum* ocurre a fines de verano e inicio de otoño. En primavera puede encontrarse nuevamente en general acompañado por otras especies. Las hembras de esta especie pueden reproducirse aún con temperaturas bajas. Inician la reproducción una o dos semanas luego de haber alcanzado el estado adulto y en tres o cuatro semanas originan de sesenta a setenta descendientes. Pasa el invierno sobre gramíneas, tanto cultivadas como silvestres (Bentancourt y Scatoni, 2010).

2.4.3 Daño e importancia económica

A nivel mundial el pulgón verde es considerado una de las plagas de gran importancia económica en los cultivos cerealeros de muchos países y se encuentra ampliamente distribuido en Asia, África, Australia y América. Los síntomas observados comienzan como lesiones cloróticas y necróticas alrededor de los sitios de alimentación, afectando la implantación del cultivo, pudiendo provocarla muerte de plantas (Bentancourt y Scatoni, 2010). Ocasiona daños directos e indirectos, dada su capacidad de transmisión de virus (Pollard 1973, Tatchell 1990). Los daños directos causados se asocian a sustancias tóxicas que se inyectan desde la saliva durante la alimentación, lo cual destruye las células vegetales (Ribeiro et al., 2013).

Por otra parte es responsable de la transmisión del virus del mosaico, del enanismo del maíz, el enanismo amarillo de la cebada y predispone al cultivo de sorgo a la pudrición carbonosa (Ricci y Kahan, 2005).

2.4.4 Enemigos naturales

Los áfidos en Uruguay cuentan con una amplia red de enemigos naturales que abarca parasitoides, predadores y hongos entomopatógenos. Los áfidos cumplen un rol importante en el mantenimiento de poblaciones de predadores por ser las primeras plagas en aparecer al inicio del ciclo del cultivo y ser una de las principales fuentes de alimentación, en ese período hasta que se presentan otras plagas en el sistema (Bentancourt y Scatoni, 2010). Para el país se cita principalmente ciertas especies de la familia Braconidae y Aphelinidae (Bentancourt y Scatoni, 2001). Los predadores de las familias Coccinellidae (Coleoptera), Syrphidae (Diptera), Chrysopidae (Neuroptera) y algunas chinches predadoras (Ribeiro et al., 2013).

Entre los enemigos naturales de *Schizaphis graminum*, se destacan los parasitoides: *Diaretus plesiorapae* (Blanchard, 1940), *Aphidius platensis* (Brethes) *Aphidius colemani* (Viereck, 1912). Según los estudios realizados en Paysandú, *A. colemani* es el parasitoide más frecuente en gramíneas, y el segundo en importancia en leguminosas (Alzugaray et al. 2010, Silva et al. 2012). La mayor abundancia de parasitoides se da en períodos frescos (otoño-invierno). Su actividad depende de la temperatura y de la disponibilidad de áfidos (Langer y Hence, 2000). Los predadores frecuentemente asociados a los áfidos en el país son *Tropiconabis capsiformis* (Germar), *Orius tristicolor* (White) y *Orius insidiosus* (Say), *Eriopis connexas* (Germar), *Chrysoperla externa* (Hagen) en cebada, avena, soja, alfalfa y campo natural (Ribeiro, 2010).

Los hongos entomopatógenos son importantes factores de mortalidad de áfidos en el campo (Keller, 2006). Con frecuencia causan epizootias que pueden rápidamente reducir las densidades de áfidos (Steinkraus et al., 1995). Los cuerpos pequeños y blandos (débilmente esclerotizados) de los áfidos hacen que presenten relativamente pocas barreras a la penetración de hongos patógenos (Feng et al., 1992).

Entre los hongos entomopatógenos que afectan a *Schizaphis graminum* se citan: *Pandora neoaphidis* (Remaudière y Hennebert) Humber; *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko; y *Neozygites fresenii* (Nowakowski) Remaudière y Keller (Manfrino, 2004).

2.4.5 Control

Durante el período de emergencia a macollaje las plantas de cebada son más propensas a los daños del pulgón verde de los cereales y en general los enemigos naturales son escasos o poco eficientes porque el cultivo no les brinda los recursos necesarios para su supervivencia. El control debe realizarse en función al umbral de daño (Cuadro No.1), cuyo valor de referencia puede variar en función de la presencia y efecto de los enemigos naturales, y si las condiciones climáticas favorecen a la población plaga o al desarrollo del cultivo (Ribeiro et al., 2013).

2.5 INTERACCIÓN PLANTA-INSECTO

Las plantas presentan distintos mecanismos que les permiten defenderse de los insectos (Kogan, 1994), por este motivo, mediante el análisis de las interacciones entre los insectos y las plantas se pueden lograr un eficaz manejo de plagas obteniendo resultados duraderos y estables. El uso de variedades resistentes es una medida efectiva y sustentable para el control de plagas, la cual explota las estrategias presentes en los hospedantes para defenderse de los agresores (Castro et al., 1999). La caracterización de la resistencia a la plaga es una herramienta para la obtención de variedades resistentes a

partir del mejoramiento genético, que es uno de los componentes principales del Manejo Integrado de Plagas (Lage et al., 2003).

La resistencia de las plantas al ataque de insectos se define como la cantidad relativa de elementos heredables de la planta que influyen sobre la resistencia al daño hecho por los insectos (Teetes, 1975). Según Painter (1951), la resistencia puede explicarse por diferentes mecanismos: antixenosis (también llamada no preferencia), antibiosis y tolerancia.

El término antixenosis (no preferencia) es usado para describir el grupo de caracteres de las plantas y de respuestas de los insectos que llevan a aceptar o rechazar una planta particular para la oviposición, la alimentación o refugio, o una combinación de estos tres elementos (Painter, 1951).

Se entiende por antibiosis a aquellos efectos adversos en la biología de los insectos que ocurren cuando el mismo utiliza determinada planta hospedante para su alimentación (Painter, 1951). Los efectos sobre el insecto abarcan entre otros la reducción de la fecundidad, una disminución del tamaño corporal o el incremento de la mortalidad.

La tolerancia es un mecanismo de resistencia por el cual la planta demuestra cierta capacidad para crecer y reproducirse o para compensar en cierta medida los daños causados por una población de insectos aproximadamente igual a aquella que causaría mermas de diferente índole en un hospedante susceptible (Painter, 1951).

A nivel mundial, se han identificado genes de resistencia a *S. graminum* en cebada (Gardenhire et al. 1973, Merkle et al. 1987). En estudios realizados en Argentina se caracterizó la resistencia de este áfido en una población de líneas recombinantes de cebada en base a la evaluación de antixenosis, antibiosis y tolerancia, pudiendo identificar genotipos resistentes (Tocho et al., 2012). En Uruguay, el Instituto Nacional de Investigación Agropecuario (INIA), ha realizado una caracterización de diferentes híbridos de sorgo en relación a su capacidad de resistencia para *S. graminum* INIA (1991). Pero hasta la actualidad, no existe información de los diferentes genotipos de cebada sembrados en el país, en relación a la resistencia a uno de los pulgones más frecuentes y dañinos para dicho cultivo.

2.6 ANÁLISIS METABÓLICO BASADO EN RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) Y SU APLICACIÓN AL ESTUDIO DE MATRICES DE INTERÉS AGROPECUARIO

Las moléculas involucradas en procesos bioquímicos aportan una gran cantidad de información sobre el estado y función de un sistema biológico. El proceso de monitorear y evaluar las variaciones en el pool de estas moléculas o metabolitos se denomina análisis metabolómico o metabólico. Esta disciplina engloba la comprensión simultánea y ordenada de los perfiles de múltiples niveles de metabolitos y sus cambios sistemáticos o temporales en una matriz biológica (Roessner y Bowne, 2009). Para ello se utilizan diferentes técnicas analíticas, como por ejemplo la cromatografía gaseosa por detección de masas (GCMS) o cromatografía líquida con detección por masas (LC-MS) y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN, Lindon et al., 2007).

2.6.1 Antecedentes del estudio metabólico mediante uso de RMN aplicado al efecto de plagas en cultivos

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) son únicos y específicos para cada compuesto (Verpoorte et al., 2007) y permiten identificar metabolitos biológicos sin la necesidad de conocerlos a priori (Fan y Lane, 2008). En este sentido, mediante técnicas de estudio metabólico basado en el empleo de RMN, se puede identificar metabolitos asociados a la resistencia de las plantas frente a diferentes plagas. Esto permitiría a su vez seleccionar cultivares resistentes en base a la presencia o ausencia de dicho metabolito específico.

El efecto de insectos fitófagos sobre las plantas ha sido estudiado mediante RMN en insectos masticadores como orugas de *Plutella xylostella* y *Spodoptora exigua* en *Brassica rapa* (Widarto et al., 2006). En híbridos de *Senecio jacobaea* y *Senecio aquaticus* infestados por *Frankliniella occidentalis* se han encontrado diferencias entre los perfiles metabolómicos de genotipos resistentes en comparación con los susceptibles (Leiss et al., 2009). En cultivares silvestres de tomate se ha identificado en cultivares silvestres de tomates metabolitos asociados a respuestas de defensa de la planta cuando resulta dañada por *F. occidentalis* (Mirnezhad et al., 2009), estando estos compuestos ausentes en cultivares comerciales.

Hasta el presente, no existen estudios donde se hayan utilizado técnicas de RMN con el fin de caracterizar posibles diferencias en los perfiles metabólicos asociados a los mecanismos de resistencia por antixenosis (no preferencia) a insectos fitófagos. Este tipo de abordaje permitiría identificar genotipos que sin haber sido previamente afectados por la plaga en cuestión, presenten per se uno o varios metabolitos que estén vinculados con este mecanismo. Esta información resultaría de suma importancia para enriquecer los programas de mejoramiento genético de numerosos cultivos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 TOLERANCIA

3.1.1 Cría de insectos

Se instaló una cría de *Schizaphis graminum* en el Laboratorio de Entomología de la Estación Experimental Dr. Mario A. Cassinoni (EEMAC) de la Facultad de Agronomía. Para iniciar la misma, los áfidos fueron colectados de parcelas de avena del campo experimental de la EEMAC durante el otoño. Las poblaciones fueron criadas y mantenidas sobre cebada susceptible (cultivar Danielle) en condiciones controladas de luz y temperatura ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y 14 horas de fotoperíodo). La cría fue mantenida hasta lograr más de 1280 ninfas, número necesario para las evaluaciones de tolerancia.

3.1.2 Material vegetal

Se evaluaron 8 genotipos de cebada provenientes de una selección, la misma se realizó a partir de variedades comercialmente utilizadas en Uruguay, líneas avanzadas de los programas nacionales de mejoramiento (Facultad de Agronomía e INIA) y ancestros comunes de muchas variedades utilizadas a nivel nacional y fuentes de calidad maltera.

Los genotipos evaluados fueron los siguientes:

- Karl (F 23)
- F 183
- F 329
- C9614
- Ambev 59
- Ceibo (F 32)
- Perún (F 21)
- Arrayán (F 35)

3.1.3 Tratamientos y diseño experimental

Se evaluaron dos tratamientos:

- Plantas infestadas artificialmente con *Schizaphis graminum*
- Plantas sin infestación (testigo).

Los 8 genotipos de cebada fueron sembrados en el invernáculo de EEMAC. Se utilizaron macetas individuales para cada uno de los materiales evaluados, sembrando dos plantas por maceta. Las macetas fueron mantenidas en invernáculo, regadas periódicamente y una vez emergidas fueron fertilizadas.

El ensayo se instaló cuando las plántulas tenían dos hojas completamente expandidas. Para ello se colocaron 20 áfidos por maceta (10 por cada planta) en los tratamientos con pulgón. A todas las macetas de ambos tratamientos se les colocaron jaulas cubiertas con tela de gual para impedir la fuga y contaminación de las macetas con insectos. En el caso de las macetas testigo, las jaulas y el gual fueron colocados para descartar el posible efecto de interferencia de luz sobre el crecimiento de las plantas. Las jaulas se mantuvieron durante 10 días, luego de los cuales, los áfidos fueron retirados.

Para evaluar tolerancia, se utilizó un diseño en bloques completos al azar (DBCA) con 8 bloques (Figuras No. 5 y No. 6), siendo cada maceta una unidad experimental (Figura No. 4) y teniendo 8 sub muestras por bloque para cada tratamiento.



Figura No. 4. Unidad experimental



Figura No. 5. Diseño experimental en bloques al azar

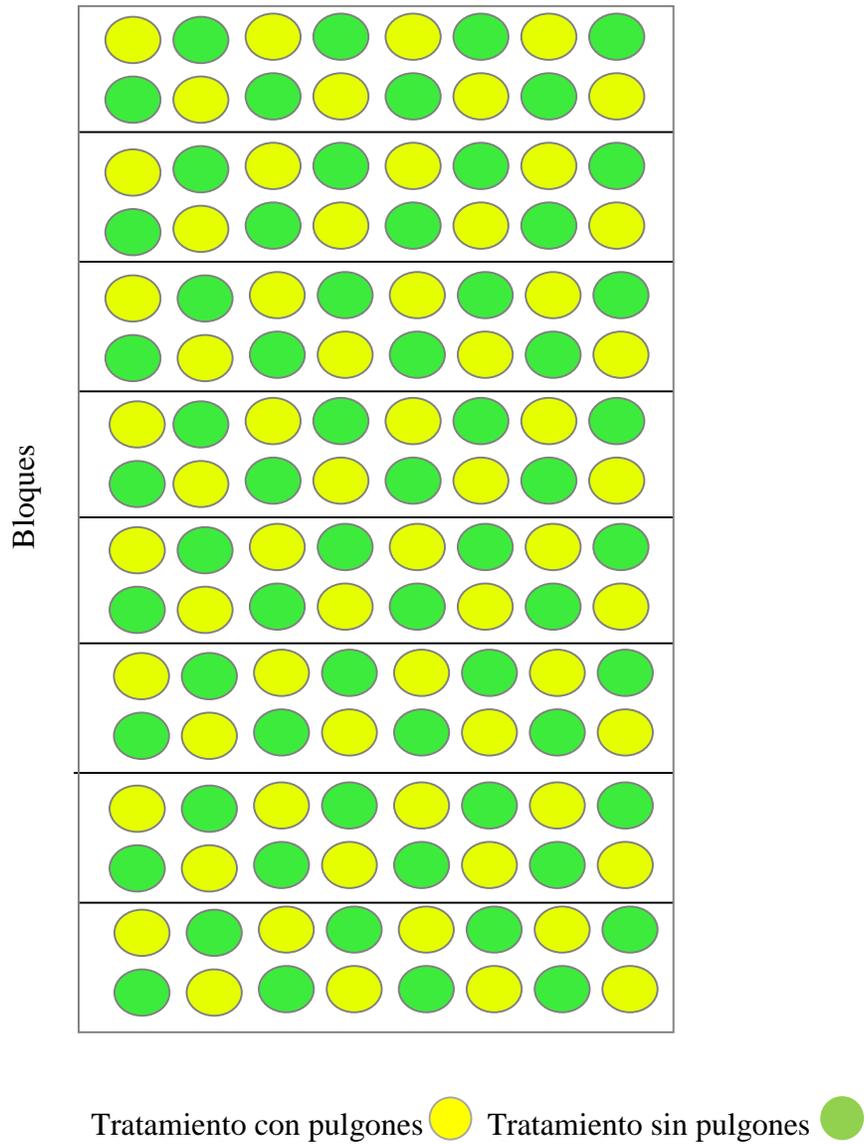


Figura No. 6. Croquis del diseño experimental

3.1.4 Determinaciones

La tolerancia de los genotipos de cebada a *Schizaphis. graminum* se estimó mediante la determinación del efecto del insecto en el contenido de clorofila foliar y la biomasa aérea. Dichas mediciones tienen como objetivo detectar cambios en el crecimiento vegetal debidos al daño generado por el áfido.

El índice de clorofila se estimó mediante la utilización de un Minolta SPAD (soil plant analysis development, Figura No. 7). Este instrumento estima la cantidad relativa de clorofila de acuerdo a la absorbancia de la hoja en dos regiones de longitud de onda (azul 400-500 nm y rojo 600-700 nm).

Las muestras de SPAD fueron realizadas en dos partes de la hoja, una en la zona más próxima a la inserción con el tallo (SPAD basal) y otra cercana al extremo distal de la misma (SPAD apical). Dichas medidas se realizaron previo a la infestación con los áfidos y 10 días posteriores a la misma (pre y post tratamiento respectivamente).

La biomasa aérea de las plantas se cuantificó una vez alcanzado los 10 días de infestación y habiendo retirado los pulgones de cada plántula. Las plántulas fueron cosechadas y secadas en estufa a 60°C durante 48 horas. Posteriormente, cada muestra fue pesada utilizando una balanza de precisión.



Figura No. 7. Determinación de niveles de clorofila mediante SPAD

3.1.5 Hipótesis

3.1.5.1 Hipótesis biológica

Los distintos genotipos de cebada evaluados presentan diferente grado de tolerancia al pulgón verde de los cereales.

3.1.5.2 Hipótesis estadística

- $H_0: T_{cp} = T_{sp}$
- $H_a: \text{al menos un } T_{cp} \neq T_{sp}$

3.1.6 Análisis estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente mediante el programa Infostat, utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Donde:

μ media general

τ_i efecto del i-ésimo tratamiento (1-2)

β_j efecto del j-ésimo bloque (1-8)

ϵ_{ij} error experimental del tratamiento i en el bloque j

$\epsilon_{ij} \sim N ID (0, \sigma^2)$.

Las variables de clasificación utilizadas para el análisis Anava fueron: tratamientos, bloques, genotipos y la interacción genotipo por tratamiento. Las diferencias entre tratamientos fueron determinadas utilizando el test de Tukey (p-valor <0,10).

3.2 DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES METABÓLICOS DE LOS GENOTIPOS DE CEBADA

En el laboratorio del departamento de química del litoral, se realizaron los análisis empleando métodos quimiométricos basados en 1H RMN de los perfiles metabólicos de diferentes genotipos de cebada. Se analizaron extractos orgánicos y acuosos de láminas foliares de cebada utilizando como herramienta analítica la resonancia magnética nuclear (RMN). Los resultados obtenidos fueron contrastados con la respuesta de los genotipos en ensayos de antixenosis.

3.2.1 Material vegetal

Se evaluaron seis de los ocho genotipos de cebada utilizados en la evaluación de tolerancia: Karl, F 183, F329, C9614, Ambev 59, Ceibo. Estos materiales fueron caracterizados en ensayos previos de evaluación de resistencia por antixenosis, utilizando el método de libre elección de hospederos (Castro et al., 2001). Los materiales que presentaron resistencia por antixenosis fueron: Karl y C9614, los genotipos susceptibles: F 183, F 329, Ceibo y Ambev 59 que presentó un comportamiento intermedio por lo que se decidió no incluirlo en los análisis multivariados.

Los diferentes genotipos fueron sembrados en tubos falcón de 50 ml con un sustrato de arena y vermiculita, se fertilizaron y regaron mantenido las plántulas hasta que las mismas alcanzaron el estado de dos hojas expandidas. Luego se procedió a cortar las

láminas foliares para trabajar con aproximadamente 300 gr de material para procesar. Para la obtención de los 300 gr de material vegetal se emplearon laminas foliares de una planta, contenida en el tubo falcón. Luego de extraído el material se mantuvieron en una heladera de frio seco a -80°C hasta el momento de ser procesadas.

3.2.2 Metodología de extracción

Las láminas foliares fueron trituradas en un mortero. Luego se realizó una extracción empleando una mezcla con cloroformo (CHCl_3), agua (H_2O) y metanol (MeOH). Cada muestra fue centrifugada durante 20 minutos a 3500 rpm con el fin de obtener las fases orgánica y acuosa por separado. Luego se procesó cada fase por separado (Figura No. 8), hasta que los extractos fueron retomados en cloroformo deuterado (CDCl_3) o agua deuterada (D_2O) y se les realizó espectros de protón (^1H RMN) con y sin supresión de agua en un equipo Bruker Avance 500 MHz.

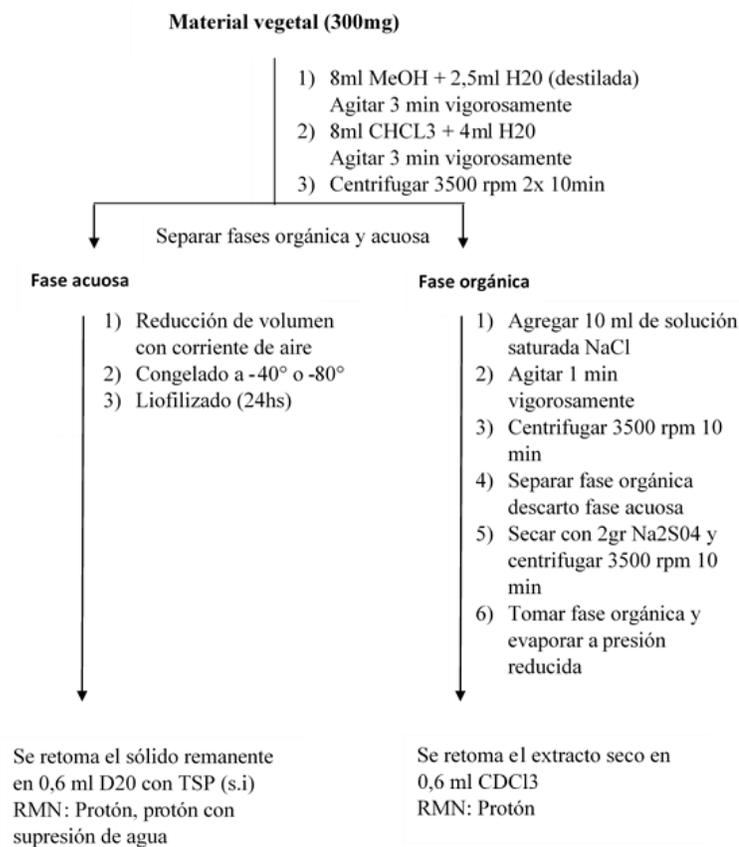


Figura No. 8. Diagrama de extracción vegetal con solventes
Fuente: adaptado de Choi et al. (2007)

3.2.3 Análisis por RMN

El análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizó mediante experimentos de protón con y sin supresión de agua. Se efectuaron 64 escanes, procurando mejorar la relación señal/ruido (Anderson et al., 2011). Posteriormente a todos los espectros se les corrigió manualmente la fase y línea de base. Luego se les realizó un binning para cortar el espectro en secciones de 0.001 ppm, y de esta forma reducir su tamaño para un mejor análisis (Van den Berg et al., 2006). Previo al análisis estadístico fueron alineados y normalizados al total del área y luego se exportó la matriz de datos para dicho análisis.

3.2.4 Determinaciones

Se aplicó la metabolómica basada en la resonancia magnética nuclear (RMN) a los 6 genotipos de cebada estudiados, con el objetivo de lograr diferenciarlos en base a sus perfiles metabólicos. Se realizaron 10 réplicas de cada uno, dividiendo los set de datos para los análisis estadísticos por diferentes regiones del espectro: fenólicas, azúcares y aminoácidos.

Una vez extraídas todas las muestras se procesaron ambas fases orgánica y acuosa. Pero luego los análisis multivariados no discriminaron los distintos espectros de las fases orgánicas correspondientes a los distintos genotipos, por lo que se procedió a continuar el análisis solo con la fase acuosa, descartando la orgánica.

A partir de las muestras procesadas para reducir la dimensionalidad del grupo de datos se realizó un PCA (análisis de componentes principales) solamente de las fracciones acuosas, y así evaluar la variación del sistema. Luego se procedió a buscar correlaciones con los datos de antixenosis a través de análisis PLS (regresión de mínimos cuadrados parciales) y O-PLS (proyecciones ortogonales de estructuras laterales), de esta forma explicar las diferencias entre los genotipos a partir de las variables de la matriz respuesta con la variable x.

3.2.5 Hipótesis

3.2.5.1 Hipótesis biológica

Las hojas de los distintos genotipos de cebada evaluados difieren en el perfil de compuestos químicos y esto podría determinar diferencias en la preferencia por *Schizaphis graminum*.

3.2.5.2 Hipótesis estadística

- Ho: $Gc1 = Gc2 = Gc3 = Gc4 = Gc4 = Gc5 = Gc6 = 0$
- Ha: al menos un Gc es distinto

3.2.6 Análisis estadístico

A través del análisis de componentes principales (PCA) se logra representar los datos espectrales en un espacio de baja dimensionalidad. Los componentes principales son autovectores de la diagonalización de la matriz de covarianza de la matriz de datos original. De esta forma, el primer componente principal consistirá en una combinación lineal de todas las variables espaciales ponderadas para explicar el máximo de la varianza total del espacio original; el segundo componente principal será ortogonal al primero y explicará el máximo de la varianza residual, y así con el resto hasta que la varianza total esté explicada.

El análisis por mínimos cuadrados parciales (PLS) es un método donde una matriz de observables X (datos espectrales) y una matriz de valores cualitativos Y (respuesta antixenotica) se relacionan a través de un modelo lineal multivariante. La dirección de cada variable latente de la matriz X es modificada para maximizar la covarianza entre ella y la variable latente de la matriz Y. El análisis de proyección de ortogonales de estructuras latentes también es un análisis dirigido al igual que el PLS, ya que se contrasta con los datos de antixenosis pero se realiza de forma de dejar la mayor varianza sobre la variable latente 1.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 TOLERANCIA a *Schizaphis graminum*

4.1.1 Índice de clorofila

En los resultados obtenidos no se encontraron diferencias significativas entre el contenido de clorofila medido por SPAD de la parte basal ni apical de las hojas de plantas que fueron infestadas con pulgones durante 10 días en comparación con las plantas creciendo sin pulgones.

Cuadro No. 2. Índice de clorofila basal y apical de las hojas de cebada para los diferentes genotipos evaluados medidos con SPAD

Genotipo	SPAD BASAL		SPAD APICAL	
	Con pulgón	Testigo	Con pulgón	Testigo
F183	22,88 A	21,25 A	36,86 ab	34,9 abc
Karl	19,45 A	21,84 A	32,61 abc	33,71 abc
Ceibo	20,73 A	20,32 A	33,75 abc	32,7 abc
Perún	19,65 A	21,16 A	34,21 abc	34,55 abc
Arrayan	23,74 A	21,28 A	37,75 a	35,35 abc
F329	19,17 A	21,61 A	30,67 bc	32,76 abc
C9614	19,71 A	20,88 A	32,63 abc	29,78 c
Ambev 59	22,40 A	21,86 A	35,88 abc	36,96 ab

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (test de Tuckey p-valor < 0,10)

Como se observa en el Cuadro No. 2 el contenido de clorofila en las diferentes zonas de la lámina de cebada, no fue afectado por la presencia del áfido, lo cual podría indicar que los ocho genotipos evaluados presentan un mecanismo de tolerancia a *Schizaphis graminum*. Estos resultados estarían indicando que, en el estado fenológico evaluado (2 hojas), el daño provocado por 10 pulgones por planta no tendría un efecto significativo en los materiales evaluados.

Tocho et al. (2012) en un ensayo de tolerancia a *S. graminum*, el cual presentaba iguales días y niveles de infestación a este trabajo, identificaron entre sus genotipos evaluados líneas que sufrieron significativamente escasa pérdida de clorofila frente al ataque e incluso, muchas de ellas superaron a sus testigos en el contenido de este pigmento.

El áfido durante su alimentación inyecta pectinasas y otras enzimas presentes en su saliva, esto provoca clorosis y necrosis foliar en plantas susceptibles (Dorschner et al.

1987, Ryan et al. 1990). Esta especie de pulgón tiene la capacidad de dañar las hojas, ocasionando una masiva clorosis a partir del quinto día de infestación, en cultivares susceptibles (Al-Mousawi et al., 1983). Si la pérdida de este pigmento no es excesiva, podrían considerarse esos genotipos como tolerantes (Lage et al., 2003), dado que son capaces de contrarrestar las enzimas salivares del insecto, evitando grandes pérdidas de clorofila o sintetizando más pigmento (Reese et al., 1994). Este podría haber sido el mecanismo presente en los genotipos evaluados en el presente ensayo.

Los resultados obtenidos indicarían que los materiales evaluados de cebada tendrían mayor tolerancia que el trigo ante el daño de *S. graminum*, cultivo para el cual se utiliza un Umbral de Acción para la determinación de aplicaciones de insecticidas de entre 3 a 5 pulgones (información de INTA Argentina y adoptada para nuestro país tanto en trigo como en cebada). Estos datos son promisorios y abrirían el camino a la determinación de umbrales de acción de *S. graminum* en cebada para nuestro país, información inexistente hasta la fecha.

La falta de diferencias entre los tratamientos evaluados pudo deberse a que las mediciones de índice de clorofila se realizaron respetando las zonas de medición pre y pos tratamiento, que en el caso de la medición basal, se realizó aproximadamente 5 cm distantes de la unión de la lámina con el tallo, pero la ubicación natural de los áfidos fue más cercana al sitio de inserción de la hoja al tallo, el cual se encontraba debajo del sitio de lectura.

4.1.2 Biomasa aérea (mg de materia seca)

Los materiales evaluados no mostraron diferencias de peso seco aéreo luego del período de infestación en relación a sus respectivos testigos sin áfidos (Figura No. 9), con excepción del genotipo F 183. Este genotipo presentó menor peso aéreo en el tratamiento con *Schizaphis graminum*, el cual en promedio fue de 4,8 miligramos menos que en los tratamientos creciendo sin infestación. La menor biomasa aérea del genotipo F 183 en las plántulas infestadas lo indicarían como no tolerante a *S. graminum*. En contraposición, los restantes genotipos evaluados se comportaron como tolerantes.



** indican diferencias significativas de 10%

Figura No. 9. Comparación de medias de producción de biomasa aérea expresado como mg/MS según tratamiento y genotipo

Es de esperarse que la biomasa aérea de genotipos susceptibles se vea reducida debido a la presencia de áfidos, ya que estos durante su alimentación tanto ninfas como adultos extraen nutrientes de la planta. Esto induce reacciones en la planta que se manifiestan como cambios metabólicos y/o morfológicos (Prado, 1997), como una temprana senescencia y un aumento en la producción de etileno (Neese et al., 1991).

Según Castro et al. (1987), las plantas susceptibles atacadas por el áfido presentan una inhibición del crecimiento aéreo, siendo este efecto mayor en etapas morfológicas más tempranas, debido que a menor desarrollo foliar mayor es el nivel de daño. También se produce un efecto de estrés en la planta debido a la alteración del metabolismo de la misma por parte del áfido.

En cultivares tolerantes no se presentan mermas en la tasa de crecimiento a pesar de la presencia del insecto (Castro et al., 2001). En estudios similares al presente fue posible identificar genotipos de cebada que toleraron una infestación de 10 pulgones por planta durante dos semanas, los cuales lograron presentar incrementos aéreos similares o superiores a sus testigos (Castro et al., 1987).

La tolerancia implica características compensatorias de la planta, la misma es capaz de albergar un gran número de áfidos sin interferir con la fisiología o comportamiento de la plaga. Algunos estudios han observado que las plantas tolerantes pueden compensar fotosintéticamente evitando la inhibición de la retroalimentación y el daño en el flujo de electrones producido en el fotosistema II como resultado de la alimentación del insecto. De forma similar, la regulación positiva de las peroxididasas y otras enzimas oxidativas durante la alimentación de los insectos, junto con niveles elevados de fitohormonas, pueden desempeñar un papel importante en la provisión de tolerancia de las plantas a los áfidos (Koch et al., 2016).

Strauss y Agrawal (1999) identificaron al aumento de la tasa fotosintética, y altas tasas de crecimiento relativo, como mecanismos fisiológicos que contribuyen a que las plantas puedan tolerar el ataque de áfidos. Dichos mecanismos forman parte del crecimiento compensatorio que experimenta la planta tolerante frente al ataque.

Como parte del crecimiento compensatorio en plantas resistentes el aumento de la actividad fotosintética se ha confirmado en muchos ejemplos de tolerancia a los áfidos (Burd y Elliott 1996, Girma et al. 1998, Haile et al. 1999, Botha et al. 2006, Heng Moss et al. 2006, Franzen et al. 2007, Murugan et al. 2010, Luo et al. 2014, Cao et al. 2015). Gutsche et al. (2009, en cebada), Franzen et al. (2007, en trigo) demostraron que la tasa de regeneración de la ribulosa 1,5-bifosfato RuBP (importante sustrato implicado en la fijación de carbono durante el ciclo de Calvin de la fase oscura de la fotosíntesis) se mantuvo en plantas tolerantes a áfidos después de la infestación por *D. noxia*, mientras que las plantas susceptibles mostraron disminuciones aceleradas en la regeneración de RuBP.

Numerosos estudios han documentado reducciones generales de la clorofila total y los carotenoides en las plantas susceptibles en respuesta a la alimentación de hemípteros. Heng-Moss et al. (2006) reportaron reducciones de las concentraciones de clorofila a y b, y carotenoides en líneas de trigo susceptibles en respuesta a la alimentación de *Diuraphis noxia* (áfido del trigo), lo que sugiere que la alimentación de *D. noxia* puede dañar el complejo de recolección de luz, fotosistema II, donde las clorofilas a y b y los carotenoides son cromóforos importantes. Por el contrario, las concentraciones de clorofila fueron similares entre plantas no infestadas y plantas infestadas de líneas resistentes al áfido, lo que sugiere que la alimentación de áfidos puede tener menor efecto sobre la pérdida de clorofila en líneas de trigo resistentes a *D. noxia* (Heng-Moss et al., 2006).

Tolerancia y antixenosis tienen diferentes mecanismos de acción, debido a que la antixenosis interfiere con la conducta del áfido afectando su alimentación e ingestión de alimentos, la antixenosis siempre se traduce en una reducción sustancial de la población de áfidos en la planta con dicha característica, pero en un mayor daño para las susceptibles, porque el áfido es forzado a seleccionar otro hospedante más atractivo. La tolerancia actúa como una habilidad genética que posee la planta para recuperarse del ataque y producir nuevos tejidos, pero este mecanismo no afecta la colonización de la planta por parte del áfido ni afecta su desarrollo o reproducción. La tolerancia no afecta al insecto de ninguna manera a diferencia de la antixenosis, solamente contribuye a que la planta se recupere del daño (Cardona et al., 2005).

Debido a que los mecanismos de tolerancia y antixenosis difieren, fue que en el presente trabajo la clasificación de los mismos materiales mediante los dos mecanismos de resistencia antes mencionados difiere en sus resultados. Los materiales evaluados que presentaron alta tolerancia a *S. graminum*, solamente Karl y C9614 manifestaron altos grados de respuesta antixenótica, lo cual era de esperar ya que en general cuando un genotipo presenta resistencia mediante un mecanismo (antixenosis) generalmente es débil en los mecanismos de resistencia por otras vías (tolerancia, antibiosis). De todos modos una misma planta puede portar más de un mecanismo de resistencia. La combinación de distintas categorías de resistencia tiene efectos más benéficos que aquellos aportados por cada una en forma individual (Smith, 1989).

El uso de plantas tolerantes otorga varias ventajas en un manejo integrado de plagas. Este mecanismo de defensa no tiene efectos adversos sobre las poblaciones del insecto, por lo tanto, no ejerce presión de selección sobre las mismas, lo que impide que se desarrollen nuevos biotipos. Además, la presencia de abundantes hospederos tolerantes permite la permanencia de enemigos naturales de los áfidos (Smith, 1989). En este sentido los materiales evaluados Arrayán, Perún, Karl, F329, C9614, Ambev 59 y Ceibo podrían ser usados en programas de mejoramiento genético nacionales, ya que presentan tolerancia a una de las plagas más importantes de este cultivo en Uruguay.

4.2 CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL METABOLÓMICO DE CEBADA ASOCIADO A ENSAYOS DE ANTIXENOSIS

Ninguna técnica analítica permite obtener una imagen completa del estado metabólico de un ser vivo. Combinando diferentes métodos de extracción y tratamiento de muestra con diversas técnicas analíticas es posible concentrarse en una parte del perfil metabólico, lo que permite generar conclusiones de una fracción del metabolismo.

En este sentido se obtuvieron los perfiles metabólicos por ^1H RMN de las fases orgánicas y acuosas de los diferentes genotipos. Cada espectro de protón es la sumatoria de todas las señales de todos los metabolitos en la matriz de estudio. Donde cada señal se corresponde con un tipo de protón de una molécula. En la Figura No. 10 se puede observar las regiones del espectro de un extracto acuoso correspondiente a aminoácidos y azúcares (0,5 a 2.0 ppm y 2.0 a 5.0 ppm, respectivamente).

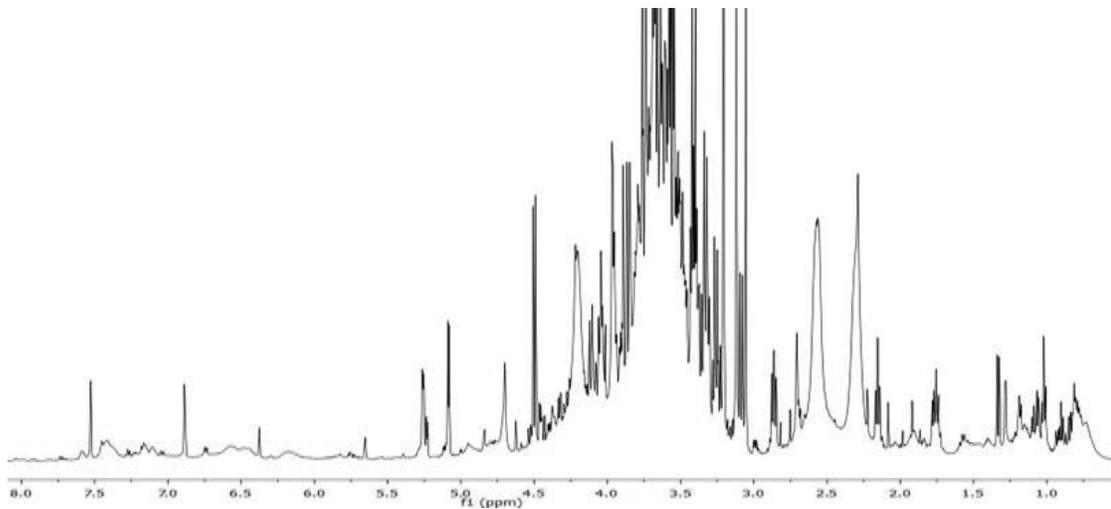
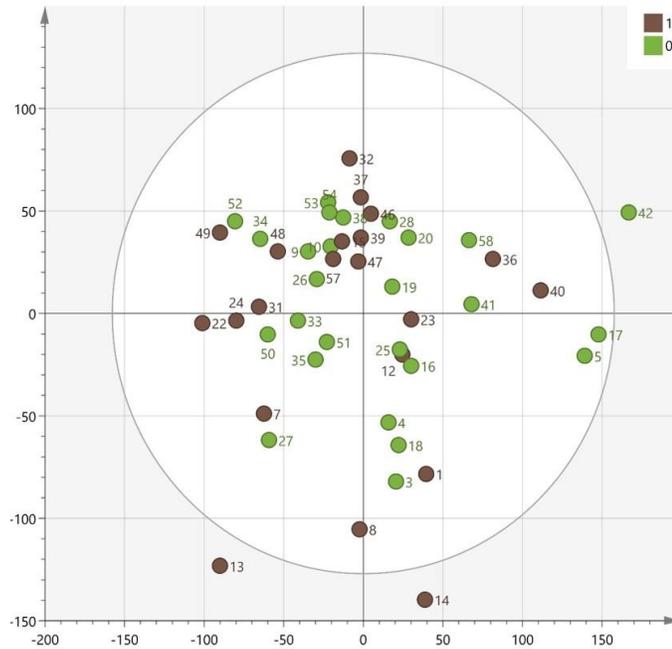


Figura No. 10. Espectro de ^1H (500 MHz) de un extracto acuoso de cebada en D_2O

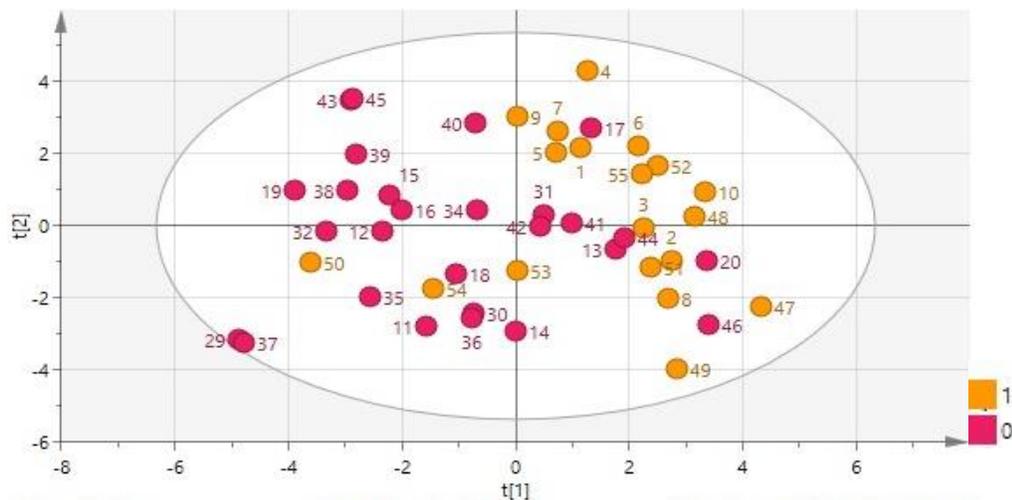
En la Figura No. 11 se observan los resultados de PCA realizado a partir de los datos de las fases orgánicas, en la cual no se aprecia la formación de ningún clusters o conjunto como si se obtuvo de las fases acuosas. Se trabaja con matriz de variable discreta correspondiendo 0 susceptible y 1 resistente.



* 0 corresponde a materiales susceptibles y 1 a materiales resistentes

Figura No. 11. Análisis de componentes principales a partir de datos de las fases orgánicas

De los espectros logrados de los extractos acuosos a partir de un análisis de componentes principales (PCA) Figura No. 12, se pudieron diferenciar dos clúster que se corresponden con los resultados de antixenosis obtenidos previamente de los distintos genotipos de cebada, susceptibles y resistentes.



* 0 (color rosa) corresponde a materiales susceptibles y 1 (color naranja) a materiales resistentes

Figura No. 12. Análisis de componentes principales de perfiles acuosos por $^1\text{HRMN}$ de extractos de hojas de cebada

Tomando en cuenta estos resultados se buscó explicar las correlaciones entre la matriz de datos espectrales y los resultados de antixenosis. Para ello se realizaron análisis de PLS y OPLS los cuales lograron identificar las variables que más contribuyen a diferenciar las poblaciones. En las Figuras No. 13 y No. 14 se observan los dos clúster formados, correspondiendo uno a materiales susceptibles y otro a materiales resistentes.

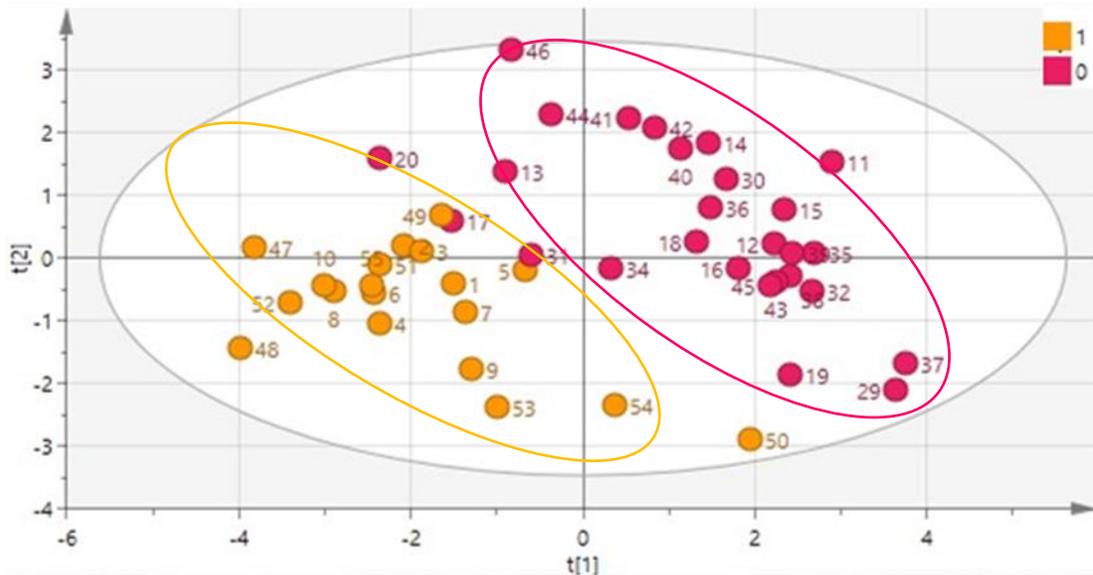


Figura No. 13. Análisis por PLS de perfiles acuosos por $^1\text{HRMN}$ de extractos de hojas de cebadas

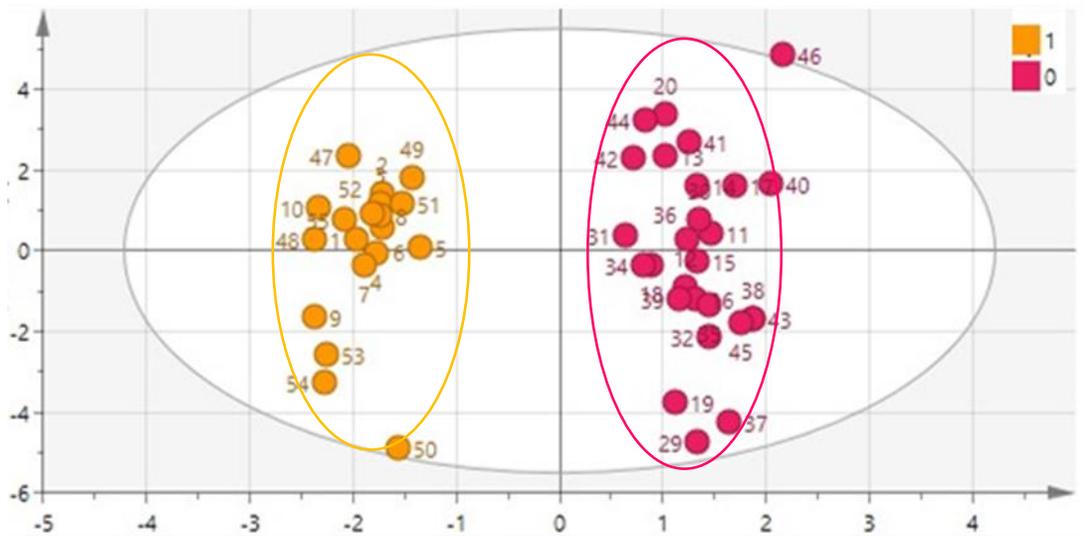


Figura No. 14. Análisis por O-PLS de perfiles acuosos por $^1\text{HRMN}$ de extractos de hojas de cebadas

En la Figura No. 15 se observa los valores de carga del O-PLS en el cual se muestran los picos a 3,27; 3,23; 3,20 ppm, que se corresponden a las variables que más contribuyen a la separación entre ambas poblaciones.

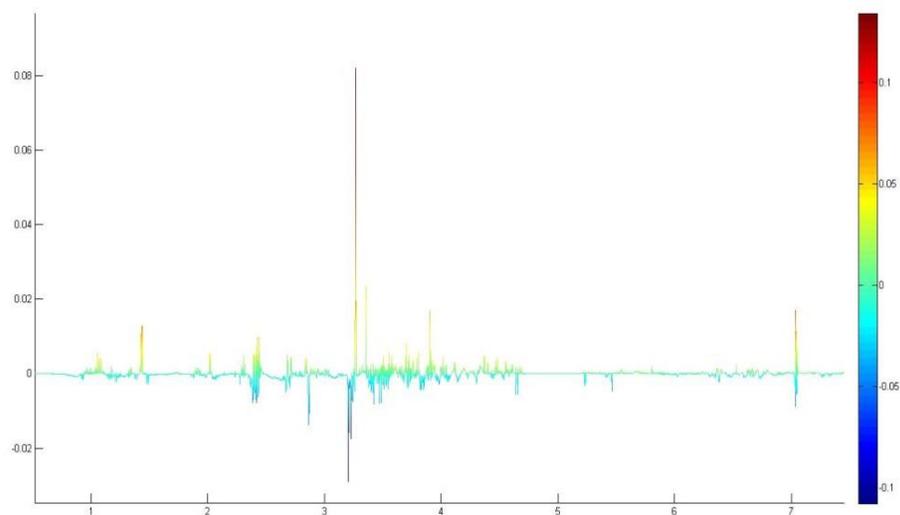


Figura No. 15. Valores de carga del O-PLS

El estudio de la composición química del material vegetal, comparado con los datos de respuesta antixenótica, diferencian claramente las poblaciones identificando dos grados de preferencia.

Una vez establecida las señales que más contribuyen a la diferenciación entre grupos, se realizó un análisis STOCSY (Statiscal total correlation spectroscopy) que permite buscar señales que estén asociadas con las ya obtenidas del OPLS. De esta forma al generar más información se logró identificar a colina y betaína como los metabolitos responsables de dichas señales y como posibles fitomarcadores. Esta información será de gran importancia para el sector productivo ya que permitirá la selección de genotipos resistentes a plagas, direccionar el mejoramiento genético, además contribuirá al manejo integrado de plagas. Esto redundara en una disminución del uso de plaguicidas por ende un manejo de plagas sustentable.

La metodología empleada de resonancia magnética nuclear (RMN) podrá ser extrapolada a otros cultivos no solo al cultivo de cebada. Por ejemplo, Leiss et al. (2009) aplicaron la metabolómica basada en la resonancia (RMN) para diferenciar los perfiles metabólicos de los crisantemos (*Dendranthema grandiflora*) resistentes a trips de los susceptibles. De esta forma se distinguieron cantidades del ácido clorogénico y ácido feruloil químico. Ambos fenil propanoides son conocidos por su efecto inhibitorio sobre herbívoros y patógenos. Así, el ácido clorogénico y el ácido feruloil químico son los compuestos de elección para mejorar la resistencia de las plantas huésped a los trips en plantas ornamentales y cultivos (Leiss et al., 2009). Por otra parte Ward et al. (2003) distinguieron varios ecotipos de *Arabidopsis thaliana* usando RMN ^1H y análisis multivariados (Choi et al., 2004) encontrando metabolitos que estaban presentes en diferentes concentraciones en hojas de *Catharanthus roseus* infectadas con fitoplasma versus hojas sanas.

Mediante el uso de este método también Mauricio y Rausher (1997) así como Shonle y Bergelson (2000) han demostrado que la concentración total de glucosinolato en *Arabidopsis thaliana* y la concentración de dos alcaloides individuales en *Datura stramonium* estando bajo presión de selección por insectos. Estos mismos autores también estudiaron el daño de alimentación de las larvas de insectos masticadores de hojas identificando una amplia variedad de compuestos orgánicos volátiles, incluyendo mono y sesquiterpenos, sulfuros (iso) tiocianatos y otros, usando RMN.

Otro estudio basado en la diferenciación metabolómica de las hojas de *Brassica rapa* dañadas por *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae), y *Spodoptera exigua* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae), en comparación con las hojas de control. Al estudiar el patrón metabólico de las hojas de *B. rapa* dañadas localmente y las sistémicas, se detectaron diferencias claras, tanto en las hojas locales como sistémicas en el nivel de fenoles (ácido ferúlico y ácido cinámico) y glucosinolato (gluconapina), estos compuestos fueron identificados mediante el uso de RMN (Widarto et al., 2006).

Partiendo de que las plantas tienen diferentes vías de respuestas frente al ataque de insectos Stratmann y Ryan (1997) utilizaron la resonancia magnética nuclear (RMN) para identificar la proteína quinasa la cual detectaron que es activada por el ataque del gusano del tabaco (*Manduca sexta*) durante su alimentación.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo permitieron asociar dos metabolitos: colina y betaína a los mecanismos de defensa antixenótica de los genotipos de cebada Karl y C9614. Esta información generada constituye un avance significativo en el conocimiento de las relaciones planta-insecto, proporcionando información clave en pro de lograr implementar el mejoramiento para la resistencia a plagas.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a partir del ensayo de tolerancia a *S. graminum* en los cultivares de cebada: Arrayán, Ceibo, Perún, Karl, F329, C9614, Ambev 59, se concluyó que dichos materiales en el estado de dos hojas expandidas y con un nivel de infestación de 10 pulgones por planta durante 10 días no resulta comprometido su crecimiento, debido a que ambos parámetros medidos tanto índice de clorofila como biomasa aérea, no presentaron diferencias significativas entre tratamientos. Esto estaría indicando que en dicho estado fenológico y nivel de infestación, el daño provocado no tendría un efecto significativo en la mayoría de los materiales evaluados. Los resultados se pueden vincular a la capacidad de compensación o de contrarrestar las enzimas salivares del áfido que presentan las plantas afectadas con pulgones evitando posibles daños.

Con esta información podríamos inferir que los materiales evaluados de cebada tendrían mayor tolerancia que el trigo ante el daño de *S. graminum*, cultivo para el cual se utiliza un umbral de acción para la determinación de aplicaciones de insecticidas de entre 3 a 5 pulgones o que los umbrales utilizados están sobre estimando el daño del pulgón en los materiales que se comercializan en la actualidad. Estos datos son promisorios y abrirán el camino a la determinación de umbrales de acción para *S. graminum* en cebada en nuestro país, información inexistente hasta la fecha. Y también fomentaría la realización de estudios de este tipo en trigo con materiales utilizados en la actualidad.

Nuestros hallazgos no fueron los esperados, ya que nuestra hipótesis se basaba en que los materiales evaluados diferían en el grado de tolerancia a esta plaga. Si bien se concluyó que los materiales presentan cierto nivel de tolerancia a excepción de F183 el cual se calificó como no tolerante, los restantes materiales se comportaron con igual grado de tolerancia, sin presentarse diferencias entre ellos.

En cuanto al estudio metabólico de los espectros proveniente de los distintos genotipos de cebada estudiados, se identificaron dos poblaciones siendo una susceptible y otra resistente. Estos resultados se correspondieron con la caracterización realizada en estudios de antixenosis. Este mecanismo de resistencia estaría asociado con los metabolitos colina y betaína responsable de la diferenciación del perfil metabólico de ambas poblaciones. Los mismos son posibles fitomarcadores de interés dentro de un programa de mejoramiento, o bien para identificar líneas posiblemente resistentes.

Los materiales que presentaron alta tolerancia a *S. graminum*, no manifestaron altos grados de respuesta antixenótica, lo cual era de esperar ya que en general cuando un genotipo presenta resistencia mediante un mecanismo (antixenosis) generalmente es débil en los mecanismos de resistencia por otras vías (tolerancia, antibiosis).

6. RESUMEN

Los áfidos presentan un gran problema en los sistemas agropastoriles del Uruguay, ocasionando daños directos e indirectos. Los primeros son ocasionados durante la alimentación consumiendo fotoasimilados de las plantas e inyectando saliva tóxica, mientras que los indirectos se asocian a la transmisión de virus. Una especie destacada es la del pulgón verde de los cereales *Schizaphis graminum*, el cual produce grandes pérdidas de rendimiento en los cultivos que ataca. La utilización de genotipos resistentes a esta plaga propiciaría un manejo más sustentable del cultivo dentro de programas de manejo integrado. En este trabajo se realizó un estudio para determinar la tolerancia a *S. graminum* existente en el germoplasma de cebada representativo de los materiales utilizados en Uruguay. Conjuntamente se utilizó la quimiometría basada en resonancia magnética nuclear (RMN) en la identificación de fitomarcadores de resistencia por antixenosis para la selección y mejoramiento de cultivares de cebada. El ensayo de Tolerancia consistió en la siembra de 8 genotipos de cebada (Arrayán, Ceibo, Perún, Karl, F329, C9614 y Ambev 59) en invernáculo, en donde luego de llegar al estado de dos hojas, se obligó a las plantas a convivir durante 10 días con 20 pulgones de la especie *S. graminum*. Para evaluar el comportamiento vegetal se midieron los niveles de clorofila (basal y apical) pre y post tratamiento mediante SPAD y se determinó la biomasa aérea (mg de MS) finalizado el experimento. De esta manera se obtuvo que siete de los ocho materiales evaluados presentaron tolerancia a *S. graminum*, en el estado de dos hojas y con un nivel de infestación de 10 pulgones por planta. Estos resultados son el primer paso para la elaboración de Umbrales de Acción de cebada para esta especie en el país, información inexistente hasta el momento. En el estudio de los perfiles metabólicos por ^1H RMN se trabajó con 6 de los genotipos de cebada utilizados en el ensayo de tolerancia. Se realizaron 10 réplicas para cada material y a partir de la extracción proveniente de moler aproximadamente 300 gr de hoja, se obtuvieron por separado extractos orgánicos y acuosos de las mismas. Mediante análisis de componentes principales (PCA) se diferenciaron solamente las fracciones acuosas de los genotipos en base a datos de preferencia proporcionados. De este modo se identificaron dos clúster correspondientes a dos grados de preferencia. Posteriormente se compararon algunos mediante un O-PLS y se efectuó el gráfico de valores de carga. Como resultado se identificaron señales en el espectro que se asocian con la conducta de *S. graminum* ante las plantas, y que estaría asociado a componentes que más contribuyen a las diferencias entre los clúster siendo estos posibles fitomarcadores en un programa de mejoramiento genético nacional. De esta manera incorporar la caracterización de resistencia como parte del manejo integrado de plagas (MIP).

Palabras clave: Cebada; *Schizaphis graminum*; Tolerancia; RMN.

7. SUMMARY

Aphids present a major problem in the agricultural systems of Uruguay. Erroneous control measures and thanks to their high fecundity, attributable to their short life cycle, their parthenogenetic reproduction, viviparity and polymorphism, together, have given it a life strategy, which is conferred by its biological success. Aphids cause direct and indirect damage. The former are caused during feeding consuming photo of the plants and injecting the toxin from the saliva, while the indirect ones are associated with the transmission of the virus. A prominent species in the green of *Schizaphis Graminum* grains, which produce large losses of yield in the crops it attacks. The use of genotypes resistant to this pest would lead to a more sustainable management of the crop within integrated management programs. In this work, a study was carried out to determine the tolerance to *S. graminum* present in barley germoplasm representative of the materials used in Uruguay. Chemometrics based on nuclear magnetic resonance (NMR) was used in the identification of the resistance biomarkers for the selection and improvement of barley cultivars. The tolerance test consisted of the sign of eight barley genotypes (Arrayán, Ceibo, Perún, Karl, F329, C9614 and Ambev 59) in greenhouse, where after reaching the state of two leaves, the plants were forced to coexist During 10 days with 20 aphids of the species *S. graminum*. To evaluate plant behavior, chlorophyll levels (basal and apical) were measured before and after treatment using SPAD and the aerial biomass (mg of MS) was determined. In this way it was obtained that seven of the materials evaluated tolerance to *S. graminum*, in the state of two leaves and with a level of infestation of 10 aphids per plant. These results are the first step in the elaboration of barley action thresholds for this species in the country, information that has not yet been available. In the study of the metabolic profiles by ^1H NMR were worked with 6 of the barley genotypes used in the tolerance test. Ten replicates were made for each material and one extraction outlet from milling approximately 300 g of sheet organic and aqueous extracts were obtained therefrom. Principal components analysis (PCA) differentiates only the aqueous fractions of the genotypes based on data of preference provided. In this way the clusters corresponding to the degrees of preference were identified. Subsequently some were compared by an O-PLS and the graph of load values was performed. As a result we identified the signals in the spectrum that are associated with the behavior of *S. graminum* in plants, and which is associated with the components that contribute the most to the differences between clusters and possible phytocarriers

Key words: Barley; *Schizaphis graminum*; Tolerance; NMR.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdel-Farid, I. B.; Choi, Y. H.; Klinkhamer, P.G. L.; Leiss, K. A.; Verpoorte, R. 2009. NMR metabolomics of thrips (*Frankliniella occidentalis*) resistance in Senecio hybrids. (en línea). Journal of Chemical Ecology. 35: 219-229. Consultado 28 dic. 2016. Disponible en <http://link.springer.com/article/10.1007/s10886-008-9586-0>
2. Ahman, I. M.; Ninkovic, V. 2009. Aphid acceptance of Hordeum genotypes is affected by plant volatile exposure and is correlated with aphid growth. Euphytica. 169 (2): 177-175.
3. Akhtar, N.; Begum, I.; Gillani, W, A; Haq, E; Khan, J; Saeed, K; Yasmin, S. 2011. Screening for resistance to aphid in barley. Journal of Agriculture Research. 24: 94-99.
4. Ali, K.; Choi, Y. H.; Fortes, A. M.; Maltese, F.; Pais, M. S.; Verpoorte, R. 2011. Pre-analytical method for NMR-based grape metabolic fingerprinting and chemometrics. Analytica Chimica. 703: 179– 186.
5. Al-Mousawi, A. H.; Richardson, P. E.; Burton, R. L. 1983. Ultra estructural studies of greenbug (Hemiptera: Aphididae), feeding damage to susceptible and resistant wheat cultivars. Annals of the Entomological Society of America. 76: 964-970.
6. Alzugaray, R.; Ribeiro, A.; Silva, H.; Stewart, S.; Castiglioni, E.; Bartaburu, S.; Martínez, J. J. 2010. Prospección de agentes de mortalidad natural de áfidos en leguminosas forrajeras en Uruguay. (en línea). Agrociencia (Montevideo). 14 (1): 27-35. Consultado 21 dic. 2016. Disponible en http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2301-15482010000100005
7. Argandoña, V. H.; Corcuera, L. J.; Luza, J. G.; Niemeyer, H. M. 1980. Role of hidroxamic acids in the resistance of cereals to aphids. Santiago de Chile, Universidad de Santiago de Chile. Facultad de Ciencias. s.p.
8. _____; Cardemil, L.; Corcuera, L. J.; Chaman, M. E.; Zúñiga, G. E. 2001. Induction of soluble and cell wall peroxidases by aphid infestation in barley. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49 (5): 2249-2253.
9. Bailey, N. J.; Holmes, E.; Nicholson, J. K.; Oven, M.; Zenk, M. H. 2002. Metabolomic analysis of the consequences of cadmium exposure in

Silene cucubalus cell cultures via ¹H NMR spectroscopy and chemometrics. *Phytochemistry*. 62: 851–858.

10. Baker, J. M.; Beale, M. H.; Cavaleiro, A. J.; Coutinho, I. D.; Creste, S.; Ward, J. L. 2016. Metabolite profiling of sugarcane genotypes and identification of flavonoid glycosides and phenolic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64 (21): 1-45.
11. Bentancourt, C. M. 2001. *Enemigos naturales; guía ilustrada para la agricultura y la forestación*. Montevideo, Facultad de Agronomía. s.p.
12. _____. 2004 *Manual de entomología*. Montevideo, Facultad de Agronomía. s.p.
13. _____.; Morelli, E. 2009. *Insectos de Uruguay*. Montevideo, Facultad de Agronomía. s.p.
14. _____.; Scatoni, I. B. 2010. *Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay*. 3^a. ed. Montevideo, Facultad de Agronomía. s.p.
15. Berger, S.; Sinha, A.; Roitsch, R. 2007. Plant physiology meets phytopathology; plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. (en línea). *Journal of Experimental Botany*. 58(15-16): 4019-4026. Consultado 12 mar. 2017. Disponible en <https://doi.org/10.1093/jxb/erm298>
16. Biggs, D. R.; Kain, W. M. 1980. Effect of pea aphid and bluegreen lucerne aphid (*Acrythosihon spp.*) on coumestrol levels in herbage of lucerne (*Medicago sativa*). *Journal of Agricultural Research*. 23: 563-568.
17. Blackman, R. L.; Eastop, V. F. 1984. *Aphids on the world's crops; an identification and information guide*. London, The Natural History Museum. Department of Entomology. 466 p.
18. Botha, A. M.; Du Preez, F. B.; Lacock, L.; Loots, S.; Matsioloko, M. T.; Van Niekerk, C. 2006. Is photosynthetic transcriptional regulation in *Triticum aestivum* L. cv. Tugela DN a contributing factor for tolerance to *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). *Plant Cell*. 25:41–54.
19. Brocchi, G. N.; Giménez, D. O. s. f. Acción sistémica de la infestación del pulgón verde de los cereales sobre la producción de etileno y disminución del crecimiento de coleóptilos de cebada. La Plata, UNLP. Instituto de Fisiología Vegetal. pp. 26-27.

20. Burd, J. D.; Elliott, N. C. 1996. Changes in chlorophyll α fluorescence induction kinetics in cereals infested with Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Ecology Entomology*. 89: 1332–1337.
21. Cao, H. H.; Pan, M. Z.; Liu, H. R.; Wang, S. H.; Liu, T. X. 2015. Antibiosis and tolerance but not antixenosis to the grain aphid, *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae), are essential mechanisms of resistance in a wheat cultivar. *Bull Entomology*. 105: 448–455.
22. Castro, A. M.; Rumi, C. P.; Arriaga, H. O. 1987a. Deterioro en la producción de avena susceptible a *Schizaphis graminum* (Rondani) sometidas a un período de infestación y su posterior recuperación. *Turrialba*. 39: 97-105.
23. _____.; _____. 1987b. Greenbug damage on the aerial vegetative growth of two barley cultivate. *Enviromental and Experimental Botany*. 27 (3): 263-271.
24. _____.; _____.; Arriaga, H.O. 1988. Influence of greenbug on root growth of resistant and susceptible barley genotypes. *Enviromental and Experimental Botany*. 28: 61-72.
25. _____.; _____.; _____. 1990. Alteraciones en el crecimiento radical de cultivares de sorgo infestado con pulgón verde. *Turrialba*. 41:166-171.
26. _____.; Ramos, S.; Vasicek, A.; Worland, A.; Giménez, E.; Suarez, M.; Muñoz, A. A.; Clúa, A.; Frangi, P. 1999. Different types of resistance against greenbug (*Schizaphis graminum* Rond.) and the Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*, Mordvilko) in wheat. *Plant Breeding*. 118: 131-137.
27. _____.; _____.; _____.; _____.; Giménez, D.; Clúa, 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.
28. Cerretta, S.; Zerbino, S. 1991. El pulgón de los cereales *Schizaphis graminum* en sorgo. (en línea). INIA. Hoja de Divulgación no. 12. 3 p. Consultado 12 mar. 2016. Disponible en <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/1413/1/15630031107205220.pdf>

29. Choi, Y. H.; Tapias, E. C.; Kim, H. K.; Lefeber, A. W.; Erkelns, C.; Verhoeven, J. T.; Brzin, J.; Zel, J.; Verpoorte, R. 2004. Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using ¹H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Plant Physiology*. 135: 2398–2410.
30. _____.; Gonzalez, R.; Klinkhamer, P. G. L.; Mirnezhad, M.; Leiss, K. A.; Verpoorte, R. 2007. Metabolomics analysis of host plant resistance to thrips in wild and a cultivated tomatoes. *Phytochemical Analysis*. 21:110-117.
31. _____.; Klinkhamer, P. G.; Leiss, K. A.; Verpoorte, R.; Maltese, F. 2009. Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in *Chrysanthemum*. (en línea). *Plant Physiology*. 150 (3): 1109-1110. Consultado 21 dic. 2016. Disponible en <http://www.plantphysiol.org/content/150/3/1567>
32. Colazo, J. C.; Garay, J. A.; Veneciano, J. H. 2012. El cultivo de sorgo en San Luis. (en línea). Villa Mercedes, INTA. 118 p. Consultado 20 oct. 2016. Disponible en http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_-_eea_san_luis_-_el_cultivo_de_sorgo.pdf
33. Cruz, I. 1986. Resistencia de genotipos de sorgo ao pulgao-verde *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852); (Homoptera, Aphididae). Tese do título de Doutorem Ciências- Área de Entomología. Sao Paulo, Brasil. Universidade de Sao Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”. 222 p.
34. Dorschner, D. W.; Ryan, J. D.; Johnson, R. C.; Eikenbary, R. D. 1987. Modification of host nitrogen levels by the greenbug (Homoptera: Aphididae); its role in resistance of winter wheat to aphids. *Environmental Entomology*. 16: 1007-1011.
35. Dughetti, A. 2012. Pulgones clave para identificar las formas ápteras que atacan a los cereales. Buenos Aires, INTA Hilario Ascasubi. Estación Experimental Agropecuaria. 44 p.
36. EMBRAPA (Empresa Brasileira de Investigación Agropecuaria, BR). 2011. Informações técnicas para trigo e triticales - safra 2012. Brasilia. 225 p.
37. Fan, T.W.-M.an.; Lane, A. N. 2008. Structure-based profiling of metabolites and isotopomers by NMR. Programa nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Biomolecular NMR*. 52: 69–117.

38. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). Statistical pocketbook. Rome. 231 p.
39. Feng, M. G.; Nowierski, R. M.; Johnson, J. B.; Poprawski, T. J. 1992. Epizootics caused by entomophthorale an fungi (Zygomycetes, Entomophthorales) in populations of cereal aphids (Homoptera, Aphididae) in irrigated small grains of southwestern. *Journal of Applied Entomology*. 113: 376–390.
40. Ferreira, A. 1998. Resistência de genótipos de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) a *Alabama argillacea* (Huebner, 1918) (Lepidoptera: Noctuidae). Tese do título de Master em Agronomia em Entomologia Agrícola. Sao Paulo, Brasil. UNESP. Campus de Japoticabal. 57 p.
41. Franzen, L. D.; Gutsche, A. R.; Heng-Moss, T.; Higley, L. G.; Sarath, G.; Burd, J. D. 2007. Physiological and biochemical responses of resistant and susceptible wheat to injury by Russian wheat aphid. *Journal of Economic Entomology*. 100: 1692–1703.
42. Gardenhire, J. H.; Tuleen, N. A.; Stewart, D. W. 1973. Trisomic analysis of greenbug resistance in barley, *Hordeum vulgare*. *Crop Science*. 13: 684–685.
43. Girma, M.; Kofoid, K. D.; Reese, J. C. 1998. Sorghum germoplasm tolerant to greenbug (Homoptera: Aphididae) feeding damage as measured by reduced chlorophyll loss. *Journal of Kansas Entomology Society*. 71:108–115.
44. Gutsche, A.; Heng-Moss, T.; Sarath, G.; Twigg, P.; Xia, Y.; Lu, G. 2009. Gene expression profiling of tolerant barley in response to *Diuraphis noxia* (Hemiptera: Aphididae) feeding. *Bull Entomology*. 99: 163–173.
45. Haile, F. J.; Higley, L. G.; Quisenberry, S. S. 1999. Physiological and growth tolerance in wheat to Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) in jury. *Environmental Entomology*. 28: 787–794.
46. Heng-Moss, T.; Macedo, T.; Franzen, L.; Baxendale, F.; Higley, L.; Sarath, G. 2006. Physiological responses of resistant and susceptible buffalograsses to *Blissus occiduus* (Hemiptera: Blissidae) feeding. *Journal of Economic Entomology*. 99:222–228.

47. Hesler, S.; Tharp, C. I. 2005a. Antibiosis and antixenosis to *Rhopalosiphum padi* among triticale accessions. *Euphytica*. 143: 153-160.
48. _____. 2005b. Resistance to *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) in three Triticale accessions. *Journal of Economic Entomology*. 98: 603-610.
49. Hines, A.; Southam, A. D.; Viant, M. R.; Wu, H. 2007. High-throughput tissue extraction protocol for NMR and ms-based metabolomics. *Analytical Biochemistry*. 372: 204–212.
50. Hoffman, E.; Castro, A.; Arbeleche, P. 2013. Área agrícola y superficie cultivada anualmente en Uruguay; implicancias de las diferencias en los números oficiales. *Cangüé*. no. 34: 12-34.
51. Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. 2007. Metabolic profiling; applications in plant science. *The Handbook of Metabolomics and Metabolomics*. 16: 443-487.
52. Hu, X. S.; Hu, Z. Q.; Liu, T. X.; Liu, X. F.; Liu, Y. J.; Wang, B.; Wang, Y. H.; Wang, Z.; Zhang, S. 2016. Resistance of wheat accessions to the english grain aphid *Sitobion avenae*. *Plos One*. 11(6): 1-17.
53. Humber, R. A. 1991. Fungal pathogens of aphids. *In*: Peters, D. C.; Webster, J. A.; Chlouser, C. S. eds. *Aphid-Plant Interactions; populations to Molecules*. Stillwater, Oklahoma State University. s.p.
54. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuario, UY). 1991. El pulgón de los cereales *Schizaphis graminum* en sorgo. Hoja de divulgación no. 12. 3 p.
55. Keller, S. 2006. Species of entomophthorales attacking aphids with description of two new species. *Sydowia*. 58 (1): 38-74.
56. Kogan, M. 1975. Plant resistance in pest management; introduction to insect pest management *In*: Metcalf, R. L.; Luckman, W. H. eds. *Introduction to insect pest management*. New York, Wiley. pp. 73- 128 (Interscience Series of texts and monographs no. 3).
57. Kruger, N. J.; Ratcliffe, R. J.; Troncoso-Ponce, M. A. 2008. ¹H NMR metabolite fingerprinting and metabolomic analysis of perchloric acid extracts from plant tissues. *Nature Protocols*. 3(6): 1001-1012.

58. Kvalheim, O. M.; Rajalahti, T. 2011. Multivariate data analysis in pharmaceuticals; a tutorial review. *International Journal of Pharmaceutics*. 417: 280– 290.
59. Lage, J.; Skovmand, B.; 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. *Journal of Economic Entomology*. 96: 202-206.
60. Langer, A.; Hance, T. 2000. Overwintering strategies and cold hardiness of two aphid parasitoid species (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Journal of Insect Physiology*. 46:671– 676.
61. _____.; Boivin, G.; Hance, T. 2004. Oviposition flight and walking capacity at low temperatures of four aphid parasitoid species (Hymenoptera: Aphidiinae). *European Journal of Entomology*. 101:473-479.
62. Latin American Metabolic Profiling Symposium (2nd., 2016, Rosario, Argentina). 2016. Application of NMR- based metabolomics to the selection of barley varieties with resistance to aphids. Rosario, s.e. s.p.
63. Levin, D. A. s.f. The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. Austin, Texas, University of Texas. Department of Botany. 39 p.
64. Lin, CH. Y.; Tjeerdema, R. S.; Wu, H.; Viant, M. R. 2006. Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics. *Metabolomics*. 3(1): 55-66.
65. Lindon, C.; Nicholson, K.; Holmes, E. 2007. The handbook of metabolomics and metabolomics. London, Imperial College. s.p.
66. Luo, K.; Zhang, G.; Wang, C.; Ouellet, T.; Wu, J.; Zhu, Q. 2014. Candidate genes expressed in tolerant common wheat with resistant to english grain aphid. *Journal of Economic Entomology*. 107: 1977–1984.
67. Manfrino, R. G. 2014. Hongos entomofitiales patógenos de pulgones plaga de cultivos de cereales y hortícolas de la región pampeana de la Argentina. Estudios comparativos de la diversidad y prevalencia. Tesis Doctor en Ciencias Naturales. La Plata, Argentina. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. s.p.
68. Marimuthu, M.; Smith, C. M. 2012. Barley tolerance of Russian wheat aphid (Hemiptera: Aphididae) biotype 2 herbivory involves expression of

defense response and developmental genes. (en línea). *Plant Signalling and Behavior*. 7 (3): 1-10. Consultado 16 oct. 2016. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3443920/>

69. Maxwell, F. G.; Painter, R. H. 1962a. Auxinas in honeydew of *Toxoptera graminum*, *Therioaphis maculate*, and *Macrosiphum pisi*, and their relation to degree of tolerance in host plants. Manhattan, Kansas State University. pp 229-233.
70. _____. 1962b. Plant growth hormones in ether extracts of the greenbug, *Toxoptera graminum*, and the Pea Aphid, *Macrosiphum pisi*, fed on selected tolerant and susceptible host plants. *Journal of Economic Entomology*. 55(1): 57-62.
71. Merkle, O. G.; Webster, J. A.; Morgan, G. H. 1987. Inheritance of a second source of greenbug resistance in barley. *Crop Science*. 27: 241-243.
72. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2016. Encuesta agrícola “primavera 2016”. (en línea). Montevideo. s.p. (Serie Encuestas no. 344). Consultado 19 dic. 2016. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/estadisticas/produccion-vegetal/agricultura-de-secano/agricola-primavera-2016>
73. Murugan, M.; Khan, S. A.; Cardona, P. S.; Orozco, G. V.; Viswanathan, P.; Reese, J. 2010. Variation of resistance in barley against biotypes 1 and 2 of the Russian wheat aphid (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*. 103: 938–948.
74. Neese, P. A.; Berberet, R. C.; Caddel, J. L.; Dillwith, J. W. 1991. Induction of ethylene production in alfalfa by aphid feeding. Oklahoma State University. Agricultural Experiment Station. Miscellaneous publication no. 132. 296 p.
75. Nuessly, G. S.; Nagata, R. T. 2014. Greenbug; *Schizaphis graminum*. (en línea). Gainesville, FL, University of Florida. IFAS. s.p. Consultado 18 nov. 2016. Disponible en <http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/bugs/greenbug.htm>
76. Painter, R. H. 1951. Insect resistance in crop plants. New York, McMillan. 151 p.

77. Pell, J. K.; Eilenberg, J.; Hajek, A. E.; Steinkraus, D. C. 2001. Biology, ecology and pest management potential of entomophthorales. (en línea). In: But, T. M.; Jackson, C. W.; Magan, N. eds. Fungi as biocontrol agents; progress, problems and potential. Fayetteville, s.e. cap. 4, pp. 71–154. Consultado 28 may. 2017. Disponible en: http://fmedicine.ajums.ac.ir/_fmedicine/Documents/FUNGI%20AS%20BIOCONTROL%20AGENTS_20130410_173915.pdf#page=82
78. Pollard, D. G. 1937. Plant penetration by feeding aphids (Hemiptera, Aphididae): a review. *Bulletin of Entomological Research*. 62: 631-714.
79. Powers, R.; Worley, B. 2013. Multivariate analysis in metabolomics. *Journal of Current Metabolomics*. 1(1): 92–107.
80. Price, P. W.; Waldbaver, G. P. 1990. Aspectos ecológicos del manejo de plagas. In: Luckmann, W. H.; Metcalf, R. L. eds. *Introducción al manejo de plagas de insectos*. s.l., Limusa. pp. 51-89.
81. Prinsloo, G. J.; Hewitt, P. H.; Van Der Westhuizen, M. C. 1993. The effect of temperature on oviposition behaviour and success of two parasitoids of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdjumov) (Hemiptera: Aphididae). *African Entomology*. 1: 189–193.
82. Puterka, G. J.; Peters, D. C.; Kerns, D. L.; Slosser, J. E.; Bush, L.; Worrall, D. W.; Mc. NEW, R.W. 1988. Designation of two new greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes G and H. *Journal of Economic Entomology*. 81: 1754-1759.
83. Reese, J. C.; Schwenke, J. R.; Lamont, P. S.; Zehr, D. D. 1994. Importance and quantification of plant tolerance in crop pest management programs for aphids: greenbug resistance in sorghum. (en línea). *Journal of Agricultural Entomology*. 11:255-270. Consultado 28 nov. 2016. Disponible en https://www.researchgate.net/profile/John_Reese2/publication/268298495_Importance_and_Quantification_of_Plant_Tolerance_in_Crop_Pest_Management_Programs_for_Aphids_Greenbug_Resistance_in_Sorghum_/links/54d134110cf28370d0e031b9.pdf
84. Ribeiro, A. 2010. Prospección de agentes para el control natural de plagas en sistemas agrícolas pastoriles. In: Altier, N.; Rebuffo, M.; Cabrera, K. eds. *Enfermedades y plagas de pasturas*. Montevideo, INIA. pp. 105-109 (Serie Técnica no. 183).

85. _____.; Abbate, S.; Silva, H. 2013. Manejo de plagas en trigo y cebada. Montevideo, Bibliotecaplural. 62 p.
86. Ricci, M.; Kahan, A. 2005. Aspectos biológicos y poblacionales de *Sypba maydis* (Passerini) y *Schizaphis graminum* (Rondani) en cebada. (en línea). Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. 37 (2): 25-32. Consultado 17 mar. 2017. Disponible en http://www.bdigital.uncu.edu.ar//objetos_digitales/780/ricciAgrarias2-05.pdf
87. Rodney, M.; Mark, D. R. 1997. Experimental manipulation of putative selective agents provides evidence for the role of natural enemies in the evolution of plant defense. International Journal of Organic Evolution. 51 (5): 1435-1444.
88. Roessner, U.; Bowne, J. 2009. What is metabolomics all about? (en línea). Biotechniques. 46: 363-365. Consultado 13 dic. 2016. Disponible en http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00044/BTN_A_000113133_O_44653a.pdf
89. Ryan, J. D.; Morgham, A. T.; Richardson, P. E.; Johnson, R. C.; Mort, A. J.; Eikenabary, R. D. 1990. Greenbugs and wheat: a model system for the study of phytotoxic Homoptera. In: Campbell, R. K.; Eikenabary R. D. eds. Aphid-plant genotype interactions. Amsterdam, Elsevier. pp. 171-186.
90. Salvadori, J. R.; Lau, D.; Valle da Silva, P. R. 2009. Cultivo de trigo; pragas e métodos de controle. Brasil, EMBRAPA. Sistemas de producao 4. sp.
91. Shonle, I.; Bergelson, J. 2000. Evolutionary ecology of the tropane alkaloids of *Datura stramonium* (solanaceae). Evolution. 54(3): 778-788.
92. Silva, H. R. 2016. Descripción cuantitativa de una red trófica de tres niveles; leguminosas-áfidos-parasitoides y entomopatógenos. Tesis de Maestría. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. s.p.
93. Silveira Guido, A.; Conde Jahn, E. 1946. El pulgón verde de los cereales en el Uruguay (*Toxoptera Schizaphis graminum* Rondani). Revista de la Facultad de Agronomía (Montevideo). no. 41: 35-86.
94. Smith, C. M. 1989. Plant resistance to insects; a fundamental approach. New York, Wiley. s.p.

95. Steinkraus, D. C.; Hollingsworth, R. G.; Slaymaker, P. H. 1995. Prevalence of *Neozygites fresenii* (Entomophthorales: Neozygitaceae) on cotton aphids (Homoptera: Aphididae) in Arkansas cotton. *Environmental Entomology*. 24 (2): 465-474.
96. Stratmann, J. W.; Ryan, C. A. 1997. Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United State of America*. 94 (20): 11085–11089.
97. Tatchell, G. M.; Parker, S. J. 1990. Host plant selection by migrant *Rhopalosiphum padi* in autumn and the occurrence of an intermediate morph. *Entomology Experimentalis et Applicata*. 54 (3): 237-244.
98. Teetes, G. L.; Schaefer, C. A.; Gipson, J. R.; McIntyre, R. C.; Latham, E. E. 1975. Greenbug resistance to organophosphorous insecticides on the Texas high plains 12. *Entomological society of America, Journal of Economy Entomology*. 68(2): 214-216.
99. Tocho, E. F.; Marino de Remes Lenicov, A. M.; Castro, A. M. 2012. Evaluación de la resistencia a *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae) en cebada. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 71 (1-2):01-10.
100. Van den Berg, R.; Hoefsloot, H.; Westerhuis, J.; Smilde, A.; Van der Werf, M. 2006. Centering, scaling, and transformations; improving the biological information content of metabolomics data. (en línea). *BMC Genomics*. 7: 142-157. Consultado 10 ene. 2017. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1534033/>
101. Van Emden, H. F.; Harrington, R. 2007. *Aphids as crop pests*. (en línea). London, UK, CABI. 699 p. Consultado 20 nov. 2016. Disponible en <http://www.arvin-agri.com/Maghalat/Book/Aphids-as-Crop-Pests.pdf>
102. Verpoorte, R.; Choi, Y. H.; Kim, H. K. 2007. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochemical Rev*. 6: 3–14
103. Webster, J. A.; Starks, K. J. 1984. Sources of resistance in barley to two biotypes of greenbug *Schizaphis graminum* (Rondani) (Homoptera: Aphididae). *Protection Ecology*. 6:51-55.

104. Widarto, H. T.; Van der Meijden, E.; Lefeber, A.W. M.; Erkelens, C.; Kim, H. K.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. 2006. Metabolomic differentiation of *Brassica rapa* following herbivory by different insect instars using two dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Chemical Ecology*. 32: 2417-2428

9. ANEXOS

Anexo No. 1. Análisis de varianza para SPAD basal post-tratamiento

F. V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	524,2	22	23,8	2,2088	0,0041
Genotipo	96,6	7	13,8	1,2787	0,2681
Tratamiento	2,8	1	2,8	0,2592	0,6117
Bloque	328,6	7	46,9	4,3513	0,0003
Genotipo*trat.	96,3	7	13,7	1,2749	0,2700
Error	1121,9	104	10,8		
Total	1646,1	126			

(α 0,10). CV %15,5

Según el análisis de varianza no son significativos los tratamientos ni los genotipos, tampoco lo es la interacción genotipo por tratamiento para el SPAD basal.

Se analizaron las medidas de SPAD tanto basal como apical para obtener resultados, representativos del estado general de la planta.

Anexo No. 2. Análisis de varianza para SPAD apical post- tratamiento

F. V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	780,5	22	35,5	2,7876	0,0003
Genotipo	484,8	7	69,3	5,4426	<0,0001
Trat	6,8	1	6,8	0,5312	0,4677
Bloque	191,6	7	27,4	2,1507	0,0446
Genotipo*trat	97,3	7	13,9	1,0918	0,3739
Error	1323,5	104	12,7		
Total	2103,9	126			

(α 0,10). CV 10,47%

Se observa que el efecto genotipo es significativo para el SPAD apical, no existiendo significancia para los tratamientos ni la interacción de los mismos con el genotipo.

Para un análisis más exhaustivo de los resultados se compararon las medias de SPAD basal y apical entre los genotipos para constatar la existencia de diferencias entre los genotipos.

Anexo No. 3. Comparación de medias de SPAD apical y basal entre genotipos

Genotipo	Media apical	Media basal
F183	35,88a	22,06a
F23	33,16ab	20,65a
F32	33,23ab	20,52a
F21- Ceibo	34,39ab	20,46a
F35- Arrayan	36,55a	22,51a
F329	31,72b	20,39a
C9614	31,20b	20,30a
Ambev 59	36,42a	22,13a

Test de Tukey (α 0,10)

El test de Tukey para el contenido de clorofila apical de la hoja medido como SPAD apical pos tratamiento, no arrojo diferencias significativas en cuanto a la media de los tratamientos con y sin pulgón, lo mismo se identificó para SPAD basal

Anexo No. 4. Análisis de varianza para materia seca post- tratamiento

F. V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,0015	22	0,0001	4,1124	<0,0001
Genotipo	0,0010	7	0,0001	9,1702	<0,0001
Tratamiento	0,0001	1	0,0001	3,7206	0,0564
Bloque	0,0003	7	3,7E-05	2,2732	0,0340
Genotipo*trat	0,0001	7	1,6E-05	0,9498	0,4718
Error	0,0017	105	1,6E-05		
Total	0,0032	127			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p -valor > 0,10). CV 18,43%

Se midió la biomasa aérea expresada en mg de materia seca de los genotipos pos tratamiento para determinar si había diferencias entre tratamientos y entre genotipos. Se observó que la interacción genotipo por tratamiento no fue significativa (p -valor > 0,10), lo que sí se puede constatar es que tanto los genotipos como los tratamientos son significativos (p -valor < 0,10). Cabe destacar que para este análisis se utilizó un p -valor de 0,10, de forma de encontrar al menos alguna diferencia, que con un análisis más estricto con un alfa menor no se podría detectar.

Para evaluar el efecto de *S.graminum* en cada genotipo se realizó una comparación de medias de datos de materia seca pos tratamiento, para constatar la existencia de diferencias significativas entre los genotipos evaluados.

Anexo No. 5. Comparación de medias de materia seca (MS) entre genotipos.

Genotipo	Media kg MS
Ambev 59	0,0262 a
F183	0,0255 ab
C9614	0,0242 abc
Perún	0,0218 bcd
F329	0,0212 cd
F35- Arrayan	0,0196 d
Ceibo	0,0193 d
Karl	0,0178 d

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p-valor > 0,10).

Luego de comparar las medias de materia seca entre los genotipos se comparó la media entre los tratamientos con y sin pulgón para ver el efecto general de la presencia del pulgón.

Anexo No. 6. Comparación de medias de los tratamientos.

Tratamiento	Media (mg de MS)
Sin pulgón	0,0226 A
Con pulgón	0,0212 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p-valor > 0,10)

Se obtuvieron diferencias significativas en el contenido de MS de los cultivares al realizarles el tratamiento que se basaba en convivir durante diez días con pulgones. El testigo sin pulgón fue el que presentó mayor contenido de materia seca por planta, coincidiendo con los resultados esperados que constatan que la presencia del pulgón afecta la producción de biomasa de la planta, mediante la reducción del contenido de fotoasimilados los que son succionados durante la alimentación de *S.graminum*.