

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I

**PAPEL DE LOS ÁCIDOS HIDROXÁMICOS DE CEREALES EN EL  
CONTROL DE *DIURAPHIS NOXIA* (HOMOPTERA, APHIDIDAE).**

TESIS DOCTORAL

ANA MARIA MAYORAL CANALEJAS

1995

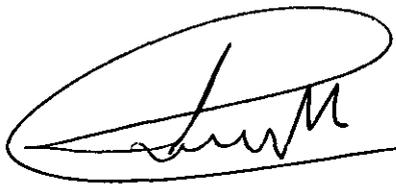
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I



**PAPEL DE LOS ÁCIDOS HIDROXÁMICOS DE CEREALES EN EL  
CONTROL DE *DIURAPHIS NOXIA* (HOMOPTERA, APHIDIDAE).**

Director:

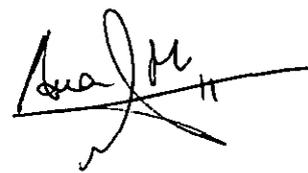
Dr. Pedro Castañera Domínguez



Profesor de Investigación del  
Centro de Investigaciones  
Biológicas (CSIC)

Autora:

Ana María Mayoral Canalejas



Memoria presentada por  
Ana María Mayoral Canalejas  
para optar al grado de Doctor en  
Ciencias Biológicas

Madrid, mayo de 1995

*A mis padres*

Deseo expresar mi agradecimiento:

Al Dr. Pedro Castañera, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis, por la paciente atención que ha demostrado a lo largo del desarrollo de la misma y por haberme introducido en el mundo de la investigación.

Al Dr. Freddy Tjallingii, por la excelente acogida de la que fui objeto en el Departamento de Entomología de la Universidad de Wageningen y por facilitarme el aprendizaje de la técnica de EPG.

A la Dra. Carmen Gutiérrez, por su ayuda en el desarrollo del método de análisis de las muestras.

A la Dra. Pilar Estévez por su desinteresado apoyo y por haber aceptado la ponencia de esta tesis.

A mi compañera de laboratorio Ana Taberner, por sus buenos consejos, su valiosa ayuda durante el transcurso de esta tesis y muy especialmente por su amistad.

A mis compañeros Vicente Marco y Félix Ortego, por sus acertados comentarios y por el apoyo moral que me han sido de gran ayuda en todo momento.

A Marisa Ruíz, por el apoyo técnico y por su buen humor que siempre me han hecho el trabajo muy agradable.

A Concepción Novillo, que siempre ha tenido palabras de aliento en los momentos finales de la escritura de la tesis.

A Paloma Pérez y Carmen Muñoz, por el apoyo y amistad que me han brindado constantemente.

A Ernesto Prado, por su gran compañerismo y por su entrañable amistad.

Al Dr. Marteen van Helden por su asesoramiento técnico y por su ayuda constante durante mi estancia en la Universidad de Wageningen.

A Jose Manuel por su apoyo incondicional, por sus indicaciones y consejos, así como por haberme soportado pacientemente durante la escritura de esta tesis.

A mi familia y amigos, que también me han animado, soportado y apoyado en todo momento.

A todas aquellas personas que, aunque no aparecen aquí, me han brindado su colaboración, enseñanzas y apoyo, y sin cuya ayuda hubiera sido difícil la realización de este trabajo.

Esta tesis se ha realizado en el Departamento de Biología de Plantas del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) gracias a una beca de FPI concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia.

## INDICE

### I. INTRODUCCION.

I.1 Resistencia de las plantas frente al ataque de insectos.	1
I.2 Papel de los metabolitos secundarios en la resistencia de plantas a insectos.	3
I.2.1 Metabolitos secundarios constitutivos.	3
I.2.2 Metabolitos secundarios no constitutivos.	5
I.3 Papel de los metabolitos secundarios en la resistencia de las plantas a pulgones.	5
I.3.1 Los ácidos hidroxámicos.	7
I.3.1.1 Tipos de benzoxazinonas.	7
I.3.1.2 Fisiología de los ácidos hidroxámicos en las plantas.	10
I.3.1.3 Papel biológico de los ácidos hidroxámicos en las plantas.	14
I.3.1.3.1 Resistencia a insectos.	14
I.3.1.3.2 Otras funciones.	16
I.4 Los pulgones de cereales.	16
I.5 Biología del pulgón <i>Diuraphis noxia</i> (Kurdjumov).	19
I.5.1 Posición sistemática.	19
I.5.2 Descripción morfológica.	20
I.5.3 Distribución geográfica.	20
I.5.4 Biología.	23
I.5.5 Daños.	24
I.5.6 Métodos de control.	25

I.5.6.1 Plaguicidas.	25
I.5.6.2 Fertilizantes.	26
I.5.6.3 Enemigos naturales.	26
I.5.6.4 Plantas resistentes.	28
I.6 Objetivos de la tesis.	29

## II. MATERIAL Y METODOS.

II.1 Material biológico.	31
II.2. Aparatos y reactivos.	32
II.2.1. Aparatos.	32
II.2.2. Reactivos.	33
II.2.3. Otros.	34
II.3 Mantenimiento del clon de <i>D. noxia</i> .	34
II.4 Análisis de Hx mediante HPLC.	35
II.4.1 Obtención del material vegetal para el aislamiento de ácidos hidroxámicos.	35
II.4.2 Preparación de patrones.	36
II.4.3 Preparación de muestras.	36
II.4.4 Condiciones de análisis.	37
II.4.5 Identificación y cuantificación de DIBOA, DIMBOA y MBOA en extractos acuosos.	38
II.5 Cuantificación de las concentraciones de Hx en genotipos de cinco especies de cereales de invierno.	38
II.6. Recolección y análisis de floema.	39
II.6.1 Valoración de los Hx en los exudados de floema mediante HPLC.	40

II.6.2 Detección de los Hx en los exudados de floema mediante GLC-MS.	40
II.6.2.1 Preparación de extractos.	40
II.6.2.2 Preparación de las muestras para GLC-MS.	41
II.6.2.3 Identificación de los Hx en exudados de floema de varias especies de cereales.	42
II.6.3 Valoración de sacarosa.	43
II.7. Estudio del comportamiento de alimentación de <i>D. noxia</i> mediante la técnica de EPG con un sistema de corriente continua en cinco especies de cereales con distintos niveles de Hx.	43
II.7.1 Pretratamiento de los pulgones.	44
II.7.2 Registro del comportamiento de alimentación.	45
II.7.3 Análisis de los registros.	48
II.7.4 Análisis de los ácidos hidroxámicos.	52
II.8 Tabla de vida de <i>D. noxia</i> en cultivares de cinco especies de cereales de invierno con distintos niveles de Hx.	52
II.8.1 Procedimientos generales.	52
II.8.2 Cálculo de la tasa interna de crecimiento y otros parámetros poblacionales de la tabla de vida.	53
II.9 Tabla de vida de <i>D. noxia</i> en cultivares de trigo blando y trigo duro con distintos niveles de Hx.	55
II. 10 Efecto de DIMBOA, suministrado en dieta	

artificial, sobre ninfas de <i>D. noxia</i> .	55
II.10.1 Obtención de ninfas de la misma edad.	55
II.10.2 Estudio del efecto del DIMBOA en ninfas de <i>D. noxia</i> .	56
II.11 Análisis estadístico.	57

### III. RESULTADOS.

III.1. Método de separación y cuantificación de ácidos hidroxámicos por HPLC.	58
III.1.1 Identificación de DIBOA, DIMBOA y MBOA en extractos acuosos de cereales.	58
III.1.2 Cuantificación de DIBOA, DIMBOA y MBOA en genotipos de cinco especies de cereales de invierno.	64
III.2 Cuantificación de las concentraciones de Hx en genotipos de cinco especies de cereales de invierno.	65
III.2.1 Cultivares de trigo blando.	65
III.2.2 Cultivares de trigo duro.	65
III.2.5 Cultivares de triticale.	66
III.2.6 Cultivares de centeno.	66
III.2.7 Cultivares de cebada.	66
III.3 Comportamiento de alimentación de <i>D. noxia</i> en genotipos de cinco especies de cereales de invierno con distintos niveles de Hx.	70
III.3.1 Cuantificación de Hx en exudados de floema.	74
III.4 Tabla de vida de <i>D. noxia</i> en cultivares de cinco	

especies de cereales de invierno con diferentes concentraciones de Hx.	79
III.5 Tabla de vida de <i>D. noxia</i> en cultivares de trigo blando con diferentes concentraciones de Hx.	87
III.5.1 Niveles de Hx.	87
III.5.2 Niveles de sacarosa en exudados de floema.	87
III.5.3 Tabla de vida de <i>D. noxia</i> en cultivares de trigo blando.	91
III.6 Tabla de vida de <i>D. noxia</i> en cultivares de trigo duro con diferentes concentraciones de Hx.	94
III.6.1 Niveles de Hx.	94
III.6.2 Niveles de sacarosa en exudados de floema.	96
III.6.3 Tabla de vida de <i>D. noxia</i> en cultivares de trigo duro.	96
III.7 Efecto del DIMBOA, suministrado en dieta, sobre ninfas de <i>D. noxia</i> .	104

#### **IV. DISCUSION.**

IV.1. Método de separación y cuantificación de ácidos hidroxámicos por HPLC.	107
IV.2 Cuantificación de las concentraciones de Hx en genotipos de cinco especies de cereales de invierno.	109
IV.2.1 Cultivares de trigo blando.	109
IV.2.2 Cultivares de trigo duro.	110
IV.2.3 Cultivares de triticale.	111
IV.2.4 Cultivares de centeno.	111

IV.2.5 Cultivares de cebada.	112
IV.3 Comportamiento de alimentación de <i>D. noxia</i> en genotipos de cinco especies de cereales de invierno con distintos niveles de Hx.	112
IV.4 Efecto del DIMBOA y DIBOA sobre los parámetros poblacionales de la tabla de vida de <i>D. noxia</i> en cultivares de cinco especies de cereales de invierno con distintos niveles de Hx.	116
IV.5 Efecto del DIMBOA y DIBOA sobre los parámetros poblacionales de la tabla de vida de <i>D. noxia</i> en cultivares de trigos blandos y duros con distintos niveles de Hx.	119
IV.6 Efecto del DIMBOA, suministrado en dieta artificial, sobre ninfas de <i>D. noxia</i> .	126
<b>V. CONCLUSIONES.</b>	129
<b>VI. BIBLIOGRAFIA.</b>	133

## ABREVIATURAS

<b>BOA</b>	2(3)-benzoxazolinona
<b>BSTFA</b>	Bis(trimetilsilil)-trifluoracetamida
<b>BYDV</b>	Virus del enanismo amarillo de la cebada
<b>Ch. spring</b>	Chinese spring
<b>cv.</b>	Cultivar
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DIBOA</b>	2-(2,4-dihidroxi)-1,4(2H)-benzoxazin-3-ona
<b>DIMBOA</b>	2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4(2H)-benzoxazin-3-ona
<b>EDTA</b>	Acido etilendiamino tetracético
<b>EPG</b>	"Electrical Penetration Graph"
<b>GLC</b>	Cromatografía Gas-Líquido
<b>GLC-MS</b>	Cromatografía Gas-Líquido y Espectrometría de masas
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta eficacia
<b>H.R.</b>	Humedad relativa
<b>Hx</b>	Acidos hidroxámicos
<b>MBOA</b>	6-metoxi-2(3)-benzoxazolinona
<b>min</b>	minutos
<b>np</b>	no penetración
<b>Recio de M.</b>	Recio de Málaga
<b>seg</b>	segundos
<b>TMS</b>	trimetil-silil
<b>tris</b>	tris (hidroximetil) aminometano

## INTRODUCCION

## **I. INTRODUCCION.**

### **I.1 Resistencia de las plantas frente al ataque de insectos.**

La utilización de plantas resistentes a insectos comenzó, de forma empírica, a finales del siglo XVIII en Estados Unidos, donde se utilizaron cultivares de maduración temprana para evitar el ataque del mosquito del trigo (*Mayetiola destructor* Say). En 1831 la variedad de manzano "Winter Majetin" fue descrita en Inglaterra como resistente al pulgón del manzano (*Eriosoma lanigerum* Hausman). Pero, sin duda, el éxito más espectacular conseguido fue el control de la filoxera (*Phylloxera vitifoliae* Finch) en las vides europeas en 1890, mediante el empleo de pies de vides americanas resistentes a dicho insecto.

En las primeras décadas del presente siglo el estudio de la resistencia de plantas a insectos perdió el auge que había alcanzado en el siglo anterior, hasta que Painter impulsó de nuevo estos estudios al final de los años veinte. Tras su libro: "Insect resistance in crop plants", publicado en 1951, este autor ha sido considerado como el fundador de la investigación en la resistencia de plantas a insectos en Estados Unidos (Smith, 1990). Desde 1978 se han desarrollado y registrado en Estados Unidos aproximadamente unas 400 variedades con resistencia a varios artrópodos. De ellos actualmente se emplean unos 100 cultivares. Del mismo modo en Asia se han obtenido unos 100 variedades de arroz resistentes a insectos (Smith, 1989).

Painter definió en 1951 la resistencia de plantas a insectos como la propiedad que capacita a una planta para evitar, tolerar o recuperarse del daño producido por una población de insectos que causarían un daño mayor a otras plantas de la misma especie en las

mismas condiciones ambientales. Este autor propuso la existencia de tres categorías generales de resistencia en las plantas:

- No preferencia: Modifica el comportamiento del insecto para la alimentación y/o la oviposición. Puede estar ligada a caracteres físicos o morfológicos.
- Antibiosis: Afecta de forma negativa los procesos metabólicos de los insectos, interfiriendo con los procesos fisiológicos del crecimiento, la reproducción y/o la supervivencia de los mismos.
- Tolerancia: La planta es capaz de soportar una población de insectos sin pérdida de su vigor o reducción del rendimiento.

Posteriormente, Kogan y Ortman (1978) llamaron antixenosis al mecanismo de "no preferencia". Russell sugirió en 1978 la existencia de una cuarta modalidad de resistencia: "Escape de la plaga" que consiste en que la planta no se encuentra en un estado de desarrollo susceptible cuando se produce el ataque de los insectos.

Otra categorización de la resistencia fue propuesta por Levin (1971), quien la clasificó en:

- Constitutiva: La planta es resistente antes del contacto con el patógeno o plaga.
- Inducida: La resistencia tiene lugar como consecuencia de la interacción física y/o química entre la planta y el organismo que la ataca.

Posteriormente, Kogan y Paxton (1983) definieron la resistencia inducida como el aumento cualitativo y/o cuantitativo de los mecanismos defensivos de la planta en respuesta a estímulos externos físicos o químicos.

Las características que confieren resistencia en plantas pueden ser morfológicas: variación en el tamaño, forma, color, pubescencia, dureza o grosor de las hojas, y bioquímicas, que incluyen la composición desde el punto de vista nutritivo de la planta, así como la presencia de compuestos aleloquímicos que actúan como repelentes, deterrentes de la alimentación u oviposición y tóxicos (Levin, 1971; Auclair, 1989). La defensa química de las plantas a una o varias especies de insectos se basa a menudo en la presencia de varios compuestos (Shapiro, 1991). Las barreras morfológicas y físicas son también importantes componentes de las defensas de las plantas, aunque se ha dado mayor importancia a los metabolitos secundarios (Rhodes, 1994).

## **1.2 Papel de los metabolitos secundarios en la resistencia de plantas a insectos.**

Los metabolitos secundarios pueden ser constitutivos y no constitutivos.

### **1.2.1 Metabolitos secundarios constitutivos.**

Son aquellos metabolitos que se encuentran en plantas sanas y que suponen una primera barrera química para el ataque de insectos (Levin, 1971). Se ha observado que cultivares de sorgo sufren menos daño al ser atacadas por insectos masticadores cuando presentan elevadas concentraciones de compuestos fenólicos (Woodhead *et al.*, 1980). Los productos del metabolismo primario son comunes a todas

las especies de plantas y constituyen un número limitado de compuestos, mientras que los procedentes del metabolismo secundario presentan una mayor variedad y su distribución varía entre especies de plantas, pudiendo incluso limitarse a una única especie o algunas especies relacionadas (Rhodes, 1994).

Los metabolitos secundarios no se encuentran uniformemente distribuidos en la planta, sino que suelen localizarse en órganos determinados o en ciertos tejidos o células especializadas dentro de un órgano de la planta (Hashimoto *et al.*, 1987). A menudo, el órgano donde se acumulan estos compuestos es diferente al de biosíntesis.

Las enzimas que intervienen en el metabolismo secundario son de dos tipos: específicas de los esqueletos básicos de las moléculas y las implicadas en la modificación de la estructura básica de los compuestos: *deshidrogenasas, monooxigenasas, metiltransferasas y glucosiltransferasas*. Se ha sugerido que la acción de este último grupo de enzimas explicaría la gran variedad de metabolitos secundarios presentes en las plantas que poseen el mismo esqueleto básico (Rhodes, 1994).

Los metabolitos secundarios pueden desempeñar un importante papel en la interacción de la planta con otros organismos actuando como sustancias de defensa frente a patógenos, fitófagos y distintas formas de estrés ambiental (Levin, 1971). Esta teoría tiene amplia aceptación en la actualidad, a pesar de que el soporte experimental de la misma se basa más en correlaciones que en evidencias directas.

### **I.2.2 Metabolitos secundarios no constitutivos.**

Son aquellos metabolitos que no están presentes en plantas sanas y se sintetizan como consecuencia del ataque de agentes externos, debido a unas señales que se liberan en el tejido dañado y se transportan al lugar de síntesis. Se ha descrito que el ataque de insectos y de hongos fitopatógenos provoca el aumento de la concentración de fenoles (Woodhead, 1981). También se ha detectado la síntesis de fitoalexinas como consecuencia del ataque de insectos: el pulgón del moteado de la alfalfa provoca el aumento de la concentración de cúestrol, una fitoalexina de la alfalfa (Loper, 1968; Smith *et al.*, 1971). Las pectinasas del curculiónido *Cylas formicarius* (Fabricius) inducen la síntesis de terpenos en algunas convolvuláceas (Sato *et al.*, 1982).

### **I.3 Papel de los metabolitos secundarios en la resistencia de las plantas a pulgones.**

Varios tipos de metabolitos secundarios han sido implicados en la resistencia natural de plantas a pulgones. Entre ellos cabe destacar alcaloides, compuestos fenólicos y los ácidos hidroxámicos (Hx).

La resistencia de la retama al pulgón *Aphis cytisorum* (L.) y del altramuz a *Acyrtosiphum pisum* (Harris) se ha atribuido a los alcaloides asparteina y lupanina, respectivamente (Wink *et al.*, 1982; Wink y Witte, 1984). En cuanto a la resistencia de gramíneas a pulgones, la gramina juega un papel importante. Este compuesto es un indolalcaloide que se ha detectado en algunas especies del género

*Hordeum* (Hanson *et al.*, 1981) y en otras gramíneas silvestres (Williams *et al.*, 1971; Mulvena y Slaytor, 1983). La gramina se ha localizado en la epidermis y en el parénquima mesofílico, pero no se ha detectado en el floema, exudados de xilema o gotas de gutación (Argandoña *et al.*, 1987; Yoshida *et al.*, 1993). Tampoco se ha detectado en la melaza de pulgones alimentados con plantas de cebada (Dreyer y Campbell, 1987). Varios autores han establecido correlaciones entre la concentración de gramina en varios cultivares de cebada y el grado de resistencia a *Schizaphis graminum* (Rondani) (Zúñiga *et al.*, 1985) y a *Rhopalosiphum padi* L. (Zúñiga y Corcuera, 1986). Por otra parte, Corcuera (1984) y Zúñiga *et al.* (1985) observaron que la gramina actuaba de forma deterrente y/o tóxica cuando se suministró en dieta artificial, a *S. graminum* y *Rhopalosiphum maidis* (Fitch), así como a *R. padi* (Zúñiga y Corcuera, 1986).

Otros metabolitos que parecen tener un papel relevante en la resistencia a los pulgones son los compuestos fenólicos. Se han observado menores niveles de infestación de *R. padi* y *Sitobion avenae* (F.) en cultivares de trigo con alto contenido en compuestos fenólicos (Leszczynski *et al.*, 1985, 1989; Niraz *et al.*, 1985). Es más, cuando se incorporaron en cultivos hidropónicos los dihidroxifenoles: cafeico, ferúlico y pirocatecol, presentes en gramíneas, a plantas de trigo carentes de estos compuestos, ejercían un efecto tóxico sobre las ninfas de *R. padi* (Leszczynski *et al.*, 1985). Así mismo, se ha comprobado que dichos metabolitos suministrados en dieta artificial reducen drásticamente el peso, la fecundidad y la supervivencia de esta especie (Todd *et al.*, 1971).

Por otra parte, se ha observado que la sinigrina, un glucosinolato, actúa como deterrente para algunas especies de pulgones tales como *Aphis fabae* Scopoli y *A. pisum* (Nault y Styer, 1972).

Los glucósidos cianogénicos han sido también implicados en la resistencia de plantas a pulgones. Concretamente la durrina, que se localiza en la epidermis de las hojas de sorgo (Kojima et al., 1979), se ha descrito como un deterrente de la alimentación a *S. graminum* (Dreyer et al., 1981).

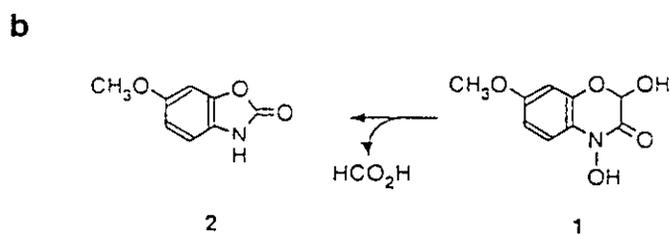
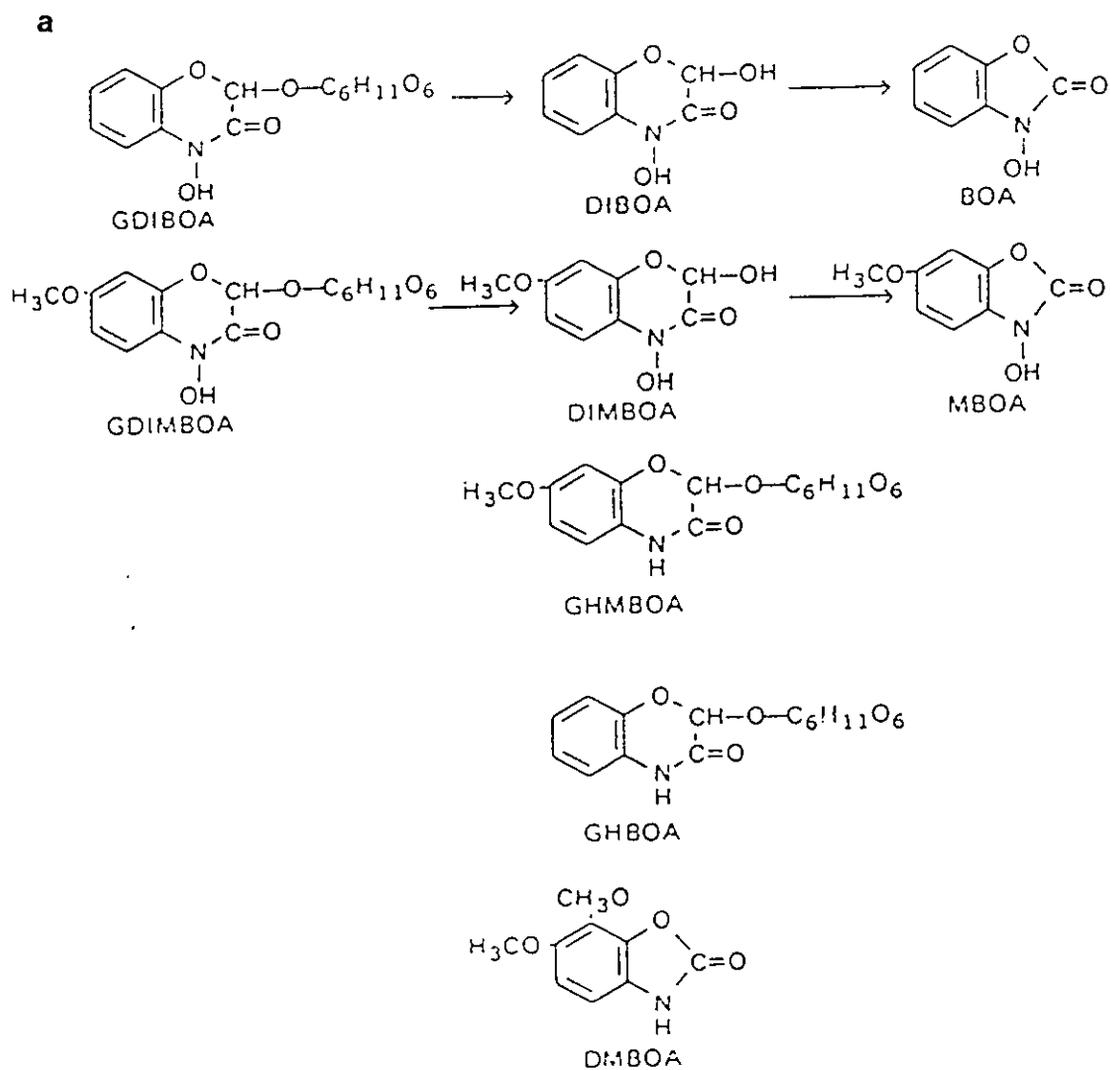
El ácido aconítico es un compuesto de modo de acción no bien conocido (Corcuera, 1993), que se ha detectado en varias especies de gramíneas: maíz, trigo, sorgo, arroz, *Echinochloa* spp y en pequeñas cantidades en cebada. Las líneas de maíz, sorgo y tres subespecies de *Echinochloa oryzicola* que presentaron concentraciones altas de ácido aconítico fueron resistentes a *R. maidis* (Rustamani et al., 1992a,b).

Mención aparte requieren los ácidos hidroxámicos.

### **1.3.1 Los ácidos hidroxámicos.**

#### **1.3.1.1 Tipos de benzoxazinonas.**

Las benzoxazinonas (Fig. 1a) son ácidos hidroxámicos cíclicos (Hx) que se encuentran en numerosas especies de plantas. La primera referencia a estos compuestos se debe a Virtanen y Hietala (1955), que aislaron el 2(3)-benzoxazolinona (BOA) de plántulas de centeno (Fig. 1a). El metoxi derivado del BOA, el 6-metoxi-2(3)-benzoxazolinona (MBOA), fue aislado posteriormente de trigo y maíz



**Fig. 1.** a) Estructura de los ácidos hidroxámicos. b) Degradación del DIMBOA (1) a MBOA (2).

(Virtanen *et al.*, 1956; Loomis *et al.*, 1957) (Fig. 1a). Virtanen *et al.* (1957) propusieron que el precursor natural del BOA en centeno era un glucósido, mientras que Walhroos y Virtanen (1959) postularon que el precursor del MBOA en trigo y maíz era un glucósido. Posteriormente se identificaron las estructuras de los precursores naturales del BOA en centeno como el glucósido 2-(2,4-dihidroxi)-1,4(2H)-benzoxazin-3(4H)-ona-D-glucopiranosido (GDIBOA) y el aglucón 2-(2,4-dihidroxi)-1,4(2H)-benzoxazin-3-ona (DIBOA) (Hietala y Virtanen, 1960) (Fig. 1a). Igualmente, Walhroos y Virtanen (1959) determinaron las estructuras del glucósido precursor del MBOA en trigo y maíz, 2-(2,4-dihidroxi)-7-metoxi-1,4(2H)-benzoxazin-3(4H)-ona-D-glucopiranosido (GDIMBOA) y del aglucón 2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4(2H)-benzoxazin-3-ona (DIMBOA) (Fig. 1a). La estructura del DIMBOA aislado de maíz fue confirmada por Hamilton *et al.* (1962). Muchos de los trabajos iniciales en relación con resistencia de cereales a plagas se realizaron con BOA y MBOA, sin embargo estos productos no se encuentran de forma natural en las plantas sino que son artefactos de la extracción (Willard y Penner, 1976). Los Hx se acumulan en la planta en forma de glucósidos y sufren hidrólisis mediante endoglucosidasas cuando se daña el tejido vegetal (Virtanen y Hietala, 1960). El calor y otros agentes durante la extracción provocan la formación de las benzoxazolinonas a partir de las agluconas. Inicialmente se pensó que el BOA y el MBOA se encontraban de forma natural en las plantas debido a que no se detenía el proceso enzimático antes de la extracción (Virtanen y Walhroos, 1963). Posteriormente, se observó que cuando la reacción enzimática se detenía inmediatamente sólo se detectaba el glucósido

(GDIMBOA) en tejidos de maíz (Hofman y Hofmanova, 1971). Honkanen y Virtanen (1961) comprobaron que la conversión de DIBOA y DIMBOA a BOA y MBOA, respectivamente, tenía lugar mediante la liberación de ácido fórmico (Fig. 1b).

Se han aislado, en menores cantidades, otros Hx en maíz, como: el 2-(2-hidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona)-D-glucopiranosido (GHMBOA) (Gahagan y Mumma, 1967), el 2-(2-hidroxi-1,4-(2H)-benzoxazin-3(4H)-ona)-D-glucopiranosido (GHBOA) (Hofman y Hofmanova, 1969) y el 6,7-dimetoxi-2-benzoxazolinona (DMBOA) (Klun *et al.*, 1970) (Fig. 1a).

Los ácidos hidroxámicos han sido detectados en gran número de géneros de la familia Gramineae, excepto en *Avena*, *Hordeum* y *Oriza* (Hamilton, 1964; Tang *et al.*, 1975; Argandoña *et al.*, 1980), aunque recientemente Barria *et al.* (1992) han detectado DIBOA en especies silvestres del género *Hordeum*. El Hx mayoritario en trigo y maíz es el DIMBOA, mientras que el DIBOA es más abundante en centeno (Niemeyer, 1988).

### **1.3.1.2 Fisiología de los ácidos hidroxámicos en las plantas.**

Los niveles de Hx no son constantes a lo largo del desarrollo de la planta. Se ha descrito que los niveles de Hx en la parte aérea de la planta disminuyen a partir del cuarto día de la germinación en cultivares de trigo blando y que dichos compuestos no son detectables a las 3 semanas de la nascencia (Baker y Smith, 1977). Posteriormente, Argandoña *et al.* (1981) observaron que los Hx no están presentes en las semillas de trigo duro y que estos compuestos

se detectaban en las plantas a partir del segundo día de la germinación, alcanzando un máximo de concentración al cuarto día de desarrollo, para declinar progresivamente a medida que aumentaba la edad de la planta. El mismo fenómeno se ha observado en la raíz de las plantas, aunque el contenido en Hx fue menor. Thackray *et al.* (1990) analizaron los niveles de DIMBOA en cultivares de trigo blando y trigo duro desde el segundo día de la nascencia y observaron que a partir de ese momento se producía una disminución muy acusada de dichos niveles hasta el cuarto día de desarrollo y más lenta hasta el día 12.

Klun y Robinson (1969) encontraron que en maíz, al igual que ocurre en el trigo, la concentración de Hx fue disminuyendo exponencialmente a medida que aumentaba la edad de la planta, hasta alcanzar valores mínimos en el estado de dehiscencia de las anteras. Morse *et al.* (1991) observaron que se producía una disminución en el contenido en dichos compuestos en plantas de maíz a partir del sexto día de la nascencia. Richardson y Bacon (1993) detectaron el máximo de DIMBOA y DIBOA en plántulas de un día, para declinar después a medida que aumentaba la edad de la plántula de maíz. El ácido abscísico parece estar implicado en la rápida disminución de los niveles de Hx en hojas de maíz, sin embargo el ácido indolacético no parece ejercer ningún efecto sobre la concentración de estos compuestos (Morse *et al.*, 1991).

En cuanto a su distribución en los distintos órganos vegetativos de la planta, se ha observado que en trigos las hojas jóvenes presentan mayores niveles de Hx que las viejas (Argandoña *et al.*, 1980; Niemeyer, 1988b; Thackray *et al.*, 1990). En plantas de maíz se

ha encontrado una mayor concentración de DIMBOA en el tallo que en las hojas (Long *et al.*, 1978).

Según Auclair (1989) no está clara la localización de los Hx en el floema de la planta o en el mesófilo, ni si son ingeridos o no por los pulgones. Los Hx no se han encontrado en exudados de xilema ni en las gotas de gutación de plantas de maíz y trigo. Sin embargo, se ha comprobado que la concentración de Hx es mayor en los haces conductores que en la hoja completa de plantas de maíz y trigo (Argandoña y Corcuera, 1985; Argandoña *et al.*, 1987). Dreyer y Campbell (1987) no detectaron DIMBOA, ni ningún otro metabolito relacionado, en la melaza de *S. graminum* que se habían alimentado de cebada y trigo, por lo que concluyeron que estos compuestos no son transportados en el floema. Sin embargo, el DIMBOA se ha detectado en ninfas de *Metopolophium dirhodum* (Walker) que se habían alimentado de plántulas de trigo y dieta artificial con DIMBOA, así como en *S. avenae* alimentándose de plántulas de trigo (Niemeyer *et al.*, 1989a). Aunque, Givovich *et al.* (1992) han detectado DIMBOA-glucósido en la melaza de *R. padi* alimentados de trigo. Posteriormente, Givovich *et al.* (1994) han informado de la presencia de este compuesto en el floema de cultivares de trigo.

Los niveles de Hx están ligados a los factores ambientales de las plantas, aunque no siempre se ha podido establecer una relación clara. Así, se ha observado que la deficiencia de hierro en el suelo provoca un aumento en la concentración de Hx en plantas de maíz (Manuwoto y Scriber, 1985). Las temperaturas tienen también incidencia. A bajas temperaturas se han observado disminuciones en las concentraciones de Hx en las raíces de plantas de maíz

(Thompson *et al.*, 1970). Sin embargo, se han registrado incrementos de Hx en la parte aérea de plántulas de trigo a bajas temperaturas (Epstein *et al.*, 1986).

La intensidad lumínica y el fotoperiodo afectan igualmente a la concentración de Hx. Manuwoto y Scriber (1985) observaron que plantas de maíz sometidas a un régimen de baja intensidad luminosa presentaban elevadas concentraciones de Hx, mientras que plantas de centeno crecidas en oscuridad mostraban niveles de Hx más bajos que las plantas verdes (Virtanen *et al.*, 1957). Recientemente, se ha observado que los niveles del DIMBOA-glucósido se encuentran negativamente correlacionados con la intensidad lumínica (Ahman y Johansson, 1994).

El estrés hídrico puede también influir en el contenido en DIMBOA y DIBOA, así se ha comprobado que dichos niveles aumentan en plantas de maíz sometidas a estrés hídrico (Richardson y Bacon, 1993).

Otra forma de incremento de los niveles de DIMBOA es a través de la inducción generada por el daño mecánico o de insectos. Se han observado aumentos significativos de este compuesto en plantas de maíz dañadas por el taladro del maíz *Sesamia nonagroides* (Lef.) (Gutiérrez *et al.*, 1988). Así mismo, Thackray *et al.* (1988) mostraron aumentos de la concentración de Hx en plantas de trigo infestadas con *S. avenae*. Resultados similares se han obtenido en trigos insectados con ninfas de *M. dirhodum* (Niemeyer *et al.*, 1989b). Daños artificiales en plantas de maíz también resultaron en un aumento de sus niveles totales de Hx (Thackray *et al.*, 1988; Morse *et al.*, 1991).

### **I.3.1.3 Papel biológico de los ácidos hidroxámicos en las plantas.**

#### **I.3.1.3.1 Resistencia a insectos.**

Los ácidos hidroxámicos han sido implicados en la resistencia de cereales a diversas plagas de insectos. En el caso del taladro del maíz, *Ostrinia nubilalis* (Hübner), el DIMBOA adicionado en una dieta artificial actuó preferentemente como deterrente (Robinson *et al.*, 1982). Posteriormente, se ha observado la existencia de una correlación positiva entre el nivel de resistencia de la planta de maíz y la concentración de Hx (Grombacher *et al.*, 1989). De hecho, la resistencia a este taladro se ha incrementado mediante el empleo de las técnicas de mejora clásica para la obtención de plantas con elevados niveles de Hx (Guthrie *et al.*, 1986; Grombacher *et al.*, 1989). Igualmente, se ha descrito una correlación positiva entre los niveles de DIMBOA y la resistencia del maíz al taladro *S. nonagroides* (Gutiérrez y Castañera, 1986), a *Spodoptera eridania* (Cramer) (Manuwoto y Scriber, 1982) y a *Heliothis zea* (Boddie) (Dowd, 1989). Tanto el DIMBOA como el MBOA han sido implicados en la resistencia del maíz al taladro *Diatraea grandiosella* (Dyar) (Hedin *et al.*, 1993). Otros autores (Xie *et al.*, 1990; 1992) han encontrado que el DIMBOA, aplicado externamente a raíces de maíz, muestra una correlación negativa con el desarrollo larval del coleóptero *Diabrotica virgifera virgifera* (Leconte).

Los Hx han sido considerados como el principal mecanismo de resistencia de carácter bioquímico de trigos frente a pulgones, tanto por antibiosis como por antixenosis (Escobar y Niemeyer, 1993). El primer trabajo que relacionó los niveles de Hx con la resistencia a

pulgones se realizó con *R. maidis* (Long *et al.*, 1977). Se han descrito correlaciones negativas entre los niveles de infestación y la concentración de Hx en las plantas, tanto en condiciones de invernadero como en campo (Beck *et al.*, 1983). Así mismo, se han obtenido correlaciones negativas entre los niveles de Hx y la tasa interna de crecimiento (Bohidar *et al.*, 1986; Thackray *et al.*, 1990). Incluso cuando se incorporó el DIMBOA a hojas cortadas de cebada, que no contienen Hx, se observó igualmente una correlación lineal entre el nivel de infestación de *M. dirhodum* y la concentración de DIMBOA (Argandoña *et al.*, 1980). Corcuera (1982) observó que a medida en que se incrementaba la concentración de DIMBOA suministrado en dieta artificial aumentó la mortalidad de *M. dirhodum* y *S. graminum*. Otros autores han descrito que a concentraciones relativamente bajas de DIMBOA la mortalidad de *S. graminum* se debía a la toxicidad del compuesto, mientras que a concentraciones mayores se observaba un fenómeno de deterrencia, por lo que a concentraciones muy elevadas de DIMBOA los pulgones morirían por inanición (Argandoña *et al.*, 1983). Se han obtenido resultados similares con *S. avenae* alimentándose de plantas de trigo (Niemeyer *et al.*, 1989a). Sin embargo, Kazemi y Emden (1992) no encontraron ninguna correlación entre la concentración de Hx en varios cultivares de trigo y la fecundidad de *R. padi*. Recientemente, se ha estudiado el efecto de los ácidos hidroxámicos sobre el comportamiento de alimentación de los pulgones mediante la técnica "Electrical penetration graph" (EPG). En experimentos realizados con *R. padi* se observó un retraso en el acceso al floema en aquellos cultivares con mayor contenido en DIMBOA y la preferencia de dicho pulgón por los

cultivares con menor contenido en DIMBOA (Givovich y Niemeyer, 1991).

#### **I.3.1.3.2 Otras funciones.**

Los Hx están igualmente implicados en la resistencia de plantas a hongos y bacterias, en la detoxificación de herbicidas y plaguicidas, y algunos de sus productos de degradación presentan actividad alelopática (ver revisión de Niemeyer, 1988a).

#### **I.4 Los pulgones de cereales.**

Los pulgones se encuadran dentro del orden Homoptera y pertenecen a la superfamilia Aphidoidea. Los pulgones son insectos chupadores, alimentándose del floema de las plantas. A lo largo de su ciclo biológico pueden presentar formas ápteras y aladas, y reproducirse asexual y sexualmente. Las formas sexuales se producen fundamentalmente en el otoño, y tras el apareamiento las hembras ovíparas realizan la puesta. Al año siguiente los huevos eclosionan y se suceden generaciones de hembras partenogénicas. Los pulgones pueden desarrollar su ciclo biológico sobre una única planta huésped (monoécicos) o presentar alternancia de plantas huésped (heteroécicos). Algunas especies de pulgones no presentan formas sexuales durante el ciclo y se reproducen partenogénicamente durante todo el año, a estas especies se las denomina anholocíclicas. Cuando presentan reproducción sexual a lo largo del ciclo biológico se les denomina holocíclicas.

Existen referencias de los pulgones como plaga en cereales en Europa desde el siglo XVIII, no obstante no han sido consideradas importantes desde un punto de vista económico hasta la década de los cincuenta, en la que se describieron como vectores del virus del enanismo amarillo de la cebada (BYDV) (Oswald y Houston, 1951;1953). Entre los años 1950-60 se iniciaron estudios sobre los daños directos producidos por los pulgones en Estados Unidos y Nueva Zelanda, pero en Europa no comenzaron hasta 1968, año en el que *S. avenae* produjo daños importantes en los cultivos de cereales del Centro y Norte de Europa. Hacia finales de los 70, de las 40 especies de pulgones asociados a gramíneas en Europa, solamente siete especies se habían encontrado habitualmente en cereales y gramíneas silvestres. Seis de ellas se alimentan de la parte aérea de la planta: *S. avenae*, *Sitobion fragariae* (Walker), *M. dirhodum*, *Metopolophium festucae* (Theobald), *R. padi* y *R. maidis*, y una, el *Rhopalosiphum insertum* (Walker), que ataca a las raíces (Vickerman y Wratten, 1979).

El incremento de la incidencia de los pulgones de cereales en Europa se ha atribuido a los cambios en las técnicas agrícolas (Kolbe y Linke, 1974).

Los pulgones pueden provocar daños directos en los cultivos originando pérdidas en el rendimiento de los mismos (George, 1974,1975; Kolbe y Linke, 1974), así como disminuir la calidad harinopañadera del grano (Vickerman y Wratten, 1979) y su contenido proteico (Rautapää, 1968a,b; Wratten, 1975). Además, pueden producir daños indirectos mediante la transmisión BYDV, puesto que

muchas de las especies importantes de pulgones de cereales son capaces de transmitir este virus (Plumb, 1978).

En la última década las poblaciones de pulgones en cereales han aumentado también en nuestro país, probablemente como consecuencia de los cambios varietales y de los sistemas de producción de cereales de invierno, siendo la plaga de insectos más importante en estos cultivos, debido tanto a sus daños directos (Castañera y Gutiérrez, 1983; Castañera, 1988) como a los indirectos, al ser vectores del BYDV (Alfaro *et al.*, 1985; Pons y Albajes, 1987a,b; Fereres *et al.*, 1989; Lister *et al.*, 1990, Moriones *et al.*, 1993).

Las especies más abundante en trigo, en la zona centro, durante el periodo 1980-85 fueron, en general, *S. avenae*, seguida de *M. dirhodum* y *R. padi* (Castañera, 1988). Así mismo, *S. avenae* y *R. padi* fueron las especies predominantes en rebrotes de trigo y praderas de gramíneas silvestres en los muestreos realizados en los otoño-invierno de 1984-87 (Fereres *et al.*, 1990a) y en cebada en 1987-88 (Moriones *et al.*, 1993).

Las especies más abundantes en Lérida sobre trigos duros fueron *S. avenae*, *M. dirhodum* y *R. padi*. La importancia relativa de estas especies varió a lo largo del periodo de estudio, aunque *S. avenae* fue la más abundante en los años 1983, 1984 y 1985 (Pons *et al.*, 1989).

## **1.5. Biología del pulgón *Diuraphis noxia* (Kurdjumov).**

### **1.5.1 Posición sistemática.**

Phyllum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Homoptera

Superfamilia: Aphidoidea

Familia: Aphididae

Subfamilia: Aphidinae

Tribu: Macrosiphini

Género: *Diuraphis*

Especie: *noxia*, Kurdjumov 1913

Sinónimos utilizados (Stoetzel, 1987):

*Brachycolus noxius* Mordvilko

*Cavahyalopterus graminearium* Mimeur

*Cavahyalopterus noxius* (Mordvilko)

*Cuernavaca noxia* (Mordvilko)

Nombre común: Pulgón ruso del trigo.

Hasta hace unos años, la especie *D. noxia* era conocida como *D. noxia* (Mordv.), sin embargo Mordvilko nunca publicó la descripción de dicha especie, fue Kurdjumov el que proporcionó la descripción morfológica de *D. noxia*, estudió su biología e incluso elaboró unas claves para diferenciarla de otros pulgones de cereales (Kurdjumov, 1913). Por lo tanto, y de acuerdo con el Código Internacional de

Nomenclatura Zoológica, el nombre correcto para la especie sería *D. noxia* (Kurdjumov) (Kovalev *et al.*, 1991).

### **I.5.2 Descripción morfológica.**

*D. noxia* es un pulgón de pequeño tamaño ( $\approx 2,3$  mm) y de color verde amarillento (Fig. 2). Su cuerpo es alargado y a menudo se encuentra cubierto de cera. Los sifones son cortos, truncados y de longitud aproximadamente igual a su anchura. La cauda es alargada y normalmente posee tres pares de setas laterales. Presenta, además, un proceso supracaudal de aproximadamente la misma longitud que la cauda en individuos ápteros, pero aparece como una pequeña protuberancia en los alados (Stoetzel, 1987).

### **I.5.3 Distribución geográfica.**

*D. noxia* fue descrita por primera vez como una plaga de cereales en Rusia (Grosheim, 1914), posteriormente se detectó en 1945 en España (Alfaro, 1947), Turquía en 1962, Sudáfrica en 1978 (Walters *et al.*, 1980), Méjico en 1980 (Gilchrist *et al.*, 1984), Estados Unidos en 1986 (Stoetzel, 1987; Webster *et al.*, 1987), Chile en 1987 (Zerené *et al.*, 1988) y Canadá en 1988 (Jones *et al.*, 1989). El análisis de ADN de varias poblaciones de *D. noxia* procedentes de Méjico, Chile, Estados Unidos, Canadá, Francia y Sudáfrica sugirió que dichas poblaciones proceden de un mismo clon, mientras que las poblaciones de Oriente medio y el sur de Rusia serían ligeramente



Fig. 2. Adulto y ninfa de *D. noxia*.

diferentes de las anteriormente mencionadas (Puterka *et al.*, 1993; Robinson *et al.*, 1993).

La presencia de *D. noxia* en España fue detectada por primera vez sobre plantas de trigo (Alfaro, 1947). No se disponen de datos sobre la incidencia de esta plaga en nuestro país hasta la década de los ochenta. En los muestreos realizados durante los años 1980-85 en la finca El Encín (Madrid), la presencia de *D. noxia* fue detectada como colonias aisladas sobre trigo blando y cebada, e individuos alados en maíz, *Phalaris* sp y *Hordeum murinum* (L.) (Castañera y Gutiérrez, 1983), siendo la segunda especie más abundante de los pulgones registrados en 1983 (Castañera, 1988). En los muestreos de campo efectuados durante el otoño-invierno de 1984-87 se encontraron algunos individuos de *D. noxia* en rebrotes de gramíneas, pero siempre en bajo número (Fereres *et al.*, 1990a). Igualmente, esta especie ha sido detectada de forma ocasional en Lérida (Pons *et al.*, 1993).

En 1989, *D. noxia* fue de las especies más abundantes capturadas en trampas de succión tipo Rothamsted en León, y fue la especie mayoritaria en Salamanca (Melia *et al.*, 1990). Sin embargo, en 1990 la presencia de esta especie fue importante tan sólo en Salamanca (Seco *et al.*, 1991). En 1991, fue la segunda especie de pulgones de cereales más abundante en León y Salamanca (Postigo *et al.*, 1993).

*D. noxia* fue también la especie más abundante en Madrid, Navarra y Zaragoza de los pulgones de cereales capturados en los muestreos realizados en varias localidades españolas en 1990 (Pérez *et al.*, 1992).

Estos recientes hallazgos, a pesar de que los métodos de muestreo fueron distintos, sugieren la existencia de poblaciones altas de *D. noxia* en nuestro país, en el que tradicionalmente *S. avenae* y *R. padi* eran las especies de pulgones de cereales más abundantes.

#### **I.5.4 Biología.**

Todas las especies del género *Diuraphis* son monoécicas en gramíneas (Kovalev *et al.*, 1991). En zonas frías esta especie es probablemente holocíclica (Blackman y Eastop, 1984). En Estados Unidos no se han encontrado formas sexuales (Harvey y Martin, 1988), por lo que parece que las poblaciones de Norteamérica son anholocíclicas (Jones *et al.*, 1989).

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

*D. noxia* se alimenta de las hojas nuevas, especialmente en la base de las mismas. De los cereales, el trigo, la cebada y el triticale son las plantas huéspedes más susceptibles al ataque de esta plaga. La avena, el centeno y el sorgo son menos susceptibles a *D. noxia* (Jones *et al.*, 1989; Kindler y Springer, 1989). En Estados Unidos, *D. noxia* presenta alternancia de huéspedes en verano sobre *Bromus* spp, avenas silvestres, *Agropyrum cristatum* (L.) y *Elymus*

*canadensis* (L.), por lo que estas especies de gramíneas pueden ser un importante reservorio de individuos para años sucesivos (Kindler y Springer, 1989; Armstrong *et al.*, 1991).

### **I.5.5 Daños.**

En los últimos 30 años se ha incrementado el interés en *D. noxia* debido a la rápida propagación de esta plaga y a las elevadas pérdidas económicas que producen en los cultivos de trigo y cebada (Kindler y Springer, 1989; Robinson, 1992a).

Los daños directos producidos por *D. noxia* en las plantas se deben fundamentalmente a que inyectan toxinas que degradan las membranas de los cloroplastos, disminuyendo por tanto la eficacia fotosintética (Fouché *et al.*, 1984) y, como consecuencia de ello, las hojas aparecen cloróticas y se encuentran enrolladas longitudinalmente (Starý y Erdelen, 1982). La clorosis puede dar lugar a necrosis en plantas especialmente susceptibles y finalmente a la muerte de las mismas. *D. noxia* provoca síntomas similares a los producidos por la sequía en plantas de cebada: menor contenido relativo en agua, menor potencial hídrico y bajos niveles de clorofila. Del mismo modo, disminuye la asimilación de CO<sub>2</sub> y la concentración total de hidratos de carbono solubles. El ataque del insecto da lugar también a un incremento en los niveles de prolina y de glicina-betaína (Riedell, 1989; Cabrera *et al.*, 1994). Debido a estos cambios fisiológicos que provocan los pulgones en las plantas se reduce la capacidad de respuesta al estrés hídrico de las mismas, dificultando así el ajuste del potencial osmótico (Dorschner *et al.*, 1986).

*D. noxia* origina igualmente daños de forma indirecta, ya que transmite varias virosis de elevada importancia económica como el BYDV, el BMV (Virus del mosaico del *Bromus*) y el RhpV (Virus de *R. padi*) (Rybicki y Wechmar, 1982; Burnett *et al.*, 1984).

### **I.5.6 Métodos de control.**

#### **I.5.6.1 Plaguicidas.**

El control de esta especie mediante productos químicos es difícil debido a que los pulgones se encuentran protegidos en el interior de las hojas enrolladas (Starý y Erdelem, 1982; Robinson *et al.*, 1992). Insecticidas sistémicos como el disulfoton y el dimetoato controlan de forma eficaz esta plaga, sin embargo, los costes económicos de su aplicación son elevados (Robinson, 1992a). En algunos casos puede ser rentable el tratamiento con insecticidas granulados de liberación lenta de los compuestos activos, con objeto de proteger al cultivo durante un periodo comprendido entre uno y dos meses (Araya *et al.*, 1990). De los insecticidas de contacto, el clorpirifos ha dado buenos resultados, ya que este producto es capaz de penetrar en las hojas enrolladas en forma de vapor, no obstante, su efecto en el campo no es muy duradero (Hill *et al.*, 1993). El tratamiento de huéspedes alternativos de *D. noxia* con clorpirifos puede reducir el número de plantas infestadas entre un 15-43 % (Krall *et al.*, 1993). También se ha descrito que el tratamiento de semillas con el insecticida sistémico imidacloprid, o bien conjuntamente con fungicidas, ejerce una protección eficaz (Pike *et al.*, 1993). Sin embargo, el empleo de productos fitosanitarios para el control de esta

plaga conlleva unos costes que no permiten su aplicación en áreas con rendimientos bajos y con unos precios de mercado a la baja. Existe, además, el riesgo de que estos productos actúen como presión de selección de individuos resistentes, lo que dificultaría en el futuro el control de esta plaga (Robinson, 1992a).

#### **1.5.6.2 Fertilizantes.**

Se ha descrito que el empleo de fertilizantes nitrogenados puede paliar parcialmente los daños causados por *D. noxia* (Riedell y Kieckhefer, 1993). Krall *et al.* (1993) recomiendan la fertilización de suelos para evitar los daños producidos por esta especie, especialmente cuando no hay problemas de sequía.

#### **1.5.6.3 Enemigos naturales.**

##### **Depredadores.**

Actualmente, el control biológico de *D. noxia* mediante el uso de depredadores específicos es difícil por la falta de la sincronización de los ciclos de vida de los depredadores y los pulgones en aquellas zonas donde tiene gran importancia (Estados Unidos). A este hecho se une la dificultad de acceso al interior de las hojas enrolladas por su tamaño (Robinson, 1992a). A pesar de estos inconvenientes, se han introducido y propagado seis especies de coccinélidos para control biológico de *D. noxia*, de las que sólo tres se han establecido en Estados Unidos: *Hippodamia (Adonia) variegata* (Goeze), *Propylea quatuordecimpunctata* (L.) y *Coccinella septempunctata* (L.), (Gordon

y Vanderberg, 1991). Así mismo, se han localizado larvas de sírfidos y de neurópteros alimentándose de *D. noxia*, aunque es poco probable su utilidad en el control de este pulgón, ya que aparecen cuando el nivel de infestación es muy grande y son incapaces de alimentarse de forma efectiva en el interior de las hojas enrolladas (Robinson, 1992b).

### **Parasitoides.**

El empleo de parasitoides en el control de *D. noxia* presenta los mismos problemas que los depredadores: los ciclos biológicos no están sincronizados y es difícil el acceso a los pulgones al estar protegidos por las hojas enrolladas (Robinson, 1992a). En Estados Unidos se ha encontrado al himenóptero *Aphelinus* sp. nr. *varipes* (Foerster) y a un díptero, posiblemente *Leucopis* sp. parasitando a *D. noxia* en el interior de las hojas, siendo el primero el más prometedor para su uso en el control biológico de esta especie. En Colorado y en México el parasitoide más abundante fue el braconídeo *Diaeretiella rapae* (M'Intosh) (Wraight *et al.*, 1993; Robinson, 1992b).

### **Hongos entomopatógenos.**

Feng y Johnson (1991) han observado que *D. noxia* era susceptible a la mayoría de hongos entomopatógenos que atacan a otras especies de pulgones, entre ellos cabe destacar los géneros *Erynia*, *Conidiobolus* y *Verticillium*. El empleo de *Beauveria bassiana* (Balsamo) parece prometedor, ya que aumenta significativamente la

mortalidad de *D. noxia* (Wang y Knudsen, 1993). El mayor potencial de los hongos entomopatógenos es en condiciones de cultivo de regadío por la importancia de la humedad relativa para el desarrollo de los mismos.

#### **I.5.6.4 Plantas resistentes.**

La rápida extensión de *D. noxia*, en varios países en los que su presencia no había sido detectada antes, ha conducido a realizar el cribado de las colecciones existentes en los bancos de germoplasma con el objeto de localizar fuentes de resistencia a esta especie. En Sudáfrica se han identificado varios genotipos resistentes de trigos de invierno procedentes de Oriente Medio y la Europa del Este (Toit, 1987). Recientemente, se han detectado trigos de invierno resistentes en las colecciones de Estados Unidos, muchas de estas líneas procedían del lugar de origen de esta plaga (Porter *et al.*, 1993), de Irán (Baker *et al.*, 1992) y Turquía (Formusoh *et al.*, 1992), y se están empleando en programas de mejora. También se han detectado cebadas resistentes a *D. noxia* (Robinson, 1992c,d), así como genotipos de triticales (Webster, 1990; Scott *et al.*, 1991; Tolmay *et al.*, 1993) y de otras gramíneas resistentes a esta plaga, incluyendo *T. monococcum* L. (Toit y Niekerk, 1985; Toit, 1987) y *T. tauschii* (Nkongolo *et al.*, 1991). Los géneros *Elymus* y *Elytrigia* se han descrito como prometedoras fuentes de resistencia (Kindler *et al.*, 1993).

La resistencia a *D. noxia* en trigos parece estar controlada por genes dominantes (Toit, 1989; Nkongolo *et al.*, 1991). En el caso de la

cebada parece ser de carácter monogénico (Robinson *et al.*, 1992). Mediante análisis de monosómicos se ha localizado el gen que confiere resistencia a esta especie (Dn1) en el cromosoma 7D (Schroeder-Teeter *et al.*, 1994). También se han descrito marcadores moleculares de resistencia en los cromosomas 2 y 5 de cebadas resistentes (Nieto-López y Blake, 1994). Hasta la fecha las variedades de trigo resistentes no se han comercializado, aunque existen buenas perspectivas (Robinson, 1992a).

## **I.6 Objetivos de la tesis.**

El empleo de plantas resistentes a insectos es un método de control eficiente y no contaminante. Además los costes variables ligados a la adquisición y aplicación de plaguicidas se reducen drásticamente.

Por ello, es de gran importancia el conocimiento de las bases químicas de la resistencia de plantas a insectos, tanto para el diseño de programas de mejora tradicionales como para la aplicación de técnicas de ingeniería genética en la obtención de cultivares resistentes. Así mismo, la identificación de los mecanismos bioquímicos de resistencia permite el cribado de un gran número de cultivares empleando métodos de análisis químicos que pueden realizarse en cortos periodos de tiempo.

En este contexto, los aspectos concretos a abordar en el estudio de la interacción pulgón cereal son:

a) La puesta a punto de un método sensible y rápido de separación y cuantificación por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia) de los ácidos hidroxámicos DIBOA, DIMBOA y de sus productos de degradación MBOA y BOA, respectivamente.

b). Cuantificación de los niveles de DIMBOA y DIBOA en genotipos de cinco especies de cereales de invierno para su categorización en relación a estos compuestos y su estudio posterior.

c) Estudiar el comportamiento de alimentación de *D. noxia*, mediante la técnica de EPG con corriente continua, en cinco especies de cereales de invierno con distintos niveles de ácidos hidroxámicos.

d) Determinar la tabla de vida de *D. noxia* en cultivares de varias especies de cereales de invierno con diferentes concentraciones de DIMBOA y DIBOA e implicaciones de estos en la resistencia a este pulgón.

e) Evaluar el efecto producido por distintos niveles de DIMBOA, suministrado en dieta artificial, sobre ninfas de *D. noxia*.

## MATERIAL Y METODOS

## II. MATERIAL Y METODOS

### II.1 Material biológico.

Material vegetal:

- Cultivares de trigo blando, *Triticum aestivum* L.: ABE, Anza, Aragón 03, Armada, Arganda, Astral, Autonomía, Cajeme, Caldwell, Candeal Teruel, Chamorro, Chinese Spring, Estrella, Impeto, Little club, Maris Houtsman, Marius, Mora, Montana, Pané 247, Rieti, Traqueño y Yécora.
  
- Cultivares de trigo duro, *T. turgidum* L.: Aldura, Amoros Blanco, Arisnegro Tenerife, Berberisco F. Núñez, Blat Obeia, Camacho, Mexa, Recio de Almería, Recio de Málaga, Rojo de Llerena, Roqueño, Rubio, Rubio de Córdoba y Vitrón.
  
- Cultivares de triticale, x*Triticosecale* (Wittmack): Badiel, Beagle, Cachirulo, Cananea, Delfín, Fascal, Manigero, Tajuña y Torote.
  
- Cultivares de centeno, *Secale cereale* L.: Elbon y Petkus.
  
- Cultivares de cebada, *Hordeum vulgare* L.: Albacete, Barbarrosa, Beka, Bomi, Bruce, Cytris, Hattif de Griñón, Jeff, Kim, Logra, Mary, Mingo, Reinette, TD Unión, Weak y York.

Todas las semillas fueron suministradas por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA).

Insectos:

Se utilizaron poblaciones del pulgón ruso del trigo: *D. noxia*, procedente de un clon de la finca El Encín (Madrid), mantenido en condiciones de laboratorio.

## **II.2. Aparatos y reactivos.**

### **II.2.1. Aparatos.**

Agitador magnético SELECTA.

Balanza (granatario) PRECISA 600 C.

Balanza de precisión METTLER AM100.

Baño (termostático) de temperatura controlable SELECTA.

Baño de ultrasonidos BRANSON 3200.

Bomba de aspiración EYELA A-2S.

Cámara de cultivo de temperatura, humedad relativa y fotoperiodo controlables CONVIRON S10H.

Congelador de -20°C LIEBHERR.

Cromatógrafo de gases PERKIN ELMER Sigma 3B.

Espectrofotómetro UV-VIS HITACHI U-2000.

Espectrofotómetro UV-VIS SHIMADZU 160.

Espectrómetro de masas PERKIN ELMER (Detector de trampa de iones).

Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) BECKMAN

- Bombas (Modelo 126).

- Detector (Modelo 168).

- Inyector automático (Modelo 502).

Equipo de EPG (Amplificadores Giga-2 y Giga-4, WAU).

Estufa HERAEUS0.

Ordenador personal COMPAQ 386.  
pH-metro BECKMAN  $\Phi$  32.  
Rotavaporador BUCHI RE III.  
Termohidrógrafo semanal SALMOIRAGHI.  
Ultracentrífuga BECKMAN Microfugue 11.  
Vortex HEIDOLPH.

### **II.2.2. Reactivos.**

Acetato de etilo (PANREAC).  
Acetonitrilo HPLC (CARLO ERBA).  
Acido cítrico 1-hidrato (MERCK).  
Acido sulfúrico concentrado (MERCK).  
Antrona (MERCK).  
BSTFA(MERCK).  
DMSO (CARLO ERBA).  
EDTA (MERCK).  
Estearato de metilo (MERCK))  
Etanol absoluto (CARLO ERBA).  
Eter-etílico (CARLO ERBA).  
Fertilizante Zelti-foliage (ICI ZELTIA).  
HgCl<sub>2</sub> (PROBUS).  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (PROBUS)  
Metanol HPLC (CARLO ERBA).  
NaOH (PROBUS).  
N-Hexano (CARLO ERBA).  
Sacarosa (SERVA).  
Tris (MERCK).

### **II.2.3. Otros.**

Bandejas de germinación de plástico de 49 x 36 cm.

Bolsas de celofán transparente.

Cilindros de metacrilato transparente.

Filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro MILLIPORE.

Hilo de oro de 20  $\mu\text{m}$  de sección.

Homogeneizador de vidrio POTTER.

"Jyffies" RYONGAARD.

Lana de vidrio PANREAC.

Mantillo-mezcla Floragard.

Papel WHATMAN N° 42.

Papel celofán amarillo.

Parafilm (AMERICAN NATIONAL CAN).

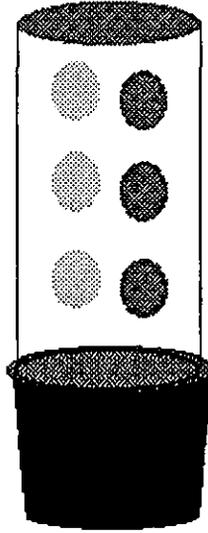
Pincel de pelo de marta N° 00.

Pintura de plata soluble en agua (DEMETRON).

Tiestos de plástico.

### **II. 3 Mantenimiento del clon de *D. noxia*.**

El clon de *D. noxia* se mantuvo sobre cebada (Cv. Albacete) sembrada en tiestos de 13 cm de diámetro y confinados mediante un cilindro de metacrilato transparente de 31 cm de altura y 12 cm de diámetro, con una malla de tela en la parte superior y orificios de ventilación en los laterales (Fig. 3). Las condiciones de cría fueron a  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  de temperatura, fotoperiodo de 16 h de luz y 8 de oscuridad y H.R. mayor del 70%. Se realizaron cambios semanales para evitar la superpoblación de *D. noxia* y sus efectos.



**Fig. 3** Esquema del recinto empleado para la cría de pulgones.

#### **II.4 Análisis de Hx mediante HPLC.**

##### **II.4.1 Obtención del material vegetal para el aislamiento de ácidos hidroxámicos.**

Para la obtención de DIMBOA y MBOA, y de DIBOA se utilizaron semillas de maíz y centeno, respectivamente, que se esterilizaron con una mezcla de  $\text{HgCl}_2$  0,1 % y etanol 96 % en la proporción 3:1 v/v durante 10 min y se lavaron varias veces con agua. Una vez secas se sembraron en vermiculita previamente humedecida, en bandejas de plástico y se mantuvieron en oscuridad a 22°C, durante aproximadamente 6 días. Se recolectaron los coleoptilos y se congelaron a -20°C hasta su utilización posterior.

#### **II.4.2 Preparación de patrones.**

El DIMBOA se aisló de 300 g de coleoptilos del híbrido de maíz EA2173 X Mo17, con alto contenido en DIMBOA, mediante el método de Klun *et al.* (1967), y el MBOA se obtuvo según el procedimiento de Klun y Brindley (1966) a partir de 500 g del material citado anteriormente. El DIBOA fue aislado de 800 g de coleoptilos de centeno (Cv. Petkus) mediante el método de Virtanen y Hietala (1960). La identidad de estos compuestos fue confirmada mediante la realización de espectros UV de los compuestos disueltos en etanol absoluto, a una concentración de 0,015 mg/ml, en un espectrofotómetro Shimadzu 160 UV-VIS y de los espectros de masa empleando un espectrómetro de masas Perkin Elmer (ver apartado II.6.2.3).

#### **II.4.3 Preparación de muestras.**

Todas las plántulas a analizar se recolectaron en el estado fenológico 11 de la escala de Zadoks (Zadoks *et al.*, 1974). Cada muestra (20-100 mg) se homogeneizó con agua destilada (4 x 0,04 ml/mg) en un homogenizador de vidrio tipo Potter. Los extractos acuosos se incubaron durante 15 min a 25°C, con el objeto de hidrolizar los glucósidos y obtener sus correspondientes agluconas (Argandoña *et al.*, 1981). Se tomaron alícuotas de 1 ml y se centrifugaron a 12500 rpm durante 10 min. Posteriormente, los sobrenadantes se filtraron mediante filtros de membrana de celulosa (Millipore) de 0,22 µm.

Así mismo, para el cálculo del porcentaje de recuperación se añadieron distintas cantidades de los patrones de DIMBOA, DIBOA y MBOA a 1 ml de extracto acuoso de trigo blando (cv. Chinese Spring) antes de la incubación y las muestras se procesaron como se describe en el párrafo anterior. Se hicieron 5 repeticiones por cada concentración.

Con objeto de estudiar la degradación de DIMBOA y DIBOA a MBOA y BOA, respectivamente, extractos acuosos de trigo blando (cv. Chinese spring) se incubaron a 70°C durante 0, 5 y 10 min y posteriormente se prepararon las muestras según el método descrito en el primer párrafo del presente apartado. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento.

#### **II.4.4 Condiciones de análisis.**

Las muestras obtenidas se analizaron en un HPLC Beckman System Gold equipado con un controlador de gradiente 126, un detector con "diode array" 168 y un inyector automático 502. Se empleó la columna de fase reversa PRP-1 (10µm, poliestireno-divinilbenceno, Hamilton) de 250 x 4,1 mm protegida con una columna de guarda de 25 x 2,3 mm PRP-1. El gradiente lineal de solventes empleado fue: de 8-80 % B en 30 min, de 30 a 31 min alcanza de nuevo 8 % de B , siendo A: 49 mM tris, 16 mM ácido cítrico, (pH=7) y B: metanol/acetonitrilo 80:20 v/v. El flujo de solventes fue de 1 ml/min. La detección se realizó a 288 nm, ya que a esta longitud de onda los tres compuestos presentan máximos de absorción en el UV.

#### **II.4.5 Identificación y cuantificación de DIBOA, DIMBOA y MBOA en extractos acuosos.**

Las curvas de calibrado se obtuvieron inyectando 20  $\mu$ l de soluciones conteniendo una mezcla de los patrones de DIBOA, DIMBOA y MBOA en metanol, con siete niveles de concentración, con un rango de 0,05 a 1,00 nM. Se realizaron dos repeticiones por cada concentración.

Los compuestos DIBOA, DIMBOA y MBOA presentes en los extractos acuosos fueron determinados mediante el enriquecimiento de los picos añadiendo los patrones y mediante la comparación del espectro UV (el barrido de longitud de onda fue de 220 a 400 nm) de los picos desconocidos con los correspondientes a los patrones.

#### **II.5 Cuantificación de las concentraciones de Hx en genotipos de cinco especies cereales de invierno.**

Se realizó el cribado del material vegetal citado en el apartado II.1. Las semillas se sembraron en "jyffies" de 5x5 (una semilla/celda) que contenían mantillo mezcla ("Floragard") y se mantuvieron en una cámara Conviron a una temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $75 \pm 5\%$  H.R., 13.000 lux de intensidad lumínica y un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Se recolectó la parte aérea de las plántulas y se tomaron cuatro repeticiones por cultivar, en el estado de desarrollo 11. Se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  para posterior análisis por HPLC. Así mismo, se recolectaron seis plántulas por cultivar para calcular el peso seco. Se pesaron las plántulas recién cortadas y después se secaron en una estufa a  $80^\circ\text{C}$  durante 48 h y se pesaron de nuevo una vez secas.

## **II.6. Recolección y análisis de floema.**

Se recolectó el floema de los cultivares de trigo blando: ABE, Ch. Spring, Astral, Yécora y Aragón 03, y trigo duro: Camacho, Recio de Málaga, Roqueño, Mexa y Aldura, con el propósito de valorar el contenido en sacarosa y Hx. Las semillas se sembraron en tiestos de 13 cm de diámetro, cuatro tiestos por cultivar y 40 semillas por tiesto. Se mantuvieron en una cámara Convirón en las mismas condiciones ambientales que en el apartado II.5. Cuando las plántulas se encontraban en el estado fenológico 11 se procedió a la recolección del floema según el método de Tully y Hanson (1979), ligeramente modificado:

- Las hojas expandidas se cortaron a 5 cm de la lígula y se sumergieron sus extremos en un vial de plástico que contenía 1 ml de una solución de EDTA 10 mM a pH=7, ajustada con NaOH 0.1 N. En cada vial se depositaron cuatro hojas.
- Los viales se colocaron en gradillas que se depositaron en una bandeja con agua y se taparon con una caja de plástico transparente. De este modo se formaba una atmósfera saturada de agua y CO<sub>2</sub>, que facilita la exudación del floema. Se mantuvieron en una cámara de cultivo a 22°C .
- Transcurridas dos horas, durante las cuales se eliminaron los restos celulares de otros tejidos, las hojas se colocaron en otros viales que contenían una solución nueva de EDTA 10 mM a pH=7, .

- Las hojas fueron retiradas tras cuatro horas de incubación y los exudados de floema almacenados a -20°C.

### **II.6.1 Valoración de los Hx en los exudados de floema mediante HPLC.**

Las exudados de floema se filtraron mediante filtros Millipore de 0,22 µm y se analizaron mediante el método de HPLC descrito en el apartado II.4 (Mayoral *et al.*, 1994).

### **II.6.2 Detección de los Hx en los exudados de floema mediante GLC-MS.**

#### **II.6.2.1 Preparación de extractos.**

La extracción de los exudados de floema se realizó básicamente según el método de Woodward *et al.* (1979).

Extracción de exudados de floema (35 ml), el procedimiento empleado fue:

1. Extracción con 40 ml de acetato de etilo saturado con agua destilada.
2. Lavado de la fase orgánica tres veces con 20 ml de agua destilada saturada con acetato de etilo.
3. Se repiten los pasos 1 y 2, tres veces.
4. Se combinan las fases orgánicas.
5. Se seca el extracto con SO<sub>4</sub>Mg.
6. Se filtra por lana de vidrio.
7. Se rotavapora a sequedad, a 30°C y 100 mb de presión.

8. Se almacena el residuo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Una solución patrón con 100  $\mu\text{g}$  de DIMBOA, DIBOA y MBOA en 300  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto fue sometida al mismo proceso de extracción.

1. Se retira el etanol bajo corriente de  $\text{N}_2$
2. Se añaden 3 ml de agua destilada
3. Extracción con 4 ml de acetato de etilo saturado con agua destilada
4. Lavado de la fase orgánica tres veces con 2 ml de agua destilada saturada con acetato de etilo.
5. Se repiten los pasos 3 y 4, tres veces.
6. Se combinan las fases orgánicas.
7. Se seca el extracto con  $\text{SO}_4\text{Mg}$ .
8. Se filtra por lana de vidrio.
9. Se rotavapora a sequedad, a  $30^{\circ}\text{C}$  y 100 mb de presión.
10. Se almacena el residuo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### **II.6.2.2 Preparación de las muestras para GLC-MS.**

Debido a que los Hx no pueden analizarse directamente por GLC, fue necesario derivatizarlos previamente. Las muestras se prepararon según el método de Woodward *et al.* (1979), que en síntesis es:

1. El residuo se disuelve en 300  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto.
2. Se añaden 2  $\mu\text{l}$  del estándar interno (Estearato de metilo).

3. Se evapora a sequedad mediante corriente de N<sub>2</sub>.
4. Se añaden 50 µl de BSTFA.
5. Se incuba la muestra en baño a 70°C durante 20 min.
6. Caracterización por GLC-MS.

### **II.6.2.3 Identificación de los Hx en exudados de floema de varias especies de cereales.**

La detección de los Hx se ha realizado mediante la técnica de Cromatografía Gas-Líquido y Espectrometría de masas (GLC-MS) que permite la separación e identificación de estos compuestos previamente derivatizados con BSTFA.

Se inyectó un 1 µl de la muestra en un Cromatógrafo de Gases acoplado a un espectrómetro de masas del tipo trampa de iones (ITD) de Perkin Elmer. La columna empleada de SPB-1 (30 m x 0,25 mm x 25µm de espesor de película), siendo el helio el gas portador, con una relación de división de flujo de 1:20. La temperatura del inyector fue de 280°C , la temperatura del horno de 100 a 240°C aumentando 4°C/min y manteniéndose a 240 durante 5 min. La duración del análisis fue de 40 min.

El rango del espectrómetro de masas fue de 40 a 400 m/z. Los compuestos DIMBOA, DIBOA y MBOA se identificaron por coincidencia de sus tiempos de retención con el de los patrones correspondientes y por sus espectros de masas.

### **II.6.3 Valoración de sacarosa.**

Glucosa y fructosa fueron eliminadas de la muestra mediante la incubación del exudado de floema en NaOH 0,05 N a 95°C durante 30 min (Jones *et al.*, 1977).

Se valoró después el contenido en sacarosa mediante la prueba de la antrona (Dreywood, 1946), siguiendo el método de Trevelyan y Harrison (1952) ligeramente modificado:

- Se añadieron 410  $\mu$ l de antrona al 0,2% en ácido sulfúrico concentrado a 205  $\mu$ l del exudado de floema en NaOH 0,05 N y se agitó la mezcla.
- Transcurridos 10 min se leyó la absorbancia a 660 nm en un Espectrofotómetro Hitachi U-2000.
- La curva de calibrado se realizó con distintas concentraciones de sacarosa: 5, 25, 50 y 100  $\mu$ g/ml.

Se hicieron cuatro repeticiones por cultivar analizado.

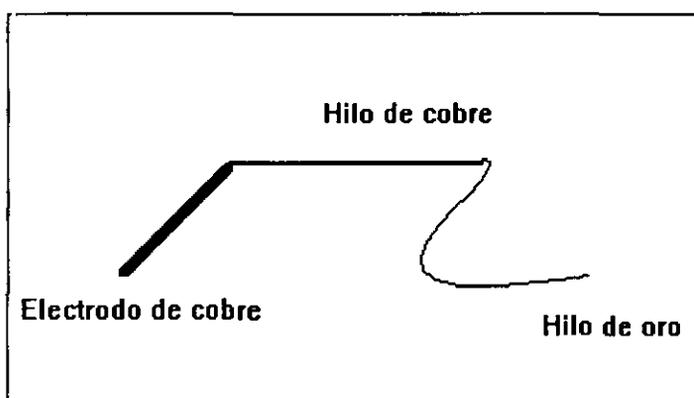
### **II.7. Estudio del comportamiento de alimentación de *D. noxia* mediante la técnica de EPG con un sistema de corriente continua en cinco especies de cereales con distintos niveles de Hx.**

Se utilizaron cultivares de alto y bajo contenido en DIMBOA en cada una de las especies siguientes: trigo blando, cv. Chinese spring y ABE; trigo duro, cv. Roqueño y Camacho; triticale, cv. Tajuña y Torote; centeno, cv. Petkus y Elbon; y cebada, cv. Albacete. Los cultivares de centeno se seleccionaron por su alto contenido en

DIBOA y la cebada por carecer de DIMBOA y DIBOA. Se sembraron dos semillas en tiestos de 5 cm de diámetro y 5 cm de altura y se mantuvieron en las condiciones ambientales ya mencionadas. Tras la germinación se eliminó una de las plántulas del tiesto.

### II.7.1 Pretratamiento de los pulgones.

Los pulgones fueron tomados del cultivo con un pincel fino humedecido y se colocaron sobre una punta de micropipeta para 200  $\mu$ l conectada a una bomba de vacío de tal modo que el pulgón quedaba inmobilizado. Se adhirió un hilo de oro de 2-3 cm de longitud y 20  $\mu$ m de diámetro al dorso del pulgón mediante una pequeña gota de pintura de plata coloidal (Tjallingii, 1988). El hilo de oro estaba conectado a un pequeño electrodo mediante un hilo de cobre (Fig. 4).



**Fig. 4** Esquema del electrodo empleado para conectar el pulgón al amplificador.

## **II.7.2 Registro del comportamiento de alimentación.**

El equipo empleado fue similar al descrito por Tjallingii (1988). Los amplificadores de corriente continua empleados fueron Giga-2 y Giga-4, con una resistencia  $10^9\Omega$ , una fuente de voltaje ajustable y una capacidad de amplificación de 50-100. Los amplificadores se conectaron directamente a un ordenador personal (IBM compatible). Los registros se efectuaron en el laboratorio a  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , bajo iluminación artificial de 13000 lux (Fluorescentes HF).

La hojas expandidas de las plantas se fijaron, mediante pinzas a una tira de plástico. Todos los elementos del equipo, excepto el ordenador y los amplificadores, se confinaron en una caja de Faraday y se aislaron mediante hilos conductores para evitar interferencias y ruidos de fondo (Fig. 5). Transcurridos 10 min desde la adherencia del pulgón, los electrodos de cobre que están conectados al pulgón (Fig. 4) se insertaron en los amplificadores. Los pulgones fueron colocados sobre las hojas expandidas. A su vez, otros electrodos conectados a los amplificadores se introdujeron en la tierra húmeda de cada uno de los tiestos. El circuito se cerraba cuando los pulgones insertaban el estilete en las hojas (Fig. 6). Dependiendo de las actividades de penetración, salivación, ingestión, etc. de los pulgones varía la resistencia eléctrica de los mismos, y por lo tanto el voltaje registrado. De este modo se obtienen señales de diferente voltaje, amplitud y frecuencia que corresponden a distintas fases del comportamiento de alimentación de los pulgones. El sistema permitió monitorizar el comportamiento de 8 pulgones a la vez en 8 plantas. Los registros se realizaron durante 8 h y se almacenaron en el disco

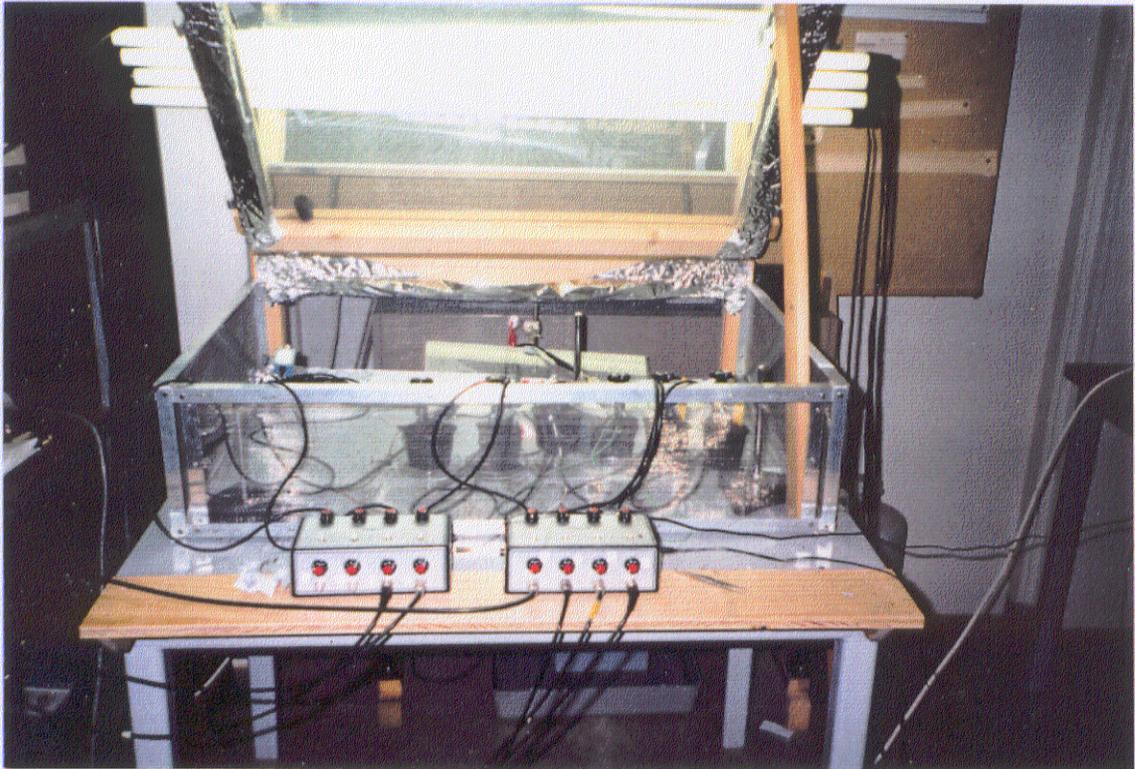
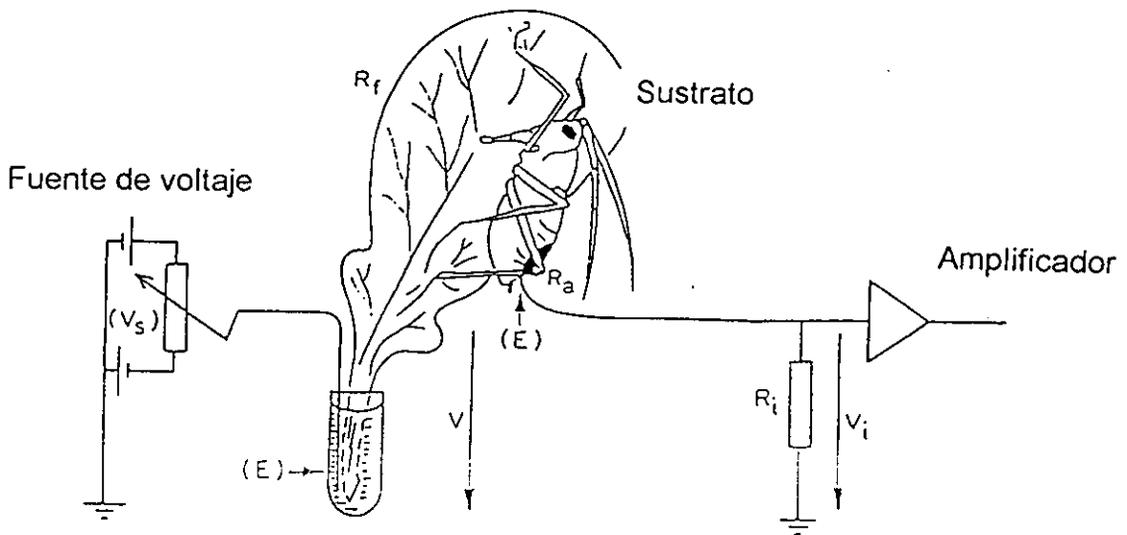


Fig. 5. Equipo empleado en el registro del comportamiento de alimentación de *D. noxia*.

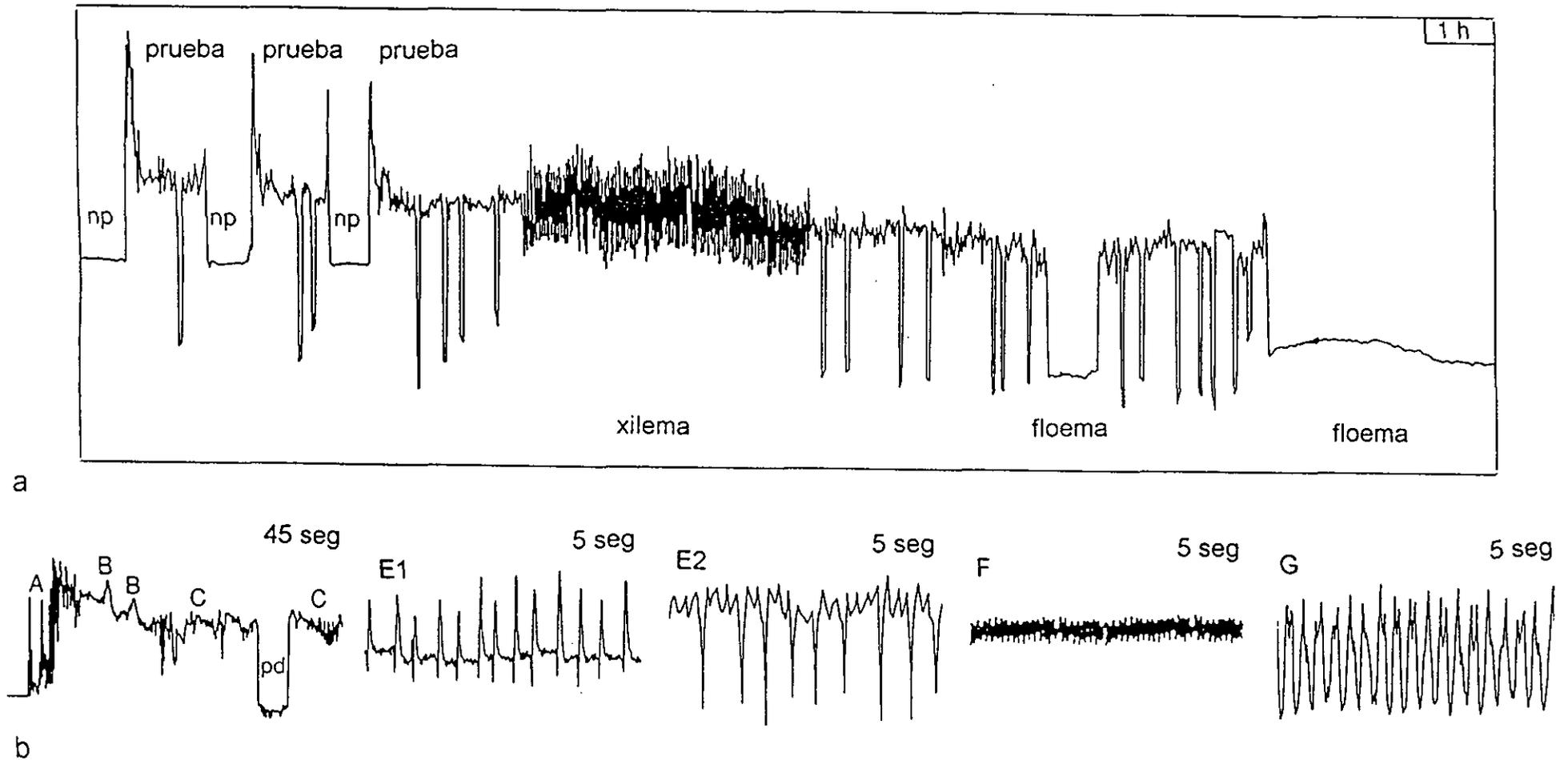


**Fig. 6.** Esquema del circuito empleado para el registro del comportamiento de alimentación de *D. noxia*.

duro del ordenador personal. En cada repetición se utilizaron nuevos pulgones y plantas.

### **II.7.3 Análisis de los registros.**

Las señales obtenidas fueron analizadas con el programa Stylet 2.2 (Tjallingii y Mayoral, 1992) y se caracterizaron de acuerdo a la clasificación de Tjallingii (1988; 1990a), Helden y Tjallingii (1993) y Prado y Tjallingii (1994). En el comportamiento de alimentación de los pulgones se observan periodos de "no penetración" y periodos de "penetración" o "prueba". En los periodos de prueba pueden distinguirse claramente tres fases, cada una de ellas puede presentar una o más señales características: "fase de ruta", que comprende fundamentalmente las señales "A" (Contactos eléctricos del estilete con la epidermis), "B" (Secreción del material que forma la vaina del estilete) y "C" (Actividades de prueba del estilete); "fase de xilema", que se reconoce por la aparición de la señal "G" (Ingestión activa de xilema) y "fase de floema", caracterizada por las señales "E1" (Salivación en los elementos del floema, siempre previa a E2) y "E2" (Ingestión pasiva de floema y posiblemente salivación acuosa). Otras señales que pueden aparecer en los registros de alimentación son: "pd" (caídas de potencial debidas a roturas de la membrana celular) y "F" (movimientos mecánicos del estilete) (Fig. 7).



**Fig. 7.** a) Registro del comportamiento de alimentación de un pulgón en 1 h. Fase de "no penetración" (np), fase de ruta (prueba), fase de xilema (Xilema) y fase de floema (floema). b) Tipos de señales recogidas en el comportamiento de alimentación de pulgones. Registro de 45 seg en el que aparecen las señales "A", "B", "C" y caída de potencial (pd). Registros de 5 seg de las señales E1, E2, F y G.

A partir de la duración, frecuencia y número de señales obtenidas se calcularon una serie de parámetros, clasificados por Helden y Tjallingii (1993) en "No secuenciales", es decir, no relacionados con una secuencia de sucesos en el comportamiento de alimentación (Tabla 1a) y "Secuenciales", relacionados con una secuencia específica de sucesos del comportamiento de alimentación en el transcurso del registro (Tabla 1b). Estos parámetros pueden indicar una cierta sensibilidad de la planta huésped o una interacción del pulgón con un tejido específico de la planta determinadas por factores físicos y químicos (Tjallingii, 1988; 1990b). Ciertos parámetros indican que un grupo de tejidos o factores pueden estar implicados en la susceptibilidad de las plantas a pulgones.

Cuando los criterios para algunos parámetros no se ajustaban a los resultados obtenidos en pulgones individuales se tomó la estimación más adecuada. Por ejemplo, cuando algunos pulgones no presentaron fase de floema se tomaron 8 horas para los parámetros: tiempo previo a la fase de floema y de ingestión de floema desde que comienza el experimento.

Las señales "F" y "G" no fueron consideradas ya que aparecían ocasionalmente y no aportaban información adicional en el estudio del comportamiento de alimentación de los pulgones en los cultivares empleados.

**Tabla 1 .** Parámetros no secuenciales (a) y secuenciales (b) de EPG y su significado biológico.

**a. Parámetros "no secuenciales":**

<b>Nº</b>	<b>parámetro</b>	<b>valor</b>	<b>Indicación de susceptibilidad de la planta</b>
[1]	Tiempo total de "no penetración"	alto	ambigua, depende los demás parámetros
[2]	Tiempo total en fase de floema (E)	alto	sensible
[3]	Tiempo total de ingestión de floema (E2)	alto	sensible
[4]	% pulgones con E2>8min	alto	sensible

**b. Parámetros "secuenciales":**

<b>No.</b>	<b>parámetro</b>	<b>Origen de los factores implicados</b>
[5]	Tiempo de "no penetración" previo a la fase de floema	mesófilo, no vascular
[6]	Tiempo previo a la fase de floema *	tejidos no floemáticos
[7]	Tiempo mínimo previo a la fase de floema **	tejidos no floemáticos
[8]	Tiempo previo a la ingestión de floema (E2>8min) *	todos los tejidos incluido el floema

\* desde que comienza el experimento.

\*\* desde que comienza la penetración.

#### **II.7.4 Análisis de los ácidos hidroxámicos.**

Se recolectó la parte aérea de plántulas de los cultivares utilizados en los experimentos cuando comenzaron los registros. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis por HPLC mediante el método descrito en el apartado II.4.

#### **II.8 Tabla de vida de *D. noxia* en cultivares de cinco especies de cereales de invierno con distintos niveles de Hx.**

##### **II.8. 1 Procedimientos generales.**

Se emplearon los cultivares de trigo blando, cv. Chinese spring y ABE; trigo duro, cv. Roqueño y Camacho; triticale, cv. Tajuña y Torote; centeno, cv. Petkus y Elbon; y cebada, cv. Albacete. Las siembras se efectuaron en tiestos de plástico de 11 cm de diámetro con mantillo mezcla Floragard sembrando tres semillas por tiesto. Una vez germinadas se eliminó una de las plántulas dejando dos por tiesto y se mantuvieron en una cámara Convirón en las condiciones ambientales ya mencionadas en el apartado II.5.

En cada plántula se introdujeron dos pulgones adultos de *D. noxia* mediante un pincel de pelo de marta del nº 00 y se confinaron con una bolsa de papel celofán transparente encajada en un cilindro de metacrilato transparente de 3 cm de diámetro y 5 cm de altura. Transcurridas 24 h se retiraron los adultos y se dejaron tres ninfas por plántula. Cuando los pulgones alcanzaron el estado adulto se contabilizaron los individuos vivos con objeto de calcular la supervivencia en el periodo pre-reproductivo.

Nuevas plántulas en el estadio 11 fueron insectadas con los adultos obtenidos previamente (1 adulto/plántula y 20 plántulas/cultivar) y se aislaron de la misma forma las plántulas insectadas y 4 plántulas/cultivar no insectadas. Previo a la insectación se recolectaron 4 plántulas de cada cultivar y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para cuantificar los Hx mediante los procedimientos de HPLC descritos en el apartado II.4 (Mayoral *et al.*, 1994). Diariamente se contabilizaron y retiraron las ninfas, y se registró la mortalidad de los adultos, durante un periodo de 27 días. Durante todo el proceso las plántulas se mantuvieron en las condiciones ya mencionadas.

### **II.8.2 Cálculo de la tasa interna de crecimiento y otros parámetros poblacionales de la tabla de vida.**

A partir del porcentaje de supervivientes en el periodo pre-reproductivo y de las matrices de nacimientos se calculó la tasa interna de crecimiento ( $r_m$ ), que representa la tasa de incremento de una población por individuo bajo unas condiciones ambientales específicas y una fuente de alimento ilimitada (1) (Birch, 1948), su error (Método de Bootstrap, 500 replicas), los intervalos de confianza y los parámetros siguientes de la tabla de vida: Tasa finita de crecimiento ( $\lambda$ ), que se define como el número de individuos añadidos a la población por hembra y por día (2); Tasa reproductiva neta ( $R_0$ ), que es el número de veces que se incrementa la población por generación (3); Duración media de una generación ( $T$ ), que es el tiempo transcurrido entre el nacimiento de los individuos y el de su progenie (4) y la Capacidad de incremento de la población ( $rc$ ) (5).

Estos parámetros fueron calculados mediante un programa informático desarrollado en nuestro laboratorio: *rm* (versión 1.9) (Taberner *et al.*, 1993), a partir de una matriz de nacimientos y la supervivencia en el periodo pre-reproductivo. Igualmente se calculó la duración del periodo pre-reproductivo.

$$\sum_{x=1}^{\infty} e^{-r_m x} l_x m_x = 1 \quad (1)$$

Donde:

$r_m$  = Tasa interna de crecimiento

$x$  = Edad de los individuos (días)

$l_x$  = Proporción de individuos supervivientes a la edad  $x$  (días)

$m_x$  = Número de hembras de la progenie / hembra / día (Tasa de fecundidad específica)

$$\lambda = e^{r_m} \quad (2)$$

$$R_0 = \sum_{x=0}^{\infty} l_x m_x = 1 \quad (3)$$

$$T = \ln(R_0) / r_m \quad (4)$$

$$rc = \ln 2 / r_m \quad (5)$$

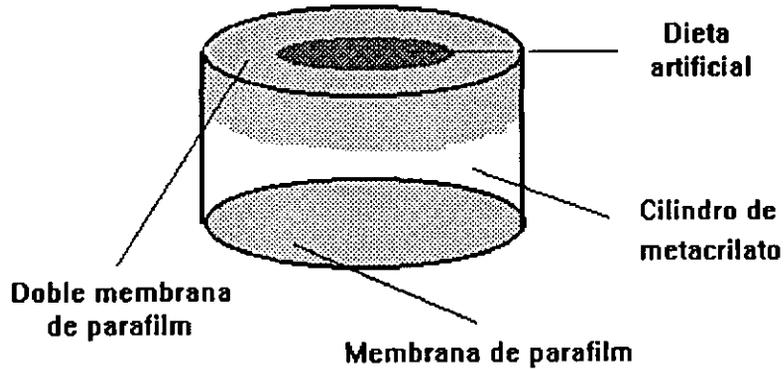
## **II.9 Tabla de vida de *D. noxia* en cultivares de trigo blando y trigo duro con distintos niveles de Hx.**

Se seleccionaron por su diferente contenido en Hx los siguientes cultivares de trigo blando: ABE, Ch. spring, Astral, Yécora y Pané 247, y de trigo duro: Mexa, Roqueño, Camacho, Recio de Málaga y Aldura. Los experimentos se realizaron siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado II.8.1; sin embargo, el registro de la fecundidad diaria se realizó durante 10 días. Además se tomaron muestras de las plántulas en el momento de la insectación y cuando finalizó el experimento. Las plantas fueron abonadas semanalmente, añadiendo el fertilizante Zelti-foliage al agua de riego (3 g/l).

## **II.10 Efecto de DIMBOA, suministrado en dieta artificial, sobre ninfas de *D. noxia*.**

### **II.10.1 Obtención de ninfas de la misma edad.**

Se confinaron adultos de *D. noxia* en cilindros de metacrilato transparente (2,5 cm de alto y 3 cm de diámetro) (15 adultos/cilindro). Los cilindros se cerraron en uno de los extremos mediante una membrana de parafilm y en el otro extremo se depositaron 45 µl de dieta artificial (30 % de sacarosa) entre dos membranas de parafilm tensadas manualmente (Fig. 8). Se retiraron los adultos a las 48 h y se dejaron 15 ninfas/cilindro.



**Fig. 8** Esquema del recinto empleado para suministrar la dieta artificial a pulgones.

#### **II.10.2 Estudio del efecto del DIMBOA en ninfas de *D. noxia*.**

En los experimentos se emplearon ninfas de 24 h aproximadamente nacidas en dieta artificial (30 % de sacarosa). Las concentraciones de DIMBOA empleadas fueron: 0, 2, 4, 6 y 8 mM, que se encuentran dentro del rango de las que presentan los cultivos estudiados en los apartados anteriores. Así mismo, se estableció un control sin dieta. La dieta empleada en los tratamientos contenía un 30% de sacarosa y 1,57 % de DMSO. El DMSO se empleó para la disolución del DIMBOA en la dieta, ya que este compuesto es insoluble en agua. Se realizaron 5 repeticiones por tratamiento con 15 ninfas por cilindro, registrándose la mortalidad a las 24 y 48 h. Los cilindros se depositaron en bandejas, que se cubrieron con papel celofán amarillo y se mantuvieron en las condiciones ambientales descritas en el apartado II.5.

## II.11 Análisis estadístico.

Las concentraciones medias de Hx que resultaron en los distintos cultivares analizados se compararon mediante la prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ). La "t" de Student ( $p < 0,05$ ) se utilizó para detectar diferencias significativas entre plantas que se encontraban en dos estadios de desarrollo diferentes.

Los parámetros poblacionales de la tabla de vida de *D. noxia* en cultivares de varias especies de cereales se analizaron mediante la prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ), excepto los valores de  $r_m$  que se compararon entre sí mediante sus límites de confianza obtenidos por Bootstraap (500 réplicas) ( $p < 0,05$ ).

En los estudios del comportamiento de alimentación de *D. noxia* se utilizaron los análisis no paramétricos Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) y el Mann-Whitney U ( $p < 0,05$ ) (Sokal y Rohlf, 1981).

Así mismo, en los estudios del efecto del DIMBOA suministrado en dieta artificial, se aplicó el análisis estadístico PROBIT (Finney, 1971) a las mortalidades obtenidas en los tratamientos con diferentes concentraciones de DIMBOA. El análisis PROBIT se realizó mediante el programa informático POLO (Russell et al., 1977). La mortalidad Probit se calculó, mediante tablas, a partir de la mortalidad corregida según la fórmula de Abbot (Abbot, 1925).

Las concentraciones medias de sacarosa presentes en los exudados de floema analizados se compararon mediante la prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ). Por último, se efectuaron análisis de correlación entre las concentraciones de DIMBOA, DIBOA y sacarosa y todos los parámetros de la tabla de vida de *D. noxia* en los cultivares estudiados.

## RESULTADOS

### **III. RESULTADOS**

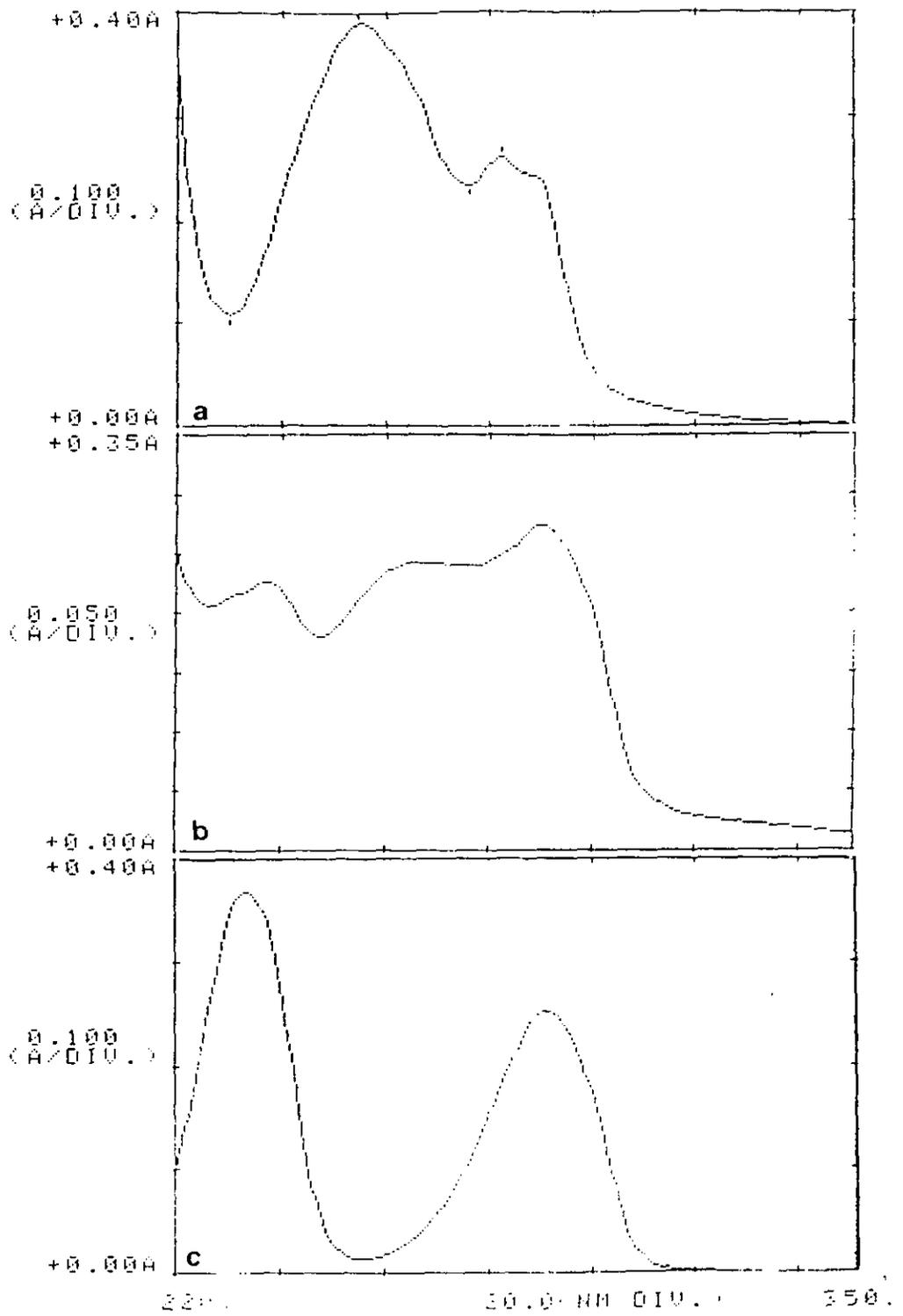
#### **III.1. Método de separación y cuantificación de ácidos hidroxámicos por HPLC.**

##### **III.1.1 Identificación de DIBOA, DIMBOA y MBOA en extractos acuosos de cereales.**

Los espectros UV de DIMBOA y MBOA aislados de maíz se muestran en las Figuras 9a y b, y el espectro UV del DIBOA, aislado de centeno, en la Fig. 9c. De igual modo, los espectros de masas de los tres compuestos mencionados se representan en la Fig. 10.

El método cromatográfico empleado permitió la separación del DIBOA, DIMBOA y MBOA, con unos tiempos de retención de 15,10; 17,46 y 25,07 min, respectivamente (Fig. 11) y con unos errores estándar inferiores a 0,02 min. La duración del análisis fue de 26 min.

En la Fig. 12 se muestran los cromatogramas correspondientes a extractos acuosos de hojas de maíz (Híbrido Pioneer 3138) y de plántulas de varias especies de cereales: trigo blando (cv. Chinese Spring), trigo duro (cv Camacho), centeno (cv. Elbon), triticale (cv. Cachirulo) y cebada (cv. Logra). Los compuestos DIBOA, DIMBOA y MBOA presentes en dichos extractos fueron identificados por coincidencia de sus tiempos de retención con los de los patrones, y por el aumento del área de los picos I, II, y III al añadir los patrones a los extractos acuosos. En cebada se encontró un pico con tiempo de retención similar al del DIMBOA, cuyo espectro UV no correspondía con ninguno de los Hx estudiados.



**Fig. 9.** Espectro de absorción UV de a) DIBOA, b) DIMBOA y c) MBOA.

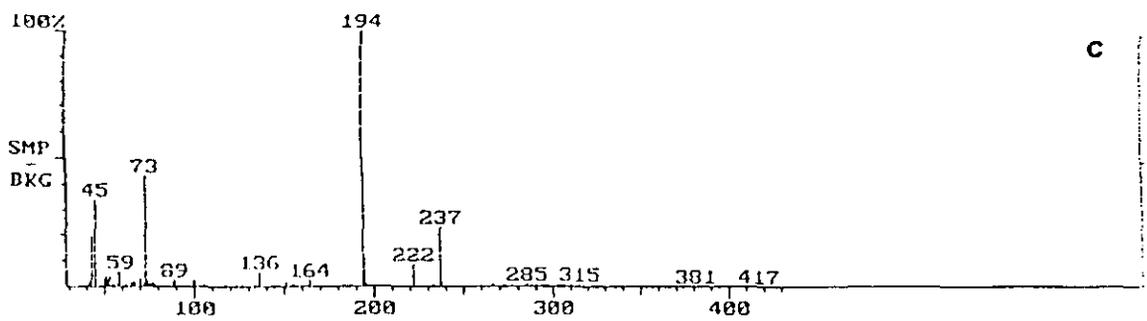
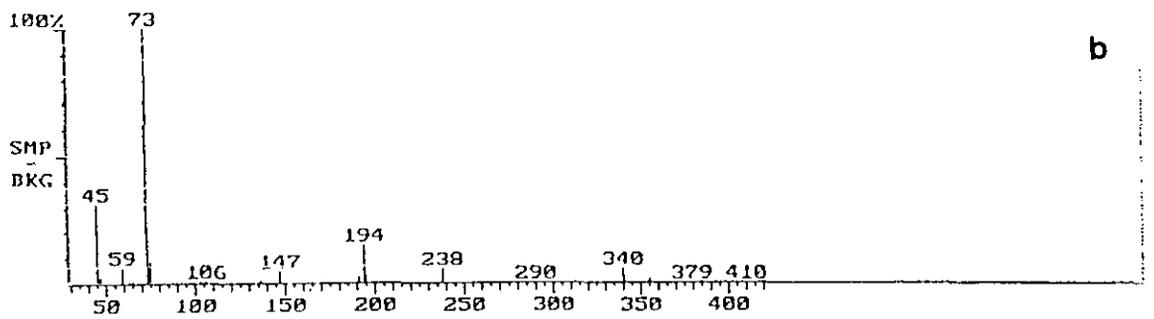
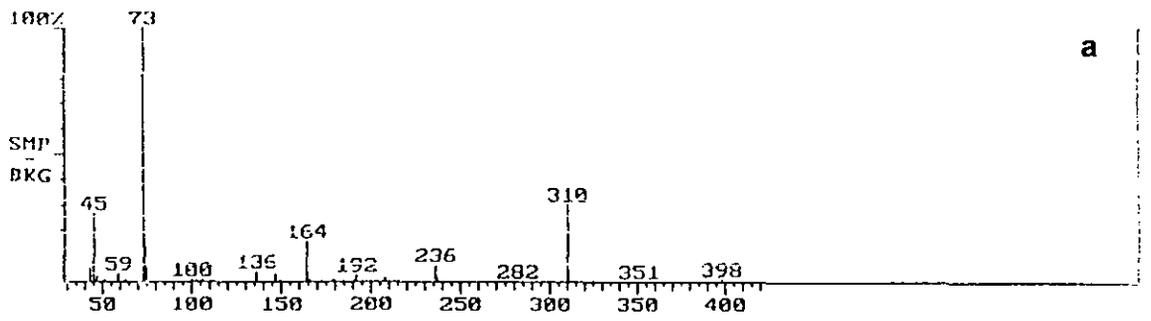
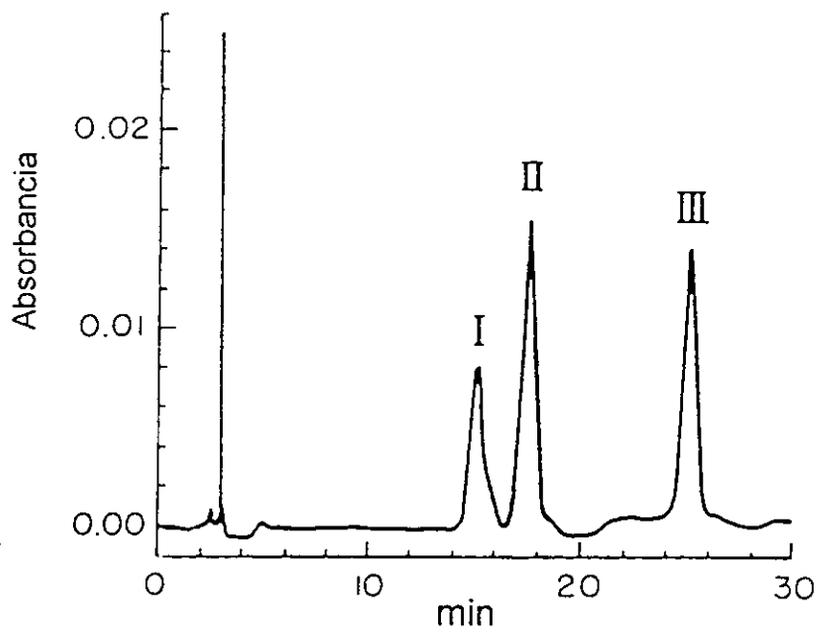
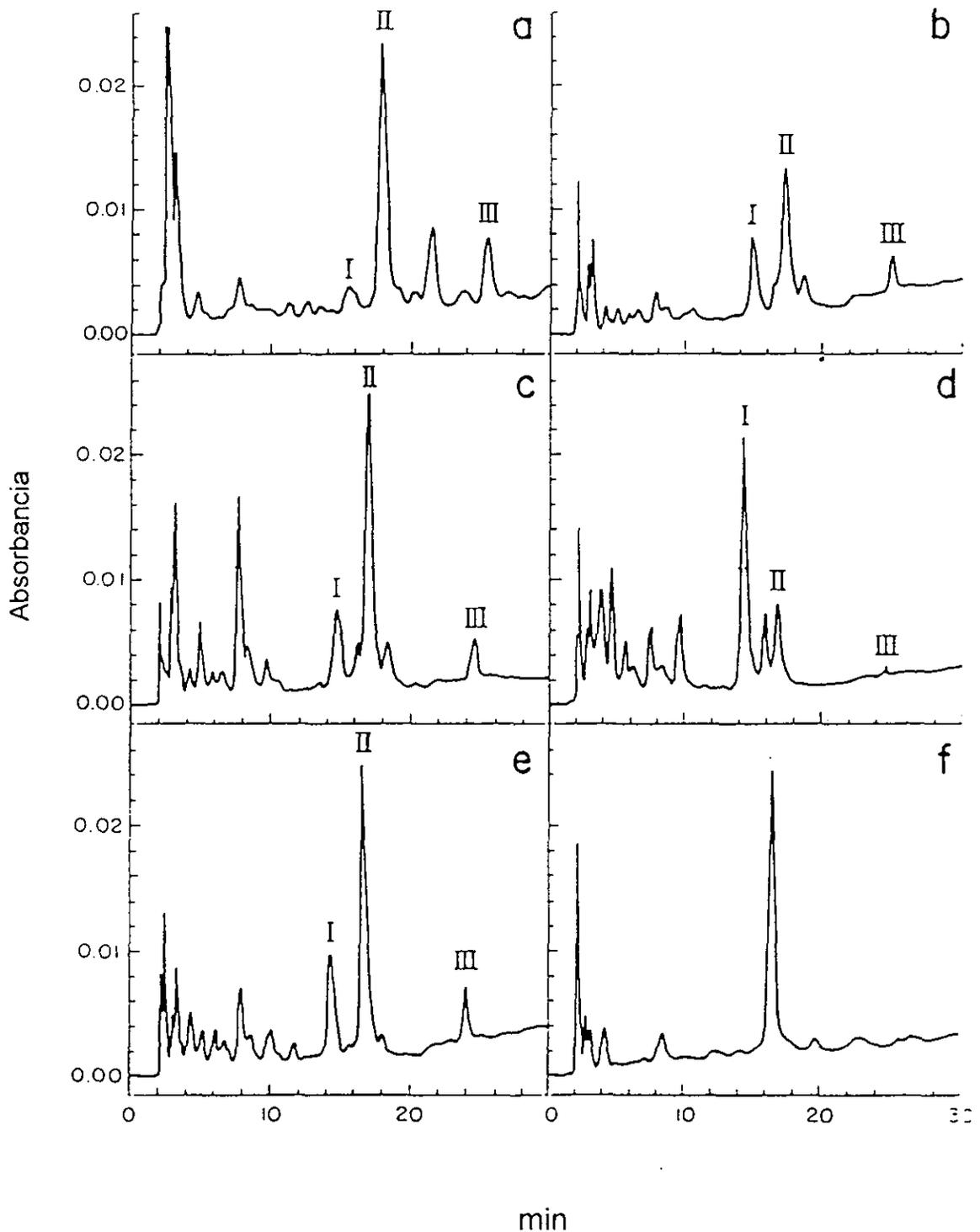


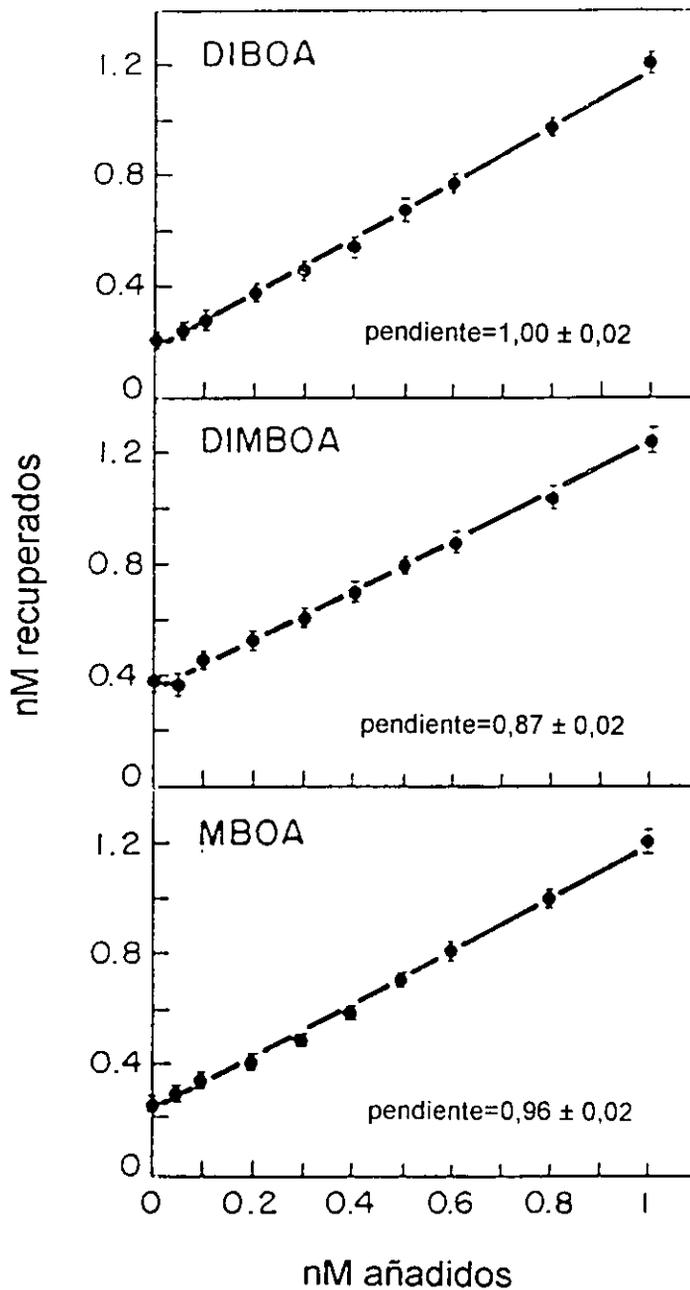
Fig. 10. Espectro de masas de TMS<sub>2</sub>-DIBOA (a), TMS<sub>2</sub>-DIMBOA (b) y TMS-MBOA (c).



**Fig. 11.** Cromatograma de una mezcla de Hx separados mediante HPLC. I, DIBOA; II, DIMBOA y III, MBOA.



**Fig. 12.** Cromatogramas de extractos de hojas de (a) maíz (Híbrido Pioneer 3138) y de plántulas de (b) trigo blando (Cv Chinese spring) (c) trigo duro (cv Camacho), (d) centeno (Cv Elbon), (e) triticale (Cv Cachirulo) y (f) cebada (Cv Logra) analizados mediante HPLC. I DIBOA; II, DIMBOA y III, MBOA.



**Fig. 13.** Porcentaje de recuperación del DIBOA, DIMBOA y MBOA añadidos a un extracto acuoso de trigo blando (Cv Chinese spring). La pendiente de cada regresión indica la cantidad de compuesto recuperado. Los valores son medias  $\pm$  errores estándar (5 repeticiones). La intersección con el eje Y representa las concentracion del extracto.

### III.1.2 Cuantificación de DIBOA, DIMBOA y MBOA en genotipos de cinco especies de cereales de invierno.

En la Fig. 13 se muestran los resultados obtenidos en el cálculo del porcentaje de recuperación del DIBOA, DIMBOA y MBOA. Los valores correspondientes a la intersección con el eje de ordenadas corresponden a las cantidades de DIBOA, DIMBOA y MBOA presentes en la muestra antes de añadir los estándares. Los porcentajes de recuperación fueron: 100 % para DIBOA, 87 % para DIMBOA, y 96 % para MBOA.

La cuantificación de DIBOA, DIMBOA y MBOA se realizó mediante el empleo de las siguientes rectas de regresión:  $y=0,023+0,183x$ ,  $r=0,998$ ;  $y=0,051+0,171x$ ,  $r=0,993$  e  $y=0,094+0,163x$ ,  $r=0,993$ , respectivamente, siendo  $x$  la absorbancia a 288 nm e  $y$  la concentración en nM. Dichas rectas fueron obtenidas al inyectar las muestras estándar que contenían una mezcla de los tres compuestos, con siete niveles de concentración. El límite mínimo de detección para estos compuestos fue de 50 pmol.

Cuando se estudió la estabilidad térmica del DIMBOA presente en extractos acuosos de Chinese Spring incubados a 70°C, se observó que el 45 % del DIMBOA se degradaba tras 5 min de incubación, mientras que a los 10 min se degradaba el 65 % del compuesto. Sin embargo, cuando se sometió al DIBOA al mismo tratamiento sólo se degradó un 3 % tras 10 min de incubación.

### **III.2 Cuantificación de las concentraciones de Hx en genotipos de cinco especies de cereales de invierno.**

Con objeto de seleccionar genotipos de cereales con diferentes niveles de Hx (bajo-medio-alto) e investigar sus efectos sobre la biología del pulgón *D. noxia*, se realizó un cribado de las especies de cereales: trigo blando, trigo duro, centeno , cebada y triticale .

#### **III.2.1 Cultivares de trigo blando.**

Las concentraciones de DIMBOA y DIBOA obtenidas para los cultivares de trigo blando se recogen en la Tabla 2. En función de los niveles de DIMBOA (mg/g de peso seco) que contienen los cultivares analizados hemos establecido las tres categorías siguientes:

- Bajos: entre 5,0 y 6,9.
- Intermedios: entre 7,0 y 8,9.
- Altos: entre 9,0 y 11,0.

#### **III.2.2 Cultivares de trigo duro.**

En la Tabla 3 se representan las concentraciones de DIMBOA y DIBOA que presentaron los cultivares analizados y se clasificaron en base a los niveles de DIMBOA (mg/g de peso seco) en:

- Bajos: entre 10,0 y 12,9.
- Intermedios: entre 12,9 y 14,9.

- Altos: entre 15,0 y 17,0.

### **III.2.5 Cultivares de triticale.**

Las concentraciones de DIMBOA y DIMBOA que presentaron los cultivares estudiados se muestran en la Tabla 4. Se establecieron igualmente tres categorías de niveles de DIMBOA (mg/g de peso seco):

- Bajos: entre 15,0 y 16,9.
- Intermedios: entre 17,0 y 19,9.
- Altos: entre 20,0 y 25,0.

### **III.2.6 Cultivares de centeno.**

De los dos cultivares de centeno analizados, Petkus es el que contiene mayor concentración de DIMBOA y DIBOA, con 12,83 y 14,20 mg/g de peso seco, respectivamente (Tabla 5).

### **III.2.7 Cultivares de cebada.**

En ninguno de los cultivares de cebada analizados: Albacete, Barbarrosa, Beka, Bomi, Bruce, Cytris, Hattif de Griñón, Jeff, Kim, Logra, Mary, Mingo, ReINETTE, TD Unión, Weak y York se detectaron los Hx DIBOA y DIMBOA ni el producto de degradación de este último MBOA.

**Tabla 2.** Concentraciones de DIMBOA y DIBOA (mg/g de peso seco) en distintos cultivares de trigo blando:

<b>Cultivar</b>	<b>DIMBOA <sup>1</sup></b>	<b>DIBOA <sup>1</sup></b>
Little Club	5,32 ± 0,23	2,32 ± 0,14
Maris Houtsman	5,37 ± 0,29	1,62 ± 0,10
Astral	5,40 ± 0,87	4,03 ± 0,23
Caldwell	5,47 ± 0,65	2,53 ± 0,20
Marius	5,53 ± 1,00	4,12 ± 0,24
Aragón 03	6,41 ± 1,12	3,78 ± 0,31
Arganda	6,45 ± 0,90	2,79 ± 0,10
Impeto	6,51 ± 0,93	4,72 ± 0,23
Chamorro	6,58 ± 0,70	4,15 ± 0,14
Armada	7,07 ± 0,39	3,59 ± 0,80
Traqueño	7,58 ± 0,75	3,10 ± 0,06
ABE	7,67 ± 0,08	2,92 ± 0,08
Candeal Teruel	8,20 ± 0,88	3,50 ± 0,22
Estrella	8,38 ± 0,62	3,98 ± 0,20
Autonomía	8,42 ± 1,11	4,92 ± 0,36
Rieti	8,43 ± 0,44	4,66 ± 0,26
Chinese Spring	8,90 ± 0,43	2,77 ± 0,08
Montana	9,16 ± 0,76	5,08 ± 0,32
Cajeme	9,60 ± 0,97	5,19 ± 0,26
Yécora	9,62 ± 0,21	4,05 ± 0,28
Mora	10,49 ± 0,46	4,64 ± 0,07
Anza	10,57 ± 1,13	3,28 ± 0,21
Pané 247	10,64 ± 0,64	4,39 ± 0,30

<sup>1</sup> Los valores son medias ± errores estándar (n=4).

**Tabla 3.** Concentraciones de DIMBOA y DIBOA (mg/g de peso seco) en distintos cultivares de trigo duro:

<b>Cultivar</b>	<b>DIMBOA <sup>1</sup></b>	<b>DIBOA <sup>1</sup></b>
Roqueño	10,47 ± 0,78	3,09 ± 0,07
Blat Obeia	11,51 ± 0,82	3,29 ± 0,15
Mexa	11,57 ± 0,49	3,88 ± 0,38
Rubio de Córdoba	14,09 ± 0,87	2,53 ± 0,28
Amoros Blanco	14,47 ± 0,60	4,61 ± 0,31
Arisnegro Tenerife	14,62 ± 0,41	5,16 ± 0,35
Berberisco F. Núñez	15,00 ± 0,20	4,66 ± 0,56
Camacho	15,02 ± 0,34	2,84 ± 0,09
Vitrón	15,33 ± 1,00	5,46 ± 0,17
Recio de Málaga	15,42 ± 1,91	2,97 ± 0,11
Rojo de Llerena	15,67 ± 0,65	2,96 ± 0,06
Aldura	15,68 ± 1,03	4,53 ± 0,15
Rubio	15,80 ± 0,40	3,41 ± 0,11
Recio de Almería	16,03 ± 3,23	4,62 ± 0,25

<sup>1</sup> Los valores son medias ± errores estándar (n=4).

**Tabla 4.** Concentraciones de DIMBOA y DIBOA (mg/g de peso seco) en distintos cultivares de triticale:

<b>Cultivar</b>	<b>DIMBOA <sup>1</sup></b>	<b>DIBOA <sup>1</sup></b>
Delfin	12,70 ± 1,55	2,13 ± 0,51
Torote	15,30 ± 1,10	4,06 ± 0,24
Cachirulo	16,79 ± 2,11	4,21 ± 0,61
Cananea	17,62 ± 1,81	2,14 ± 0,03
Beagle	19,04 ± 1,58	4,69 ± 0,42
Tajuña	21,40 ± 1,64	1,68 ± 0,35
Badiel	22,17 ± 0,81	3,76 ± 0,79
Manigero	22,95 ± 1,82	2,81 ± 0,78
Fascal	24,27 ± 1,77	4,00 ± 0,44

<sup>1</sup> Los valores son medias ± errores estándar (n=4).

**Tabla 5.** Concentraciones de DIMBOA y DIBOA (mg/g de peso seco) en distintos cultivares de centeno:

<b>Cultivar</b>	<b>DIMBOA <sup>1</sup></b>	<b>DIBOA <sup>1</sup></b>
Elbon	5,34 ± 0,58	10,99 ± 1,71
Petkus	12,83 ± 0,42	14,20 ± 0,58

<sup>1</sup> Los valores son medias ± errores estándar (n=4).

### **III.3 Comportamiento de alimentación de *D. noxia* en genotipos de cinco especies de cereales de invierno con distintos niveles de Hx.**

Los niveles de DIMBOA fueron significativamente más elevados ( $p < 0,05$ ) en el cultivar Chinese spring que en ABE, aunque ambos cultivares presentaron concentraciones similares de DIBOA (Tablas 6 y 7). El tiempo total de "np" [2] de *D. noxia* en Chinese spring y el tiempo de "np" previo a la primera fase de floema [9] fueron tres y cuatro veces mayores, respectivamente, que en ABE (Tablas 6 y 7). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la duración de la fase floemática [4] y el tiempo total de ingestión de floema [5] (Tabla 6).

Los cultivares de trigo duro presentaron concentraciones de DIMBOA aproximadamente proporcionales a las de los cultivares de trigo blando, siendo la concentración de DIMBOA en Roqueño similar a la de Chinese spring. Los niveles de DIBOA en Roqueño y Camacho fueron semejantes a los de los cultivares de trigo blando. El tiempo total de "np" [2] de *D. noxia* en los cultivares de trigo duro mostró el mismo patrón y valores similares a los cultivares de trigo blando. El tiempo total de ingestión de floema [5] se encuentra dentro del rango que presentaron los cultivares de trigo blando (Tabla 6). Así mismo, las diferencias en el tiempo previo a la fase de floema [10] y a la ingestión de floema [12], fueron similares a las registradas en los cultivares de trigo blando, aunque dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 7). En Roqueño y ABE el 100 % de los pulgones se alimentaron del floema [6], mientras que en Camacho y Chinese spring sólo el 50 y 88 %, respectivamente, de los pulgones presentaron este comportamiento (Tabla 6). Por lo tanto, cuando se tomaron las 8 horas completas de registro como tiempo necesario para alcanzar la

**Tabla 6.** Efecto del DIMBOA y DIBOA (mg/g de peso seco) sobre los parámetros "no secuenciales": Tiempo total de np (min) [2]; Tiempo total en la fase floemática (E) (min) [4], Tiempo total de ingestión de floema (E2) (min) [5] y porcentaje de pulgones que aceptaron el floema (E2>8 min) [6] de *D.noxia* en trigo blando (1,2), trigo duro (3,4), triticale (5,6), centeno (7,8) y cebada (9) durante 8 horas de registro.

Cultivares	n	DIMBOA <sup>1</sup>	DIBOA <sup>1</sup>	[2] <sup>2</sup>	[4] <sup>2</sup>	[5] <sup>2</sup>	[6]
<b>Trigo blando</b>							
(1) ABE	11	4.8 ± 0.3 a	1.8 ± 0.1 a	44 ± 14 ade	246 ± 28 a	223 ± 27 ac	100
(2) C. Spring	16	8.3 ± 0.3 b	2.2 ± 0.2 a	111 ± 27 bc	202 ± 31 ac	184 ± 32 ac	88
<b>Trigo duro</b>							
(3) Roqueño	11	8.4 ± 0.2 b	2.1 ± 0.1 a	54 ± 22 abe	380 ± 23 b	253 ± 28 a	100
(4) Camacho	15	18.6 ± 2.3 d	2.5 ± 0.1 a	121 ± 38 cd	361 ± 28 b	204 ± 38 ac	50
<b>Triticale</b>							
(5) Torote	9	13.6 ± 0.6 c	2.3 ± 0.3 a	97 ± 38 ace	108 ± 37 cd	96 ± 35 b	56
(6) Tajuña	12	18.0 ± 0.6 d	2.5 ± 0.2 a	88 ± 17 ac	198 ± 35 ac	182 ± 35 ab	75
<b>Centeno</b>							
(7) Elbon	8	7.2 ± 0.2 ab	10.2 ± 0.4 c	50 ± 10 ace	390 ± 11 b	219 ± 39 ac	75
(8) Petkus	13	12.6 ± 0.3 c	14.3 ± 1.0 b	87 ± 19 ac	177 ± 30 ad	154 ± 29 bc	75
<b>Cebada</b>							
(9) Albacete	10	0.00	0.00	34 ± 9 e	192 ± 40 ac	177 ± 39 ab	90

1. Los valores corresponden a medias ± SE. Medias ± SE situados en la misma columna seguidos por la misma letra no fueron significativamente diferentes. (P< 0.05, prueba de Duncan ).

2. Los valores corresponden a medias ± SE, excepto para [6]. Medias seguidas de la misma letra en una columna no fueron significativamente distintas (p<0,05, prueba de Mann-Whitney U).

**Tabla 7.** Efecto del DIMBOA y DIBOA (mg/g de peso seco) sobre los parámetros "secuenciales": Tiempo de np antes de la fase de floema (min) [9], tiempo previo a la fase de floema (min) [10], tiempo mínimo previo a la fase de floema desde que comienza la prueba [11] y tiempo previo a la ingestión de floema [12] de *D.noxia* en trigo blando (1,2), trigo duro (3,4), triticale (5,6), centeno(7,8) y cebada (9) durante 8 horas de registro.

Cultivares	n	DIMBOA <sup>1</sup>	DIBOA <sup>1</sup>	[9] <sup>2</sup>	[10] <sup>2</sup>	[11] <sup>2</sup>	[12] <sup>2</sup>
<i>T. aestivum</i>							
(1) ABE	11	4.8 ± 0.3 a	1.8 ± 0.1 a	22 ± 11 a	178 ± 39 abc	44.7 ± 10.0 abc	184 ± 38 ab
(2) C. Spring	16	8.3 ± 0.3 b	2.2 ± 0.2 a	88 ± 26 bdf	182 ± 28 bd	30.6 ± 3.6 a	238 ± 35 abd
<i>T. turgidum</i>							
(3) Roqueño	11	8.4 ± 0.2 b	2.1 ± 0.1 a	31 ± 12 ac	148 ± 29 bc	53.6 ± 7.5 bc	160 ± 28 bce
(4) Camacho	15	18.6 ± 2.3 d	2.5 ± 0.1 a	84 ± 29 abdf	217 ± 50 abc	36.3 ± 6.9 abc	230 ± 45 acdf
<i>Triticosecale</i>							
(5) Torote	9	13.6 ± 0.6 c	2.3 ± 0.3 a	49 ± 13 bce	291 ± 52 ad	92.3 ± 40.6 cde	334 ± 52 d
(6) Tajuña	12	18.0 ± 0.6 d	2.5 ± 0.2 a	74 ± 14 f	227 ± 32 abd	40.8 ± 4.6 abc	274 ± 38 ad
<i>S. cereale</i>							
(7) Elbon	8	7.2 ± 0.2 ab	10.2 ± 0.4 c	28 ± 3 cd	87 ± 19 ce	41.8 ± 10.7 abc	161 ± 44 bef
(8) Petkus	13	12.6 ± 0.3 c	14.3 ± 1.0 b	47 ± 8 bdf	188 ± 46 abe	28.4 ± 6.4 ad	198 ± 45 ae
<i>H. vulgarey</i>							
(9) Albacete	10	0.00	0.00	31 ± 9 ade	211 ± 34 b	112.3 ± 30.4 e	259 ± 41 adf

1. Los valores corresponden a medias ± SE. Medias ± SE situados en la misma columna seguidos por la misma letra no fueron significativamente diferentes. (P< 0.05, prueba de Duncan).

2. Los valores corresponden a medias ± SE. Medias seguidas de la misma letra en una columna no fueron significativamente distintas (p<0,05, prueba de Mann-Whitney U).

fase de floema [4] y de ingestión del floema [5], es posible que se subestimen los parámetros mencionados en aquellos *D. noxia* que no mostraron fase de floema, que, por otra parte fueron similares en número a los presentes en los cultivares de trigo blando (Tabla 6).

Los niveles de DIMBOA obtenidos en los triticales Torote y Tajuña fueron altos y significativamente mayores a los de ABE, Chinese spring y Roqueño, sin embargo, sus niveles de DIBOA fueron similares a los obtenidos en los cultivares de trigo blando y trigo duro analizados. *D. noxia* presentó en ambos triticales valores elevados del tiempo total de "np" [2]. Concretamente, en Torote, el tiempo necesario para alcanzar la fase floemática [10] y para la ingestión de floema [12], así como el tiempo previo a la fase de floema, desde que comienza la penetración [11], fueron muy altos (Tablas 7).

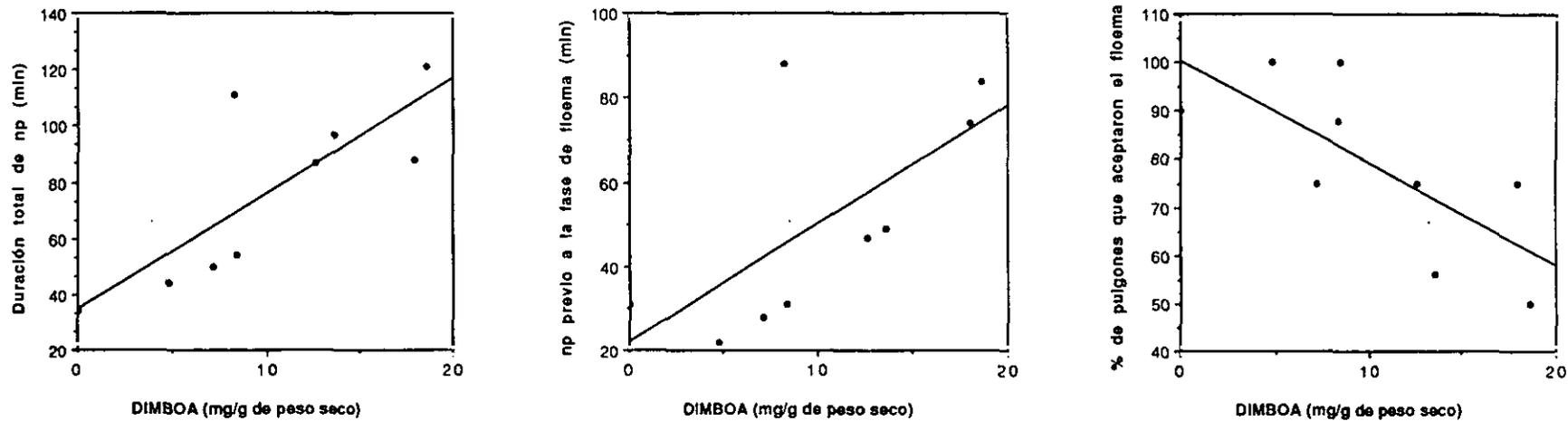
En los cultivares de centeno, la concentración de DIMBOA y DIBOA fue significativamente mayor en Petkus. Es importante señalar que los cultivares de centeno fueron los que presentaron concentraciones de DIBOA significativamente mayores que el resto de genotipos. En Elbon, el tiempo total de "np" [2], especialmente el previo a alcanzar la fase de floema [9] fue corto y con valores similares a los de ABE. Así mismo, en Elbon los pulgones alcanzaron la fase floemática [10] y de ingestión de floema [12] antes que en otros cultivares que presentaron altas concentraciones de DIMBOA, siendo pues el comportamiento de *D. noxia* en este cultivar similar al observado en ABE. El comportamiento de esta especie en Petkus fue opuesto al que presentó en Elbon para los parámetros antes mencionados, no obstante, en ambos cultivares el 75 % de los pulgones aceptaron el floema (Tablas 6 y 7).

Por último, en la cebada Albacete, en la que no se detectaron DIMBOA ni DIBOA, el tiempo total de "np" [2] fue menor que en el resto de cultivares, aunque no significativamente distintos que en ABE, Roqueño, Torote y Elbon, que fueron los cultivares que presentaron menores concentraciones de DIMBOA dentro de cada especie. Es importante destacar que el tiempo mínimo previo a la fase de floema desde que comienza la penetración [11] fue significativamente mayor que en el resto de los cultivares estudiados, excepto Torote (Tablas 6 y 7).

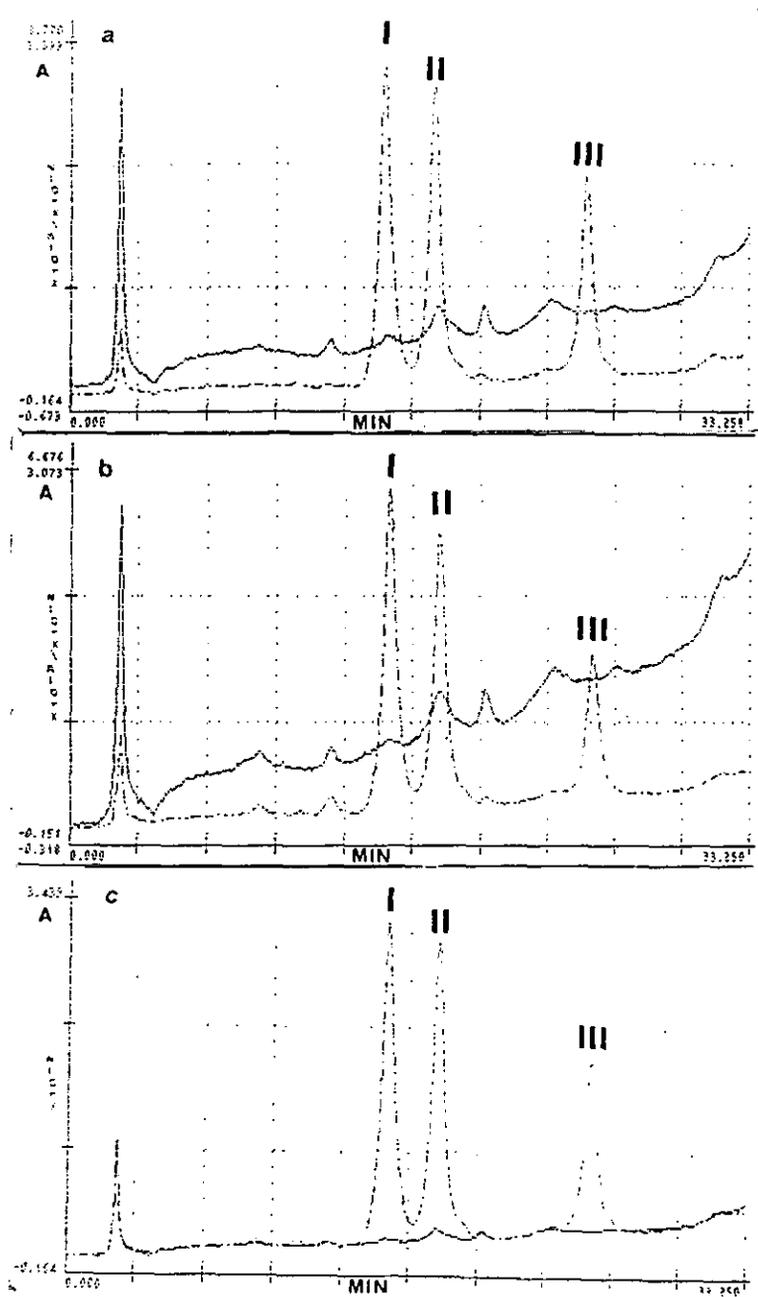
Los niveles de DIMBOA presentes en los cultivares estudiados mostraron una correlación significativamente positiva con el tiempo total de "np" ( $y=34,34 + 4,12x$ ;  $r=0,79$ ;  $p<0,05$ ) y el tiempo de "np" previo a la fase de floema ( $y=21,90 \pm 2,80x$ ,  $r=0,67$ ;  $p<0,05$ ). Del mismo modo, el porcentaje de pulgones que aceptaron el floema correlaciona significativa y negativamente ( $y=100,24-2,12x$ ;  $r=-0,73$ ;  $p<0,05$ ) con la concentración de DIMBOA presente en las plántulas analizadas (Fig. 14).

### **III.3.1 Cuantificación de Hx en exudados de floema.**

Cuando se analizaron las muestras de exudado de floema de los cultivares: Chinese spring (trigo blando), Camacho (trigo duro) y Tajuña (triticale) mediante HPLC se observaron dos picos cuyos tiempos de retención fueron similares a los del DIMBOA y DIBOA. Cuando se añadieron DIBOA, DIMBOA y MBOA a las muestras de exudado se observó un aumento en el área de los picos (Fig. 15).



**Fig. 14.** Correlación entre los niveles de DIMBOA de varias especies de cereales y a) la duración total de "np" ( $y=34,34 + 4,12x$ ;  $r=0,79$ ;  $p<0,05$ ), b) la duración de "np" previo a la fase de floema ( $y=21,90 + 2,80x$ ,  $r=0,67$ ;  $p<0,05$ ) y c) el % de pulgones que alcanzaron el floema ( $y=100,24 - 2,12x$ ;  $r=-0,73$ ;  $p<0,05$ ).



**Fig. 15.** Cromatogramas de los exudados de floema de a) Chinese spring (trigo blando), b) Camacho (trigo duro) y Tajuña (triticale) analizados mediante HPLC. (-) exudado y (-) exudado enriquecido con DIBOA (I), DIMBOA (II) y MBOA (III).

Los compuestos DIBOA, DIMBOA y MBOA previamente derivatizados y separados mediante GLC dieron unos tiempos de retención de: 17,33 (TMS-MBOA), 24,28 (TMS<sub>2</sub>-DIBOA) y 30,09 min (TMS<sub>2</sub>-DIMBOA) (Fig 16). Los compuestos se identificaron de acuerdo a sus espectros de masa (Fig 10).

Los resultados del análisis de los exudados de floema, mediante GLC-MS, de cultivares de varias especies de cereales se muestran en la Tabla 8. El DIMBOA no fue detectado en ninguna de las especies analizadas, sin embargo se encontraron trazas de DIBOA en algunos de los cultivares analizados.

**Tabla 8.** Presencia de los compuestos: DIBOA, DIMBOA y MBOA en exudados de floema de trigo blando (cv. ABE y Ch. spring), trigo duro (cv. Roqueño y Camacho), triticale (cv. Torote y Tajuña) y centeno (cv. Petkus y Elbon).

Cultivar	DIBOA	DIMBOA	MBOA
ABE	n.d.	n.d.	n.d.
Chinese	traza	n.d.	n.d.
Roqueño	traza	n.d.	n.d.
Camacho	n.d.	n.d.	n.d.
Torote	n.d.	n.d.	n.d.
Tajuña	traza	n.d.	n.d.
Petkus	traza	n.d.	n.d.
Elbon	traza	n.d.	n.d.

n.d. No detectable

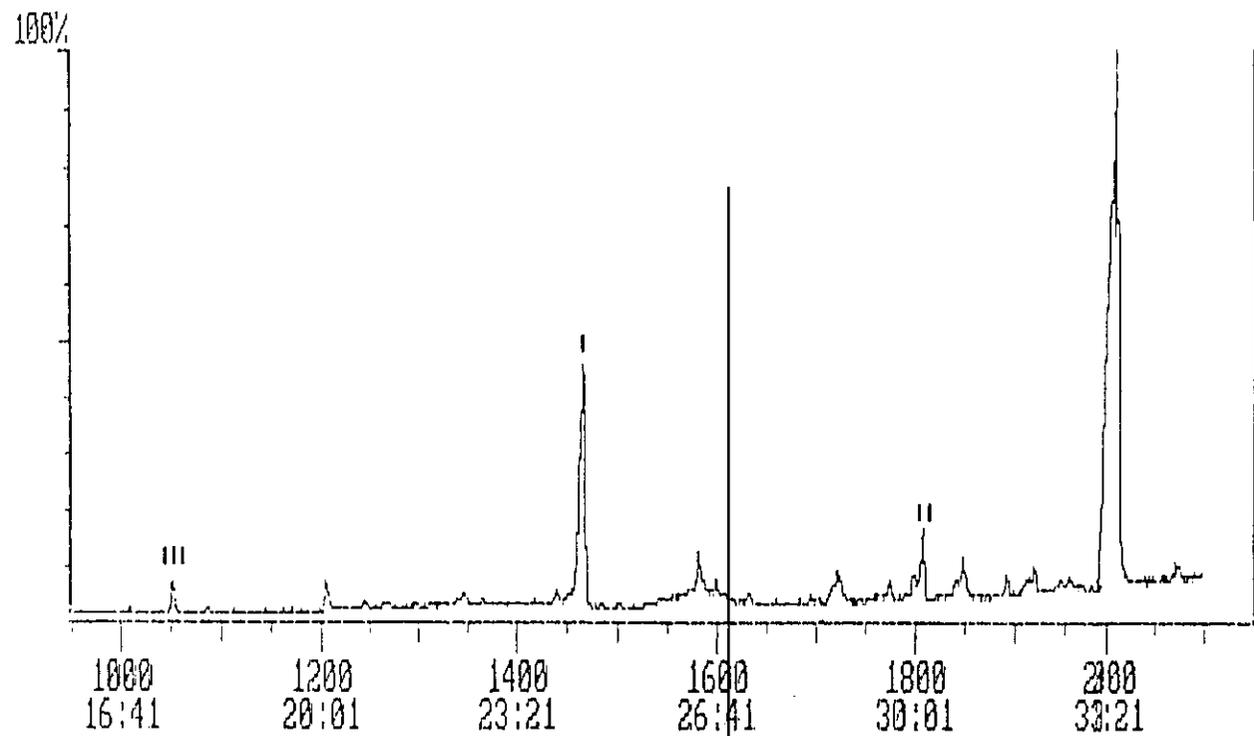


Fig. 16. Cromatograma de una mezcla de Hx separados mediante GLC. I, DIBOA; II, DIMBOA y III, MBOA.

#### **III.4 Tabla de vida de *D. noxia* en cultivares de cinco especies de cereales de invierno con diferentes concentraciones de Hx.**

Las concentraciones de los Hx, DIMBOA y DIBOA, en el momento de la insectación con *D. noxia* (Tabla 9) corresponden con las obtenidos en el estudio previo de la relación entre los niveles de Hx y el comportamiento de alimentación de *D. noxia*.

En las Tablas 10 y 11 se muestran los ficheros de salida del programa que calcula la  $r_m$  y los demás parámetros de la tabla vida de *D. noxia* en ABE (trigo blando) y Roqueño (trigo duro). Se observa que el porcentaje acumulado de contribución a la  $r_m$  de cada edad es superior al 90 % a los diez días de periodo reproductivo ( $i=16,5$ ).

Los parámetros de la tabla de vida de *D. noxia* en los cultivares: Albacete (cebada); ABE y Chinese spring (trigo blando); Roqueño y Camacho (trigo duro) Torote y Tajuña (Triticale) se muestran en la Tabla 9. Dichos parámetros no pudieron calcularse en los cultivares de centeno: Petkus y Elbon, debido a que las ninfas murieron durante el periodo pre-reproductivo.

*D. noxia* presentó en el trigo blando Chinese spring la mayor supervivencia en el periodo pre-reproductivo seguido de la cebada Albacete, Roqueño, ABE, Camacho, Tajuña y Torote, en este último la supervivencia fue especialmente baja (Tabla 9). La duración del periodo pre-reproductivo en los triticales Torote y Tajuña fue de casi 10 días y

**Tabla 9.** Tabla de vida de *D. noxia* en cultivares de trigo blando (ABE y Chinese Spring), trigo duro (Roqueño y Camacho), triticale (Torote y Tajuña) y cebada (Albacete ) con distintas concentraciones de DIMBOA (mg/g peso seco).

	Cultivares						
	Albacete	ABE	Chinese spring	Roqueño	Camacho	Torote	Tajuña
DIMBOA	0,00	4,85 ± 0,28 a	8,35 ± 0,29 b	8,43 ± 0,21 b	18,55 ± 2,35 d	13,65 ± 0,60 c	17,97 ± 0,65 d
DIBOA	0,00	1,78 ± 0,11 a	2,21 ± 0,16 a	2,09 ± 0,15 a	2,49 ± 0,12 a	2,32 ± 0,32 a	2,46 ± 0,20 a
Supervivencia en el periodo pre-reproductivo (%)	80,40	70,27	93,60	78,90	64,10	32,80	62,77
Duración del periodo pre-reproductivo (días)	6,60 ± 0,17 a	7,10 ± 0,19 a	7,35 ± 0,17 a	6,95 ± 0,14 a	7,50 ± 0,60 a	9,80 ± 0,20 b	9,54 ± 0,25 b
$r_m$	0,2647 ± 0,010 a	0,2448 ± 0,0074 b	0,2730 ± 0,0064 a	0,2430 ± 0,0064 b	0,1738 ± 0,0191 c	-0,1789 ± 0,0370 d	0,0354 ± 0,0226 e
Intervalos de confianza	[0,2474; 0,2799]	[0,2324; 0,2567]	[0,2624; 0,2830]	[0,2316; 0,2525]	[0,1396; 0,2031]	[-0,2417; -0,1311]	[-0,0072; 0,0689]
$\lambda$	1,30	1,28	1,31	1,27	1,19	0,84	1,04
Ro	27,50	30,04	48,67	26,23	9,10	0,13	1,47
T	14,51	16,42	17,10	15,77	13,74	11,12	11,22
rc	0,23	0,21	0,23	0,21	0,16	-0,18	0,03

Medias ± errores estándar (excepto para valores de  $r_m$ , tasa interna de crecimiento, error calculado mediante Bootstrap, 500 réplicas; y supervivencia en el periodo pre-reproductivo,  $\lambda$ , tasa finita de crecimiento; Ro, tasa reproductiva neta; T, tiempo medio de generación y rc, capacidad de crecimiento). Valores en la misma fila con la misma letra no fueron significativamente distintos ( $p < 0,05$ ; prueba de Duncan; excepto valores de  $r_m$  mediante sus límites de confianza para  $p < 0,05$ ).

```

" Output of rm, ver. 1.9 File abe2.per from abe2.dat
"-----
" Individuals = 20. Pivotal ages = 21
" Pre-reproductive lo value = 0.70270
" rm = 0.24480 SE = 0.00739 (Bootstrap, 500 reps.)
" Percentile confidence interval 95% [ 0.23243 , 0.25660]
" Finite rate of increase, lambda = 1.27737
" Net reproduction rate, Ro = 30.04043
" Mean generation length, T = 16.42047
" Capacity for increase, rc = 0.20721
" (1) li * mi
" (2) i * li * mi
" (3) Percentage of age contribution = 100*exp(-rm*i)*li*mi
" (4) Accumulated percentage of age contribution
" i li mi ei (1) (2) (3) (4) si fi
"-----
7.50 0.7027 0.300 14.10 0.21 1.58 3.4 3.4 20.0 6.0
8.50 0.7027 1.200 13.10 0.84 7.17 10.6 14.0 20.0 24.0
9.50 0.7027 2.300 12.10 1.62 15.35 15.9 29.9 20.0 46.0
10.50 0.6676 3.737 11.71 2.49 26.19 19.3 49.2 19.0 71.0
11.50 0.5973 3.529 12.03 2.11 24.24 12.8 61.9 17.0 60.0
12.50 0.5622 2.563 11.75 1.44 18.01 6.8 68.8 16.0 41.0
13.50 0.5622 3.438 10.75 1.93 26.09 7.2 75.9 16.0 55.0
14.50 0.5446 4.065 10.08 2.21 32.10 6.4 82.4 15.5 63.0
15.50 0.5270 4.000 9.40 2.11 32.68 4.8 87.2 15.0 60.0
16.50 0.4919 5.000 9.04 2.46 40.58 4.4 91.6 14.0 70.0
17.50 0.4568 2.615 8.69 1.19 20.91 1.7 93.2 13.0 34.0
18.50 0.4568 4.846 7.69 2.21 40.95 2.4 95.7 13.0 63.0
19.50 0.4568 2.154 6.69 0.98 19.18 0.8 96.5 13.0 28.0
20.50 0.4392 4.480 5.94 1.97 40.33 1.3 97.8 12.5 56.0
21.50 0.4216 4.083 5.17 1.72 37.01 0.9 98.8 12.0 49.0
22.50 0.4216 2.917 4.17 1.23 27.67 0.5 99.3 12.0 35.0
23.50 0.4041 2.261 3.33 0.91 21.47 0.3 99.6 11.5 26.0
24.50 0.3689 2.381 2.60 0.88 21.52 0.2 99.8 10.5 25.0
25.50 0.3338 1.158 1.82 0.39 9.86 0.1 99.9 9.5 11.0
26.50 0.2986 1.765 0.97 0.53 13.97 0.1 99.9 8.5 15.0
27.50 0.1405 4.250 0.50 0.60 16.43 0.1 100.0 4.0 17.0

```

**Tabla 10.** Fichero de salida del programa "rm" (versión 1.9) para ABE (trigo blando). Los encabezamientos dan información sobre las condiciones del cálculo. La supervivencia diaria (li) y la fecundidad diaria (mi) se han calculado a partir de 20 pulgones, habiéndose corregido con la mortalidad registrada en el periodo pre-reproductivo.

```

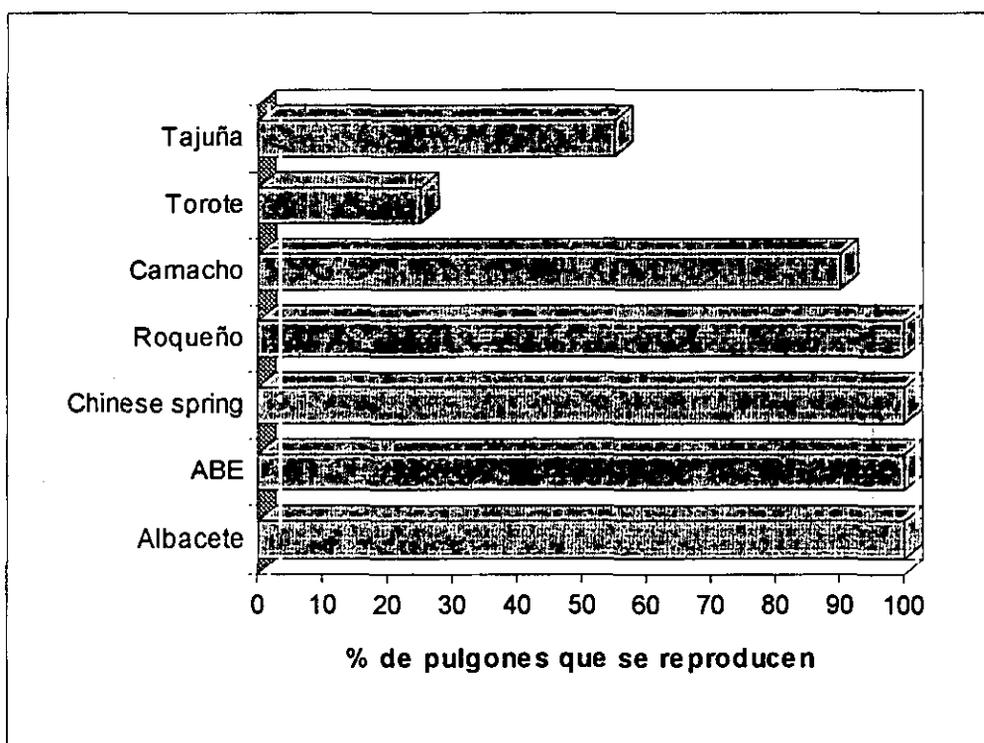
" Output of rm, ver. 1.9 File roq2.per from roq2.dat
"-----
" Individuals = 20. Pivotal ages = 21
" Pre-reproductive lo value = 0.78900
" rm = 0.24298 SE = 0.00639 (Bootstrap, 500 reps.)
" Percentile confidence interval 95% [ 0.23159 , 0.25250]
" Finite rate of increase, lambda = 1.27504
" Net reproduction rate, Ro = 26.23425
" Mean generation length, T = 15.76767
" Capacity for increase, rc = 0.20720
" (1) li * mi
" (2) i * li * mi
" (3) Percentage of age contribution = 100*exp(-rm*i)*li*mi
" (4) Accumulated percentage of age contribution
" i li mi ei (1) (2) (3) (4) si fi
"-----
7.50 0.7890 0.250 12.45 0.20 1.48 3.2 3.2 20.0 5.0
8.50 0.7890 1.100 11.45 0.87 7.38 11.0 14.2 20.0 22.0
9.50 0.7496 2.789 11.03 2.09 19.86 20.8 35.0 19.0 53.0
10.50 0.6707 3.765 11.26 2.52 26.51 19.7 54.7 17.0 64.0
11.50 0.6115 3.032 11.31 1.85 21.32 11.3 66.0 15.5 47.0
12.50 0.5720 2.897 11.05 1.66 20.71 8.0 74.0 14.5 42.0
13.50 0.5326 2.889 10.83 1.54 20.77 5.8 79.8 13.5 39.0
14.50 0.5129 3.154 10.23 1.62 23.45 4.8 84.6 13.0 41.0
15.50 0.5129 3.538 9.23 1.81 28.13 4.2 88.8 13.0 46.0
16.50 0.5129 3.538 8.23 1.81 29.94 3.3 92.1 13.0 46.0
17.50 0.4931 4.080 7.54 2.01 35.21 2.9 94.9 12.5 51.0
18.50 0.4734 2.917 6.83 1.38 25.54 1.5 96.5 12.0 35.0
19.50 0.4734 2.417 5.83 1.14 22.31 1.0 97.5 12.0 29.0
20.50 0.4734 2.917 4.83 1.38 28.31 0.9 98.4 12.0 35.0
21.50 0.4340 3.545 4.23 1.54 33.08 0.8 99.3 11.0 39.0
22.50 0.3748 1.579 3.82 0.59 13.31 0.3 99.5 9.5 15.0
23.50 0.3353 2.000 3.21 0.67 15.76 0.2 99.7 8.5 17.0
24.50 0.2959 1.067 2.57 0.32 7.73 0.1 99.8 7.5 8.0
25.50 0.2762 0.286 1.71 0.08 2.01 0.0 99.8 7.0 2.0
26.50 0.2367 2.667 0.92 0.63 16.73 0.1 99.9 6.0 16.0
27.50 0.0986 5.200 0.50 0.51 14.10 0.1 100.0 2.5 13.0

```

**Tabla 11.** Fichero de salida del programa "rm" (versión 1.9) para Camacho (trigo duro). Los encabezamientos dan información sobre las condiciones del cálculo. La supervivencia diaria (li) y la fecundidad diaria (mi) se han calculado a partir de 20 pulgones, habiéndose corregido con la mortalidad registrada en el periodo pre-reproductivo.

significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) a la del resto de cultivares estudiados, que fue entre 6 y 8 días.

Por otra parte, en los cultivares Albacete, ABE, Chinese spring y Roqueño todos los pulgones se reprodujeron, mientras que en Camacho sólo se reprodujeron el 90% de los individuos, en Torote y Tajuña el porcentaje fue mucho menor (Fig. 17).



**Fig. 17.** Porcentaje de pulgones que se reproducen en los cultivares de cebada (Albacete), trigo blando (ABE y Chinese spring), trigo duro (Roqueño y Camacho) y triticale (Torote y Tajuña).

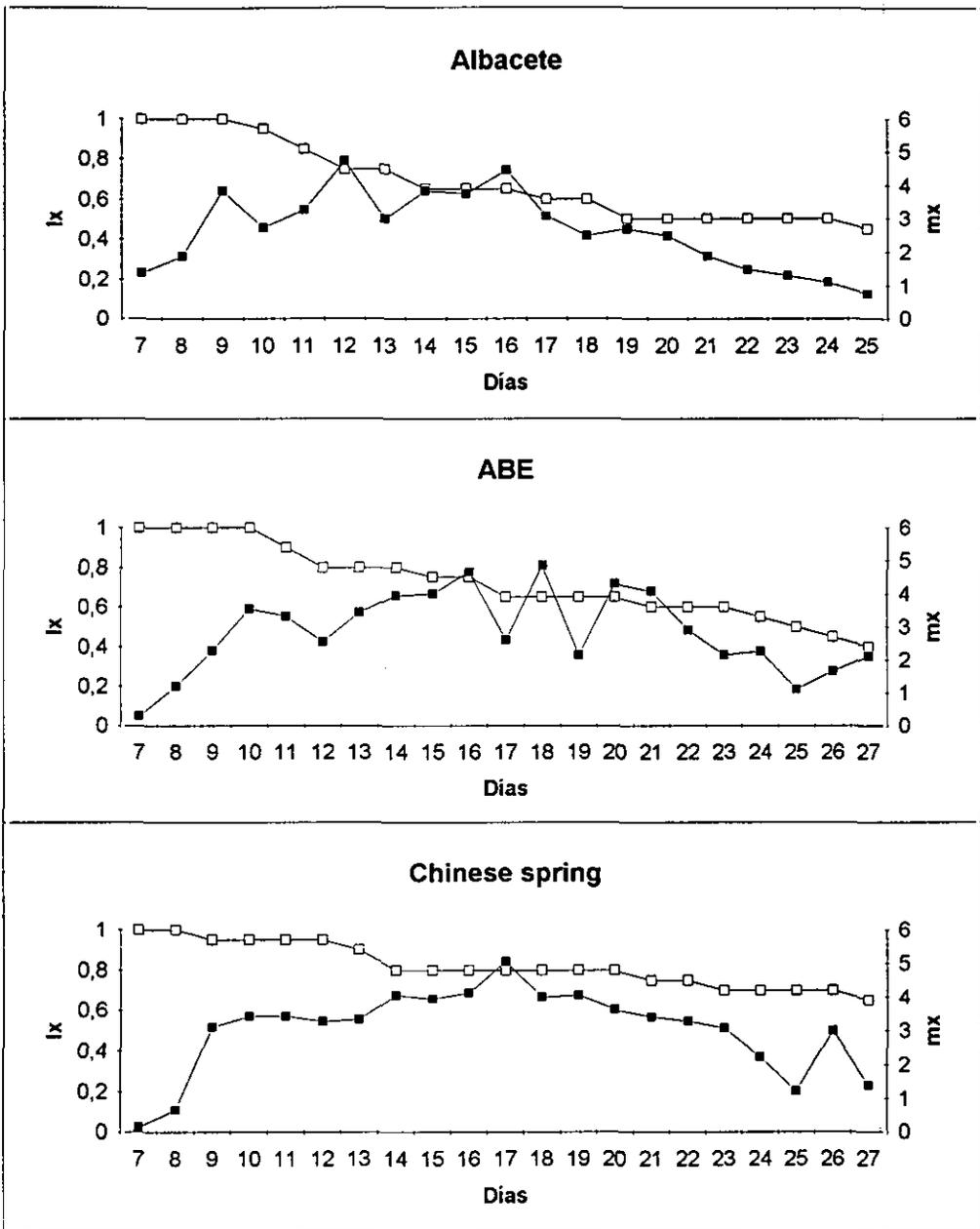
La supervivencia diaria ( $lx$ ) siguió una tendencia semejante en la cebada (Albacete) y en los trigos blandos (ABE y Chinese spring) que tienen los menores niveles de DIMBOA. Los trigos duros Roqueño y Camacho

siguieron un patrón análogo pero con valores menores y los triticales Torote y Tajuña mostraron un periodo reproductivo muy corto (Fig. 18).

En cuanto a la fecundidad diaria ( $m_x$ ) se observa un incremento rápido a partir del día 7 para llegar a una situación de meseta de sierra a partir del día 9 ó 10 en todos los cultivares con niveles de DIMBOA por debajo de 8,5 mg/g de peso seco (Albacete, ABE, Chinese spring y Roqueño (Tabla 9). El trigo duro Camacho siguió un modelo semejante pero con valores mucho menores y los triticales, Torote y Tajuña, mostraron una fecundidad diaria mucho menor y durante un periodo de tiempo más corto, entre 13 y 16 días frente a 25 ó 27 para los otros cultivares (Fig. 18).

En los cultivares Chinese spring y Albacete *D. noxia* presentó significativamente mayores valores de  $r_m$  que el resto de los cultivares. ABE y Roqueño mostraron una  $r_m$  semejante y significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que en los restantes cultivares. Los valores de  $r_m$  para el trigo duro Camacho, y los triticales Torote y Tajuña, fueron significativamente distintos entre sí y decrecieron en el orden mencionado. Los valores de  $\lambda$ , la tasa finita de incremento, y los demás parámetros poblacionales siguieron una tendencia similar a la de la  $r_m$ , aunque las diferencias no fueron tan acusadas, excepto en el caso de la tasa reproductiva neta,  $R_0$  (Tabla 9).

El análisis de regresión no mostró correlación alguna entre los niveles de DIMBOA y DIBOA y ninguno de los parámetros de la tabla de vida de *D. noxia* que se recogen en la Tabla 9.



**Fig. 18.** Supervivencia diaria, Ix (□) y fecundidad diaria, mx (■) de *D. noxia* en los cultivares: Albacete (cebada), ABE y Chinese spring (trigos blandos), Roqueño y Camacho (trigos duros) y Tajuña y Torote (triticales).

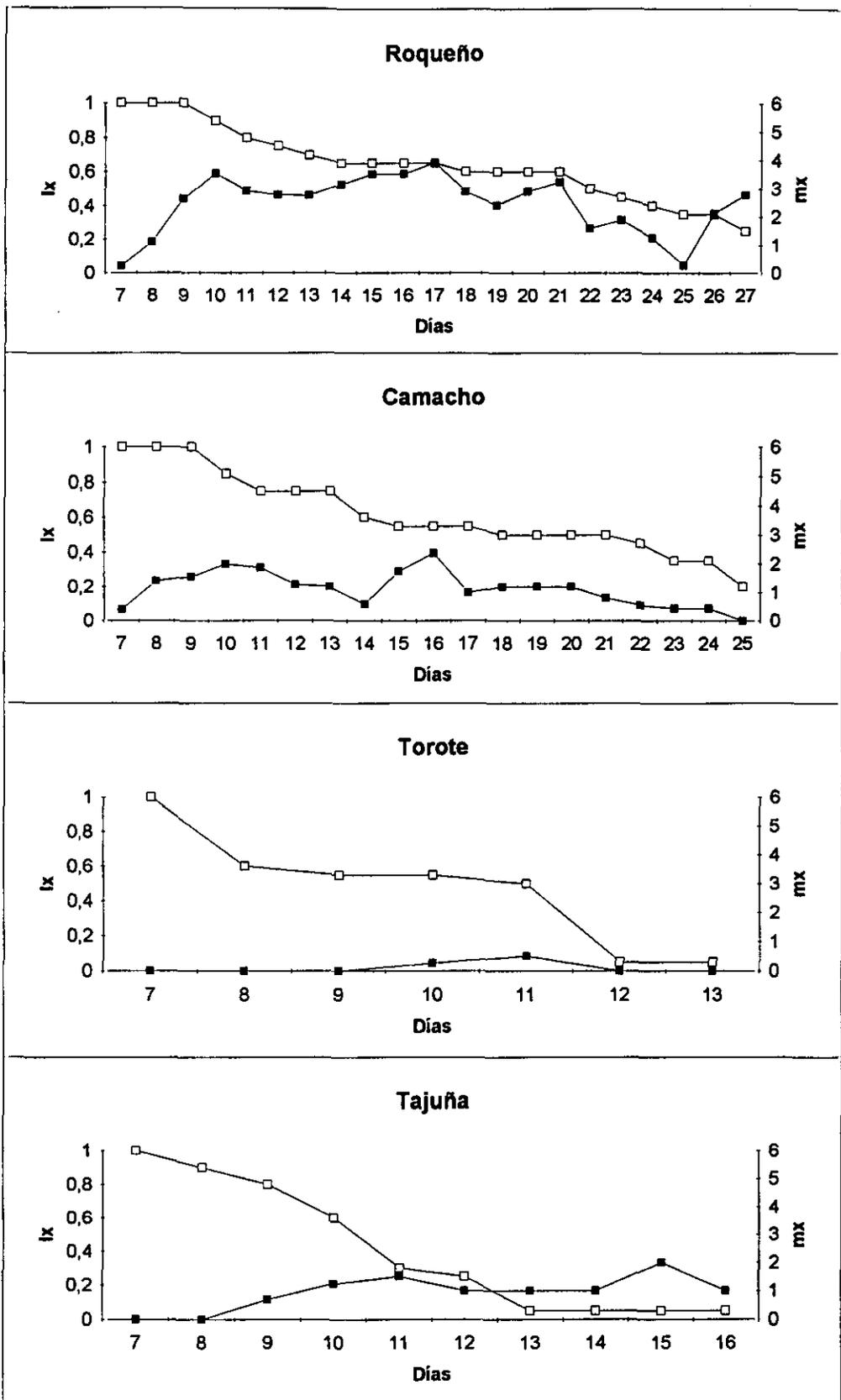


Fig. 18. Continuación.

### **III.5 Tabla de vida de *D. noxia* en cultivares de trigo blando con diferentes concentraciones de Hx.**

#### **III.5.1 Niveles de Hx.**

En el muestreo realizado en el momento de la insectación con *D. noxia* los cultivares Chinese spring y Yécora mostraron niveles de DIMBOA significativamente ( $p < 0,05$ ) mayores que los otros tres cultivares, que a su vez tenían valores semejantes (Tabla 12).

Por otra parte, efectuamos un muestro de plantas libres de pulgones y en las mismas condiciones ambientales al final del experimento (día 16). Las concentraciones de DIMBOA en este segundo muestreo son significativamente menores ( $p < 0,01$ ) que las registradas en el primero, pero disminuyen en un porcentaje semejante (Fig. 19), por lo que hemos considerado únicamente las concentraciones iniciales en las tablas 12 y 13 a efectos de correlacionar los niveles de DIMBOA con los distintos parámetros de la tabla de vida de *D. noxia*.

Por el contrario, no observamos diferencias significativas en los niveles de DIBOA entre el primer y segundo muestreo (Fig. 20), por lo que tomamos igualmente los valores del primer muestreo en la Tabla 12 y en los análisis de correlación correspondientes.

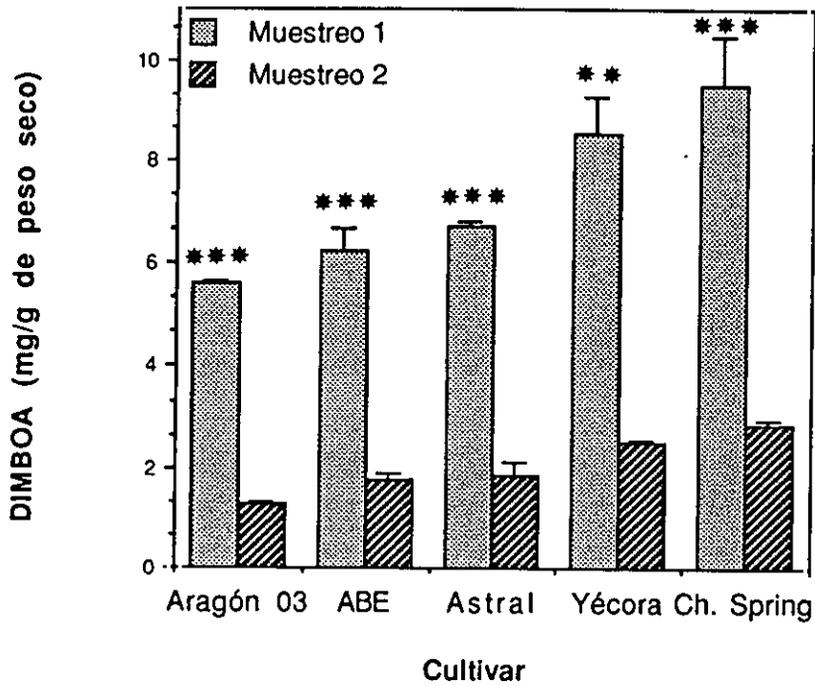
#### **III.5.2 Niveles de sacarosa en exudados de floema.**

En cuanto a los niveles de sacarosa el cultivar Aragón 03 tiene un contenido significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que el resto, que no son significativamente distintos entre sí.

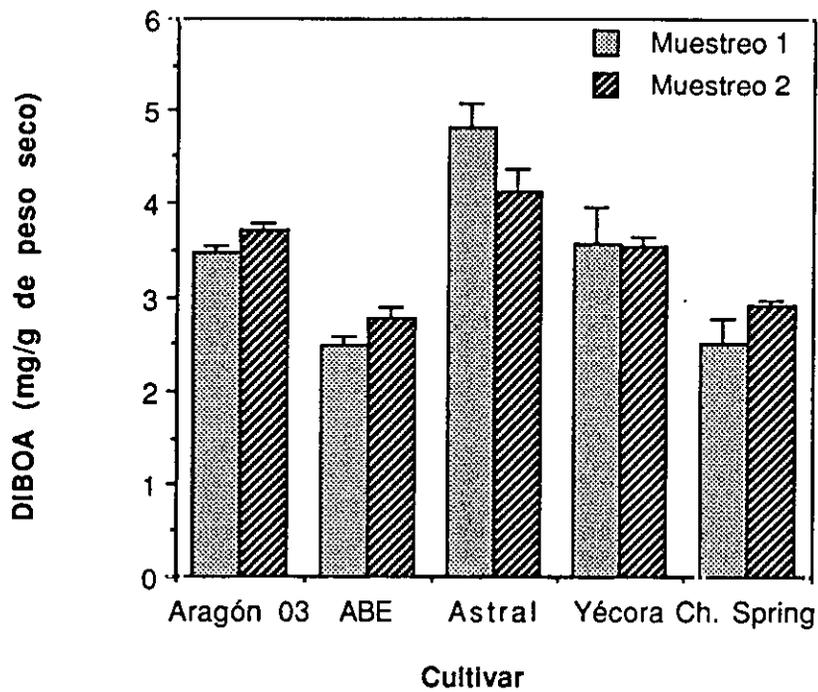
**Tabla 12.** Tabla de vida de *D. noxia* en cinco cultivares de trigo blando con distintas concentraciones de DIMBOA y DIBOA (mg/g peso seco) y sacarosa ( $\mu\text{g/ml}$  de exudado de floema).

	Cultivares				
	Aragón 03	ABE	Astral	Yécora	Chinese spring
DIMBOA	5,59 $\pm$ 0,06 a	6,23 $\pm$ 0,44 a	6,70 $\pm$ 0,11 a	8,54 $\pm$ 0,73 b	9,52 $\pm$ 0,94 b
DIBOA	3,47 $\pm$ 0,07a	2,47 $\pm$ 0,10 b	4,81 $\pm$ 0,27 c	3,57 $\pm$ 0,37 a	2,51 $\pm$ 0,25 b
Sacarosa	18,92 $\pm$ 1,13 a	9,74 $\pm$ 1,16 b	11,72 $\pm$ 1,80 b	11,91 $\pm$ 0,91 b	12,32 $\pm$ 1,21 b
Supervivencia en el periodo pre-reproductivo (%)	93,33	64,29	85,71	84,13	95,00
Duración del periodo pre-reproductivo (días)	7,50 $\pm$ 0,14 a	7,65 $\pm$ 0,15 ab	7,65 $\pm$ 0,13 ab	8,00 $\pm$ 0,13 b	7,85 $\pm$ 0,13 ab
$r_m$	0,3105 $\pm$ 0,0040 a	0,2409 $\pm$ 0,0104 b	0,2734 $\pm$ 0,0088 bc	0,2639 $\pm$ 0,0053 b	0,2908 $\pm$ 0,0055 ac
Intervalos de confianza	[0,3022; 0,3188]	[0,2191; 0,2626]	[0,2549; 0,2918]	[0,2528; 0,2750]	[0,2794; 0,3023]
$\lambda$	1,36	1,27	1,31	1,30	1,34
$R_0$	35,05	15,11	21,47	19,98	28,98
T	12,38	12,16	12,11	12,19	12,46
$r_c$	0,29	0,22	0,25	0,25	0,27

Medias  $\pm$  errores estándar (excepto para valores de  $r_m$ , tasa interna de crecimiento, error calculado mediante Bootstrap, 500 réplicas; y supervivencia en el periodo pre-reproductivo,  $\lambda$ , tasa finita de crecimiento;  $R_0$ , tasa reproductiva neta; T, tiempo medio de generación y  $r_c$ , capacidad de crecimiento). Valores en la misma fila con la misma letra no fueron significativamente distintos ( $p < 0,05$ ; prueba de Duncan; excepto valores de  $r_m$  mediante sus límites de confianza para  $p < 0,05$ ).



**Fig. 19.** Concentración de DIMBOA (mg/g de peso seco) en los cultivares de trigo blando: Aragón 03, ABE, Astral, Yécora, y Chinese spring, en los muestreos realizados en el momento de la insectación y a los 10 días del primer muestreo (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; "t" de student).



**Fig. 20.** Concentración de DIBOA (mg/g de peso seco) en los cultivares de trigo blando: Aragón 03, ABE, Astral, Yécora, y Chinese spring, en el momento de la insectación y a los 10 días del primer muestreo.

### III.5.3 Tabla de vida de *D. noxia* en cultivares de trigo blando.

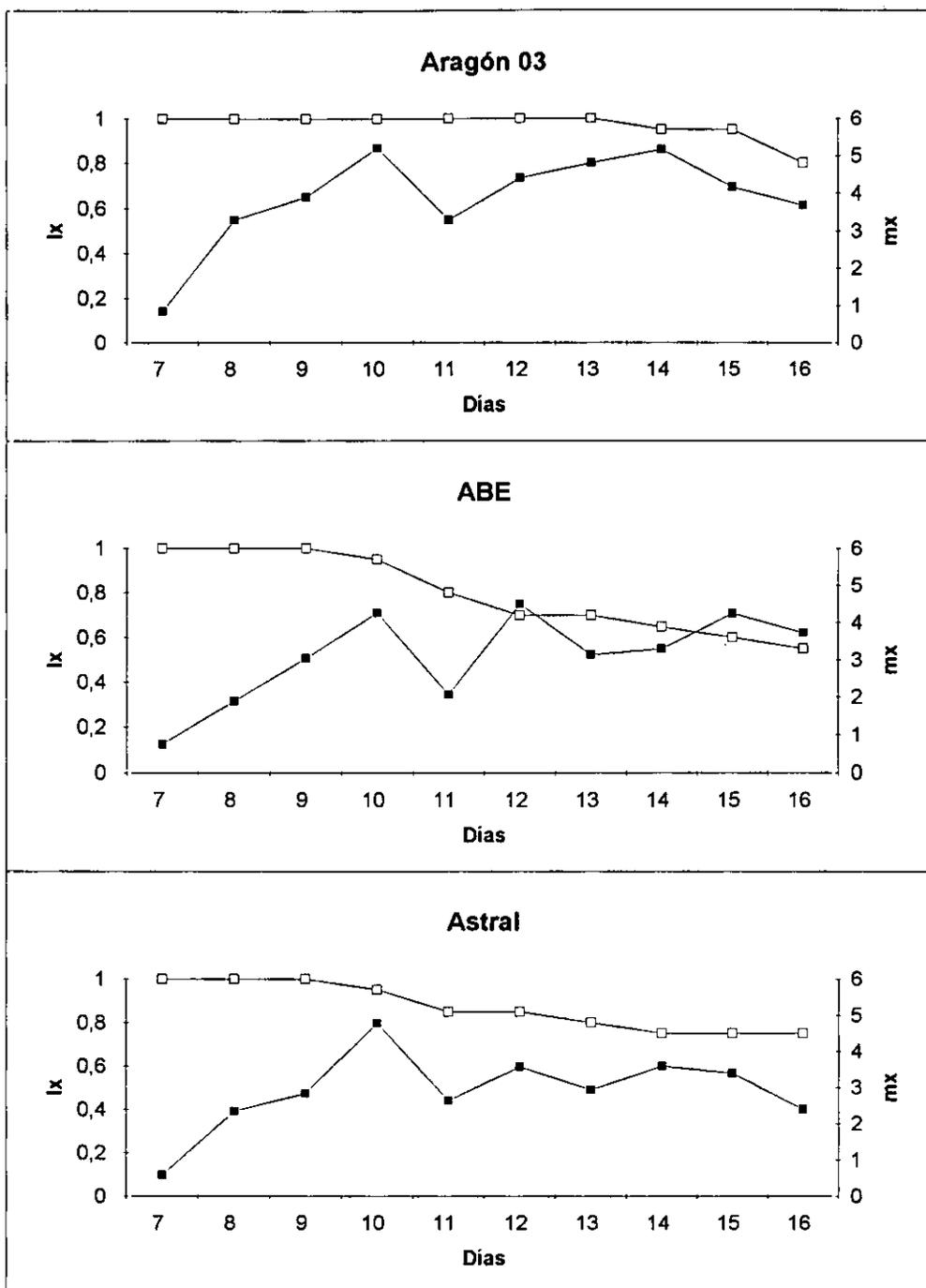
Debido a que la fecundidad en los primeros días del periodo reproductivo contribuyen en un porcentaje mayor del 90 % al valor de la  $r_m$  (Tablas 10 y 11) se consideró que el registro de la mortalidad durante los diez primeros días de dicho periodo era suficiente para estimar el valor de dicho parámetro, lo que permite acortar sensiblemente la duración del experimento.

En ABE la supervivencia de los pulgones en el periodo pre-reproductivo fue la menor de los cultivares estudiados (Tabla 12). Se observaron diferencias significativas en la duración del periodo pre-reproductivo, que fue de 8 días para el cultivar Yécora, seguido de Chinese spring con prácticamente la misma duración y decreciendo ligeramente en relación con los niveles de DIMBOA (Tabla 12).

Los pulgones presentaron en el cultivar Aragón 03, el de menor contenido en DIMBOA, las curvas de fecundidad diarias ( $m_x$ ) más elevadas, con máximos de fecundidad a los 10 y 14 días. Igualmente, la curva de supervivencia diaria ( $l_x$ ) fue más alta en dicho cultivar, iniciándose el descenso en la supervivencia el día 13 (Fig. 21).

*D. noxia* presentó en el cultivar Chinese Spring, el de mayor contenido en DIMBOA, una curva de  $l_x$  de carácter intermedio, comenzando a morir los individuos a partir del día 9. La curva de  $m_x$  fue semejante a la de Aragón 03, presentando máximos de fecundidad a los 10, 12 y 14 días (Fig. 21).

Las curvas de supervivencia diaria de *D. noxia* en los cultivares Astral y Yécora, fueron inferiores a las de Aragón 03, registrando ABE la más baja de los cultivares estudiados. En Yécora, Astral y ABE las curvas de  $m_x$



**Fig. 21.** Supervivencia diaria, Ix (□) y fecundidad diaria, mx (■) de *D. noxia* en los cultivares de trigo blando: Aragón 03, ABE, Astral, Yécora y Chinese spring.

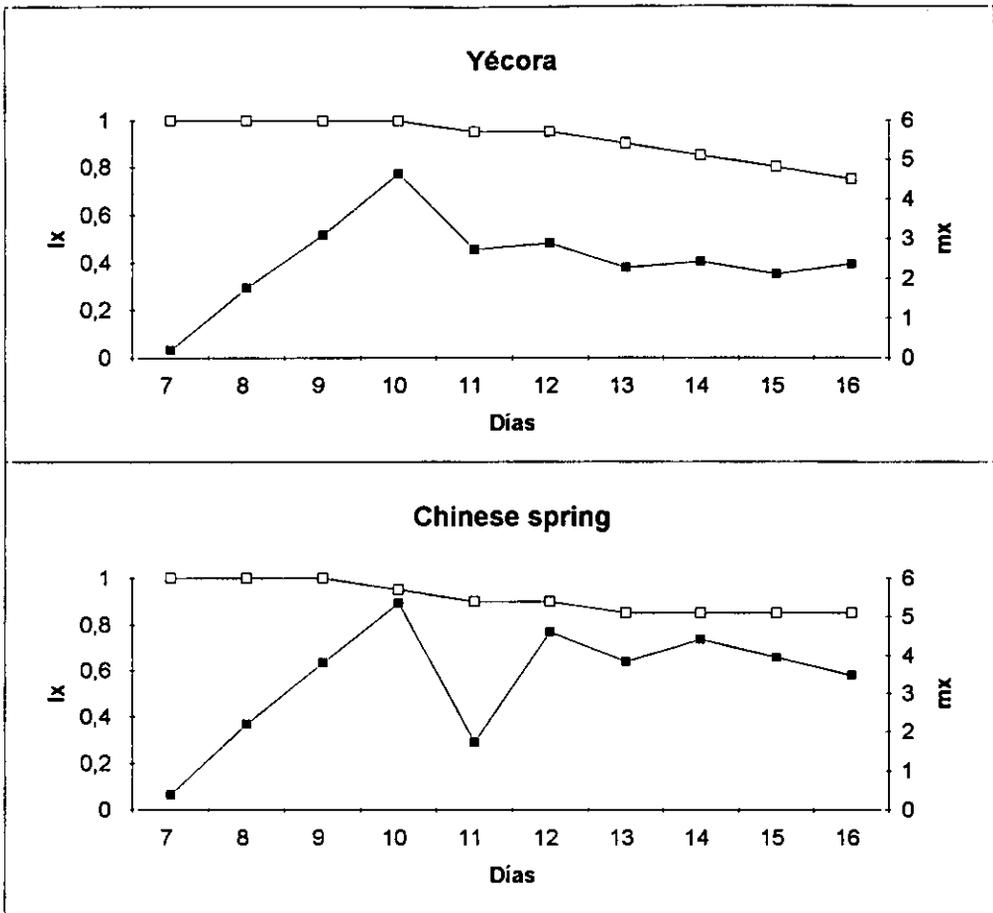


Fig. 21. Continuación.

fueron igualmente inferiores al resto de cultivares, aunque los picos de fecundidad fueron semejantes a los registrados en Aragón 03 y Chinese spring (Fig. 21).

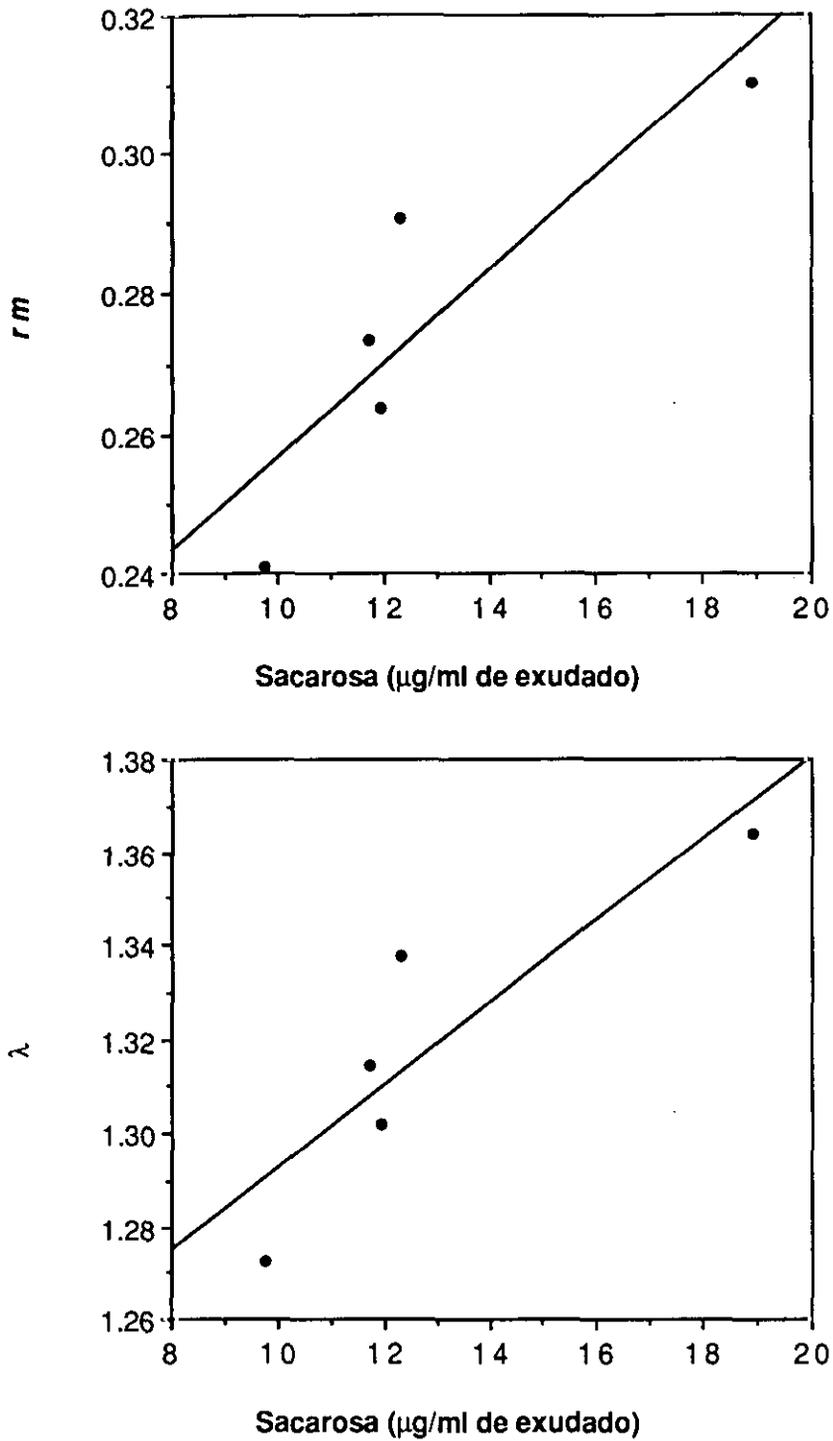
En los cultivares Aragón 03 y Chinese spring la  $r_m$  de *D. noxia* fue significativamente más elevada que en el resto de los cultivares y también presentaron los mayores valores de  $\lambda$ . Los valores de  $r_m$  no fueron significativamente distintos para los ABE, Astral y Yécora, siendo a su vez Astral no significativamente distinto a Chinese spring (Tabla 12). El resto de los parámetros poblacionales siguieron una tendencia semejante a la descrita para la tasa interna de crecimiento ( $r_m$ ) y la tasa finita de crecimiento ( $\lambda$ ).

No se ha encontrado ninguna correlación entre las concentraciones de DIMBOA y DIBOA en extractos de la planta y los parámetros de la tabla de vida calculados. Sin embargo, si se ha obtenido una correlación positiva entre los niveles de sacarosa en exudados de floema y la  $r_m$  ( $y=0,1900 + 0,0066x$ ;  $r=0,8789$ ;  $p<0,05$ ) y  $\lambda$  ( $y=1,2044 + 0,0088x$ ;  $r=0,8829$ ;  $p<0,05$ ) (Fig. 22).

### **III.6 Tabla de vida de *D. noxia* en cultivares de trigo duro con diferentes concentraciones de Hx.**

#### **III.6.1 Niveles de Hx.**

Se han detectado diferencias significativas entre cultivares ( $p<0,05$ ) respecto a las concentraciones de DIMBOA y DIBOA. Recio de Málaga y Aldura fueron los cultivares con mayores niveles de DIMBOA en el primer muestreo realizado, no observándose diferencias significativas entre ellas. Camacho registró unos niveles de DIMBOA intermedios, mientras que



**Fig. 22.** Correlación entre los niveles de sacarosa y las tasas interna ( $r_m$ ) y finita ( $\lambda$ ) de crecimiento de *D. noxia* ( $y = 0,19 + 0,01x$ ;  $r = 0,88$ ;  $p < 0,05$  para  $r_m$  e  $y = 1,20 + 0,01x$ ;  $r = 0,88$ ;  $p < 0,05$  para  $\lambda$ ) en los cultivares de trigo blando: Aragón 03, ABE, Astral, Yécora, y Chinese spring.

Roqueño y Mexa fueron los de menor concentración (Tabla 13). En el segundo muestreo tuvo lugar una notable disminución de los niveles de dicho compuesto, siendo en algunos casos del orden de 5 veces inferiores respecto de las del primer muestreo, pero manteniendo valores porcentuales semejantes frente al nivel inicial (Fig. 23). Por ello se han incluido en la Tabla 13 únicamente los niveles obtenidos en el primer muestreo. Camacho y Mexa presentaron las mayores concentraciones de DIBOA en el primer muestreo ( $p < 0,05$ ). Así mismo, se produjo una disminución significativa en el contenido en DIBOA de las plántulas correspondientes al segundo muestreo en los cultivares: Camacho y Mexa. En Roqueño, Recio y Aldura los niveles de dicho compuesto fueron similares en ambos muestreos realizados (Fig. 24).

### **III.6.2 Niveles de sacarosa en exudados de floema.**

La concentración de sacarosa presente en los exudados de floema de los cultivares de trigo duro están reflejados en la Tabla 13. Los niveles de sacarosa en Aldura fueron significativamente mayores que en Camacho ( $p < 0,05$ ). Sin embargo no se observaron diferencias significativas entre el resto de cultivares.

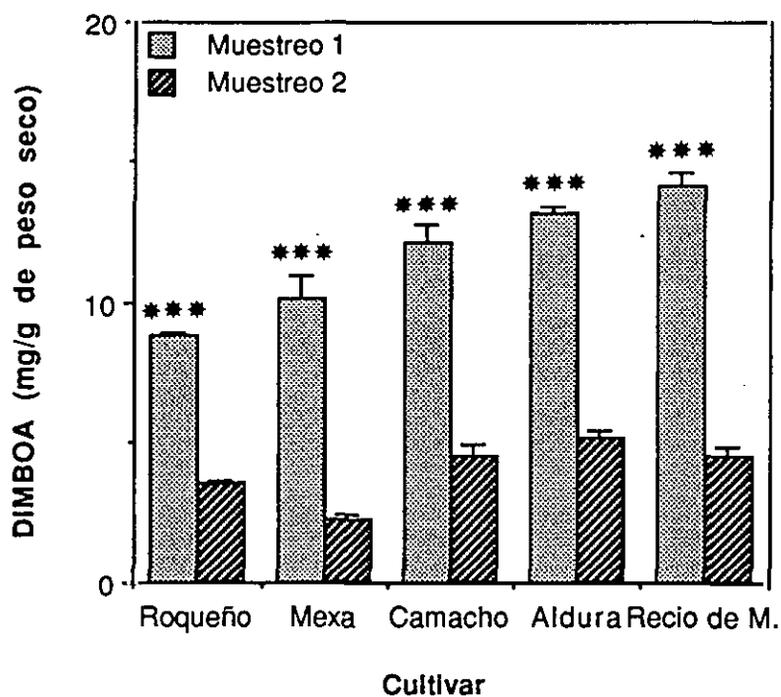
### **III.6.3 Tabla de vida de *D. noxia* en cultivares de trigo duro.**

La supervivencia de los pulgones en el periodo pre-reproductivo fue similar en todos los cultivares estudiados, mientras que la duración de dicho periodo en Recio de Málaga fue significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) a la de Mexa y Camacho, y similar a la de Roqueño y Aldura (Tabla 13).

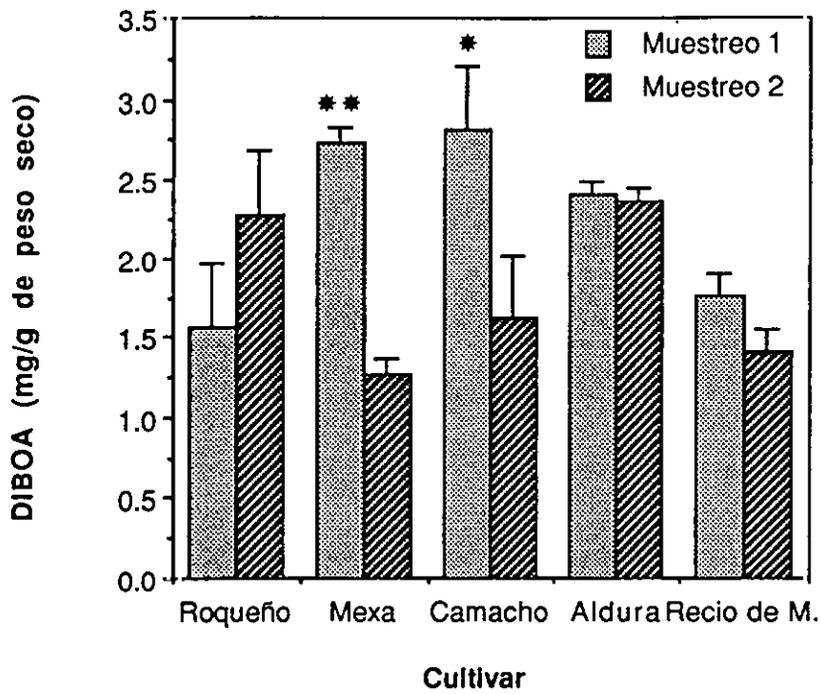
**Tabla 13.** Tabla de vida de *D. noxia* en cinco cultivares de trigo duro con distintas concentraciones de DIMBOA y DIBOA (mg/g peso seco) y sacarosa ( $\mu\text{g/ml}$  de exudado de floema).

	Cultivares				
	Roqueño	Mexa	Camacho	Aldura	Recio de Málaga
DIMBOA	8,86 $\pm$ 0,09 a	10,10 $\pm$ 0,82 a	12,14 $\pm$ 0,66 b	13,17 $\pm$ 0,21 bc	14,13 $\pm$ 0,51 c
DIBOA	1,56 $\pm$ 0,41 a	2,73 $\pm$ 0,09 b	2,81 $\pm$ 0,40 b	2,41 $\pm$ 0,08 ab	1,76 $\pm$ 0,14 a
Sacarosa	11,69 $\pm$ 0,26 ab	10,11 $\pm$ 0,71 ab	9,41 $\pm$ 0,42 a	12,45 $\pm$ 0,59 b	11,51 $\pm$ 0,78 ab
Supervivencia en el periodo pre-reproductivo (%)	94,44	90,54	92,75	93,06	93,06
Duración del periodo pre-reproductivo (días)	7,25 $\pm$ 0,10 ab	7,35 $\pm$ 0,11 a	7,30 $\pm$ 0,11 a	7,10 $\pm$ 0,07 ab	7,00 $\pm$ 0,00 b
$r_m$	0,3214 $\pm$ 0,0042 ab	0,3179 $\pm$ 0,0025 a	0,3120 $\pm$ 0,0035 a	0,3341 $\pm$ 0,0039 b	0,3228 $\pm$ 0,0029 ab
Intervalos de confianza	[0,3125; 0,3301]	[0,3127; 0,3231]	[0,3047; 0,3194]	[0,3260; 0,3423]	[0,3167; 0,3289]
$\lambda$	1,40	1,37	1,37	1,40	1,38
Ro	37,54	37,62	31,49	39,87	34,99
T	12,36	12,39	12,04	12,20	12,09
rc	0,29	0,29	0,29	0,30	0,29

Medias  $\pm$  errores estándar (excepto para valores de  $r_m$ , tasa interna de crecimiento, error calculado mediante Bootstrap, 500 réplicas; y supervivencia en el periodo pre-reproductivo,  $\lambda$ , tasa finita de crecimiento; Ro, tasa reproductiva neta; T, tiempo medio de generación y rc, capacidad de crecimiento). Valores en la misma fila con la misma letra no fueron significativamente distintos ( $p < 0,05$ ; prueba de Duncan; excepto valores de  $r_m$  mediante sus límites de confianza para  $p < 0,05$ ).



**Fig. 23.** Concentración de DIMBOA en los cultivares de trigo duro: Roqueño, Mexa, Camacho, Aldura y Recio de Málaga, en el momento de la insectación y a los 10 días del primer muestreo (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; "t" de student).



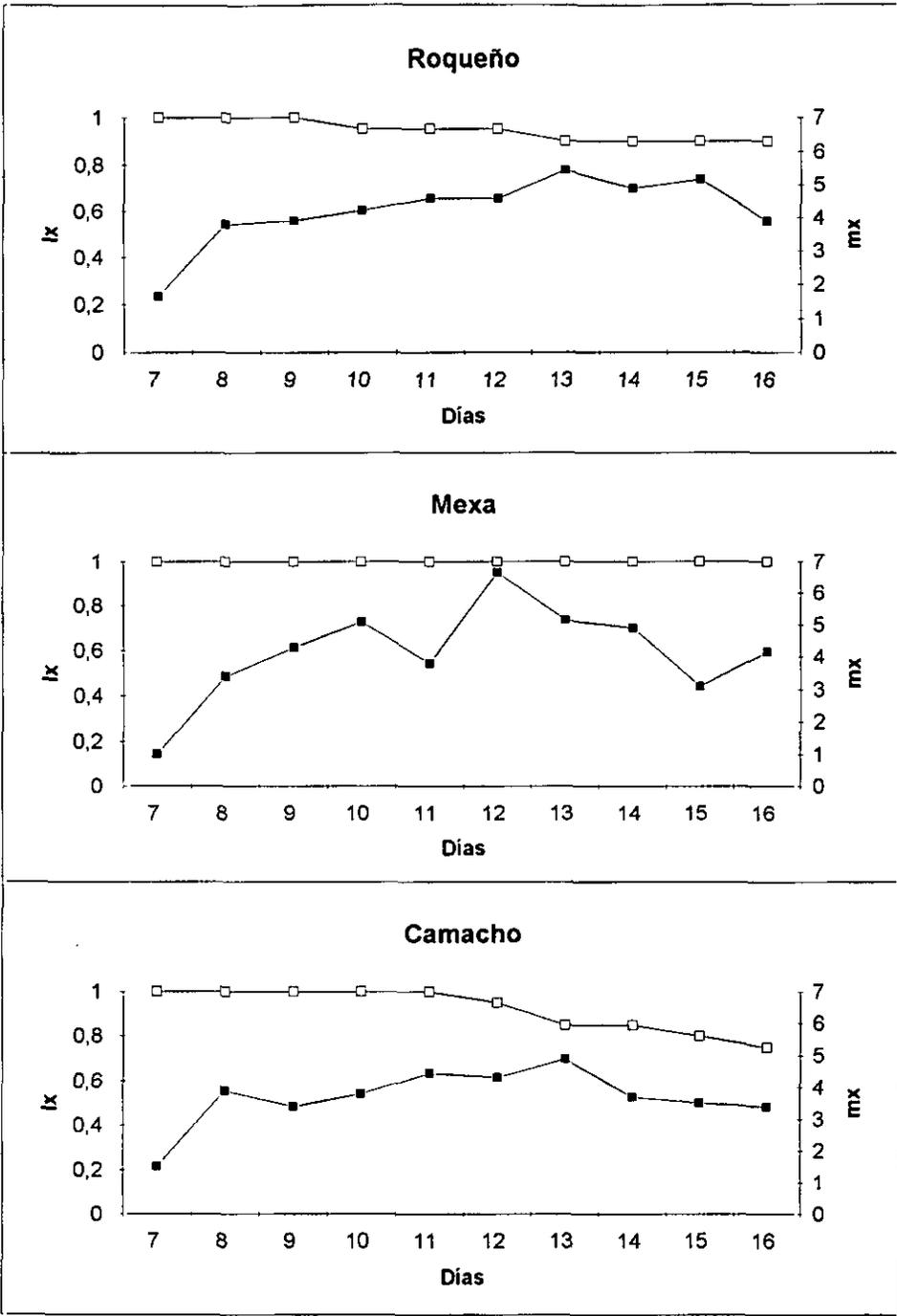
**Fig. 24.** Concentración de DIBOA (mg/g de peso seco) en los cultivares de trigo duro: Roqueño, Mexa, Camacho, Aldura y Recio de Málaga, en el momento de la insectación y a los 10 días del primer muestreo (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; "t" de student).

Todos los pulgones se reprodujeron en cada uno de los cultivares estudiados. Los pulgones alcanzaron la madurez alrededor del día 7 de su nacimiento (Tabla 13). La fecundidad diaria ( $m_x$ ) aumenta rápidamente en los días 6 y 8, en los sucesivos se produce un incremento progresivo de la fecundidad (3-6 ninfas/día) y en general disminuye alrededor de los días 14 y 15. Esta tendencia fue bastante similar en todos los cultivares (Fig. 25).

La curva de supervivencia diaria ( $l_x$ ) más favorable de *D. noxia* se obtuvo en el cultivar Mexa, en el que no murió ninguno de los pulgones iniciales. Roqueño y Aldura tampoco registraron prácticamente ninguna mortalidad y únicamente Camacho y Recio de Málaga mostraron disminuciones en  $l_x$  a partir de los días 11 y 12 respectivamente (Fig. 25).

El mayor valor de la  $r_m$  de *D. noxia* se registró en Aldura (cultivar con alto contenido en DIMBOA); Recio y Roqueño presentaron valores intermedios, mientras que Camacho y Mexa mostraron los menores valores. Sin embargo, solamente la  $r_m$  de Aldura fue significativamente distinta ( $p < 0,05$ ) de las de Mexa y Camacho. Los demás parámetros calculados siguen un patrón similar al descrito para la  $r_m$  (Tabla 13).

No se encontró correlación alguna entre los parámetros de la tabla de vida calculados y la concentración de DIMBOA y DIBOA en los dos muestreos realizados. Por el contrario, si se ha encontrado correlación significativamente positiva entre la concentración de sacarosa y la  $r_m$  ( $y = 0,2550 + 0,0060x$ ;  $r = 0,9223$ ;  $p < 0,05$ ) y  $\lambda$  ( $y = 1,2640 + 0,0109x$ ;  $r = 0,8894$ ;  $p < 0,05$ ) (Fig. 26).



**Fig. 25.** Supervivencia diaria,  $I_x$  (□) y fecundidad diaria,  $m_x$  (■) de *D. noxia* en los cultivares de trigo duro: Roqueño, Mexa, Camacho, Aldura y Recio de Málaga.

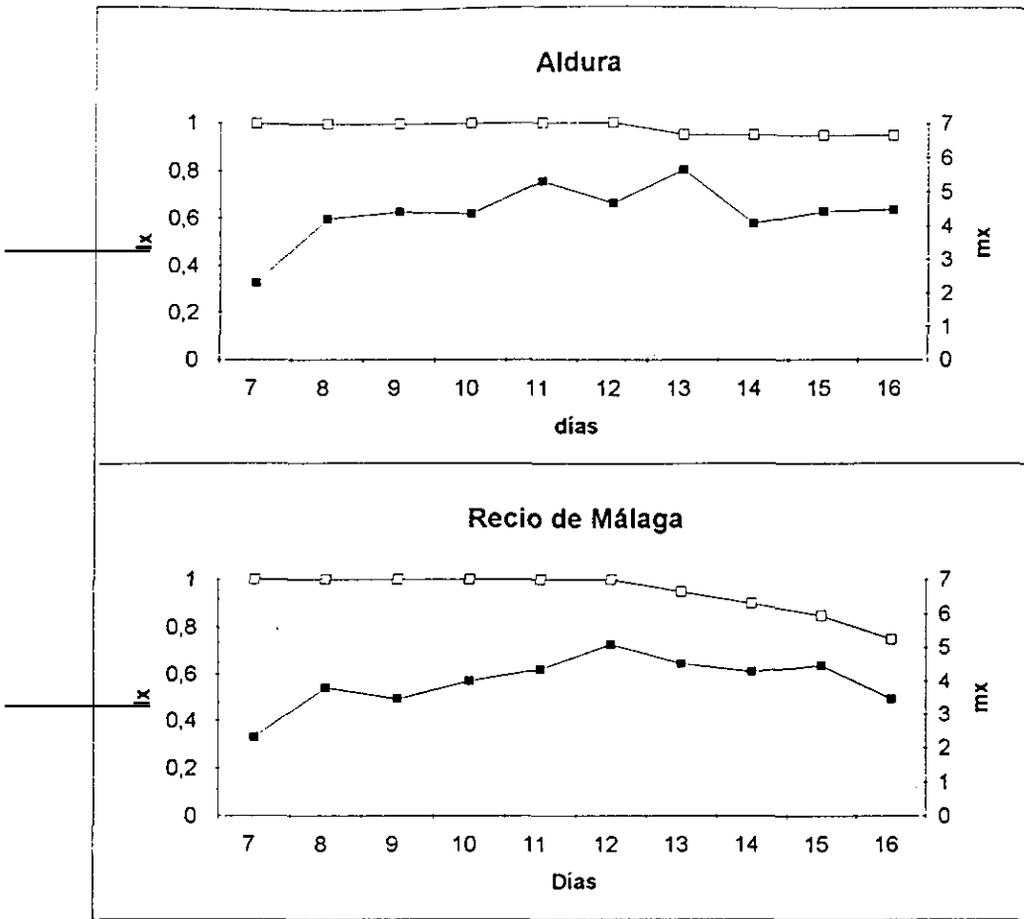
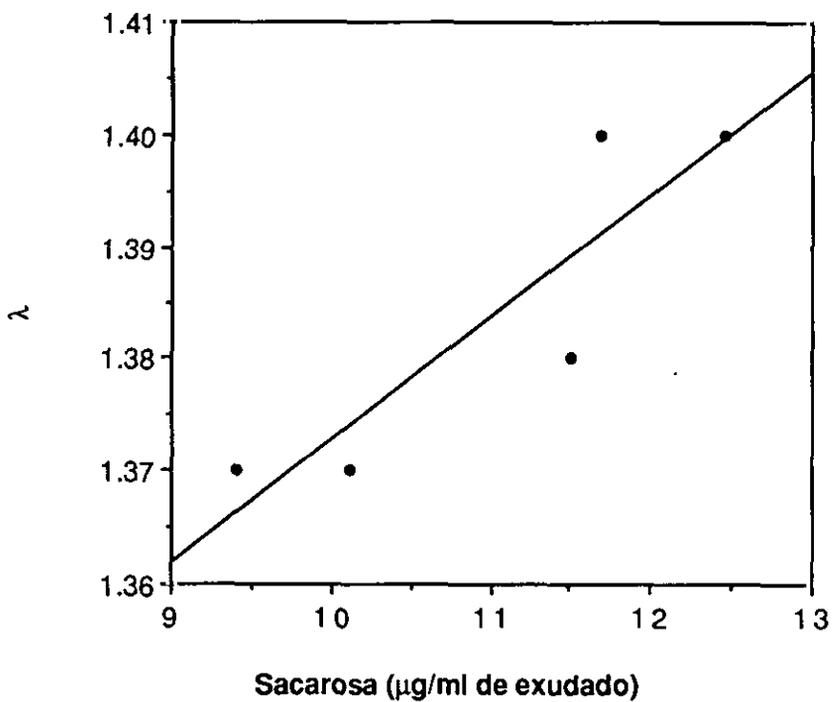
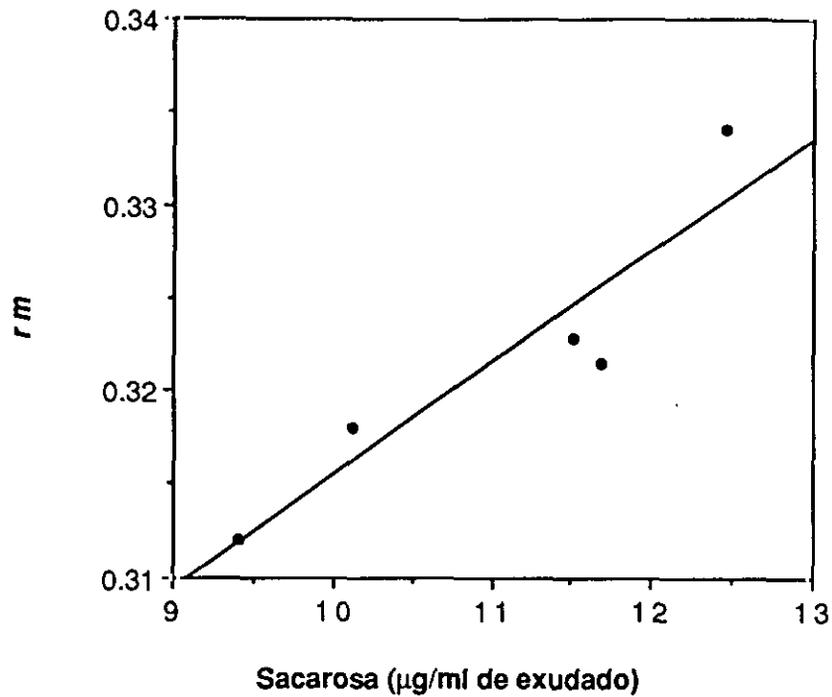


Fig. 25. Continuación.



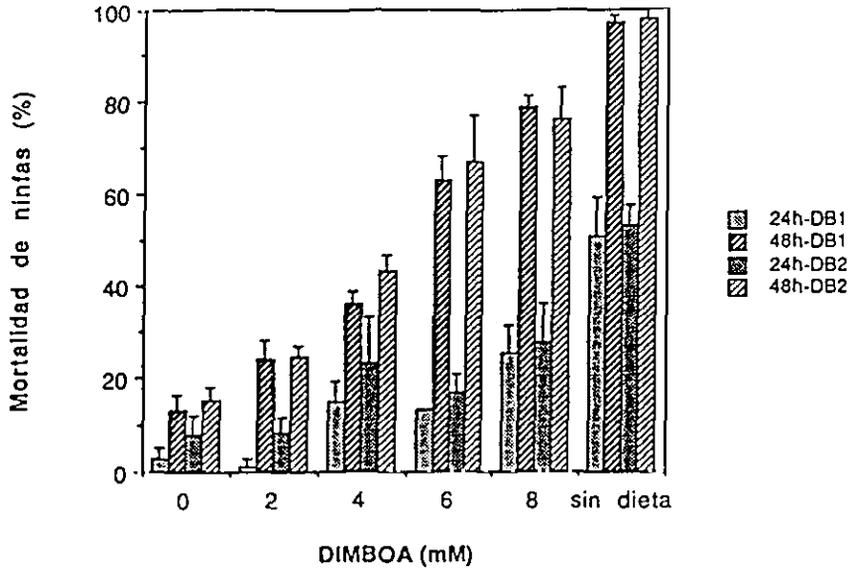
**Fig. 26.** Correlación entre los niveles de sacarosa y las tasas interna ( $r_m$ ) y finita ( $\lambda$ ) de crecimiento de *D. noxia* ( $y = 0,25 + 0,01x$ ;  $r=0,92$ ;  $p<0,05$  para  $r_m$  e  $y=1,26 + 0,01x$ ;  $r=0,89$ ;  $p<0,05$  para  $\lambda$ ) en los cultivares de trigo duro: Roqueño, Mexa, Camacho, Aldura y Recio de Málaga.

### **III.7 Efecto del DIMBOA, suministrado en dieta, sobre ninfas de *D. noxia*.**

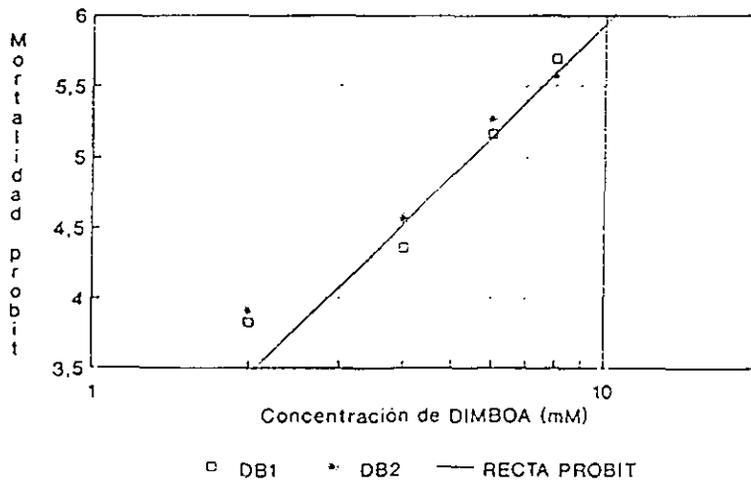
Se realizaron dos bioensayos idénticos en dos fechas distintas, con objeto de determinar la consistencia de los resultados. En la Fig. 27 se muestra la mortalidad de las ninfas, a las 24 y 48 h de tratamiento con dieta de sacarosa al 30%, que presentaba diferentes concentraciones de DIMBOA y sin dieta. Se observa, especialmente a las 48 h de tratamiento, que a medida que aumenta la concentración de DIMBOA en la dieta, disminuye la supervivencia de las ninfas. También puede observarse que la mortalidad del control sin dieta es superior a la del resto de tratamientos, tanto a las 24 como a las 48 h, lo que indica que los individuos se alimentaron de la dieta.

Se calculó la recta de regresión ponderada PROBIT para la mortalidad de las ninfas a las 48 h de tratamiento en los bioensayos DB1 y DB2. El análisis no se calculó para la mortalidad a las 24 h ya que las mortalidades probit fueron muy bajas. En la Tabla 14 se muestran los parámetros de la recta así como los resultados de la prueba del  $\chi^2$  para la calidad del ajuste.

Por otra parte, se llevo a cabo el prueba de igualdad de las dos rectas obtenidas. El valor de la  $\chi^2$  observada (0,94) fue inferior a la  $\chi^2$  teórica para dos grados de libertad ( $p < 0,05$ ), por lo tanto fue cierta la hipótesis nula, es decir, las dos rectas no son significativamente diferentes, y no existen diferencias significativas entre los experimentos DB1 y DB2. La recta probit obtenida tras asumir la hipótesis de igualdad se representa en la Fig. 28. En la Tabla 15 se muestran los parámetros de la ecuación de dicha recta calculada y las DL<sub>10</sub>, DL<sub>50</sub> y DL<sub>90</sub>.



**Fig. 27.** Efecto del DIMBOA incorporado en dieta artificial y de la ausencia de dieta sobre la mortalidad de ninfas de *D. noxia*, a las 24 y 48 h del inicio de los bioensayos DB1 y DB2.



**Fig. 28.** Recta de regresion ponderada probit para la mortalidad de ninfas debido a la aplicacion de DIMBOA en dieta artificial a las 48 h del bioensayo.

**Tabla 14.** Parámetros de la recta de regresión ponderada probit para la mortalidad de ninfas a las 48 de tratamiento en los experimentos DB1 y DB2.

	<b>b ± S.E.</b>	<b>a</b>	<b>Calidad del ajuste</b>		
			<b>χ<sup>2</sup></b>	<b>g. de l.</b>	<b>p</b>
<b>DB1</b>	3,97 ± 1,22	2,03	1,998	2	<0,05
<b>DB2</b>	3,10 ± 0,78	2,79	0,220	2	<0,05

g. de l.= grados de libertad

**Tabla 15.** Recta probit, dosis letales de DIMBOA y sus límites fiduciales ( $p < 0,05$ ) una vez asumida la hipótesis de igualdad de los experimentos DB1 y DB2.

<b>Recta probit</b>	<b>DL<sub>10</sub></b>	<b>DL<sub>50</sub></b>	<b>DL<sub>90</sub></b>
$y = 2,38 + 3,56x$	2,37 [1,56; 2,98]	5,43 [4,84; 6,01]	12,44 [10,20; 17,78]

DISCUSSION

## **IV. DISCUSION.**

### **IV.1. Método de separación y cuantificación de ácidos hidroxámicos por HPLC.**

El nuevo método puesto a punto permite el análisis de extractos acuosos, lo que reduce el tiempo empleado en la preparación de muestras si se compara con otros métodos cuantitativos descritos para GLC (Woodward *et al.*, 1979) y HPLC (Gutiérrez *et al.*, 1982; Lyons *et al.*, 1988, Xie *et al.*, 1991) que requieren la extracción con disolventes orgánicos empleándose, por lo tanto, mucho tiempo en la preparación de las muestras.

El límite mínimo de detección obtenido es de 50 pmol, lo que mejora la sensibilidad de otros métodos publicados en años anteriores por Gutiérrez *et al.* (1982), Lyons *et al.* (1988) y Xie *et al.* (1991). Los porcentajes de recuperación de DIBOA, DIMBOA y MBOA obtenidos (Fig. 13) nos indican la alta precisión de este método en la valoración de estos compuestos en extractos acuosos de plantas y representan una mejora respecto a los descritos previamente por Lyons *et al.* (1988).

Los Hx se encuentran de forma natural en las plantas como glucósidos, no obstante se han cuantificado las agluconas puesto que el aislamiento de los glucósidos implica la inactivación de las enzimas responsables de la formación de las agluconas ( $\beta$ -glucosidasas), antes de su extracción. La preparación de muestras para cuantificar los glucósidos es costosa en el tiempo (Lyons *et al.*, 1988) y por lo tanto no es adecuada para el análisis de gran cantidad de muestras. Por otra parte, la incubación durante 15 min a 25°C es suficiente para

la hidrólisis de los glucósidos (Argandoña *et al.*, 1981), por lo que se ahorra tiempo en la preparación de las muestras.

Como se muestra en la Fig. 12, los compuestos DIBOA, DIMBOA y MBOA fueron detectados en los extractos acuosos procedentes de hojas de plántulas de maíz y de plántulas de otras especies de cereales excepto en cebada. La presencia de MBOA en las muestras indica que la descomposición del DIMBOA tiene lugar durante el proceso de extracción. Este hecho pone en evidencia la importancia de detectar el MBOA para obtener una valoración precisa de la concentración de DIMBOA. En este punto es donde otros métodos previamente descritos (Niemeyer *et al.*, 1989a; Xie *et al.*, 1991) presentan ciertas deficiencias, ya que estos autores detectan los compuestos a 263 y 265 nm, respectivamente, y a estas longitudes de onda el DIMBOA presenta un máximo de absorbancia mientras que el MBOA presenta un mínimo. Por lo tanto, los niveles de MBOA serían subestimados y, como consecuencia de ello, la concentración de DIMBOA. El método desarrollado detecta los compuestos a 288 nm, a esta longitud de onda tanto el DIMBOA, MBOA, como el DIBOA presentan un máximo de absorción en el UV (Gutiérrez *et al.*, 1988).

La valoración del MBOA es de gran importancia, ya que los niveles de DIMBOA disminuyeron al incubar extractos acuosos de trigo blando (Cv. Chinese spring) a 70°C durante 5 min en un 45 % y cuando la incubación fue de 10 min el compuesto se degradó en un 65 %, por lo que es necesario cuantificar este compuesto para conocer la concentración total de DIMBOA. Sin embargo, la cuantificación del BOA, producto de degradación del DIBOA no fue necesaria debido a que tras 10 min de incubación a 70°C tan sólo se

degradó un 3 % del compuesto, lo que nos indica la gran estabilidad del mismo. Dado que el DIBOA es más estable que el DIMBOA (Lyons *et al.*, 1988), y no se detectó degradación de DIBOA en las condiciones de extracción de las muestras, se consideró innecesaria la cuantificación del BOA.

En definitiva, el método permite una fácil y rápida preparación de muestras, evitando así el empleo de disolventes orgánicos en la extracción. Además consigue una buena resolución de los tres compuestos analizados, un incremento en la sensibilidad y en la exactitud de la valoración de los mismos en cereales de invierno y otras gramíneas que presentan menores concentraciones que el maíz.

## **IV.2 Cuantificación de las concentraciones de Hx en genotipos de cinco especies de cereales de invierno.**

### **IV.2.1 Cultivares de trigo blando.**

Se ha observado una gran variación entre las concentraciones de DIMBOA que presentan los cultivares estudiados (Tabla 2). Los niveles de DIMBOA fueron superiores a los de DIBOA en todos los cultivares analizados, lo que concuerda con lo descrito por Niemeyer (1988b). Los niveles de ambos compuestos se encuadran dentro del rango de los determinados por Copaja *et al.* (1991a) en trigos chilenos, así como los observados por Nicol *et al.* (1992) en trigos procedentes de colecciones de todo el mundo y por Escobar y Niemeyer (1993) en trigos de origen sueco.

Entre los cultivares de alta concentración de DIMBOA (9,00-11,00 mg/g de peso seco) hemos seleccionado Chinese spring, por ser un cultivar ampliamente utilizado, y Yécora, de origen mexicano e

igualmente muy productivo y con buen nivel de resistencia a varias enfermedades. De los cultivares con niveles intermedios de DIMBOA (7,00-8,90 mg/g de peso seco) se ha incluido el ABE por su sensibilidad al BYDV (Fereres *et al.*, 1990b). Por último, de los cultivares con niveles bajos de DIMBOA (5,00-6,90 mg/g de peso seco) se han seleccionado Astral, un cultivar de origen francés, de buena capacidad productiva y calidad harino-panadera, resistente al oídio y poco sensible a *Septoria* y *Cercospora*; y Aragón 03, un trigo de origen español, actualmente menos empleado por su baja capacidad productiva.

#### **IV.2.2 Cultivares de trigo duro.**

Los cultivares de trigo duro analizados presentaron en general niveles de DIMBOA más elevados que los de trigo blando (Tablas 2 y 3), por lo que la categorización empleada es distinta. Entre los cultivares de alto contenido en DIMBOA hemos seleccionado Aldura y Recio de Málaga.

Entre los cultivares con niveles intermedios de DIMBOA (12,90-14,90 mg/g de peso seco) destaca Camacho, cultivar de origen español muy empleado en nuestro país. Es un cultivar altamente productivo y con un buen comportamiento frente a enfermedades. De los cultivares con bajas concentraciones de DIMBOA (10,00-12,90 mg/g de peso seco) hemos elegido Mexa y Roqueño, este último de origen español, presenta un alto rendimiento así como un buen comportamiento frente a enfermedades.

Las concentraciones de DIMBOA presentes en los cultivares estudiados se encuentran dentro del rango de los niveles encontrados

en trigos chilenos y de varios países del mundo por Copaja *et al.* (1991a) y Nicol *et al.* (1992), respectivamente.

Las concentraciones de DIBOA presentes en los cultivares trigo duro fueron similares a las de los cultivares de trigo blando analizados (Tablas 2 y 3).

#### **IV.2.3 Cultivares de triticale.**

Los cultivares de triticale presentaron elevadas concentraciones de DIMBOA (Tabla 4), superiores en muchos casos a los de trigo blando y trigo duro estudiados (Tablas 2 y 3). Sin embargo, las concentraciones de DIBOA (Tabla 4) fueron similares a las de los cultivares de las dos especies antes mencionadas (Tablas 2 y 3). De ellos, hemos seleccionado Torote y Tajuña por sus buenas características productivas y por ser obtenciones españolas.

#### **IV.2.4 Cultivares de centeno.**

En los cultivares de centeno el DIBOA se encuentra en mayor concentración que el DIMBOA (Tabla 5), al contrario de lo que ocurre en los cultivares de trigo blando, trigo duro y triticale analizados. Sin embargo, Copaja *et al.* (1991b) no detectaron DIMBOA en especies silvestres de centeno. En el caso de Petkus los niveles de DIBOA fueron 7 veces mayores que algunos cultivares de trigo blando (Tablas 2 y 5). De los dos cultivares seleccionados destaca Petkus, un cultivar de origen alemán, que se cultiva en nuestro país y produce un gran rendimiento.

#### **IV.2.5 Cultivares de cebada.**

En ninguno de los cultivares de cebada analizados se detectó DIMBOA ni DIBOA. La ausencia de Hx en especies del género *Hordeum* ya había sido descrita anteriormente (Hamilton, 1964; Tang *et al.*, 1975; Argandoña *et al.*, 1980), no obstante, Barria *et al.* (1992) encontraron DIBOA en plántulas de *Hordeum* silvestres, aunque no lo detectaron en *H. vulgare*. En estudios posteriores se ha incluido el cultivar Albacete, por ser una cebada de invierno de origen español y de las más cultivadas en nuestro país.

#### **IV.3 Comportamiento de alimentación de *D. noxia* en genotipos de cinco especies de cereales de invierno con distintos niveles de Hx.**

Las señales obtenidas en el registro del comportamiento de alimentación de *D. noxia* en los distintos cultivares estudiados fueron idénticas a las que se han descrito para otras especies de pulgones empleando el sistema de corriente continua (Tjallingii, 1990a; Helden y Tjallingii, 1993; Prado y Tjallingii, 1994).

Los resultados obtenidos indican que existe una correlación entre los niveles de DIMBOA y tres parámetros importantes de EPG (Fig. 14). A medida que se incrementaron los niveles de DIMBOA, *D. noxia* presentó mayor tiempo total de no penetración (np), especialmente antes de la fase floemática, un menor porcentaje de pulgones aceptaron el floema y se produce un retraso en el acceso al mismo (Tablas 6 y 7). Dichos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Kindler *et al.* (1992), quienes observaron que *D. noxia*

presentaba mayores tiempos totales de "np" en trigos resistentes a esta especie.

El retraso que hemos observado en el acceso al floema fue de 1 hora aproximadamente en aquellos cultivares con concentraciones de DIMBOA superiores a 8,5 mg/g de peso seco (Tabla 7). Del mismo modo, Givovich y Niemeyer (1991) observaron un retraso en el acceso al floema cuando las plantas de trigo presentaban concentraciones crecientes de DIMBOA. Campbell *et al.* (1982) y Morgham *et al.* (1992) observaron que *S. graminum* accedía más tarde al floema en plantas de sorgo y de trigo resistentes, respectivamente. En otros estudios del comportamiento de alimentación de especies de pulgones cuyas plantas huésped no son los cereales se ha descrito la misma tendencia. Por ejemplo, en plantas de lechuga resistentes los pulgones emplearon más tiempo en aceptar el floema y presentaron mayores periodos de "np" que en plantas sensibles (Cole *et al.*, 1993; Helden y Tjallingii, 1993).

No hemos encontrado ninguna correlación entre los niveles de DIMBOA y el tiempo total en fase de floema y de ingestión de floema (Tabla 6). Givovich y Niemeyer (1991) observaron igualmente que el tiempo total de ingestión de floema de *R. padi* no varió significativamente con los niveles de dicho compuesto.

De acuerdo a lo expuesto en la Tabla 1, los valores de los parámetros calculados: tiempo de "np" previo a la fase de floema y tiempo previo a la fase de floema desde que comienza el experimento sugieren que factores localizados a nivel del mesófilo y de los tejidos vasculares pueden ser responsables del comportamiento de alimentación observado en *D. noxia*. Se descarta un origen floemático de dicho comportamiento debido a que el tiempo previo a la ingestión

de floema ( $E2 > 8$  min) presentó valores bastante similares en la mayoría de los cultivares estudiados y además, no se detectó DIMBOA y solamente trazas de DIBOA en los exudados de floema (Tabla 8). Recientemente, Givovich *et al.* (1994) han informado de la presencia del glucósido de DIMBOA en el floema de plantas de trigo. Si el DIMBOA se localiza en las células del mesófilo es posible que actúe como deterrente, ello explicaría que en cultivares con elevados niveles de este compuesto los pulgones presenten mayores tiempos totales de "np" durante las 8 h que dura el experimento y antes de la fase de floema, y que un menor porcentaje de pulgones se alimente del floema (Tablas 6 y 7).

Algunos de los resultados obtenidos en el presente trabajo no pueden interpretarse teniendo en cuenta exclusivamente los niveles de DIMBOA en los cultivares analizados. Por ejemplo, el contenido en DIMBOA en Chinese spring fue similar al de Roqueño, sin embargo los pulgones presentaron significativamente menor tiempo de "np" previo a la fase de floema (Tabla 7) y el tiempo total de ingestión fue algo mayor en Roqueño (Tabla 6). Por lo tanto, las diferencias de comportamiento observadas en los cultivares de distintas especies, que presentan similares niveles de DIMBOA, sugieren que otros factores de tipo físico y/o químico estarían implicados en el diferente comportamiento de *D. noxia*.

En los cultivares de centeno (Petkus y Elbon) la situación es compleja, debido a que ambos presentan mayores niveles de DIBOA que los demás cultivares analizados (Tabla 6). Se ha descrito que el DIBOA presenta un efecto tóxico frente *S. graminum* y *R. padi* cuando se incorpora a la dieta artificial (Zúñiga *et al.*, 1983; Barria *et al.*, 1992). Del mismo modo, se ha encontrado una correlación negativa

entre la concentración de DIBOA en especies silvestres del género *Hordeum* y la fecundidad de *R. padi* (Barria *et al.*, 1992). Aunque en Petkus las concentraciones de DIMBOA y DIBOA fueron significativamente más altas que en Elbon, el porcentaje de pulgones que aceptaron el floema fue similar en ambos cultivares. El tiempo total de "np" y el tiempo de "np" previo a la fase de floema fueron mayores, aunque no significativamente distintos, en Petkus que en Elbon (Tablas 6 y 7).

El comportamiento de alimentación de *D. noxia* en la cebada Albacete, que carece de DIMBOA y DIBOA, fue similar al observado en cultivares con bajos niveles de DIMBOA (Tablas 6 y 7), ya que el tiempo total de "np" fue inferior al que presentaron los pulgones con elevada concentración de DIMBOA (Tabla 6) y los pulgones emplearon mucho tiempo en acceder y alimentarse del floema. El retraso en el acceso al floema en cebada ya había sido descrito previamente (Tjallingii y Mayoral, 1992). Estos resultados sugieren que los factores que dificultan el acceso al floema en la cebada se localizan en la epidermis o el mesófilo de la planta, ya que una vez que los pulgones aceptan el floema se alimentan ininterrumpidamente. Se han descrito varios factores de resistencia a pulgones en cebada, como las ceras, la pectina y la gramina (Corcuera, 1993). *S. graminum* presentó un comportamiento similar al de *D. noxia* en plantas de sorgo con elevadas concentraciones de pectina (Dreyer *et al.*, 1984). Por otra parte, también se ha observado en *S. graminum* y *R. padi* un retraso en la ingestión de floema en plántulas de cebada con alto contenido en gramina (Zúñiga *et al.*, 1988).

En definitiva, las correlaciones obtenidas (Fig. 14) sugieren que el DIMBOA es uno de los componentes de las complejas barreras químicas que, junto con otras de tipo físico, constituyen las barreras de defensa a *D. noxia*. Aunque, por otra parte, sería necesario realizar investigaciones con un material vegetal más homogéneo (p. ej. líneas isogénicas) para poder establecer de forma más precisa el papel del DIMBOA en las complejas interacciones que regulan los mecanismos de resistencia de cereales a pulgones.

#### **IV.4 Efecto del DIMBOA y DIBOA sobre los parámetros poblacionales de la tabla de vida de *D. noxia* en cultivares de cinco especies de cereales de invierno con distintos niveles de Hx.**

La tasa interna de crecimiento  $r_m$  es un parámetro comúnmente utilizado en estudios ecológicos y genéticos, así como en los de resistencia de plantas a insectos para categorizar, en base a la  $r_m$ , el grado de resistencia de cada genotipo.

La computerización de la  $r_m$  con los errores Jackknife o Bootstrap junto con el análisis de sus componentes individuales pueden ser de gran utilidad en estudios de resistencia y de mayor precisión que estudiar la correlaciones de parámetros tales como el peso de adultos y el número de embriones (Birch y Wratten, 1984). En general, se consideran como plantas menos adecuadas (resistentes) para el crecimiento y reproducción de aquellas en las que las pulgones tienen una  $r_m$  más baja en relación a otros genotipos.

La tabla de vida de *D. noxia* se ha obtenido con los mismos genotipos utilizados para los estudios del comportamiento de

alimentación de este pulgón, con objeto de obtener un mejor conocimiento de los mecanismos de resistencia que pueden estar implicados en la interacción *D. noxia*-cereal.

Los cultivares de centeno Petkus y Elbon fueron los más resistentes a *D. noxia*, ya que ninguno de los pulgones pudo alcanzar la fase reproductiva. Dichos cultivares no presentaron las mayores concentraciones de DIMBOA, aunque la concentración de DIBOA fue significativamente más elevada que en el resto de cultivares. Sin embargo, no hemos podido establecer ninguna correlación entre los niveles de DIBOA presentes en los otros cultivares y los parámetros poblacionales de *D. noxia*.

El trigo blando Chinese spring, de alto contenido en DIMBOA, y la cebada Albacete, sin DIMBOA, fueron los cultivares más sensibles a *D. noxia*, ya que en ambos la supervivencia en el periodo pre-reproductivo fue muy elevada y la duración de dicho periodo fue corta, y en ambos cultivares *D. noxia* presentó los valores significativamente ( $p < 0,05$ ) mayores de las tasas interna ( $r_m$ ) y finita ( $\lambda$ ) de crecimiento (Tabla 9).

Sin embargo, en ABE y Roqueño los parámetros poblacionales de *D. noxia* fueron semejantes y más desfavorables que en Chinese spring y Albacete, ya que la  $r_m$  fue significativamente inferior, así como los valores de  $\lambda$  fueron menores que los obtenidos en los cultivares anteriores. De nuevo, los niveles de DIMBOA no están ligados a estos dos parámetros poblacionales puesto que fueron el doble en Roqueño que en ABE (Tabla 9).

En el trigo duro Camacho, la supervivencia en el periodo pre-reproductivo fue inferior a la de los cultivares mencionados y tanto la  $r_m$  como la  $\lambda$  fueron de carácter intermedio (Tabla 9) y no todos los

pulgones se reprodujeron (Fig. 17), lo que indicaría que este cultivar tiene un grado de resistencia intermedio a *D. noxia*. Aunque, la concentración de DIMBOA en Camacho es, junto con Tajuña, significativamente más alta que en el resto de cultivares.

Por último, los triticales Torote y Tajuña fueron los que presentaban la mayor resistencia a *D. noxia*, debido a que la supervivencia en el periodo pre-reproductivo fue muy baja y la duración de dicho periodo fue significativamente mayor a las del resto de cultivares estudiados. Además, el porcentaje de pulgones que pasaron al periodo reproductivo fue muy bajo y con los menores valores de  $r_m$  y  $\lambda$  (Tabla 9). Es importante señalar que el periodo reproductivo fue muy corto en ambos cultivares y los pulgones murieron a los 13 y 16 días en Torote y Tajuña, respectivamente (Fig. 18). En ambos cultivares las concentraciones de DIMBOA fueron muy altas (Tabla 9), aunque, como se ha mencionado, no se ha obtenido una implicación directa de los niveles de DIMBOA y/o DIBOA sobre los parámetros poblacionales considerados.

Nuestros resultados indican que el orden de susceptibilidad de los cereales de invierno a *D. noxia* fue: cebada, trigos blandos, trigos duros, triticales y centenos. Estos resultados concuerdan con los de Jones *et al.* (1989) y Kindler y Springer (1989) quienes han informado que el centeno es mucho menos susceptible a *D. noxia* que los trigos, la cebada y el triticales, aunque datos anteriores no especifican los mecanismos de resistencia implicados.

La comparación de poblaciones mediante los valores de la tasa reproductiva neta ( $R_0$ ) no son correctas a menos que coincidan los valores de la duración media de una generación ( $T$ ) (Birch, 1948).

Puesto que en nuestro caso los valores de T fueron distintos, no se ha considerado la Ro. (Tabla 9).

En resumen, la comparación de cultivares dentro de cada especie sugiere, en algunos casos, que el DIMBOA podría ejercer un efecto negativo sobre la biología de *D. noxia*. Esta tendencia, sin embargo no es consistente cuando comparamos conjuntamente los cultivares de las cinco especies utilizadas.

#### **IV.5 Efecto del DIMBOA y DIBOA sobre los parámetros poblacionales de la tabla de vida de *D. noxia* en cultivares de trigos blandos y duros con distintos niveles de Hx.**

La utilización de cultivares de trigo blando y trigo duro con distintos niveles de Hx en el momento de la insectación permite reducir la variabilidad detectada anteriormente con genotipos de especies muy distintas y, por consiguiente, precisar el papel de los Hx en la resistencia de cereales a *D. noxia*.

En todos los cultivares las plántulas correspondientes al segundo muestreo (16 días de edad) presentaron concentraciones de DIMBOA significativamente menores que en el primer muestreo (Fig. 19). Análogamente, los cultivares de trigo duro mostraron diferencias significativas en el contenido en DIMBOA en el primer muestreo. Al igual que ocurrió en los cultivares de trigo blando, se observó una clara disminución en los niveles de DIMBOA en el segundo muestreo, que se redujeron a alrededor de un 20 % de la concentración que presentaron las plántulas en el primer muestreo (Fig. 23). La disminución de los niveles de DIMBOA a medida que aumenta la edad de la planta corresponde con la descrita por

Argandoña *et al.* (1980), Thackray *et al.* (1990) y Richardson y Bacon (1993). Por el contrario, la concentración de DIBOA que presentaron las plántulas de trigo blando fue similar en los dos muestreos efectuados (Fig. 20). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Zúñiga *et al.* (1983) quienes no observaron variaciones significativas en la concentración de DIBOA en plántulas de trigo duro, desde la germinación a los 10 días de edad. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales si hubo variaciones en el contenido de DIBOA de los cultivares Mexa y Camacho sin que haya una explicación clara de dicha disminución (Fig. 24). Los valores de la  $r_m$  de *D. noxia* (0,241- 0,310), sobre trigos blandos, calculados mediante la técnica de Bootstrap (Taberner *et al.*, 1993) y en base a los valores obtenidos durante los diez primeros días del periodo reproductivo, están dentro del rango de los obtenidos por Girma *et al.* (1990) para *D. noxia* en unas condiciones ambientales semejantes, lo que indica que tanto la forma de cálculo como el tiempo de observación (10 días) resultan adecuados para determinar los parámetros poblacionales de la tabla de vida de este pulgón.

Algunos de los parámetros obtenidos, como la tasa reproductiva neta ( $R_0$ ) y la duración media de una generación ( $T$ ) tienen una significación escasa en poblaciones como las de pulgones de incremento rápido. Igualmente, la capacidad de incremento de la población ( $r_c$ ), que es un parámetro útil para insectos con generaciones diferenciadas, pierde relevancia para pulgones puesto que atribuye el mismo peso específico a las fases reproductivas iniciales y finales (Wyatt y White, 1977). Por ello, aunque el programa informático empleado calcula dichos parámetros (Tablas 9,12 y 13) no nos referiremos a ellos por su dificultad de interpretación.

Los cultivares Chinese spring (alto contenido en DIMBOA) y Aragón 03 (bajo contenido en DIMBOA) muestran unos periodos pre-reproductivos cortos y los valores de las tasas interna ( $r_m$ ) y finita ( $\lambda$ ) de crecimiento no fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) distintos entre sí (Tabla 12). Además, las curvas de fecundidad media diaria ( $m_x$ ) y de supervivencia diaria ( $l_x$ ) siguen una tendencia muy semejante y con unos valores más altos que el resto de los cultivares (Fig. 21). Por tanto, el desarrollo de *D. noxia* sobre ambos cultivares es el más favorable para este pulgón, lo que sugiere que son más susceptibles que los demás cultivares, a pesar de que ambos presentan los valores extremos de los niveles de DIMBOA ensayados (Tabla 12).

En los cultivares ABE, Astral y Yécora, tanto las curvas de  $m_x$  y de  $l_x$  (Fig. 21) como los parámetros poblacionales:  $r_m$  y  $\lambda$  fueron inferiores a los del resto de cultivares estudiados. Estos resultados indican que ABE, Astral y Yécora fueron los cultivares menos susceptibles a *D. noxia*, especialmente ABE, en el que la supervivencia en el periodo pre-reproductivo fue inferior a la que presentaron los pulgones en el resto de cultivares estudiados. De nuevo, los cultivares ABE, Astral y Yécora parecen tener una susceptibilidad semejante a *D. noxia*, aunque presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en cuanto al contenido en DIMBOA y DIBOA (Tabla 12).

De los cultivares de trigo duro estudiados Aldura fue el más sensible a *D. noxia*, ya que presentó valores de  $l_x$  y  $m_x$  elevados (Fig. 25) y un corto periodo pre-reproductivo. Además, *D. noxia* presentó en este cultivar los mayores valores de la tasa interna de crecimiento ( $r_m$ ) (Tabla 13). Sin embargo, los niveles de DIMBOA en este cultivar fueron de carácter intermedio.

En los cultivares Camacho, Recio de Málaga, Roqueño y Mexa *D. noxia* presentó un comportamiento similar. Los valores de  $r_m$  y  $\lambda$  fueron intermedios (Tabla 13). Los resultados obtenidos indican que estos cultivares fueron ligeramente menos susceptibles a *D. noxia* que Aldura. A pesar de que los cultivares Camacho, Recio de Málaga, Roqueño y Mexa mostraron una sensibilidad similar a *D. noxia*, se observó una gran variabilidad en cuanto a su contenido en Hx, especialmente en DIMBOA (Tabla 13).

Todos los valores de las tasas interna ( $r_m$ ) y finita ( $\lambda$ ) de crecimiento obtenidos para *D. noxia* sobre los trigos duros son más elevados que sobre trigos blandos, a pesar de tener unos niveles de DIMBOA mucho mayores que los registrados para los trigos blandos, lo que indica que los trigos duros son mejores huéspedes que los blandos para este pulgón.

Los datos anteriores sugieren que no existe relación entre la concentración de DIMBOA y DIBOA y los parámetros poblacionales calculados, ya que cultivares con bajas concentraciones de dichos metabolitos se comportan como resistentes (valores de  $r_m$  y  $\lambda$  bajos), a *D. noxia*, mientras que cultivares sensibles (valores de  $r_m$  y  $\lambda$  altos) a dicha especie de pulgón presentan concentraciones de DIMBOA altas. De hecho, no se ha detectado ninguna correlación entre los niveles de estos compuestos en las plántulas de trigo y ninguno de los parámetros poblacionales obtenidos. Del mismo modo, Kazemi y Emden (1992) no encontraron ninguna correlación entre los niveles de Hx presentes en cinco cultivares de trigo y la fecundidad de *R. padi* en distintos estados fenológicos de la planta. Los experimentos realizados en el presente trabajo se iniciaron en el estadio 11 de la escala de Zadoks, y aunque se ha descrito que el peso de los adultos,

el tiempo de desarrollo y la fecundidad varían con el estado de desarrollo de la planta (Leather y Dixon, 1981; Watt, 1979), otros autores (Spiller y Llewelyn, 1986) sugieren que el empleo de plántulas permite obtener resultados comparables a los de plantas adultas para detectar resistencia a pulgones.

Por el contrario, Bohidar *et al.* (1986) encontraron una correlación negativa entre los niveles de Hx presentes en seis cultivares de trigo y la  $r_m$  de *S. avenae*. En sus estudios emplearon plántulas en el estadio 12 de la escala de Zadoks. También Leszczynski *et al.* (1989) observaron una correlación negativa entre la  $r_m$  de *S. avenae* y los niveles de Hx en plantas de *T. aestivum*. Cuando se estudiaron conjuntamente cultivares de varias especies del género *Triticum* se observó que el contenido total de Hx en las plantas analizadas explicaba en una proporción significativa la variación de la  $r_m$  de *S. avenae* (Thackray *et al.*, 1990). Sin embargo, cabe señalar que en los trabajos de Bohidar *et al.* (1986), Leszczynski *et al.* (1989), Thackray *et al.* (1990) y de Kazemi y Emden (1992) se empleó el método colorimétrico del  $\text{FeCl}_3$  (Long *et al.*, 1974) para determinar el contenido en DIMBOA de los cultivares analizados. Dicho método es muy inespecífico, ya que valora el contenido total de Hx presentes en los extractos de las plantas y no la concentración real de DIMBOA, que es el compuesto que parece tener algún efecto sobre pulgones de cereales.

Otros autores han observado fenómenos similares en plantas de maíz a los descritos anteriormente para cultivares de trigo. Así, Long *et al.* (1977) encontraron una correlación negativa entre los niveles de DIMBOA en líneas de maíz y el número de *R. maidis* que infestaban las plantas, sin embargo, no todas las líneas de maíz que emplearon

en sus estudio seguían esa tendencia, ya que uno de los cultivares (Oh45) presentó bajos niveles de DIMBOA y mostraba así mismo una pequeña población de pulgones. Estos resultados sugieren que en ese cultivar otros factores fueron los responsables de la resistencia a *R. maidis*. Beck *et al.* (1983) observaron igualmente que existía una correlación negativa entre la concentración de DIMBOA y los niveles de pulgones que soportaban las plantas. A pesar de que en la mayoría de las líneas estudiadas tenía lugar este fenómeno la línea A632 que presentó bajos niveles de DIMBOA fue altamente resistente a esta especie, lo que sugiere también que otros factores estarían implicados en la resistencia a *R. maidis*. Sin embargo, otros autores (Bing *et al.*, 1990) no detectaron ninguna relación entre la concentración de DIMBOA y el número de *R. maidis* que colonizaban las plantas de maíz. Estos autores observaron que la línea 41:2504B, de alto contenido en DIMBOA, presentaba un elevado nivel de infestación; mientras que la línea C103, de bajo contenido en DIMBOA, presentaba un pequeño número de pulgones, por lo que sugirieron que el DIMBOA no era el factor implicado en la resistencia del maíz a *R. maidis*.

Es importante señalar que en ninguno de estos trabajos mencionados en los párrafos anteriores se ha valorado el contenido real de DIMBOA de las plantas estudiadas, mientras que en el presente estudio se ha empleado un método de valoración de DIMBOA y DIBOA específico y sensible, que permite conocer con rapidez y exactitud los niveles de dichos compuestos en las plantas analizadas.

En definitiva, los resultados obtenidos indican que ni el DIMBOA ni el DIBOA tienen un efecto negativo sobre aquellos

parámetros poblacionales de *D. noxia* que están ligados a la resistencia a dicho pulgón de los cultivares estudiados. Aunque, hemos encontrado que a partir de un cierto umbral (8,5 mg/g de peso seco) el DIMBOA ejercía una acción repelente sobre *D. noxia*, pero una vez que los pulgones alcanzaban el floema se alimentaban de forma similar, independientemente de los niveles de DIMBOA en la planta, lo que concuerda con los resultados anteriores. Por tanto, otros mecanismos de defensa de tipo físico y/o químico deben estar implicados en la resistencia de cereales a este pulgón.

Por otra parte, los metabolitos secundarios junto con los factores nutritivos de la planta pueden jugar un papel importante en la resistencia a plagas (Pickett *et al.*, 1992). En este sentido, se ha descrito que la sacarosa es uno de los requerimientos necesarios para la cría de pulgones en dieta artificial y actúa como estimulante de la alimentación (Srisvastava, 1987). Además, Niraz *et al.* (1985) encontraron una correlación positiva entre la concentración de sacarosa en las hojas de trigo blando y la susceptibilidad a *S. avenae* y *R. padi*.

En nuestras condiciones, hemos encontrado una correlación significativamente positiva entre los niveles de sacarosa y los parámetros de la tabla de vida:  $r_m$  y  $\lambda$  en los cultivares de trigo blando y trigo duro analizados, lo que sugiere que los cultivares que contengan unos niveles bajos de sacarosa en el floema son menos susceptibles a *D. noxia*. Es conocido que los nutrientes disponibles en el floema, así como otros metabolitos presentes podrían contribuir a enmascarar la acción deterrente del DIMBOA. Por tanto, los niveles de sacarosa en el floema juegan un papel inesperadamente importante en la interacción de las plántulas de cereales con *D. noxia*.

#### **IV.6 Efecto del DIMBOA, suministrado en dieta artificial, sobre ninfas de *D. noxia*.**

Los resultados obtenidos indican que a medida que se incrementa la concentración de DIMBOA en la dieta artificial aumenta la mortalidad de las ninfas, siendo próxima a un 80% para la mayor concentración de DIMBOA aplicada (Fig. 27). Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Argandoña *et al.* (1980) con *M. dirhodum* cuando incorporaron entre 0-12 mM de DIMBOA en la dieta artificial, así como los obtenidos por Corcuera *et al.* (1982) para *M. dirhodum* y *S. graminum* a concentraciones de 0 a 2 mM de DIMBOA. La mortalidad en los controles sin dieta fue más alta que la registrada incluso a concentraciones de 8 mM de este compuesto, lo que indica que las ninfas se alimentaron de la dieta y que la mortalidad registrada no se debe exclusivamente a mecanismos de deterrencia.

Por otra parte, la DL<sub>50</sub> obtenida para ninfas de *D. noxia* a las 48 h de tratamiento (5,43 mM), es muy superior a la obtenida para el pulgón *S. graminum* (0,9 mM) a las 24 h de tratamiento cuando se probaron concentraciones comprendidas entre 0-3 mM (Argandoña *et al.*, 1982) y 1,2 mM cuando las concentraciones oscilaron entre 0-8 mM (Corcuera *et al.*, 1985). Por lo tanto, *D. noxia* parece ser menos sensible al DIMBOA que *S. graminum*, ya que se requieren concentraciones cinco veces superiores del compuesto para producir el mismo efecto. Otros autores han descrito que cuando se suministra DIMBOA en dieta artificial a *R. maidis*, a concentraciones en el rango de 0-3 mM, la supervivencia de las ninfas no se ve afectada (Long *et al.*, 1977; Corcuera *et al.*, 1982). Sin embargo estos autores no

probaron concentraciones de DIMBOA más altas, por lo que no puede asegurarse que no ejerza ningún efecto sobre *R. maidis*.

Por lo tanto, el DIMBOA provoca mortalidades crecientes de las ninfas de *D. noxia* a medida de que se aumenta la concentración del mismo en una dieta artificial, aunque no es posible discriminar que parte de dicha mortalidad es debida a la deterrencia producida por el DIMBOA y cual a la toxicidad del compuesto. Estos resultados pueden parecer contradictorios con los anteriores, en los que hemos observado que no existe una correlación entre los niveles de DIMBOA, que fueron semejantes a los administrados en dieta artificial, y ninguno de los parámetros poblacionales de *D. noxia*. Sin embargo, hay que señalar que el DIMBOA se encuentra localizado preferentemente en los tejidos vasculares y en el mesófilo (Argandoña *et al.*, 1987). Recientemente, se ha informado la localización del DIMBOA-glucósido en el floema, pero con una distribución irregular, y con unas concentraciones inferiores al umbral necesario para conferir resistencia a *R. padi* (Givovich *et al.*, 1994). Por consiguiente, en un sistema tan complejo como *D. noxia*-cereal, y con los antecedentes anteriores, no es posible conocer las concentraciones reales de DIMBOA a las que está expuesto el pulgón, mientras que en los bioensayos en que se suministra el DIMBOA a la dieta conocemos en todo momento las dosis aplicadas a las ninfas de *D. noxia*.

El hecho de que la DL<sub>50</sub> del DIMBOA en *D. noxia* sea cinco veces superior a la obtenida para *S. graminum* indica que es menos susceptible a dicho compuesto que otras especies de pulgones de cereales y, por tanto, contribuye también a explicar la falta de correlación entre los niveles de DIMBOA y/o DIBOA en los cultivares estudiados y las tasas interna ( $r_m$ ) y finita ( $\lambda$ ) de crecimiento de

*D. noxia* a dosis que si han sido efectivas frente a otras especies de pulgones.

CONCLUSIONES

## V. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente estudio se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El método de HPLC desarrollado permite la separación y cuantificación de los Hx: DIMBOA, DIBOA y MBOA, de una forma rápida, al evitar la extracción de las muestras con disolventes orgánicos; sensible, ya que el límite de detección (50 pmol) es inferior al de otros métodos previamente descritos; y preciso, debido a los elevados porcentajes de recuperación obtenidos. La cuantificación del BOA no es necesaria debido a la gran estabilidad del DIBOA. Este método permite el análisis de un gran número de muestras, en un corto periodo de tiempo lo que es de gran importancia en programas de mejora para resistencia a pulgones.
2. Se ha observado que, a medida que aumenta la concentración de DIMBOA en cultivares de cinco especies de cereales de invierno, *D. noxia* se encuentra más tiempo en la fase de no penetración, especialmente antes de la fase floemática, y menor número de pulgones se alimentan del floema.
3. Se produce un retraso en el acceso al floema, de aproximadamente 1 hora, en aquellos cultivares que presentaron concentraciones de

DIMBOA superiores a 8,5 mg/g de peso seco, a pesar de haberse empleado cultivares de cinco especies de cereales con la consiguiente variabilidad genotípica y fenotípica.

4. La duración de la fase de no penetración previa a la fase floemática y el tiempo necesario para alcanzar dicha fase desde que comienza el experimento sugieren que los factores responsables del comportamiento del *D. noxia* se localizan a nivel del mesófilo y/o en los tejidos vasculares de la planta. La semejanza en cuanto al tiempo previo a la ingestión de floema en los cultivares estudiados sugiere que dicho comportamiento no está ligado a factores floemáticos.
5. No se ha encontrado ninguna correlación entre los niveles de DIMBOA en cinco especies de cereales de invierno y la duración total de la fase floemática y de ingestión de floema. En general, una vez los pulgones aceptaron el floema se alimentaron ininterrumpidamente.
6. No se ha encontrado correlación entre los niveles de DIBOA en los cultivares de cinco especies de cereales de invierno y ninguno de los parámetros secuenciales o no secuenciales para *D. noxia*.
7. No se ha observado ninguna relación entre los niveles de DIMBOA y DIBOA y la tasas interna ( $r_m$ ) y finita ( $\lambda$ ) de crecimiento de *D. noxia* en

los cultivares de cinco especies de cereales. Este hecho, unido a que no se ha detectado DIMBOA en los exudados de floema, y a la información aportada por el estudio del comportamiento de alimentación, sugiere que el DIMBOA es uno de los factores que determinan el retraso en el acceso al floema, la duración de los periodos de no penetración y que un menor número de pulgones acepten el floema, pero una vez que *D. noxia* acepta el floema no ejercería ningún efecto.

8. Se ha encontrado una correlación positiva entre los niveles de sacarosa en el floema de cultivares de trigo blando y trigo duro, y las tasas interna ( $r_m$ ) y finita ( $\lambda$ ) de crecimiento, lo que sugiere que los niveles de sacarosa podrían contribuir a enmascarar la acción deterrente del DIMBOA, y, por tanto, ser uno de los nutrientes implicados en la susceptibilidad de los mismos a *D. noxia*. Sin embargo, no puede descartarse que otros factores físicos y/o químicos estén implicados en la supervivencia, desarrollo y reproducción de *D. noxia* en los cultivares estudiados.
9. Los cultivares de trigo duro son mejores huéspedes que los de trigos blandos para *D. noxia*, puesto que registraron mayores valores para las tasas interna ( $r_m$ ) y finita ( $\lambda$ ) de crecimiento, a pesar de tener todos ellos unos niveles de DIMBOA superiores a los obtenidos en los trigos blandos.

- 10 Los cultivares de centeno Petkus y Elbon no son huéspedes adecuados para *D. noxia* debido a que los pulgones no pudieron pasar al periodo reproductivo, mientras que si lo hicieron en los cultivares de las demás especies de cereales evaluadas, aunque en varios casos (ej. triticales) registraron niveles de DIMBOA superiores a los observados en los centenos.
11. Cuando se administraron dosis crecientes de DIMBOA en una dieta artificial de sacarosa al 30 % se observó un aumento de la mortalidad de las ninfas de *D. noxia* dependiente de la dosis del DIMBOA aplicado, aunque no es posible discriminar que parte de dicha mortalidad es debida a antixenosis y cual a antibiosis.
12. La  $DL_{50}$  obtenida fue 5,43 mM de DIMBOA, cinco veces superior a la encontrada para otras especies de pulgones de cereales para los que sí se ha obtenido una correlación entre los niveles de DIMBOA y la  $r_m$ . Lo que sugiere que esta especie de pulgón es menos sensible a este metabolito que las otras especies de pulgones de importancia económica en cultivos de cereales, y ayudaría a explicar la no correlación obtenida entre niveles de DIMBOA y las tasas interna ( $r_m$ ) y finita ( $\lambda$ ) de crecimiento de *D. noxia*.

## BIBLIOGRAFIA

## VI. BIBLIOGRAFIA.

**Abbott, W.S.** 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 18: 265-267.

**Ahman, I. y Johanson, M.** 1994. Effect of light on DIMBOA-glucoside concentration in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ann. appl. Biol.*, 124: 569-574.

**Alfaro, A., Jorda, C. y Osca, J.M.** 1985. El "amarilleo enanizante" de la cebada. Una peligrosa virosis en nuestros cereales. *Agricultura*, 640: 848-849.

**Alfaro, A.** 1947. Notas sobre *Brachycolus noxius* (Mordv.), nueva plaga para nuestros trigos y cebadas. *Bol. Patol. veg. Ent. agric.*, 15: 125-130.

**Araya, J.E., Foster, J.E., Schreiber, M.M., Wing, R.E., Fereres, A., Tadeo, J.L. y Castañera, P.** 1990. Control temprano de áfidos transmisores del virus del enanismo amarillo de la cebada (Barley yellow dwarf virus) con formulaciones granuladas de insecticidas sistémicos de liberación lenta. *Bol. San. Veg. Plagas*, 16: 195-203.

**Argandoña, V.H. y Corcuera, L.J.** 1985. Distribution of hydroxamic acids in *Zea mays* tissues. *Phytochemistry*, 24: 177-178.

**Argandoña, V.H., Luza, J.G., Niemeyer, H.M. y Corcuera, L.J.** 1980. Role of hydroxamic acids in the resistance of cereals to aphids. *Phytochemistry*, 19: 1665-1668.

**Argandoña, V.H., Niemeyer, H.M. y Corcuera, L.J.** 1981. Effects of content and distribution of hydroxamic acids in wheat on

- insectation by the aphid *Schizaphis graminum*. *Phytochemistry*, 20: 673-676.
- Argandoña, V.H., Corcuera, L.J., Niemeyer, H.M. y Campbell, B.C.** 1983. Toxicity and feeding deterrency of hydroxamic acids from gramineae in synthetic diets against the greenbug *Schizaphis graminum*. *Entomol. exp. appl.*, 34: 134-138.
- Argandoña, V.H., Zúñiga, G.E. y Corcuera, L.J.** 1987. Distribution of gramine and hydroxamic acids in barley and wheat leaves. *Phytochemistry*, 26: 1917-1918.
- Armstrong, J.S., Porter, M.R. y Peairs, F.B.** 1991. Alternate host of the Russian wheat aphid (Homoptera, Aphididae) in Northeastern Colorado. *J. Econ. Entomol.*, 84: 1691-1694.
- Auclair, J.L.** 1989. Host plant resistance. En: *Aphids. Their biology, natural enemies and control. Vol 2C.* Minks, A.K. y Harrewijn, P. (eds) Elsevier, Amsterdam. pp, 225-265.
- Baker, E.A. y Smith, I.M.** 1977. Antifungal compounds in winter wheat resistant and susceptible to *Septoria nodorum*. *Ann. appl. Biol.*, 87: 67-63.
- Baker, C.A., Webster, V.A. y Porter, D.R.** 1992. Characterization of a Russian wheat aphid resistance in a hard white spring wheat. *Crop Sci.*, 32: 1442-1446.
- Barria, B.N., Copaja, S.V. y Niemeyer, H.M.** 1992. Ocurrence of DIBOA in wild *Hordeum* species and its relation to aphid resistance. *Phytochemistry*, 31: 89-91.
- Beck, D.L., Dunn, G.M., Routley, D.G. y Bowman, J.S.** 1983. Biochemical basis of resistance in corn to the corn leaf aphid. *Crop Sci.*, 23: 995-998.

- Bing, J.W., Guthrie, W.D., Dicke, F.F. y Obrycki, J.J.** 1990. Relation of corn leaf aphid (Homoptera: Aphididae) colonization to DIMBOA content in maize inbred lines. *J. Econ. Entomol.*, 83: 1626-1632.
- Birch, L.C.** 1948. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *J. Anim. Ecol.*, 17: 15-26.
- Birch, N. y Wratten, S.D.** 1984. Patterns of aphid resistance in the genus *Vicia*. *Ann. appl. Biol.*, 104: 327-338.
- Blackman, R.L. y Eastop, V.F.** 1984. Aphids on the world's crops: An identification and information guide. John Wiley & Sons, New York. 466 pp.
- Bohidar, K., Wratten, S.D. y Niemeyer, H.M.** 1986. Effects of hydroxamic acids on the resistance of wheat to the aphid *Sitobion avenae*. *Ann. appl. Biol.*, 109: 193-198.
- Burnett, P.A., Vivar, H., Rajaram, S. y Brajcich, P.** 1984. The Barley yellow dwarf research program at CYMMYT. En: Barley yellow dwarf, A Proceedings of the Workshop International Maize and Wheat Improvement Center (CYMMYT), Ciudad de Méjico, 6-8 Diciembre, pp: 132-136.
- Cabrera, H.M., Argandoña, V.H. y Corcuera, L.J.** 1994. Metabolic changes in barley seedlings at different aphid infestation levels. *Phytochemistry*, 35: 317-319.
- Campbell, B.C., McLean, D.L., Kinsey, M.G., Jones, K.C. y Dreyer, D.L.** 1982. Probing behaviour of the greenbug (*Schizaphis graminum*) biotype C on resistance and susceptible varieties of sorghum. *Entomol. exp. appl.*, 31: 140-146.

- Castañera, P.** 1988. Present status of cereal pest in Spain with special reference to cereal aphids. Proc. Meeting EC Expert's Group. Integrated Crop Protection in Cereal. Littlehampton. 1986. Cavalloro, R y Suntherland, K.D. (ed). Inglaterra. pp. 13-31.
- Castañera, P. y Gutiérrez, C.** 1983. Importancia relativa de las plagas de cereales de invierno en la zona Centro. I Jornadas técnicas sobre cereales de invierno. Madrid 13-15 diciembre 1983. MAPA. Madrid. Vol. II: 115-126.
- Cole, R.A., Riggall, W. y Morgan, A.** 1993. Electronically monitored feeding behaviour of the lettuce root aphid (*Pemphigus bursarius*) on resistant and susceptible lettuce varieties. Entomol. exp. appl., 68: 179-185.
- Copaja, S.V., Barría, B.N., y Niemeyer, H.M.** 1991b. Hydroxamic acid content of perennial Triticeae. Phytochemistry, 30: 1531-1534.
- Copaja, S.V., Niemeyer, H.M. y Wratten, S.D.** 1991a. Hydroxamic acids levels in Chilean and British wheat seedlings. Ann. appl. Biol., 118: 223-227.
- Corcuera, L.J.** 1982. Effect of cyclic hydroxamic acids from cereals on aphids. En: Chemistry and Biology of hydroxamic acids. Kehl, H. (ed.) Karger, Basel. pp: 111-118.
- Corcuera, L.J.** 1984. Effects of indole alkaloids from gramineae on aphids. Phytochemistry, 23: 539-541.
- Corcuera, L.J.** 1993. Biochemical basis for the resistance of barley to aphids. Phytochemistry, 33: 741-747.
- Corcuera, L.J., Argandoña, V.H. y Niemeyer, H.M.** 1982. Effect of cyclic hydroxamic acids from cereals on aphids. En: Chemistry

and Biology of Hydroxamic Acids. Kehl, H. (ed). Karger, Basel. pp: 111-118.

**Corcuera, L.J., Queirolo, C.B. y Argandoña, V.H.** 1985. Effects of 2- $\beta$ -D-glucosyl-4-hydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one on *Schizaphis graminum* (Rondani) (Insecta, Aphididae) feeding on artificial diets. *Experientia*, 41: 514-516.

**Dorschner, K.W., Johnson, R.C., Eikenbary, R.D. y Ryan, J.D.** 1986. Insect-plant interactions: Greenbugs (Homoptera: Aphididae) disrupt acclimation of winter wheat to drought stress. *Environ. Entomol.* 15: 118-121.

**Dowd, P.F.** 1989. Fusaric acid: A secondary fungal metabolite that synergizes the toxicity of cooccurring host allelochemicals to the corn earworm, *Heliothis zea* (Lepidoptera). *J. Chem. Ecol.*, 15: 249-254.

**Dreyer, D.L., Reese, J.C. y Jones, K.C.** 1981. Aphid feeding deterrents in sorghum. Bioassay, isolation and characterization. *J. Chem. Ecol.*, 7: 273-283.

**Dreyer, D.L. y Campbell, B.C.** 1987. Chemical basis of host-plant resistance to aphids. *Plant Cell Environ.*, 10: 353-361.

**Dreyer, D.L., Campbell, B.C. y Jones, K.C.** 1984. Effect of bioregulator-treated sorghum on greenbug fecundity and feeding behavior: implications for host plant resistance. *Phytochemistry*, 23: 1593-1596.

**Dreywood, R.** 1946. Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. and Eng. Chem. Anal. Ed.*, 18: 99.

- Fouché, A., Verhoeven, R.L., Hewitt, P.H., Walters, M.C., Kriel, C.F. y De Jager, J.** 1984. Russian wheat aphid feeding damage on wheat, related cereals and a *Bromus* grass species. En: Walters, M.C. (ed.), Progress in Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia* Mordv.) research in the Republic of South Africa. S. Afr. Dep. Agrc. Techn. Commun., 191: 22-33.
- Gahagan, H.E. y Mumma, R.O.** 1967. The isolation of 2-(2-hydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one)-D-glucopyranoside from *Zea mays*. Phytochemistry, 6: 1441-1449.
- George, K.S.** 1974. Damage assessment aspects of cereal aphid attack in autumn- and spring-sown cereals. Ann. appl. Biol., 63: 155-156.
- George, K.S.** 1975. The establishment of economic damage thresholds with particular reference to cereal aphids. Proc. Br. Insectic. Fungic. Conf., 1: 79-85.
- Gilchrist, L.I., Rodriguez, R. y Burnett, P.A.** 1984. The extent of freestate streak and *Diuraphis noxia* in Mexico. In Barley yellow dwarf, A Proceedings of the Workshop. International Maize and Wheat Improvement Center (CYMMYT), Ciudad de Mexico, 6-8 Dec. 1983, pp. 157-163.
- Girma, M., Wilde, G. y Reese, J.C.** 1990. Influence of temperature and plant growth stage on development, reproduction, life span, and intrinsic rate of increase of the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). Environ. Entomol., 19: 1438-1442.
- Givovich, A. y Niemeyer, H.M.** 1991. Hydroxamic acids affecting barley yellow dwarf virus transmission by the aphid *Rhopalosiphum padi*. Entomol. exp. appl., 59: 79-85.

- Givovich, A., Morse, S., Cerda, H., Niemeyer, H.M., Wratten, S.D. y Edwards, P.J.** 1992. Hydroxamic acid glucosides in honeydew of aphids feeding on wheat. *J. Chem. Ecol.*, 18: 841-846.
- Givovich, A., Sandström, J., Niemeyer, H.M. y Petterson, J.** 1994. Presence of a hydroxamic acid glucoside in wheat phloem sap, and its consequences for performance of *Rhopalosiphum padi* (L.) (Homoptera: Aphididae). *J. Chem. Ecol.*, 20: 1923-1930.
- Gordon, R.D. y Vanderberg, N.** 1991. Field guide to recently introduced species of coccinellidae in North America, with a revised key to North American genera of Coccinellini. *Proc. Entomol. Soc. Wash.*, 93: 845-865.
- Grombacher, A.W., Russell, W.A. y Guthrie, W.D.** 1989. Resistance to first generation European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and DIMBOA concentration in midwhorl leaves of the BS9 maize synthetic. *J. Kansas Ent. Soc.*, 62: 103-107.
- Grosheim, N.A.** 1914. *Brachycolus noxius*. Memoirs of the Natural History Museum of the Zemstro of the Govt of Taurida, Simferopol iii: 35-78 (de Rev. Appl. Entomol. Ser. A 1915, 3: 307-308).
- Guthrie, W.D., Tseng, C.T., Russell, W.A., Coats, J.R., Robbins, J.C. y Tollefson, J.J.** 1986. DIMBOA content at seven stages of plant development in maize synthetic cultivar. *J. Kansas Ent. Soc.*, 59: 356-360.
- Gutiérrez, C. y Castañera, P.** 1986. Efecto de los tejidos de maíz con alto y bajo contenido en DIMBOA sobre la biología del taladro *Sesamia nonagroides* Lef. (Lepidoptera, Noctuidae). *Invest. Agr. Prod. Prot. veg.*, 109-119.

- Gutiérrez, C., Castañera, P. y Torres, V.** 1988. Wound-induced changes in DIMBOA (2,4 dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4 benzoxazin-3(4H)-one). Concentration in maize plants caused by *Sesamia nonagroides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. appl. Biol.*, 113: 447-454.
- Gutiérrez, C., Guerrero, A., Castañera, P. y Torres, V.** 1982. A High-Performance Liquid Chromatography method for quantitation of DIMBOA in maize plant extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 30: 1258-1260.
- Hamilton, R.H.** 1964. Tolerance of several grass species to 2-chloro-triazine herbicides in relation to degradation and content of benzoxazine derivatives. *J. Agric. Food Chem.*, 12: 14-17.
- Hamilton, R.H., Bandurski, R.S. y Reusch, W.H.** 1962. Isolation and characterization of cyclic hydroxamate from *Zea mays*. *Cereal Chem.*, 39: 107-113.
- Hanson, A.D., Traynor, P.L., Ditz, K.M. y Reicosky, D.A.** 1981. Gramine in barley forage - Effects of genotype and environment. *Crop Sci.*, 21: 726-730.
- Harvey, T.L. y Martin, T.J.** 1988. Relative cold tolerance of Russian wheat aphid and biotype-E greenbug (Homoptera: Aphididae). *J. Kans. Entomol. Soc.*, 61: 137-140.
- Hashimoto, T., Kohno, J. y Yamada, Y.** 1987. Epoxidation *in vivo* of hyoscyamine to scopolamine does not involve a dehydration step. *Plant Physiol.*, 84: 144-147.
- Hedin, P.A., Davis, F.M. y Williams, W.P.** 1993. 2-hydroxy-4,7-dimethoxy-1,4-benzoxazin-3-one (N-O-ME-DIMBOA), a possible

- toxic factor in corn to the Southwestern corn borer. *J. Chem. Ecol.*, 19: 531-542.
- Helden, M. van y Tjallingii, W.F.** 1993. Tissue localization of lettuce resistance to the aphid *Nasonovia ribisnigri* using electrical penetration graphs. *Entomol. exp. appl.*, 68: 269-278.
- Hietala, P.K. y Virtanen, A.I.** 1960. Precursors of benzoxazolinone in rye plants. II. Precursor. I., the glucoside. *Acta Chem. Scand.*, 14: 502-504.
- Hill, B.D, Butts, R.A y Schaalje, G.B.** 1993. Reduced rates of foliar insecticides for control of Russian wheat aphid (Homoptera, Aphididae) in Western Canada. *J. Econ. Entomol.*, 86: 1259-1265.
- Hofman, J. y Hofmanova, O.** 1969. 1,4-Benzoxazine derivatives in plants: Sephadex fractionation and identification of a new glucoside. *European J. Biochem.* 8, 109-112.
- Hofman, J. y Hofmanova, O.** 1971. 1,4-Benzoxazine derivatives in plants: Absence of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one from injured *Zea mays* plants. *Phytochemistry*, 10: 1441-1444.
- Honkanen, E. y Virtanen, A.I.** 1961. On the reaction of 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one to 2(3)-benzoxazolinone. *Acta Chem. Scand.*, 15: 221-224.
- Jones, J.W., Byers, J.R., Butts, R.A. y Harris, J.L.** 1989. A new pest in Canada: Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Homoptera: Aphididae). *Can. Entomol.*, 121: 623-624.

- Jones, M.G.K., Outlaw, W.H. Jr y Lowry, O.H.** 1977. Enzymic assay of  $10^{-7}$  to  $10^{-4}$  moles of sucrose in plant tissues. *Plant Physiol.*, 60: 379-383.
- Kazemi, M.H. y Emden, H.F. van.** 1992. Partial antibiosis to *Rhopalosiphum padi* in wheat and some phytochemical correlations. *Ann. appl. Biol.*, 121: 1-9.
- Kindler, S.D., Greer, L.G. y Springer, T.L.** 1992. Feeding behavior of the Russian wheat aphids (Homoptera, Aphididae) on wheat and resistant and susceptible slender wheat grass. *J. Econ. Entomol.*, 85: 2012-2016.
- Kindler, S.D., Jensen, K.B. y Springer, T.L.** 1993. An overview: resistance to the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) within the perennial Triticeae. *J. Econ. Entomol.*, 86: 1609-1618.
- Kindler, S.D. y Springer, T.L.** 1989. Alternate hosts of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.*, 82: 1358-1362.
- Klun, J.A. y Brindley, T.A.** 1966. Role of 6-methoxybenzoxazolinone in inbred resistance of host plant to first brood larvae of European corn borer. *J. Econ. Entomol.*, 59: 711-718.
- Klun, J.A. y Robinson, J.F.** 1969. Concentration of two 1,4-benzoxazinones in dent corn at various stages of development of the plant and its relation to resistance of the host plant to the European corn borer. *J. Econ. Entomol.*, 62: 214-220.
- Klun, J.A., Tipton, C.L. y Brindley, T.A.** 1967. 2,4-Dihidroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA), an active agent in the resistance of maize to the European corn borer. *J. Econ. Entomol.*, 60: 1529-1533.

- Klun, J.A., Tipton, C.L., Robinson, J.F., Ostrem, D.L. y Beroza, M.** 1970. Isolation and identification of 6,7-dimethoxy-2-benzoxazolinone from dried tissues of *Zea mays* (L.) and evidence of its cyclic hydroxamic acid precursor. *J. Agric. Food Chem.*, 18: 663-665.
- Kogan, M. y Ortman, E.F.** 1978. Antixenosis- a new term proposed to define Painter's "Non preference" modality of resistance. *Bull. Entomol. Soc. Am.*, 24: 175-176.
- Kogan M. y Paxton, J.** 1983. Natural inducers of plant resistance to insects, pp. 154-171. En Hedin, P.A. (ed), *Plant resistance to insects*. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Kojima, M., Poulton, J.E., Thayer, S.S. y Conn, E.E.** 1979. Tissue distribution of dhurrin and of enzymes involved in its metabolism in leaves of *Sorghum bicolor*. *Plant Physiol.*, 63: 1022-1028.
- Kolbe, W. y Linke, W.** 1974. Studies of cereal aphids, their occurrence, effect on yield in relation to density levels and their control. *Ann. appl. Biol.*, 77: 85-87.
- Kovalev, O. V., Poprawski, T.J., Stekolshchikov, A.V., Vereshchagina, A.B. y Gandrabur, S.A.** 1991. *Diuraphis Aizenberg* (Hom, Aphididae): Key to apterous viviparous females, and review of russian language literature on the natural history of *Diuraphis noxia* (Kurdjumov, 1913). *J. Appl. Ent.*, 112: 425-436.
- Krall, J.M., Miller, S.D., Bennett, L.E. y Legg, D.E.** 1993. Fertilizer and Downy brome (*Bromus tectorum*) effect on Russian Wheat aphid (*Diuraphis noxia*) in winter wheat (*Triticum aestivum*). *Weed Technology*, 7: 670-670.

- Kurdjumov, N.V.** 1913. The more important insects injurious to grains in Middle and South Russia. Citado de Kovalev *et al.* (1991).ñ
- Leather, S.R. y Dixon, A.F.G.** 1981. The effect of cereal growth stage and feeding site on the reproductive activity of the bird cherry aphid *Rhopalosiphum padi*. *Ann. appl. Biol.*, 97: 135-141.
- Leszczynsky, B., Warchol, J. y Niraz, S.** 1985. The influence of phenolic compounds on the preference of winter wheat cultivars by cereal aphids. *Insect Sci. Applic.*, 6: 157-158.
- Leszczynsky, B., Wrihgt, L.C. y Bakowsky, T.** 1989. Effect of secondary plant substances on winter wheat resistance to the grain aphid. *Entomol. exp. appl.*, 52: 135-139.
- Levin, D.A.** 1971. Plant phenolics: An ecological perspective. *Am. Nat.*, 105: 157-181.
- Lister, R.M., Fereres, A., Foster, J.E. y Castañera, P.** 1990. Occurrence of Barley yellow dwarf virus in three mayor cereal-growing regions of Spain. En: *World perspectives in barley yellow dwarf DCAS/CIMMYT. Proc. Int. Workshop, Udine, Italy.* Burnett, P.A. (ed.).pp:49-54.
- Long, B.J., Dunn, G.M. y Routley, D.G.** 1974. Rapid procedure for estimating cyclic hydroxamate (DIMBOA) concentración in maize. *Crop Sci.*, 14: 601-603.
- Long, B.J., Dunn, G.M. y Routley, D.G.** 1978. Relationship of hydroxamate concentrations in maize and field reaction to *Helminthosporium turcicum*. *Crop Sci.*, 18: 573-575.
- Long, B.J., Dunn, G.M., Bowman, J.S. y Routley, D.G.** 1977. Relationship of hydroxamic acid content corn and resistance to the corn leaf aphid. *Crop. Sci.*, 17: 55-58.

- Loomis, R.S., Beck, S.D. y Stauffer, J.F.** 1957. The European corn borer, *Pyrausta nubilalis* (Hubn), and its principal host plant. V. A chemical study of host plant resistance. *Plant Physiol.*, 32: 379-385.
- Loper, G.M.** 1968. Effect of an aphid infestation on the coumestrol content of alfalfa varieties differing in aphid resistance. *Crop Sci.*, 8: 104-106.
- Lyons, P. C., Hipskind, J.D., Wood, K.V. y Nicholson, R.L.** 1988. Separation and cuantification of cyclic hydroxamic acids and relate compounds by High-Pressure Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 36: 57-60.
- Manuwoto, S. y Scriber, J.M.** 1982. Consumption and utilization of three maize genotypes by the Southern armyworm. *J. Econ. Entomol.*, 75: 163-167.
- Manuwoto, S. y Scriber, J.M.** 1985. Consumption and utilization of experimentally altered corn by Southern armyworm. *J. Chem. Ecol.*, 11: 1469-1483.
- Mayoral, A.M.; Gutiérrez, C.; Ruíz, M.L. y Castañera, P.** 1994. A high performance liquid chromatography method for quantification of DIBOA, DIMBOA and MBOA from aqueous extracts of corn and winter cereal plants. *J. Liq. Chromatogr.*, 17: 2651-2665.
- Melia, A., Seco, M.V., Dueñas, M.E., Nuñez, E. y Nieto, J.M.** 1990. Afidos alados (Homoptera: Aphidoidea) capturados con trampas de succión en Castellón, León y Salamanca. *Bol. San. Veg. Plag.*, 16: 635-643.

- Michels, G.J.Jr. y Behle, R.W.** 1988. Reproduction and development of *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae) at constant temperatures. *J. Econ. Entomol.*, 81: 1097-1101.
- Morgham, A.T., Richardson, D.E., Campbell, R.K. y Eikenbary, R.D.** 1992. Correlation of electronically recorded waveforms with probing activities of biotype E greenbugs (Homoptera: Aphididae) on resistant and susceptible wheat plants. *J. Kansas Entomol. Soc.*, 65: 252-260.
- Moriones, E., Ortego, F., Ruíz-Tapiador, M., Gutiérrez, C., Castañera, P. y García-Arenal, F.** 1993. Epidemiology of RPV- and PAV-like barley yellow dwarf viruses on winter barley in central Spain. *Crop Protection*, 12: 224-228.
- Morse, S., Wratten, S.D., Edwards, P.J. y Niemeyer, H.M.** 1991. Changes in the hydroxamic acid content of maize leaves with time and artificial damage, implications for insect attack. *Ann. appl. Biol.*, 119: 239-249.
- Mulvena, D.P. y Slaytor, M.** 1983. N-methyltransferase activities in *Phalaris aquatica*. *Phytochemistry*, 22: 47-48.
- Nault, L.R., y Styer, W.E.** 1972. Effects of sinigrin on host selection by aphids. *Entomol. exp. appl.*, 15: 423-437.
- Nicol, D., Copaja, S.V., Wratten, S.D. y Niemeyer, H.M.** 1992. A screen of worldwide wheat cultivars for hydroxamic acid levels and aphid antixenosis. *Ann. appl. Biol.*, 121: 11-18.
- Niemeyer, H.M.** 1988a. Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the Gramineae. *Phytochemistry*, 27: 3349-3358.

- Niemeyer, H.M.** 1988b: Hydroxamic acid content of *Triticum* species. *Euphytica*, 37: 289-293.
- Niemeyer, H.M., Pesel, E., Franke, S. y Francke, W.** 1989a. Ingestion of the benzoxazinone DIMBOA from wheat plants by aphids. *Phytochemistry*, 28: 2307-2310.
- Niemeyer, H.M., Pesel, E., Copaja, S.V., Bravo, H.R., Franke, S. y Francke, W.** 1989b. Changes in hydroxamic acid levels of wheat plants induced by aphid feeding. *Phytochemistry*, 28: 447-449.
- Nieto-López, R.M. y Blake, T.K.** 1994. Russian wheat aphid resistance in barley: inheritance and linked molecular markers. *Crop Sci.*, 34: 655-659.
- Niraz, S., Leszczynski, B., Chiepela, A., Urbańska, A. y Warchoe, J.** 1985. Biochemical aspects of winter wheat resistance to aphids. *Insect Sci. Appl.*, 6: 253-257.
- Nkongolo, K.K., Quick, J.S., Limin, A.E. y Fowler, D.B.** 1991. Sources and inheritance of resistance to Russian wheat aphid in *Triticum* species amphiploids and *Triticum tauschii*. *Can. J. Plant Sci.*, 71: 703-708.
- Oswald, J.W. y Houston, B.R.** 1951. A new virus disease of cereals transmissible by aphids. *Plant Dis. Rep.*, 35: 471-475.
- Oswald, J.W. y Houston, B.R.** 1953. The yellow-dwarf virus disease of cereal crops. *Phytopathology*, 43: 128-136.
- Painter, R.H.** 1951. Insect resistance in crop plants. The University Press of Kansas, Lawrence, 520 pp.
- Pérez, P., Gimeno, C., Verdugo, M., Soto, M.J., Ponz, F. y Fereres, A.** 1992. Dinámica de poblaciones de vectores y transmisión del

- virus Y de la patata en cultivos de pimiento. Bol. San. Veg. Plagas, 18: 225-235.
- Pickett, J.A, Wadhams, L.J., Woodcock, C.M. y Hardie, J.** 1992. The chemical ecology of aphids. Ann. Rev. Entomol., 37: 67-90.
- Pike, K.S., Reed, G.L., Graf, G.T. y Allison, D.** 1993. Compatibility of Imidacloprid with fungicides as a seed-treatment control of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) and effect on germination, growth and yield of wheat and barley. J. Econ. Entomol., 86: 586-593.
- Plumb, R.T.** 1978. Aphids and virus control on cereals. Proc. 1977 Brit. Crop Protect. Conf. Pest and Diseases, 3: 903-913.
- Pons, X. y Albajes, R.** 1987a. Biology of BYDV vectors in wheat in Catalonia (Spain). IOBC/WPRS Bull. 1987/X/1:36-41.
- Pons, X. y Albajes, R.** 1987b. Role of corn and the vetch-cereal associated crop in BYDV vector populations in Catalonia (Spain). IOBC/WPRS Bull. 1987/X/1: 42-45.
- Pons, X., Albajes, R., Avilla, J., Sarasúa, M.J., Artigues, M. y Eizaguirre, M.** 1989. Spring populations development of cereal aphids on durum wheat in Lleida, NE of Spain. J. Appl. Entomol., 107: 203-210.
- Pons, X., Comas, J. y Albajes, R.** 1993. Overwintering of cereal aphids (Homoptera: Aphididae) on durum wheat in a mediterranean climate. Environ. Entomol., 22: 381-387.

- Porter, D.R., Webster, J.A. y Baker, C.A.** 1993. Detection of resistance to the Russian wheat aphid in hexaploid wheat. *Plant Breeding*, 110: 157-160.
- Postigo, M.M., Meliá, A., Seco, M.V., Balmori, A., Núñez, E. y Nieto-Nafría, J.M.** 1993. Resultados de las capturas de áfidos alados (Homoptera, Aphididae) en trampas de succión durante 1991 en Castellón, Leon y Salamanca. *Bol. San. Veg. Plagas*, 19: 475-483.
- Prado, E. y Tjallingii, W.F.** 1994. Aphid activities during sieve element punctures. *Entomol. exp. appl.*, 72: 157-165.
- Puterka, G.J., Black IV, W.C., Steiner, W.M. y Burton, R.L.** 1993. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from alozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity*, 70: 604-618.
- Rautapää, J.** 1968a. Changes in the yield and protein quantity of oat caused by *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hom., Aphididae). *Ann. agric. Fenn*, 7: 95-104.
- Rautapää, J.** 1968b. Reduction in yield and changes in brewing quality of barley caused by *Macrosiphum avenae* (F.) (Hom., Aphididae). *Acta Agric. Scand.* 18, 233-241.
- Rhodes, M.J.C.** 1994. Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. *Plant Mol. Biol.*, 24: 1-20.

- Richardson, M.D. y Bacon, C.W.** 1993. Cyclic hydroxamic acid accumulation in corn seedlings exposed to reduced potentials before, during and after germination. *J. Chem. Ecol.*, 19: 1613-1624.
- Riedell, W.E.** 1989. Effects of Russian wheat aphid infestation on barley plant response to drought stress. *Physiologia Plantarum*, 77: 587-592.
- Riedell, W.E. y Kieckhefer, R.W.** 1993. Nitrogen fertilizer management and grain yield loss to Russian wheat aphids. *Cereal Res. Commun.*, 21: 57-61.
- Robinson, J.F., Klun, J.A., Guthrie, W.D. y Brindley, T.A.** 1982. European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) leaf feeding resistance: DIMBOA bioassays. *J. Kansas Entomol. Soc.*, 55: 357-364.
- Robinson, J.** 1992a. Russian wheat aphid - A growing problem for small-grain farmers. *Outlook on Agriculture*, 21: 57-62.
- Robinson, J.** 1992b. Predators and parasitoids of Russian wheat aphid in central Mexico. *Southwestern Entomologist*, 17: 185-186.
- Robinson, J.** 1992c. Modes of resistance in barley seedlings to six aphid (Homoptera: Aphididae) species. *J. Econ. Entomol.*, 85: 2510-2515.
- Robinson, J.** 1992d. Assessment of Russian wheat aphid resistance in barley seedlings in Mexico. *J. Econ. Entomol.*, 85: 1954-1962.
- Robinson, J., Delgado, F., Vivar, H.E. y Burnett, P.A.** 1992. Inheritance of resistance to Russian wheat aphid in barley. *Euphytica*, 62: 213-217.

- Robinson, J., Fisher, M. y Hoisington, D.** 1993. Molecular Characterization of *Diuraphis* spp (Homoptera: Aphididae) using Random Amplified Polymorphic DNA. *Southwestern Entomologist*, 18: 121-127.
- Russell, R.N., Robertson, J.L, y Savin, N.E.** 1977. Polo: a new computer program for probit analysis. *Bull. Entomol. Soc. Am.*, 23: 209-215.
- Russell, G.E.** 1978. Plant breeding for pest and disease resistance. Butterworths, London, 485 pp.
- Rustamani, M.A., Kanehisa, K. Y Tsumuki, H.** 1992a. Aconitic acid content of some cereals and its effect on aphids. *Appl. Entomol. Zool.*, 27: 79-87.
- Rustamani, M.A., Kanehisa, K., Tsumuki, H. y Shiraga, T.** 1992b. Further observations on the relationship between aconitic acid contents and aphid densities on some cereal plants. *Bull. Res. Inst. Bioresour. Okayama Univ.*, 1: 9-20.
- Rybicki, E.P. y Wechmar, M.B. von.** 1982. Characterization of an aphid-transmitted virus disease of small grains. Isolation and partial characterization of three viruses. *Phytopathology Z.*, 103: 306-322.
- Sato, K., Uritani, I. y Saito, T.** 1982. Properties of terpene-inducing factor extracted from adults of the sweet potato weevil, *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera:Brenthidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 17: 368-374.
- Schroeder-Teeter, S., Zemetra, R.S., Schotzko, D.J., Smith, C.M. y Rafi, M.** 1994. Monosomic analysis of Russian wheat aphid

- (*Diuraphis noxia*) resistance in *Triticum aestivum* line PI137739. *Euphytica*, 74: 117-120.
- Scott, R.A., Worral, W.D. y Frank, W.A.** 1991. Screening for resistance to Russian wheat aphid in Triticale. *Crop Sci.*, 31: 32-36.
- Seco, M.V., Dueñas, M.E., Núñez, E., Melia, A. y Nieto, J.M.** 1991. Afidos alados (Hom. Aphidoidea) capturados con trampas de succión en Castellón, León y Salamanca. *Bol. San. Veg. Plagas*, 17: 519-527.
- Shapiro, J.P.** 1991. Phytochemicals at the plant insect interface. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 17: 191-200.
- Smith, C.M.** 1989. Plant resistance to insects. A fundamental approach. Wiley, J & sons (ed). New York. pp. 4.
- Smith, C.M.** 1990. Adaptation of biochemical and genetic techniques to the study of plant resistance to insects. *Am. Entomol.*, 36: 141-146.
- Smith, D.G., McInnes, A.G., Higgins, V.J. y Millard, R.L.** 1971. Nature of the phytoalexin produced by alfalfa in response to fungal infection. *Physiol. Plant Pathol.*, 1: 41-44.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J.** 1981. *Biometry*. W.H. Freeman and cía, San Francisco. pp 859.
- Spiller, N.J. y Llewellyn, M.** 1986. A comparison of the level of resistance in diploid *Triticum monococcum* and hexaploid *Triticum aestivum* wheat seedlings to the aphids *Metopolophium dirhodum* and *Rhopalosiphum padi*. *Ann. appl. Biol.*, 109: 173-177.

- Srisvastava, P.N.** 1987. Nutritional physiology. En: Aphids. Their biology, natural enemies and control. Vol A. Minks, A.K. y Harrewijn, P. (Ed). Elsevier. Amsterdam. pp: 99-121.
- Starý, P. y Erdelen, C.H.** 1982. Aphid parasitoids (Hym: Aphelinidae) from the Yemen Arab Republic. *Entomophaga*, 27: 105-108.
- Stoetzel, M.B.** 1987. Information on and identification of *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae) and other aphids colonizing leaves of wheat and barley in the United States. *J. Econ. Entomol.*, 80: 696-704.
- Tang, C.S., Chang, S.H., Hoo, D. y Yanagihara, K.H.** 1975. Gas chromatographic determination of 2(3)-benzoxazolinones from cereal plants. *Phytochemistry*, 14: 2077-2079.
- Taberner, A., Castañera, P.; Silvestre, E. y Dopazo, J.** 1993. Estimation of the intrinsic rate of natural increase and its error by both algebraic and resampling approaches. *CABIOS*, 9: 535-540.
- Thackray, D.J., Morse, S. y Leech, C.** 1988. The role of hydroxamic acids in wheat and maize in conferring resistance to aphids. *Aspects of Appl. Biol.*, 17: 225-227.
- Thackray, D.J., Wratten, S.D., Edwards, P.J. y Niemeyer, H.M.** 1990. Resistance to the aphid *Sitobion avenae* and *Rhopalosiphum padi* in Gramineae in relation to hydroxamic acids levels. *Ann. appl. Biol.* 116: 573-582.
- Thompson, L.Jr., Slife, F.W. y Butler, H.S.** 1970. Environmental influence on the tolerance of corn to atrazine. *Weed Sci.*, 18: 509-514.
- Tjallingii, W.F.** 1988. Electrical recording of stylet penetration activities. En: Aphids, their biology, natural enemies and control.

- Minks, A.K. y Harrewijn, A.P. (ed). Vol 2A, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. pp: 95-108.
- Tjallingii, W.F.** 1990a. Continuous recording of stylet penetration activities by aphids. En: Aphid-plant genotype interactions. Campbell, R.K. y Eikenbary, R.D. (ed). Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. pp: 88-89.
- Tjallingii, W.F.** 1990b. Stylet penetration parameters from aphids in relation to host-plant resistance. Proc. VII Int. Symp. Insect-Plant Interactions. Symp. Biol. Hung., 39: 411-419.
- Tjallingii, W.F. y Mayoral, A.M.** 1992. Criteria for host plant acceptance by aphids. En: Menken, S.B.J., Visser, J.H. y Harrewijn, P. (ed). Proc. VIII Int. Symp. Insect-Plant Interactions. Kluwer Acad. publ. Dordrecht. The Netherlands. pp: 280-282.
- Todd, G.W., Getahun, A. y Cress, D.C.** 1971. Resistance in barley to the greenbug *Schizaphis graminum*. 1. Toxicity of phenolic and flavonoid compounds and related substances. Ann. Entomol. Soc. Amer., 64: 718-722.
- Toit, F. du.** 1987. Resistance in wheat (*Triticum aestivum*) to *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). Cereal Res. Commun., 15: 175-179.
- Toit, F. du.** 1989. Inheritance of resistance in two *Triticum aestivum* lines to Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). J. Econ. Entomol., 82: 1251-1253.
- Toit, F. du y Niekerk, H.A. van.** 1985. Resistance in *Triticum* species to the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Homoptera: Aphididae). Cereal Res. Comm., 13: 371-378.

- Tolmay, V.L., Smit, I.B.J. y Koen, B.** 1993. A spring triticale with Russian wheat aphid resistance in South-Africa. *Cereal Res. Commun.* , 21: 2-3.
- Trevelyan, W.E. y Harrison, J.S.** 1952. Studies on yeast metabolism. I. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochem. J.*, 50: 298-303.
- Tully, R.E. y Hanson, A.D.** 1979. Amino acids translocated from turgid and water-stressed barley leaves. *Plant. Physiol.*, 64: 460-466.
- Vickerman, G.P. y Wratten, S.D.** 1979. The biology and pest status of cereal aphids (Hemiptera: Aphididae) in Europe: A review. *Bull. Ent. Res.*, 69: 1-23.
- Virtanen, A.I. y Hietala, P.K.** 1955. 2(3)-benzoxazolinone an antifusarium factor in rye seedling. *Acta Chem. Scan.*, 9: 1543-1544.
- Virtanen, A.I. y Hietala, P.K.** 1960. Precursors of benzoxazolinone in rye plants. I. Precursor. II. The aglucone. *Acta Chem. Scand.*, 14: 499-502.
- Virtanen, A.I., Hietala, P.K. y Wahlroos, O.** 1956. An anti-fungal factor in maize and wheat plants. *Suomen Kemistilehti B29*: 143.
- Virtanen, A.I., Hietala, P.K. y Wahlroos, O.** 1957. Antimicrobial substances in cereals and fodder plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 69: 486-500.
- Virtanen, A.I. y Wahlroos, O.** 1963. Absence of 6-methoxy-benzoxazolinone in uninjured maize tissue. *J. Pharma. Sci.*, 52: 713-714.

- Wahlroos, O. y Virtanen, A.I.** 1959. Precursors of 6-methoxy-benzoxazolinone in uninjured maize tissue. *J. Pharma. Sci.*, 52: 713-714.
- Walters, M.C., Penn, F., Toit, F. du, Botha, T.C., Aalbersberg, K., Hewitt, P.H. y Broodryk, S.W.** 1980. The Russian wheat aphid. Farming in South Africa. Leaflet Series, Wheat G3: 1-6.
- Wang, Z.G. y Knudsen, G.R.** 1993. Effect of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) on fecundity of the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *Environ. Entomol.*, 22: 874-878.
- Watt, A.D.** 1979. The effect of cereal growth stages on the reproductivity activity of *Sitobion avenae* and *Metopolophium dirhodum*. *Ann. appl. Biol.*, 91: 147-157.
- Webster, J.A.** 1990. Resistance in triticale to the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.*, 83: 1091-1095.
- Webster, J.A., Starks, K.J. y Burton, R.L.** 1987. Plant resistance studies with *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae), a new United States wheat pest. *J. Econ. Entomol.*, 80: 944-949.
- Willard, J.I. y Penner, D.** 1976. Benzoxazinones: Cyclic hydroxamic acids found in plants. *Residue Rev.*, 64: 64-76.
- Williams, M., Barnes, R.F. y Cassedy, J.M.** 1971. Characterization of alkaloids in palatable and unpalatable clones of *Phalaris arundinacea* L. *Crop Sci.*, 11: 213-217.
- Wink, M., Hartmann, T., Witte, L. y Rheinheimer, J.** 1982. Interrelationship between quinolizidine alkaloid producing legumes and infesting insects: exploitation of the alkaloid-containing phloem sap of *Cytisus scoparius* by the broom aphids,

- Aphis cytisorum*. Zeitschrift für Naturforschung, Series 37 C: 1081-1086.
- Wink, M. y Witte, L.** 1984. Turnover and transport of quinolizidine alkaloids. Diurnal fluctuations of lupanine in the phloem sap, leaves and fruits of *Lupinus albus* L. *Planta*, 161: 519-524.
- Woodhead, S., Padgham, D.E. y Bernays, E. A.** 1980. Insect feeding on different sorghum cultivars in relation to cyanide and phenolic acid content. *Ann. appl. Biol.*, 95: 151-157.
- Woodhead, S.** 1981. Environmental and biotic factors affecting the phenolic content of different cultivars of *Sorghum bicolor*. *J. Chem. Ecol.*, 7: 1035-1047.
- Woodward, M.D., Corcuera, L.J., Schnoes, H.K., Helgeson, J.P. y Upper, C.D.** 1979. Identification of 1,4-benzoxazin-3-ones in maize extracts by Gas-Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Plant Physiol.*, 93: 9-13.
- Wraight, S.P., Poprawski, T.J., Meyer, W.L. y Peairs, F.B.** 1993. Natural enemies of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) and associated cereal aphid species in spring-planted wheat and barley in Colorado. *Environ. Entomol.*, 22: 1393-1391.
- Wratten, S.D.** 1975. The nature of the effects of the aphids *Sitobion avenae* and *Metopolophium dirhodum*. *Ann. appl. Biol.*, 79: 27-34.
- Wyatt, I.J. y White, P.R.** 1977. Simple estimation of intrinsic increase rates for aphids and tetranychid mites. *J. Appl. Ecol.*, 14: 757-766.
- Xie, Y.S., Arnason, J.T., Philogene, B.J.R., Lambert, J.D.H., Atkinson, J. y Morand, P.** 1990. Role of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) in the resistance of

- maize to western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Leconte) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Can. Entomol.*, 122: 1177-1186.
- Xie, Y.S., Atkinson, J., Arnason, J.T., Morand, P. y Philogene, B.J.R.** 1991. Separation and quantification of 1,4-benzoxazin-3-ones and benzoxazolinones in maize root extract by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography*, 543: 389-395.
- Xie, Y.S., Arnason, J.T., Philogene, B.J.R., Atkinson, J. y Morand, P.** 1992. Behavioral responses of western corn rootworm larvae to naturally occurring and synthetic hydroxamic acids. *J. Chem. Ecol.*, 18: 945-947.
- Yoshida, H., Tsumuki, H., Kanehisa, K. y Corcuera, L.J.** 1993. Release of gamine from the surface of barley leaves. *Phytochemistry*, 34: 1011-1013.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T. y Zonzac, C.F.** 1974. A decimal code for the growth stage of cereals. *Weed Res.*, 4: 415-421.
- Zerené, M., Cagleric, M. y Ramírez, I.** 1988. Un nuevo áfido de los cereales detectado en Chile. *Agricultura Técnica*, 48: 60-61.
- Zúñiga, G.E., Argandoña, V.H., Niemeyer, H.M. y Corcuera, L.J.** 1983. Hydroxamic acid content in wild and cultivated gramineae. *Phytochemistry*, 22: 2665-2668.
- Zúñiga, G.E. y Corcuera, L.J.** 1986. Effect of gamine in the resistance of barley seedlings to the aphid *Rhopalosiphum padi*. *Entomol. exp. appl.*, 40: 259-262.

**Zúñiga, G.E., Salgado, M.S. y Corcuera, L.J.** 1985. Role of an indole alkaloid in the resistance of barley seedlings to aphids. *Phytochemistry*, 24: 945-947.

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