

OZONO TROPOSFERICO COMO MODULADOR DE LA INTERACCION PLANTA-HERBIVORO

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

ANALIA INES MENENDEZ

Licenciada en Ciencias Biológicas - Universidad de Buenos Aires-

Lugar de trabajo: Cátedra de Ecología, IFEVA- FAUBA



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO



Director de tesis
M. Alejandra Martinez-Ghersa
Lic. en Cs. Biológicas CAECE
PhD Cs. Ambientales (Oregon State University)

Co-director
Ana María Romero
Ing. Agrónomo-UBA
PhD en Fitopatología (North Carolina State University)

Consejero de Estudios
Nora Trápani
Ing. Agrónomo-UBA

JURADO DE TESIS

M. Alejandra Martinez-Ghersa
Lic. en Cs. Biológicas CAECE
PhD Cs. Ambientales (Oregon State University)

Zavala, Jorge Alberto
Ing. Agrónomo-UBA
Doctor - Friedrich-Schiller Universität

Grilli, Mariano Pablo
Biólogo - Universidad Nacional de Córdoba
Doctor en Ciencias Biológicas - Universidad Nacional de Córdoba

Zanor, María Inés
Bioquímica - Universidad Nacional de Rosario
Doctor - Universidad Nacional de Rosario

Fecha de defensa de la tesis: 14 de junio de 2011

Dedicatoria

*A Pablo, el mejor compañero, mi amor.
A mis hijos: Matías, Micaela y Sebastián, regalo de Dios.
A mi padres, que me educaron maravillosamente y me facilitaron el camino.*

Agradecimientos

A Ale Martínez Ghera., por guiarme en este oficio del investigador. Gracias por su respeto y su apoyo en lo personal y en lo profesional.

A Claudio Ghera., por compartir sus sorprendentes ideas y su pensamiento integrador de conocimientos.

A Ana M. Romero y Ana M. Folcia por estar siempre cuando las necesité, por sus enseñanzas y consejos.

A Nora Trápani por su apoyo y consejos.

A Fernando Biganzoli por su ayuda estadística.

A los que colaboraron en los experimentos y con las cámaras: Walter, Carlitos, Roberto, Laura V. y Natalia Q.

Hay más colaboradores: Miriam Izaguirre y Javier Moreno.

A todos mis compañeros y amigos: Mariano Sposaro., Genoveva Pignataro, Gonzalo Irisarri, Luis Perez, Laura Ventura., Marta Telesnicki, Alfonsina Szpeiner., Nati Quarlieri.

A toda la gente del IFEVA y de la EPG “Alberto Soriano”.

A CONICET y FAUBA.

Declaración

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.”

Publicaciones derivadas de la tesis

-Menéndez A. I., A.M.Romero, A.M.Folcia and M.A. Martinez-Ghersa. 2009. Getting the interactions right: does ozone interfere with antiherbivore defenses? *Basic and Applied Ecology* 10, 255-264.

-Menéndez A. I., A.M. Romero, A.M. Folcia and M.A. Martinez-Ghersa. 2010. Aphid and episodic O₃ injury on Arugula plants (*Eruca sativa* Mill). *Agriculture, Ecosystems and Environment* 135, 10-14.

Tabla de Contenidos

	Pág.
CAPITULO 1.	
1. Introducción general.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.1.1. Mecanismos de respuesta inducidos en las plantas por la exposición a ozono	6
1.1.2. Mecanismos de respuesta inducidos en las plantas por el ataque de herbívoros.....	8
1.1.3. Interacción del sistema de defensa frente a ozono y a los herbívoros que se alimentan del floema.....	9
1.2. Modelo de estudio: interacción planta-herbívoro.....	15
1.3. Objetivos e hipótesis generales.....	16
1.4. Estructura de la tesis.....	17
 CAPITULO 2.	
2. Caracterización de las respuestas de las plantas al ataque de áfidos	
2.1. Introducción.....	18
2.1.1 Objetivos particulares de cada experimento.....	21
2.2. Materiales y métodos generales.....	22
2.2.1 Primer experimento: Infestación de plantas de tomate y rúcula con diferentes densidades de áfidos.....	22
2.2.2 Segundo experimento: Plantas de rúcula con diferentes pre-tratamientos	

de infestación	23
2.2.3 Tercer experimento: Desarrollo poblacional de áfidos provenientes de poblaciones con diferente densidad inicial.....	25
2.3. Resultados	
2.3.1 Infestación de plantas de tomate y rúcula con diferentes densidades de áfidos.....	25
2.3.2 Plantas de rúcula con diferentes pre-tratamientos de infestación.....	29
2.3.3 Desarrollo poblacional de áfidos provenientes de poblaciones con diferente densidad inicial.....	31
2.4. Discusión.....	32

CAPITULO 3.

3. Daño por áfidos y episodios de ozono en plantas de rúcula (*Eruca sativa* Mill)

3.1. Introducción.....	36
3.2. Materiales y Métodos	
3.2.1. Exposición a O ₃ en cámaras “open top”.....	38
3.2.2 Plantas y áfidos.....	39
3.2.3. Procedimiento experimental.....	39
3.3.4. Análisis estadístico.....	40
3.4. Resultados.....	41
3.5. Discusión.....	46

CAPITULO 4.

4. DISCUSIÓN GENERAL

4.1. Motivación e Hipótesis.....	49
----------------------------------	----

4.2. Comprobación de las hipótesis y resultados principales.....	52
4.3. Contribuciones al estado actual del conocimiento en ecología.....	54
4.4. Conclusiones principales.....	59
4.5. Líneas de investigación futuras.....	60
BIBLIOGRAFÍA.....	62

Indice de Tablas

	Pág.
CAPITULO 1.	
Tabla 1.1. Ejemplos de estrés por ozono en áfidos.....	13
CAPITULO 2.	
Tabla 2.1. Tasas de crecimiento per cápita de la población de áfidos en plantas de rúcula y tomate, del comienzo al punto máximo, según las diferentes densidades iniciales.....	37
Tabla 2.2. Concentraciones de tbars ($\mu\text{M/g.hoja}$) y trap ($\mu\text{M/g.hoja}$) para diferentes combinaciones de tiempo de duración de pre-exposición a herbivoría y posterior infestación por áfidos.....	43
CAPITULO 3.	
Tabla 3.1. Efecto de la exposición a ozono (O_3) y a herbivoría por áfidos sobre el crecimiento de plantas de rúcula determinado por split-plot ANOVA.....	60
Tabla 3.2. Índice TRAP: potencial antioxidante total ($\mu\text{M/g.hoja}$), registrado en las plantas de rúcula a los 5 días y a los 10 días desde la siembra.....	61

Indice de Figuras

CAPITULO 1.

- Figura 1.** Relación entre la agresividad del herbívoro, la susceptibilidad del hospedador (planta) y los factores ambientales..... 6
- Figura 1.2.** Diagrama modelo de señales generadas en respuesta a la exposición de ozono y al ataque por áfidos en plantas de tomate. Inducción o modulación positiva del proceso. Inducción o modulación débil..... 15

CAPITULO 2.

- Figura 2.1.** Crecimiento de una población de áfidos a partir de distintas densidades iniciales en plantas de tomate y de rúcula 26
- Figura 2.2.** Dinámica temporal del verdor de las hojas en plantas de tomate infestadas originalmente con 2 áfidos, con 8 áfidos iniciales y con 32 áfidos iniciales..... 27
- Figura 2.3.** Relación tallo/raíz de plantas de tomate y rúcula con poblaciones de áfidos de distinta densidad inicial..... 28
- Figura 2.4.** **A.** N° de áfidos alcanzado en las plantas según diferentes densidades de infestación previa. **B.** N° de áfidos alcanzado en las plantas según diferentes duraciones de las infestaciones previas. **C.** N° de áfidos alcanzado en todos los tratamientos según el momento de la infestación: inmediatamente, al día o a los tres días después de la remoción de los áfidos. 30
- Figura 2.5.** Crecimiento de poblaciones de áfidos originadas de individuos provenientes de poblaciones con diferentes densidades iniciales y tiempos de permanencia..... 32

CAPITULO 3.

Figura 3.1. Foto del sistema experimental que asemeja las condiciones ambientales naturales y recrea ambientes con aumentos posibles en la concentración de ozono.....	39
Figura 3.2. Foto de las plantas de rúcula luego de los diferentes tratamientos.....	41
Figura 3.3. Daño causado por la infestación de áfidos y exposición a ozono, estimado como porcentaje del tejido verde remanente (media + SE).	42
Figura 3.4. Infestación por áfidos, exposición a O ₃ y áfidos + O ₃ modularon la relación de la biomasa tallo/raíz de las plantas de rúcula.	43
Figura 3.5. Crecimiento de la población de áfidos en ambientes con alto O ₃ y libres de O ₃	45
Figura 3.6. El efecto del ozono sobre el crecimiento de la población de áfidos. Los áfidos fueron expuestos a condiciones con ozono o con aire filtrado libre de ozono y luego transferidos a plantas control.....	46

CAPITULO 4.

Figura 4.1. Representación esquemática de diferentes escalas de organización en la interacción planta-O ₃ -herbívoro, modificada (Paul y col 2000). En la progresión de las interacciones “río abajo” desde los procesos iniciales de reconocimiento, hasta la respuesta en toda la planta, la herbivoría y el O ₃ tienen una progresiva disminución en el grado de especificidad de la respuesta.....	51
Figura 4.2. Interacciones entre los componentes del sistema. (a) Efecto del herbívoro sobre la planta. (b) Respuesta de la planta contra el herbívoro. (c) Efecto del O ₃ sobre la planta.....	52
Figura 4.3. 24 experimentos publicados sobre los efectos de exposición a O ₃ en el desarrollo de las poblaciones de áfidos.....	53
Figura 4.4. Modelo teórico a escala de metapoblación. Representa un sistema de parches heterogéneo según exposiciones a O ₃ y herbivoría, con dinámica migratoria y con variaciones de la población de áfidos.....	59

Abreviaturas

i.e.: es decir

e.g.: por ejemplo

ES: error estándar

F: valor de la tabla F de Snedecor

O₃: ozono

ROS: especies de oxígeno reactivas

HR: respuesta de hipersensibilidad

SA: ácido salicílico

JA: ácido jasmónico

PR: respuesta a patógenos

SAR: resistencia sistémica adquirida

LAR: resistencia local adquirida

TBARS: sustancias reactivas al ácido tio-barbitúrico

TRAP: potencial antioxidante total

OTCs: Cámaras abiertas arriba (open top)

Ppb: partes por billón

UBA: Universidad de Buenos Aires

Resumen

Una de las consecuencias de la actividad humana en zonas densamente pobladas es la contaminación atmosférica, que genera condiciones propicias para la acumulación de ozono (O_3) en la troposfera. Se plantea la necesidad de comprender el efecto de los contaminantes atmosféricos sobre las interacciones entre las plantas y sus plagas. En esta tesis se caracterizaron las respuestas de las plantas a la infestación con áfidos. Se estudió cómo se modifican dichas respuestas en ambientes con diferente grado de contaminación por O_3 y sus consecuencias sobre la dinámica poblacional de los insectos. Las plantas de rúcula y tomate fueron capaces de desarrollar defensa inducida por la infestación de áfidos, la que fue desarticulada por una alta infestación de insectos o por infestaciones prolongadas. En ambas especies, la tasa de crecimiento poblacional de áfidos fue proporcional al aumento de densidad inicial, lo que sugiere que la población de insectos no tuvo un control denso-dependiente. El crecimiento de las poblaciones cesó a distintas densidades, posiblemente por la acción de mecanismos relacionados con el balance oxidativo en la planta huésped. El O_3 produjo disminución en el tejido verde mientras que no se detectaron cambios relacionados con la infestación de áfidos, aunque el daño por O_3 fue menor en las plantas infestadas con áfidos que en el control. Sin embargo, la alometría y el tamaño de las plantas fueron sensibles a ambos factores, disminuyéndose principalmente la biomasa de las raíces y la biomasa total de las plantas. El crecimiento de la población de áfidos en ambientes libres de O_3 disminuyó en un 50 % cuando los áfidos provenían de plantas que habían sido expuestas a ozono. El balance entre la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS) y la capacidad antioxidante de la planta parece haber sido determinante en estas interacciones. La herbivoría indujo la síntesis de alta concentración de antioxidantes, que varió a lo largo del experimento. Asimismo la exposición al O_3 afectó el balance de los antioxidantes, creando una dinámica con aumentos y reducciones menores a los inducidos por los áfidos. La dinámica del balance de antioxidantes fue diferente cuando los factores de estrés actuaron simultáneamente, manteniéndose en valores bajos con una tendencia a aumentar en el tiempo. Los resultados de esta tesis permiten concluir que el impacto del O_3 sobre el crecimiento de la población de áfidos va a depender del orden de exposición de las plantas a los factores de estrés. La capacidad de infestación dependerá de la impronta en los áfidos de las condiciones previas y del estado oxidativo de la planta a colonizar. En consecuencia, la probabilidad de epidemias estará determinada por la heterogeneidad de los parches, la historia de los individuos y de la dinámica de migraciones de los insectos.

Palabras claves: ozono troposferico, contaminación del aire, cambio climático, herbivoría, áfidos, interacción y resistencia.

Abstract

In densely populated zones one of consequences of human activity is the atmospheric pollution by different routes, which generate conditions for the ozone (O₃) accumulation in the troposphere. There is a need to understand the effects of atmospheric pollution on the interactions between plants and their plagues. This thesis studies the eco-physiological responses of plants to herbivore insects (aphids) in environments with different degree of pollution by O₃ and the consequences on the insect population. Both tomato and arugula plants developed induced defenses to aphid infestation, which was neutralized by high level or long-term infestations. Growth rate of aphid population was proportional to initial density, suggesting a lack a density-dependence regulation. Population growth stopped at different densities, possibly by the action of oxidative balance in the host plant. Ozone produced a decrease in green tissue, while no changes related to aphid infestation were detected. However ozone damage was lower in aphid infested plants. Plant biomass and allometry were sensible to both stress factors, which mainly decreased root biomass. Aphid population growth in ozone-free environments decreased 50 % when aphids came from ozone-exposed plants. Balance between reactive oxygen species (ROS) production and antioxidant capacity of the plant seem to have determined the above interactions. Herbivory induced high concentration of antioxidants, which varied with time. Ozone also affected oxidative balance, and determined a dynamic oxidative balance which remained lower than that induced by aphids. When both stressors acted simultaneously oxidative balance was lower than that produced by each factor separately, and increased with time. These results lead to the conclusion that impact of ozone on aphid population growth will depend on the order of exposure. Aphid ability to infest new plants will depend on their previous history and the oxidative balance of the new plant. As a consequence the probability of occurrence of epidemics will be determined by patch heterogeneity, history of individual insects and migration dynamics.

Keywords: tropospheric ozone, air pollution, climate change, herbivory, aphid performance, interaction, resistances.

CAPITULO 1

1. Introducción general

1.1. Antecedentes

El crecimiento de la población humana y el aumento resultante en el uso de los recursos se sustenta en diferentes actividades como la agricultura, la industria, la pesca y el comercio internacional (Vitousek y col. 1997). El cambio en el uso de la tierra debido a las actividades agrícolas altera la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas y la interacción con la atmósfera, constituyendo una fuente importante de cambios ambientales como son: a) la contaminación de las aguas y suelos por la acumulación de agroquímicos, b) la erosión y disminución de la fertilidad de los suelos y cambios en la tasa de regeneración de los mismos, c) dependencia de combustibles fósiles para fertilización de cultivos y tracción de maquinaria, d) la reestructuración de los bioecosistemas y e) la alteración de la química reactiva de la troposfera. El uso de nitrógeno y fósforo como fertilizantes ha ido aumentando a una tasa del 5% anual, alterando de esta manera los ciclos de los mismos (Cox y Atkins 1979; Vitousek y col. 1997). Las prácticas de fertilización generan importantes pérdidas de nitrógeno y fósforo desde los agroecosistemas, tornándose en fuente de contaminación de las napas de agua. Por su parte, el aumento de las tareas relacionadas con el control de plagas, fue facilitado por el uso de subsidios derivados de la energía fósil (Cox y Atkins 1979). La combustión de productos vegetales y de combustibles de origen fósil a altas temperaturas (en los motores de automóviles), o la acumulación-fermentación de necro-masa o la desnitrificación de fertilizantes orgánicos o inorgánicos, genera condiciones propicias para la acumulación de ozono (O₃) en la troposfera, la capa de la atmósfera más cercana a la tierra (Jacob y Wofsy 1988; Vitousek 1992).

Una de las respuestas esperadas en los agro-ecosistemas con el aumento de los cambios en el uso de la tierra son las epidemias de plagas herbívoras (Fuhrer 2003). Dentro de las plagas agrícolas más serias, los áfidos constituyen una preocupación ya que la mayoría de los cultivos son hospedantes de por lo menos una de las especies de áfidos (Blackman y Eastop 2000).

En la actualidad una proporción de la agricultura mundial, y casi la totalidad de la agricultura intensiva, se practica en el ambiente de los paisajes peri-urbanos y urbano-rurales (Forman 1995). En estos lugares la densidad de la población humana alcanza valores superiores a los 50 habitantes por km². Una de las consecuencias de la actividad humana en zonas densamente pobladas es la contaminación atmosférica por diferentes vías. Los cinturones que rodean a las grandes ciudades son importantes núcleos de producción hortícola, por su cercanía a los centros de consumo. Una de las principales zonas productoras en la Argentina, es el cinturón verde de Buenos Aires - La Plata. Esta es una de las zonas con mayor densidad de población del país, y por lo tanto con mayor contaminación atmosférica (Aramendia y col. 2000).

Actualmente la concentración de O₃ en esta región no revela niveles alarmantes para la salud. Sin embargo, se encuentra en un continuo aumento en la troposfera (Ashmore 2002), convirtiéndose en el componente principal de la contaminación del aire. Se trata de un contaminante secundario, es decir que no es emitido directamente a la atmósfera sino que se forma a partir de una reacción fotoquímica de sustancias precursoras tales como: óxidos de nitrógeno e hidrocarburos producidos por diferentes actividades humanas y compuestos orgánicos volátiles (Finlayson-Pitts y Pitts 1997). Las concentraciones medias actuales de O₃ en la tropósfera son de 2 a 5 veces mayores que en el siglo pasado (Sandermann y col. 1998), debido a la intensificación de las actividades industriales, agrícolas, generación de energía y quemado de bosques. Además, las emisiones naturales pueden tener un gran impacto. Los hidrocarburos biogénicos emitidos por la vegetación, especialmente isoprenos y terpenos, son importantes para la formación de O₃ (Hewitt y Street 1992). La concentración de este gas en áreas urbanas y en áreas rurales de regiones industrializadas es mayor que la encontrada en regiones apartadas de la actividad antropogénica. Modelos recientes predicen que la concentración de O₃ continuará en aumento a una tasa anual de 1-2 % (Vinzargan 2004).

La molécula de O₃ es un poderoso oxidante, el tercer átomo de oxígeno tiene una gran tendencia a separarse de la molécula de O₃ y a combinarse con otros elementos químicos, oxidándolos. Altos niveles de O₃ pueden potencialmente causar efectos deletéreos en la productividad no solo de los agro-ecosistemas sino también de los sistemas naturales, cuyas consecuencias socioeconómicas son aún desconocidas (Fiscus y col. 2005).

Existe una gran cantidad de información respecto a las bases moleculares y fisiológicas de las plantas en respuesta al O₃ (Noctor 2006; Foyer y Noctor 2005) y al ataque de insectos herbívoros (Bruxelles y col. 2001; Gatehouse 2002). Estudios recientes han comenzado a analizar el perfil de la expresión génica inducida por diferentes vías de señales, encontrando puntos en común a nivel de transcripción en respuesta a ambos factores de estrés (Ellis y col. 2002; Tamaoki y col. 2003; Van Wees y col. 2003; Zhu-Salzman Bi y col. 2005; Thompson y Goggin 2006). Sin embargo, la información recopilada sobre las respuestas de las plantas a la combinación de factores de estrés, como

son el ozono y la herbivoría, es escasa y a veces con resultados contradictorios, tanto a nivel individual como poblacional.

La falta de conocimiento sobre como los organismos responden a múltiples factores de estrés, ha originado la creencia que se puede extrapolar el conocimiento desde el nivel molecular al nivel ecológico. Sin embargo, al intentar extrapolar las observaciones sobre respuestas al ambiente del nivel molecular a los sistemas ecológicos aparecen tres problemas fundamentales:

1. *Los procesos ecológicos ocurren por la interacción de sistemas complejos que no puede ser explicada simplemente describiendo el funcionamiento de genes individuales. A escalas más altas de organización biológica aparecen propiedades emergentes que no pueden ser predichas desde el análisis molecular de una especie aislada.*

En los sistemas biológicos se pueden identificar mecanismos que actúan en un nivel de complejidad y que pueden ser relevantes para los procesos que se evidencian en el nivel siguiente. Por ejemplo, los métodos moleculares pueden indicar y en algunos casos, identificar genes que subyacen los caracteres relevantes a nivel ecológico, proporcionando nuevas herramientas para responder las preguntas ecológicas. Algunos trabajos examinaron los cambios en el transcriptoma en respuesta al ataque de herbívoros y patógenos. Van Wees y col. (2003) examinó la respuesta de plantas de *Arabidopsis* frente a la infección de un hongo patógeno (*Alternaria brassicicola*). Las plantas mostraron una dramática respuesta a la infección dentro de las 12 hs. tiempo en el que no se observaron lesiones visibles y la respuesta permaneció por más de 36 hs, sin evidencias visuales. Cuando se comparó con un perfil de expresión del mismo laboratorio en respuesta a la infección con *Pseudomonas syringae* (Glazebrook y col. 2003) y siendo evidente que ambos patógenos pueden considerarse como estímulos diferentes, encontraron genes inducidos en común. Los autores sugieren que los mecanismos que controlan las respuestas de defensa actúan similarmente en respuesta a diferentes patógenos. Comprender la implicancia en toda la planta de los cambios en el transcriptoma requiere cuidadosa atención en los patrones espacio-temporales de inducción y en la interpretación de los datos que muestran diferentes factores inductores de los mismos genes, como evidencia de interacción entre ellos. A nivel ecológico la interpretación de los síntomas en la planta no podrá explicar el mecanismo desencadenado “río arriba”.

La genética ecológica, que intenta ser una fusión entre la ecología y la biología molecular, ha comenzado identificando genes de relevancia ecológica y evolutiva para entender la distribución y las interacciones entre organismos en tiempo y espacio y para predecir cómo las poblaciones responden a los cambios en el medioambiente (Jackson y col. 2002). Una de las técnicas usadas para poner en evidencia los procesos moleculares que están operando en los procesos ecológicos es el uso de microarreglos. Los microarreglos proveen una perspectiva integrada de las respuestas de las plantas a múltiples factores de estrés (por ejemplo, niveles de agua o nutrientes, herbivoría, contaminantes,

etc.). Los microarreglos pueden ser usados para examinar cambios en la expresión de los genes en paralelo y por lo tanto permiten explorar la respuesta a múltiples factores (Casteel y col. 2008). Más aún, los mecanismos bioquímicos de la síntesis de compuestos, con consumo de energía y los de degradación, con liberación energética, pueden utilizarse para explicar el crecimiento de los órganos y tejidos y éstos, para explicar el crecimiento individual. Sin embargo, a mayor escala, aparecen propiedades emergentes que no pueden predecirse desde un análisis molecular o fisiológico de una simple especie. Por esta razón los procesos que se observan a cada nivel de complejidad (por ejemplo crecimiento poblacional) no podrían ser completamente adjudicados a un mecanismo de un nivel inferior (por ejemplo desregulación de un grupo de genes o tasa de fotosíntesis), ya que el incremento en complejidad en el sistema resulta en nuevas propiedades, como las interacciones entre individuos (Jackson y col. 2002). Es por ello que los procesos y respuestas características de los individuos que conforman una población no permiten hacer inferencias del comportamiento poblacional, ni tampoco las propiedades de las poblaciones que conforman una comunidad describen su comportamiento. Esto crea problemas relacionados no solo con las escalas de observación sino con las técnicas analíticas. En los sistemas experimentales es común aislar factores y demostrar mecanismos de respuesta que luego se utilizan para hacer inferencias sobre los procesos y respuestas en los sistemas superiores. Por ejemplo, se realizan experimentos para verificar los efectos del O₃ sobre los órganos o sobre los individuos vegetales y animales aislados. Es poco probable que de los resultados observados se puedan hacer inferencias sobre la interacción entre los órganos cuando conforman el individuo o de la comunidad, cuando el animal se alimenta de una planta. Por ello es necesario estudiar los procesos en varios niveles simultáneamente. En este sentido, la respuesta al O₃ del sistema planta herbívoro puede resolverse estudiando al mismo tiempo variables causales, mecanismos y procesos en niveles hacia abajo y hacia arriba del de nuestro interés.

2. *El uso de especies modelo.*

La biología molecular utiliza un conjunto de especies modelos por ej. *Escherichia coli* o *Arabidopsis thaliana*, que fueron seleccionadas por las aplicaciones moleculares de sus características (facilidad de crecimiento en laboratorio, características de su genoma, etc.) y en las cuales no pueden representarse muchos procesos y estructuras de los organismos bajo estudio, con estrategias ecológicas muy diferentes, incluidas las de defensa.

3. *Condiciones experimentales de los estudios de nivel fisiológico o molecular.*

Los caracteres importantes para el *fitness* y que son modificados por factores de estrés muchas veces son estudiados en condiciones de laboratorio, muy diferentes a los ambientes que moldearon su evolución fenotípica. Esto se

convierte en un problema debido a que el efecto de la expresión de los genes sobre el fitness depende del ambiente en que se expresan. Por ejemplo, mutaciones que pueden parecer inocuas en un ambiente de laboratorio benigno, podría ser detrimental en la naturaleza.

Una solución a este problema es sin duda aplicar técnicas moleculares a plantas crecidas en el campo, en las mismas condiciones en que se realizaron los experimentos a nivel ecológico. Esta práctica se llevó a cabo en el desarrollo de esta tesis ya que la elección del sistema adecuado será de crucial importancia para la extrapolación de los resultados.

En síntesis para determinar si el aumento en la concentración de compuestos oxidantes en la troposfera puede inducir respuestas plásticas en las plantas, generando fenotipos más resistentes a un segundo factor de estrés oxidativo, es necesario combinar estudios ecológicos con métodos moleculares, pero eligiendo un sistema de estudio apropiado y considerando los estudios moleculares bajo las condiciones ambientales experimentales de los estudios ecológicos (Figura 1.1). Solo de este modo será posible la generalización de las predicciones con el cambio de escala (Hatcher y col. 2004).

Estudiar los efectos de un ambiente oxidante sobre las respuestas de las plantas contribuirá a la resolución de los problemas ambientales crecientes generados por el hombre, que producen daño oxidativo fuera del contexto de los factores naturales (Sih y col. 2004). Las reacciones inducidas por algún estrés parecen cambiar el estado de la planta ya sea aumentando la resistencia o la susceptibilidad al siguiente factor de estrés (Holopainen 2002). Resulta claro que debemos concebir y conducir nuevos experimentos para predecir con efectividad como se alterarán las relaciones planta-herbívoro con un aumento en los niveles de ozono troposférico en un futuro cercano.

El *objetivo* de este capítulo es 1) examinar la utilidad del conocimiento sobre el intercambio de información entre vías de señales (o “crosstalk”) (Taylor y col. 2003) inducidas en la planta por ozono y herbívoros succionadores (áfidos) a nivel fisiológico-molecular para predecir interacciones a nivel ecológico, es decir el grado de dependencia de la concentración de ozono de la respuesta de la planta a los herbívoros y las consecuencias sobre el fitness de las poblaciones de plantas e insectos y 2) derivar a partir de ese análisis las hipótesis exploradas en esta tesis.

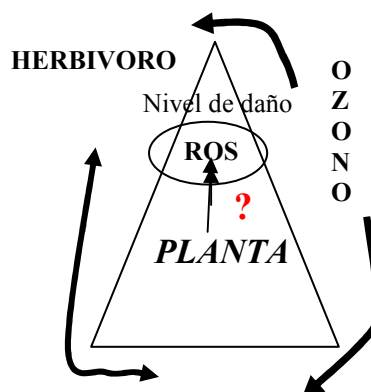


Figura 1.1: Relación entre la agresividad del herbívoro, la susceptibilidad del hospedador (planta) y los factores ambientales (e.g. nivel de O₃) con el daño en la planta.

1.1.1. Mecanismos de respuesta inducidos en las plantas por la exposición a ozono

La molécula de O₃ posee la capacidad de modificar ciertos procesos fisiológicos en las plantas tales como la asimilación de dióxido de carbono (Benton y col. 2000). El O₃ difunde desde la atmósfera al mesófilo de la hoja a través de los estomas, una vez que accedió al fluido del apoplasto que rodea a las células, interactúa con el agua y con otros componentes celulares. Este proceso depende de factores físicos, químicos y biológicos que involucran la transición entre la fase gaseosa a la fase líquida dentro de las células. En la fase líquida, el O₃ actúa como productor de radicales libres. Grimes y col. (1983) y Heath (1987) demostraron que una vez dentro de la hoja el O₃ es rápidamente convertido en compuestos reactivos de oxígeno (ROS) en las células de las plantas sensibles a O₃, como radical hidroxilo (OH[•]), radical anión superóxido (O₂^{•-}) y peróxidos de hidrógeno (H₂O₂). Los compuestos oxigenados son altamente reactivos con las moléculas biológicas y se refleja claramente en la apariencia de las hojas (Grimes y col. 1983). Una vez formados los ROS, pueden ser neutralizados en la pared celular o pueden reaccionar con compuestos celulares hasta inducir una respuesta a nivel génico en la planta (Pell y col. 1997; Sandermann y col. 1998).

La activación rápida del metabolismo oxidativo inmediatamente después de la exposición al factor de estrés se denomina “explosión oxidativa”. Esta respuesta es una característica común en las plantas y un evento detectable en forma temprana (Bruxelles y Roberts 2001; Scheel 2002) que ocurre frente a factores de estrés de origen tanto biótico como abiótico, por ej. la contaminación del aire y del suelo, el aumento de la radiación UV-B o lluvia ácida, la herbivoría por insectos o el ataque por patógenos. Aunque la activación de una explosión oxidativa es una reacción general característica de las plantas sensibles a O₃, se desconoce la razón por la cual el tipo predominante de ROS difiere entre especies, aún cuando las plantas son

expuestas al gas bajo las mismas condiciones (Wohlgemuth y col. 2002). Cuando la concentración de ROS en las células de la planta aumenta, estos compuestos pueden reaccionar con componentes de la pared celular y de la membrana plasmática (Cross y col. 1998; Wohlgemuth y col. 2002), provocando una reducción en la tasa de fotosíntesis y senescencia prematura de las hojas (Holopainen 2002).

Las plantas han adquirido un eficiente sistema de reparación que contrarresta las acciones de oxidación a través de la producción de antioxidantes no enzimáticos, principalmente el ácido ascórbico, glutatión, compuestos fenólicos y antioxidantes enzimáticos, tales como superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa (Noctor y Foyer 1998), lo que provee una protección importante contra el daño oxidativo, ya que remueve las ROS generadas por el O₃ (Luwe y col. 1993). Por ejemplo en el poroto la tolerancia al ozono está asociada con elevados niveles de ácido ascórbico en la hoja (Burkey y Eason 2002). En tomate y tabaco la tolerancia al O₃ está relacionada con una baja acumulación de peróxido de hidrógeno en la zona perinerval (Wohlgemuth y col. 2002).

Cuando se produce un desbalance entre la generación de ROS y la producción de antioxidantes resulta un estado metabólico que frecuentemente es referido como estrés oxidativo (Baier y col. 2005). Los ROS producidos oxidan los componentes celulares tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, pudiendo iniciarse una cadena de reacciones que alteran la función celular. Esta activa explosión oxidativa continúa luego de concluida la exposición a O₃ (Kangasjärvi y col. 2005). Frecuentemente se encuentran respuestas relativamente similares a la fumigación con O₃ al comparar diferentes especies de plantas (Baier y col. 2005). La magnitud del efecto del O₃ sobre las plantas puede variar dependiendo de diversos factores como la especie de planta, el estadio de crecimiento, la disponibilidad de agua, luz o CO₂, que afectan la conductancia de la hoja, y por lo tanto el acceso del O₃ al tejido foliar (Fuhrer 2003), la producción de antioxidantes (Velikova y col. 2005) y la concentración y tiempo de duración de la exposición a O₃ (Darrall 1989; Heagle y col. 1991; Pleijel y col. 1997).

Las lesiones provocadas por el O₃ en las plantas podrían ser causadas por la activación de procesos de muerte celular programada, similar al colapso rápido de las células observado luego de un ataque por patógenos, conocido como respuesta de hipersensibilidad (HR) (Langebartels y col. 2002; Rao 2000). Esta respuesta de defensa parece estar mediada por varias moléculas, como el ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno. Principalmente hay un aumento en la producción y una rápida acumulación de SA. La muerte celular gatilla la producción de etileno requerida para una continua producción de ROS, la cual es responsable de propagar la muerte celular. El etileno y SA amplifican la señal oxidativa mientras que el JA contrarresta el daño por O₃ (Kangasjärvi y col. 2005). El aumento de la concentración del SA celular activa la expresión de productos relacionados con la defensa a patógenos, conocido como proteínas PR (Pathogen Related, Scheel 2002; Baier y col. 2005) (Figura 1.2). Parece lógico pensar entonces, que la formación de ROS inducida por el O₃ podría servir como una señal de alarma general que conduzca a la muerte celular (apoptosis), y a la expresión de los genes de defensa (Rao y col., 2000). La exposición a O₃ y al ataque por patógenos no

solamente podrían inducir la síntesis de SA a pocas horas del comienzo de la exposición, sino que también existiría una correlación entre la acumulación de SA con el aumento de la resistencia a la infección por ciertos patógenos, sugiriendo que el O₃ puede disparar las vías de transducción de señales que son activadas durante la HR (Sharma y col. 1996; Yalpani 1994).

1.1.2. Mecanismos de respuesta inducidos en las plantas por el ataque de herbívoros

Las defensas de las plantas inducidas por el ataque de insectos pueden resultar en la producción de metabolitos secundarios, proteínas de defensa, que actúan contra los atacantes directamente *i.e.* inhibidores de proteasas y/o indirectamente, a través de la atracción de enemigos naturales (Karban y Baldwin 1997; Gatehouse 2002). Las diferentes vías de respuesta inducidas en las plantas (Findantsef y col. 1999) y los genes activados por el ataque de herbívoros están fuertemente correlacionados con el modo de herbivoría y el grado de daño del tejido en el sitio donde se alimentan. Los insectos masticadores, tales como las orugas, causan un daño extenso en el tejido y activan las vías de señalización a través de la herida mientras que los insectos succionadores del floema producen un daño pequeño en el tejido de la planta, y posiblemente sea percibido como el daño causado por microorganismos patógenos (Walling 2000). Estos insectos conducen a la estimulación de las vías de respuesta asociadas tanto a la infección por patógenos como a las heridas.

Los áfidos son insectos herbívoros, succionadores, generalistas y se encuentran entre las principales plagas de cultivos. Causan daños en las plantas debido a la succión de savia y a la acción tóxica de las secreciones salivales. Previo a alcanzar el floema, los estiletes se mueven a través de espacios intercelulares de las células del mesófilo. Una vez localizado el sitio de alimentación, pueden usarlo desde horas a semanas. Los efectos que producen son diferentes a los provocados por otras clases de insectos (Bruxelles y Roberts 2001; Kessler y Baldwin 2002). Los áfidos penetran el tejido de la planta con el estilete a través de las capas celulares epidérmicas y del mesófilo y se alimentan translocando foto-asimilados de los elementos del floema (Pollard 1972); al mismo tiempo pueden liberar una batería de enzimas hidrolíticas. Esta combinación de traumas físico-químicos es posiblemente similar al daño que se produce inicialmente durante la penetración de una hifa fúngica y muy diferente del efecto sobre las células causado por los insectos masticadores (Findantsef y col. 1999).

Sin embargo, la información disponible acerca de las respuestas inducidas en la planta es escasa y contradictoria. Se sabe que la alimentación vía floema resulta en la estimulación de vías de señales que también son estimuladas por exposición a O₃ y al ataque por patógenos (Chisholm y col. 2006; Mudgett, 2005). Por ejemplo, al igual que en las interacciones planta-patógeno, la defensa contra el áfido del trigo (*Diuraphis noxia* Mordvilko) está

acompañado por la producción de ROS. Estas ROS inducen la acumulación de SA celular y disparan la expresión de las proteínas PR (Botha y col. 2006). También se observó la expresión de los genes de las proteínas PR relacionadas a la vía dependiente del SA en plantas de tomate expuestas al áfido *Macrosiphum euphorbiae* (Findantsef y col. 1999), y en *Arabidopsis* expuestas al áfido verde del duraznero, *Myzus persicae* (Moran y Thompson 2001). Sin embargo, la inducción de las respuestas dependientes del SA no genera resistencia contra los áfidos, en contraposición a lo que ocurre luego del ataque por patógenos frente a una nueva infestación de los mismos.

Por otra parte, algunas especies de plantas atacadas por áfidos muestran respuestas asociadas a los insectos masticadores tales como un incremento en los niveles del mRNA que codifica para lipoxigenasa, una enzima inducida por las heridas, cuya producción involucra la cascada de señalización JA (Reymond y col. 2000). Ellis y col. (2002) demostró que la vía de señal de JA aumenta la resistencia al áfido *Myzus persicae*, en un mutante de *Arabidopsis*. Pero, los niveles de SA y JA se encuentran inversamente correlacionados entre las vías de resistencia sistémica (Felton y col. 1992 y Walling 2000); la muerte celular SA-dependiente continúa hasta que el JA limita la propagación de la lesión (Rao y col. 2000), (Figura 1.2). Aparentemente algunos áfidos son capaces de suprimir la biosíntesis de JA a través del aumento de producción de SA (Zhu-Salzman y col. 2005). De hecho, la observación que los áfidos promueven tanto la inducción de los genes regulados por SA como por JA se contradice con las observaciones descriptas donde el SA puede efectivamente inhibir la producción de JA, inducida en casos de heridas, y a la promoción de la expresión de los genes de JA (Kessler 2002). Es decir, la alimentación por áfidos podría evitar la estimulación de ciertas defensas de la planta. Además, se producen cambios en los componentes del floema volviéndolos nutritivamente mas ventajosos para los mismos áfidos (Zhu-Salzman y col. 2005).

El conocimiento actual sugiere que existen más vías de señales involucradas en el ataque por áfidos (aparte de las dependientes de SA – JA y etileno), que interactúan en caminos complejos (“crosstalk molecular”) (Botha y col. 2006). Entonces, no resultaría sorprendente que exista una variedad de respuestas a la herbivoría por áfidos en plantas expuestas a altas concentraciones de O₃.

1.1.3. Interacción del sistema de defensa frente a ozono y a los herbívoros que se alimentan del floema

Se ha sugerido que es posible predecir el resultado de “crosstalk” a nivel de organismo y población entre las respuestas a los áfidos y la exposición a O₃ basándonos solamente en el conocimiento de cómo interactúan los mecanismos de señalización a nivel molecular. En algunos casos, la extrapolación desde el nivel genético hasta el nivel de organismo depende de unos pocos estudios que han intentado superar la brecha entre la fisiología molecular y la ecología.

Varios estudios sugieren que los áfidos son uno de los grupos de insectos más sensibles en términos de respuesta de las plantas al estrés por contaminación del aire (Docherty y col. 1997). Sin embargo, las observaciones sobre el desarrollo de las poblaciones de áfidos en plantas expuestas a O₃ han mostrado resultados muy variables. A través de las vías de SA, JA y etileno, la respuesta a O₃ y al ataque por áfidos tienen puntos en común, pero no existe evidencia que demuestre que las plantas son capaces de distinguir el daño hecho por exposición a O₃ del daño producido por insectos o patógenos, y como responden a las diferentes amenazas. Por este motivo resulta difícil predecir si las respuestas a O₃ y a áfidos serán antagónicas o sinérgicas exponiendo a las plantas a ambos factores de estrés de manera secuencial (Bostock 2005).

El crecimiento de las poblaciones de insectos en plantas expuestas a O₃ no muestran una tendencia clara ya que en ciertos casos su tamaño poblacional ha aumentado y en otros ha disminuido respecto de las poblaciones crecidas en plantas bajo condiciones libre de O₃ (Holopainen 2002). Por lo tanto, es difícil predecir la respuesta de los insectos frente a los aumentos en la concentración de O₃, ya que puede ser positiva, negativa o nula en las mismas especies, dependiendo de las condiciones experimentales. Una posible fuente de variabilidad, no solamente en la dirección sino también en la magnitud de los resultados observados, podría ser el peso diferente de los efectos *directos* o *indirectos* del O₃ sobre los insectos i.e. los insectos pueden responder no solamente a la acción directa de la exposición O₃ sino también indirectamente a través de los cambios morfológicos y fisiológicos de la planta, como resultado de la exposición de las mismas al contaminante (Tabla 1.1).

Existe información que indica que los efectos del O₃ sobre los áfidos son principalmente indirectos, a través de cambios en la calidad de la planta hospedadora, especialmente en la fuente de alimento de los áfidos, la savia del floema. Los cambios en el tamaño de las poblaciones de áfidos expuestas a ozono también han sido explicados por una lignificación temprana de tallos nuevos, inducido por un elevado nivel de O₃ o por una re-localización del nitrógeno hacia los tejidos dañados, aumentando la cantidad de aminoácidos libres en el floema (Holopainen 2002). El nitrógeno soluble es un factor importante en determinar la calidad nutricional de las plantas para los herbívoros. De acuerdo con Larsson (1989), los áfidos parecen responder más positivamente que otros insectos a los aumentos en las concentraciones de nitrógeno soluble mediado por las plantas. Sin embargo, la lignificación de los tallos jóvenes, la liberación de alelo-químicos y un aumento en la concentración de nitrógeno soluble en el floema pueden afectar a los áfidos de diferente forma según el estado nutricional de las plantas, lo que aumenta la dificultad en realizar predicciones sobre la interacción de las respuestas a ambos factores de estrés.

Siguiendo la misma línea de pensamiento, Bostock (2005) estudió los mecanismos que determinan las interacciones mediadas por las plantas, entre planta-patógenos y planta-herbívoros. Este autor observó que cuando las hojas del roble eran infectadas con el hongo *Microsphaera alphitoides*, la población de los áfidos declinaba dramáticamente, por lo cual se concluyó que las defensas de la planta inducidas por el hongo afectaban negativamente a los áfidos (efecto indirecto). Dada la superposición de las respuestas a ciertos

patógenos y al ozono es posible extrapolar estas conclusiones a la interacción O₃ - herbívoro: altos niveles de O₃ pueden desencadenar respuestas de defensa que afecten indirectamente a los áfidos y reduzcan su tamaño poblacional (efecto indirecto) (Stout y col. 1999).

No obstante, otros estudios presentaron dos hipótesis alternativas para explicar los resultados observados sin incluir el efecto de las respuestas de la planta. Primero, el hongo podría potencialmente usar el mismo recurso nutritivo que el herbívoro, resultando en una disminución de la población debido a la competencia. Segundo, el hongo por sí mismo podría producir toxinas influenciando negativamente a los herbívoros (efecto directo). Del mismo modo, se ha sugerido que el O₃ puede reducir el ataque por herbívoros por afectar directamente las tasas de mortalidad y natalidad, a partir de una excesiva cantidad de radicales libres producidos en un ambiente oxidante que puede llegar a ser tóxicos para los herbívoros (Stout 1998). Además, Mondor (2005) mostró que los cambios atmosféricos en la concentración de O₃ pueden alterar directamente no sólo el tamaño de la población general, sino también las frecuencias genotípicas y fenotípicas de las poblaciones de áfidos. Distintas tolerancias a O₃ de áfidos de diferentes genotipos suma una considerable complejidad al estudio de los efectos directos del O₃ sobre las poblaciones de áfidos. Son necesarios más trabajos para separar claramente los efectos directos de los indirectos sobre los áfidos expuestos a O₃ y de este modo resolver las contradicciones que existen en los estudios que muestran efectos opuestos.

Por otro lado, considerando la respuesta individual de los áfidos a niveles elevados de O₃ no se puede predecir la respuesta a nivel poblacional. Los intentos por elevar de escala las respuestas de desarrollo a corto plazo de los individuos insectos a los efectos del nivel poblacional no han sido fructíferos. Por ej. Awmack (2004) no detectó ningún efecto de altos niveles del O₃ a escala de organismo individual, mientras que encontró un fuerte efecto positivo sobre las tasas de crecimiento poblacional o fecundidad potencial. Así mismo, la expresión de diferentes rasgos de defensa en las plantas debería estudiarse en diferentes niveles de complejidad (organismo y población), como vía para entender los cambios en el *fitness* que pueden desarrollar las plantas como consecuencia de las interacciones entre factores de estrés bióticos y los contaminantes del aire.

Frente a estas consideraciones en las respuestas de las plantas, no podemos pensar que las bases mecánicas de respuestas tanto a O₃ como a los áfidos, bastarán para entender la complejidad de las interacciones ecológicas entre ambos factores de estrés. Por ejemplo, el impacto de la ontogenia de las plantas sobre la sensibilidad a O₃ está mediado por la eficiencia de la fotosíntesis neta, la conductancia y densidad estomática así como la actividad de la Rubisco y el contenido de nutrientes foliares (otros que N) (Heagle 1991).

Más aún, debido a la inherente variabilidad temporal y espacial del O₃ troposférico, es difícil generalizar si son las exposiciones crónicas o las agudas las que impactan más a las plantas en el campo. Bajo un conjunto particular de condiciones estacionales, puede ser uno u otro. Las metodologías de exposición encontradas en la literatura difieren ampliamente y el rango de las exposiciones varía desde exposiciones crónicas relativamente suaves durante varios días, semanas o toda la estación de crecimiento hasta exposiciones agudas de pocas horas a pocos días (Fiscus y col. 2005). La intensidad y la frecuencia de

exposición tanto a la herbivoría como al O₃ deberían ser importantes en determinar el resultado del *crosstalk* a nivel de toda la planta. En la naturaleza, tanto el ataque por insectos como la presencia de altos niveles de contaminación por O₃ son episódicos. El ataque por insectos y la contaminación del O₃ troposférico varía en frecuencia e intensidad en tiempo y espacio (Benton y col. 2000). Existen estudios que tratan los factores que controlan estos patrones a nivel de parche, pero no hay información sobre la co-variación de los mismos. Por ejemplo, son necesarios altos niveles de radiación para producir O₃ troposférico (Vinzargan 2004), el cual puede en alguna región ser también determinante del ataque por insectos (Stout y col. 1999). En este caso, la correlación entre el aumento del O₃ y el aumento de la herbivoría puede ser casual y no tener relación con la respuesta de las plantas; ya que altas densidades de herbívoros pueden encontrarse también en áreas de alta radiación (Mazza 2002). Pero como se mencionó anteriormente, en algunos casos los áfidos expuestos a altos niveles de O₃ pueden tener un crecimiento poblacional negativo (Holopainen 2002).

Otra fuente de variabilidad en la respuesta al O₃ es el orden de exposición a los factores de estrés, es decir, exposición simultánea o secuencial a ambos factores de estrés. Con factores de estrés biótico y abiótico actuando de manera simultánea o muy cercanamente, no se espera que aparezcan efectos aditivos por solapamiento del mecanismo de explosión oxidativa. El SA aumenta luego de la exposición a O₃ y del ataque por áfidos amplificando la señal oxidativa producida por estos eventos (Langebartels y col. 2002; Zhu-Salzman y col. 2004). Los síntomas de daño podrían resultar principalmente de una exposición continua al contaminante. Por otro lado, si el O₃ entra a la planta una vez que se indujo la explosión oxidativa por los áfidos, se activa la respuesta de protección antioxidante por lo que el daño oxidativo podría estar reducido y los efectos debidos al contaminante podrían aparecer solamente a niveles muy altos o con exposiciones crónicas de las plantas.

Tabla 1.1. Ejemplos de estrés por ozono en áfidos

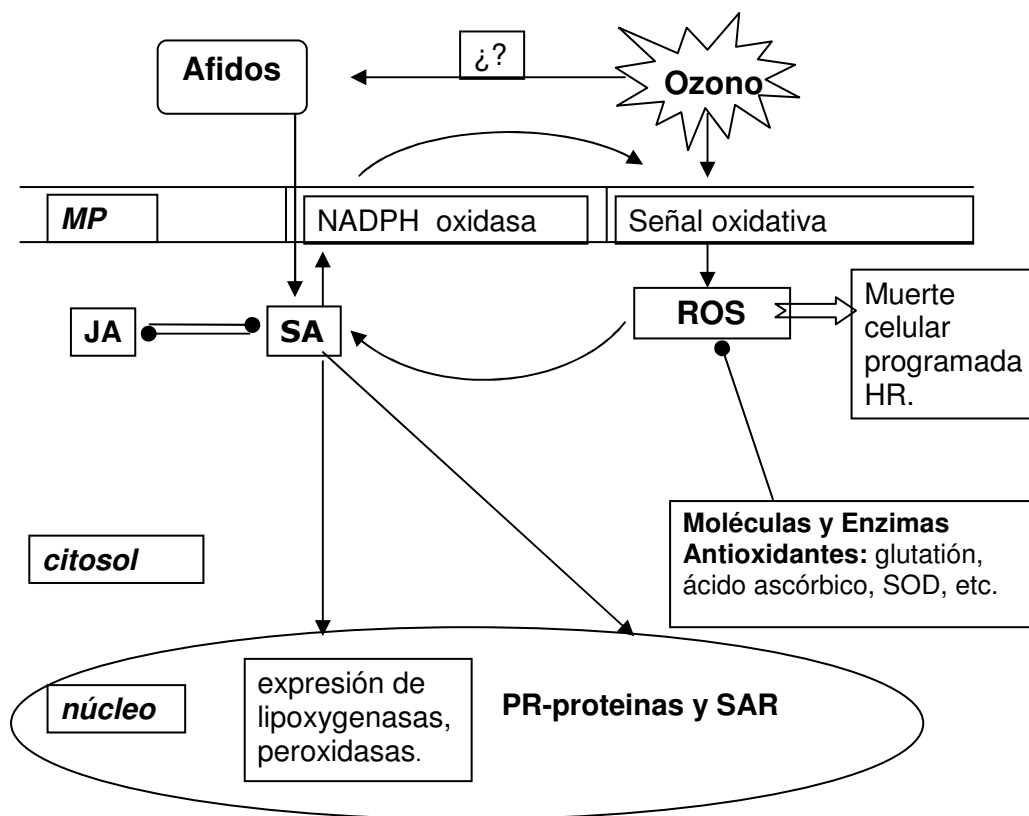
	Especies de Afidos	Efectos observados en plantas	Efecto observado sobre áfidos- posible explicación	Tipo de efecto de estrés en áfidos	Bibliografía
<u>Nivel Ecológico</u>	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Aumento de producción de ROS	Disminuye el crecimiento poblacional-toxicidad ROS	Directo	Stout y col. 1998
	<i>Chaitophorus stevensis</i>	Cambios en la química de las plantas	Aumenta la habilidad de dispersión-calidad y cantidad de feromonas	Indirecto	Mondor y col. 2004
	<i>Cinara pilicornis</i>	Cambios en la asignación de biomasa.	Disminuye/aumenta crecimiento poblacional-temperatura/duración de exposición	Indirecto	Docherty y col. 1997
	<i>Cinara pilicornis</i>	Re-asignación de nitrógeno, lignificación temprana de tallos	Disminuye el crecimiento poblacional-peor calidad de alimento	Indirecto	Holopainen 2002
<u>Nivel Evolutivo</u>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Sin evaluar	Frecuencias genotípicas alteradas-ambiente oxidante	Directo	Mondor y col. 2005
	<i>Myzus persicae</i>	Frecuencia genotípica alterada	Frecuencias genotípicas alteradas-evolución planta hospedadora	Indirecto	Zamoum y col. 2005

En resumen, tenemos que considerar que las respuestas de las plantas a los efectos combinados de ambos factores de estrés no están basadas en una cadena de señalización lineal, sino en complejas redes que interactúan a su vez

sobre un rango de niveles (Hatcher y col. 2004). Las implicancias de tales redes para la interacción planta-O₃-insecto en el campo, permanecen sin ser exploradas. Existe suficiente información sobre las respuestas a O₃ y al ataque de áfidos para inferir que las interacciones de “crosstalk” ocurren a nivel molecular. Las respuestas están reguladas por una red común de vías de transducción de señales interconectadas (Figura 1.2). Sin embargo, está menos claro cómo la exposición de las plantas a O₃ influye en la respuesta sistémica al ataque de insectos y vice-versa (crosstalk ecológico). Un aspecto central a tener en cuenta entonces, es la dinámica espacial y temporal de las respuestas inducidas en las plantas por los herbívoros. Los procesos de inducción no son irreversibles y no se expresan de forma uniforme en toda la planta. En este sentido los estudios moleculares han demostrado que las respuestas de las plantas son extremadamente dinámicas, cambiando en términos de horas o días (Reymond y col. 2000). Luego del ataque las defensas aumentarán y volverán a caer a lo largo de diferentes escalas de tiempo. Asimismo, la defensa a distintos factores de estrés muestra distintos patrones espaciales de inducción. Por lo tanto, luego de la inducción la planta se transforma en un mosaico de tejidos con diferentes patrones que cambian con el tiempo. Tanto los patrones espaciales y temporales de inducción pueden volverse aún mas complejos en respuesta a múltiples factores, de lo que ha sido considerado un “calidoscopio mas que un mosaico” (Hatcher y col 2004)

Por lo tanto, si una perspectiva molecular ha de ser extrapolada al campo, podemos hipotetizar que las defensas de las plantas serán extremadamente dinámicas, en periodos de tiempo relativamente cortos. Esto nos lleva a predecir que el perfil de respuestas de defensa específico de una planta en un momento determinado será una función de la secuencia y de la combinación de los atacantes o factores de estrés que ha experimentado en el último tiempo. Más aún, potencialmente otros factores del ambiente como el O₃ pueden influir en las respuestas de defensa añadiendo una complejidad extra. Es por eso que para adquirir una integración ecológica de lo que conocemos a nivel molecular sobre respuestas inducidas, por una combinación de factores de estrés como puede ser la herbivoría y el O₃, se requerirá de estudios que abarquen un rango de escalas tanto espaciales (desde dentro de la hoja hasta entre plantas) como temporales (desde pocas horas a varias generaciones). Este método de estudio nos permitirá entender los posibles cambios en las poblaciones de plagas agrícolas frente a los cambios ambientales globales.

En esta tesis se estudian las relaciones entre hospedador y herbívoro en distintos niveles de ambiente oxidante, teniendo como marco el modelo de interacciones de la figura.1.2.



Menéndez y col. 2009

Figura 1.2. Diagrama modelo de señales generadas en respuesta a la exposición de ozono y al ataque por áfidos en plantas de tomate. Inducción o modulación positiva del proceso. Inducción o modulación débil. SA: ácido salicílico, JA: ácido jasmónico ROS: especies de oxígeno reactivas, SAR: resistencia sistémica adquirida HR: respuesta de hipersensibilidad, SOD: superóxido dismutasa, MP: membrana plasmática.

1.2. Modelo de estudio: interacción planta-herbívoro

Mi modelo de estudio se compone principalmente de plantas de *Eruca sativa* (P. Mill.) comúnmente conocida como “rúcula” en Argentina o “arugula” o “garden rocket” en Estados Unidos y varios países de Europa, perteneciente a la familia de *Brassicaceae*. El volumen de comercialización de rúcula ha aumentado significativamente en los últimos años (www.mercadocentral.com.ar). La rúcula es producida en los cinturones hortícolas y como producto destinado al mercado interno alcanzó un total de 4.421,3 kg. en el año 2004 (SENASA 2005). La rúcula es una especie susceptible al O₃ (Madkour y Laurence 2002). Es cultivada en otoño-inverno-primavera, aunque se puede extender también al verano. Además, se trata de un cultivo propicio para la cría de áfidos, en especial de *Myzus persicae*. La

facilidad de cultivar rúcula especialmente en invierno, y su susceptibilidad a los áfidos, hacen de esta especie un cultivo apropiado para contestar las preguntas planteadas en esta tesis. El herbívoro que utilizó en los ensayos es el áfido *Myzus persicae*, cuyo nombre vulgar es el pulgón verde del duraznero. También se utilizó otro modelo de estudio compuesto por plantas de tomate (*Solanum lycopersicon* Mill) y el áfido *Macrosiphum euphorbiae*. El tomate es la hortaliza más difundida por todo el mundo y la de mayor valor comercial. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio (www.infoagro.com). Las plantas de tomate son comúnmente atacadas por el áfido *M. euphorbiae*, el cual está considerado plaga del tomate, de hecho las colonias utilizadas en los experimentos se obtuvieron por infestación natural.

1.3. Objetivos e hipótesis generales

El objetivo general de la tesis es estudiar el impacto de ambientes oxidantes, generados por las altas concentraciones de O₃ troposférico, sobre las respuestas fisiológicas y el daño por herbivoría en especies de interés agronómico.

Los objetivos particulares de esta tesis son:

- 1- Caracterizar las respuestas de las plantas al ataque de áfidos, estudiando el efecto del tiempo e intensidad de infestación sobre el crecimiento de la población de áfidos y las infestaciones posteriores.
- 2- Estudiar como la exposición a dosis variables de ozono afecta la defensa a la herbivoría en plantas susceptibles al O₃.
- 3- Evaluar los cambios en la población de herbívoros, dentro de una misma generación, como consecuencia de la exposición a O₃.

Dentro del marco teórico previamente desarrollado y a partir de los objetivos surgió el planteo de las siguientes hipótesis:

a) Las plantas pueden activar una respuesta de defensa inducida por áfidos, semejante a la estimulada por la infección por patógenos. Estas defensas pueden afectar al crecimiento de una población de áfidos en una infestación posterior, dependiendo de la intensidad y del tiempo de la pre-infestación.

b) Altos niveles de ozono troposférico producen cambios en la respuesta inducida por insectos en las plantas por lo que se espera que el daño por herbivoría sea menor en ambientes enriquecidos con O₃ que en ambientes libres de O₃ y que las plantas con una exposición previa a O₃ presenten menor infestación por áfidos que las plantas sin exposición previa a O₃.

c) La exposición a altos niveles de ozono reduce la tasa de crecimiento poblacional de los herbívoros sensibles al O₃, como los áfidos. Los áfidos expuestos a altos niveles de O₃ tendrán un menor crecimiento poblacional, i.e. menor tamaño de colonias, menor densidad de áfidos por planta, que si no hubieran sido expuestos a un ambiente oxidante. Por otro lado, la población de áfidos con una exposición previa de O₃ tendrá un crecimiento menor que los que no fueron expuestos al contaminante.

1.4. Estructura de la tesis

La tesis consta de cuatro capítulos. En este capítulo introductorio se presentó el marco teórico y los antecedentes que motivaron los objetivos de la tesis, así como también el sistema de estudio a utilizar para alcanzar dichos objetivos. Además se realizó una revisión crítica de la literatura de los efectos del ozono sobre los componentes del sistema y sobre la interacción planta-herbívoro, discutiendo las discrepancias entre los resultados y las principales implicancias a nivel ecológico.

El capítulo dos caracteriza las respuestas inducidas en las plantas frente al ataque por áfidos, teniendo en cuenta la intensidad, el tiempo de infestación y los compuestos inducidos. Además estudia la influencia de una infestación previa de áfidos sobre un ataque posterior y la capacidad de infestación de los áfidos según las condiciones de procedencia.

El capítulo tres estudia cómo se modifica la respuesta a la herbivoría en un ambiente con alta contaminación por ozono. En particular se tiene en cuenta la importancia del orden de exposición a los factores de estrés.

Por último, en el capítulo cuatro se discute la importancia de los resultados obtenidos en la tesis en el marco teórico presentado en la introducción general, resaltando los aportes teóricos y prácticos al estado del conocimiento de la relación ozono-planta-áfido. En este capítulo se discuten también, líneas futuras de investigación originadas a partir de esta tesis.

CAPITULO 2

2. Caracterización de las respuestas de las plantas al ataque de áfidos

2.1. Introducción

Los áfidos son insectos herbívoros generalistas y se encuentran entre las principales plagas de la agricultura. Se caracterizan por un crecimiento poblacional extremadamente rápido y poseen gran importancia ecológica y agronómica (Thaler 1999). Producen daños en los cultivos a través de la remoción de foto-asimilados y la transmisión de numerosos virus nocivos para las plantas (Smith 2007). Algunos trabajos han aportado datos sobre los mecanismos involucrados en los procesos de colonización áfido-planta hospedadora (Dugravot 2007). Una vez elegida la planta hospedadora, estos insectos mantienen una interacción prolongada con su hospedador causando un daño directo en el tejido de la planta con su estilete (Walling 2000) e induciendo respuestas en la planta tanto a nivel local como sistémico (Dugravot 2007). A su vez, el sondeo de los áfidos debe estar influenciado por los cambios químicos en el contenido de la savia o por los cambios fisiológicos inducidos por la saliva de los mismos (Ponder y col. 2001).

Tradicionalmente el centro de estudio de la relación planta-áfido ha sido la manera de alimentación de los áfidos (Montllo y col. 1983; Hays y col. 1999) y los cambios químicos inducidos en la planta por el ataque de los mismos (Dorschner y col. 1987; Cabrera y col. 1995; Gianoli y Niemeyer 1997), otorgándole una atención creciente a los efectos de la saliva de los áfidos debido a que activan respuestas de defensa únicas en la planta (Miles 1999; Felton y Eichenseer 2000). Sin embargo, existe muy poca información sobre la dinámica de la infestación de plantas, su relación con la aparición de síntomas de daño y de los posibles efectos de las respuestas inducidas por los

áfidos sobre el crecimiento de su propia población incluyendo la capacidad de colonizar plantas nuevas.

El pulgón verde del duraznero (*M. persicae*) afecta a varios cultivos (Sauge y col. 2006) y es la peste más importante en cultivos de rúcula (*Eruca sativa* Mill.) en Argentina (Andorno y col. 2007). El daño que produce por la succión de fotoasimilados resulta en hojas arrugadas y enrolladas, en la reducción del tamaño de las plantas y en la excreción de savia desde el floema (“honeydew”) encima de la superficie de las hojas. Esto puede llegar a matar a la planta en estadios tempranos. Además, las hojas contaminadas con la presencia de los áfidos, mudas o “honeydew”, generalmente no pueden ser comercializadas (Webb 2004). Por su manera de alimentarse los áfidos inducen resistencia a la herbivoría, i.e. un cambio en la planta provocado por el daño efectuado por el herbívoro, que disminuye la preferencia del mismo o su desempeño durante un ataque futuro (Karban y Myers 1989). La resistencia inducida a la herbivoría, que resulta de las respuestas de las plantas al daño, reduce la supervivencia, reproducción y preferencia de los herbívoros por su hospedador. Se sabe poco sobre la especificidad de dichas respuestas inducidas en las plantas, o sea, cual es el rango de especies afectadas por una respuesta dada (Stout y col. 1998). Además, la información disponible sobre resistencia inducida se refiere principalmente a insectos masticadores que dañan las hojas en forma extensiva en las plantas infestadas (Nombela y col. 2008), pero es poco lo que se conoce sobre la inducción de resistencia a insectos succionadores del floema, tales como los áfidos. Sauge y col. (2006) ha medido el éxito del pulgón verde del duraznero en plantas previamente infestadas por un co-específico comparando con plantas control no infestadas usando diferentes genotipos de duraznero (*Prunus persicae*). La respuesta a la herbivoría fue variable dependiendo si los genotipos eran susceptibles o resistentes al ataque por áfidos. Es poco claro cuales son los factores o condiciones que determinan si el ataque de los áfidos redundará en un aumento de la tolerancia o susceptibilidad del hospedador. Para comprender y caracterizar las respuestas de las plantas a ésta y otras especies de áfidos es necesario evaluar no solo parámetros de las plantas hospederas, sino además la dinámica poblacional de los insectos en la planta y sus posibilidades de colonización de nuevos hospedantes luego de permanecer por periodos variables en una planta. El reconocimiento del ataque del áfido por los receptores de la planta es seguido por una cascada de señales de respuesta de defensa que inducen resistencia en la planta contra los insectos. Esta respuesta involucra varias moléculas o compuestos secundarios inducidos por el organismo que la consume y a su vez genera resistencia contra otros agresores (Agrawal y col. 1999).

Los mecanismos bioquímicos y fisiológicos de defensa activados en las plantas por los áfidos, se parecen a las respuestas disparadas por algunos agentes químicos o patógenos (Nombela y col. 2008). Los áfidos inducen un conjunto de genes fuertemente relacionados al perfil de genes inducidos por patógenos (Felton y Eichenseer 2000; Stout y col. 1999; Walling 2000; Hunter 2000). Por ejemplo, trabajos en tres especies vegetales como cebada (Forslund y col. 2000), tomate (Fidantsef y col. 1999) y *A. thaliana* (Moran y Thompson 2001) han demostrado que durante la interacción planta-áfido se induce la formación de proteínas de defensa (PR) y la producción de especies reactivas

de oxígeno (ROS), típicos de la respuesta contra patógenos (Moran y col. 2002).

Especies de áfidos como *M. euphorbiae* y *Myzus persicae* son potentes inductores de las proteínas PR, mediante la vía dependiente del ácido salicílico (SA) (Fidantsef 1999). Se documentó que infestaciones con el áfido *Macrosiphum euphorbiae* inducen resistencia a la mosca blanca *Bemisia tabaci*, en plantas de tomate susceptibles (Nombela 2008), pero se desconoce si estas proteínas tienen alguna influencia en la resistencia contra los propios áfidos. El SA promueve el desarrollo de la resistencia inducida o adquirida que puede expresarse en forma sistémica (resistencia sistémica adquirida o SAR), o confinarse solamente a las partes infestadas de la plantas (resistencia local adquirida o LAR). Estas reacciones están frecuentemente asociadas con la muerte de un pequeño número de células en el sitio donde se produjo la infección, conocida como “respuesta de hipersensibilidad” (HR), lo que provoca necrosis localizada o sistémica en el tejido de las hojas de los cultivos (Ryan y col. 1990). Uno de los eventos tempranos durante la respuesta de HR es la generación de ROS. Estas ROS inducen una matriz de genes de defensa y protección celular que inicia el colapso de la célula desafiada (Moloi y col. 2006). Las ROS atacan los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos causando peroxidación lipídica, desnaturalización proteica y mutaciones, por lo que las plantas poseen un sistema para detoxificar estas moléculas reactivas (Gómez y col. 2004). Las acciones de oxidación por las ROS son contrarrestadas en las plantas a través de un eficiente sistema de reparación mediado por la producción de antioxidantes no enzimáticos, principalmente el ácido ascórbico, glutatión y compuestos fenólicos, y antioxidantes enzimáticos, tales como superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa (Noctor y Foyer 1998), lo que provee una protección importante contra el daño oxidativo, ya que remueve las ROS en el apoplasto (Luwe y col. 1993). En plantas de repollo (*Brassica oleracea*) los niveles de los compuestos antioxidantes cambian en respuesta al ataque por áfidos, por ej.: el nivel de ácido ascórbico aumenta durante la infestación. Sin embargo también se registra un aumento en la peroxidación lipídica (Khattab 2007). Esto sugiere que la alimentación de los áfidos resulta en estrés oxidativo en la planta: aumentaría la peroxidación lipídica, se estimularía la producción de ROS lo cual causa oxidación y un subsecuente daño de las membranas de las células del hospedador. En este caso la capacidad antioxidante de la planta resulta insuficiente para neutralizar las ROS resultantes del estrés biótico (Khattab 2007). En forma similar al efecto sobre las plantas las ROS producidos en los mecanismos de defensa en respuesta a los áfidos pueden tener efectos directos adversos sobre los tejidos del intestino medio de los insectos (Smith y Boyko 2007). Los insectos han desarrollado varios mecanismos de defensa hacia los radicales de oxígeno libres, en respuesta a las propiedades pro-oxidantes de las plantas. Entre estos, las enzimas más importantes son las enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, encargadas de remover radicales oxígeno libres, derivados de fuentes endógenas y exógenas. Se conoce muy poco a cerca de su actividad en los áfidos (Lukasik 2007).

En este capítulo se presentan estudios orientados a caracterizar la respuesta inducida por *M. persicae* y *M. euphorbiae* en plantas de dos especies

hortícolas (rúcula y tomate respectivamente), a través de diferentes parámetros como:

- la variación en los síntomas en la planta
- el tamaño y el peso de órganos de la planta
- el crecimiento poblacional de los áfidos y su relación con las variaciones en la concentración de productos generados en la inducción de defensas en los tejidos de la planta.

Las respuestas inducidas se evaluaron registrando el impacto de la densidad inicial de áfidos y de diferentes condiciones de pre-infestación sobre el crecimiento poblacional de los áfidos mismos y sobre su capacidad para colonizar nuevas plantas.

2.1.1 Objetivos particulares de cada experimento

Primer experimento

1. Estudiar los cambios en el tamaño de poblaciones de *Macrosiphum euphorbiae* y *Myzus persicae* respecto de la densidad de infestación inicial y la relación entre la dinámica de aparición de síntomas de daño en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*).
2. Evaluar y cuantificar modificaciones en las plantas por el efecto de diferentes intensidades de herbivoría.

Segundo experimento

1. Estudiar el efecto de diferentes densidades y tiempos de exposición a la herbivoría sobre el crecimiento poblacional de los propios áfidos.
2. Analizar el daño oxidativo y el potencial antioxidante inducido según la dinámica de infestación.

Tercer experimento

1. Estudiar el crecimiento poblacional de colonias de áfidos provenientes de poblaciones con diferentes densidades y tiempos de exposición a la herbivoría.

2.2. Materiales y métodos generales

Para realizar los experimentos se utilizaron plantas de tomate (*S. lycopersicum*) y de rúcula (*Eruca sativa*). Se sembraron semillas en macetas plásticas de 1 litro, de modo de obtener una planta por maceta para ambas especies vegetales. El sustrato consistió en una mezcla de tierra fértil, arena y turba (50:25:25). Las plantas se mantuvieron en invernáculo bajo ciclo día-noche e intensidad de luz natural y condiciones de temperatura controladas (20 - 26°C).

Los áfidos se obtuvieron por colonización natural sobre las plantas de tomate y rúcula. Los mismos eran de las especies *M. euphorbiae* y *M. persicae* respectivamente. Las colonias de áfidos fueron mantenidas en las plantas sembradas y se añadían plantas nuevas semanalmente reemplazando a las más viejas y dañadas, para favorecer el mantenimiento de las colonias. Cada experimento fue repetido dos veces. El análisis de los datos se realizó con el programa Infostat Profesional, Argentina (versión 2008).

2.2.1 Primer experimento: Infestación de plantas de tomate y rúcula con diferentes densidades de áfidos

Procedimiento experimental

Para estudiar el efecto de diferentes densidades y tiempos de exposición a la herbivoría sobre el crecimiento poblacional de los áfidos se realizaron estudios en cultivos de tomate y rúcula. Se seleccionaron plantas de tomate y de rúcula a las que se les asignó un tratamiento al azar. Los mismos consistieron en distintas cargas de infestación inicial con cuatro repeticiones cada uno:

- T₀: 0 áfidos
- T₁: 2 áfidos
- T₂: 8 áfidos
- T₃: 32 áfidos

Los experimentos difirieron en la época del año en que se realizaron: en plantas de tomate se realizó a principios del mes de septiembre y en plantas de rúcula en diciembre.

De las colonias de áfidos se aislaron hembras adultas, las mismas se dejaron larviponer durante 24 horas. Luego se trasladaron todas las ninfas necesarias para realizar el experimento a las plantas seleccionadas para cada tratamiento. Las ninfas se colocaron en plantas de tomate sobre la hoja ubicada

debajo de la primera hoja expandida y sobre las hojas de las plantas de rúcula. Cada tratamiento se mantuvo totalmente aislado del resto mediante una cobertura de voile, con el objetivo de evitar la migración de áfidos alados entre plantas. Se contabilizó diariamente el número total de áfidos en cada planta y los datos se analizaron con un Anova de medidas repetidas en el tiempo.

Para evaluar la dinámica de aparición de los síntomas se monitoreó el verdor de las hojas de cada planta utilizando un M-Spad 502 (origen Japón) a lo largo del experimento y los datos se analizaron con un Anova de medidas repetidas. Las modificaciones en las plantas se cuantificaron a través del peso seco de la biomasa de cada unidad experimental. Además, se calculó la relación tallo/raíz según los diferentes tratamientos.

2.2.2 Segundo experimento: Plantas de rúcula con diferentes pre-tratamientos de infestación

Plantas y áfidos

Para estudiar el efecto de la densidad inicial de áfidos y el tiempo de exposición a la herbivoría sobre el crecimiento poblacional de los propios áfidos, se diseñó un experimento con los siguientes factores: densidad inicial, duración de infestación previa, y tiempo transcurrido antes de la re-infestación. Plantas de rúcula de dos semanas de edad se ubicaron en un invernáculo bajo condiciones de luz natural y temperatura media de 24 °C. Las plantas fueron asignadas al azar a los diferentes tratamientos, con 5 réplicas cada uno.

El procedimiento experimental comenzó con los tratamientos de infestación previa colocando áfidos en una hoja de cada planta de la siguiente manera:

- a) infestación con 2 áfidos iniciales durante 24 o 72 horas.
- b) infestación con 10 áfidos iniciales durante 24 o 72 horas.
- c) control, sin infestación

Durante el periodo de infestación previa los insectos se dejaron reproducir libremente y una vez finalizado este periodo, los áfidos fueron cuidadosamente removidos con un pincel. Las plantas correspondientes a cada tratamiento de infestación previa fueron separadas y asignadas al azar a uno de los tres tratamientos de re-infestación: inmediatamente, a las 24 y a las 72 hs de finalizada la infestación previa. Estas plantas se infestaron con 5 áfidos adultos transferidos manualmente a una hoja nueva expandida, que se dejaron reproducir libremente. Luego de 18 días se contabilizó el número de áfidos sobre las plantas previamente infestadas por un co-específico y se las comparó con las plantas control.

Análisis del daño oxidativo y producción de antioxidantes

Se cosechó un conjunto de plantas de rúcula una vez finalizados los tratamientos de infestación previa con áfidos, con el objetivo de determinar el daño oxidativo y la producción de antioxidantes en las mismas al momento de ser re-infestadas. Las plantas cosechadas fueron colocadas inmediatamente en nitrógeno líquido y trasladadas a un freezer a -80°C , donde se mantuvieron hasta su análisis.

Se estudiaron dos parámetros de estrés oxidativo:

La reacción en cadena que ocurre durante la oxidación lipídica conduce principalmente a la formación de peróxidos, y productos secundarios como aldehídos. Una forma de evaluar el daño producido por peroxidación lipídica es a través de una técnica colorimétrica denominada TBARS, (Yagi 1976) que reconoce un producto directo de la peroxidación, el malondialdehído. También, se puede estimar el potencial antioxidante en las hojas de las plantas de rúcula infestadas mediante la técnica de TRAP (Lissi 1992). Este método permite conocer la cantidad de radicales libres que quedan atrapados en una muestra que contiene antioxidantes. Estas técnicas han sido exitosamente utilizadas en nuestros análisis.

1. Sustancias reactivas al ácido tio-barbitúrico (TBARs).

Aplicando una técnica colorimétrica por la cual el ácido tiobarbitúrico se une a un producto directo de la peroxidación lipídica, el malondialdehído (MDA), y forma una base de Schiff con un pico de absorción a 532 nm (Yagi 1976).

2. El potencial antioxidante total en las hojas (TRAP).

Para evaluar el estado antioxidante de una muestra se utiliza el método del potencial de atrapar radicales (TRAP) desarrollado por Wayner y col. 1985. El índice TRAP representa la capacidad antioxidante total de una muestra. Se basa en mediciones de tiempo de inducción en la oxidación de lípidos expuestos a una fuente de radicales libres producidos a una tasa constante, en condiciones aeróbicas. Mide la tasa de oxidación a través de la disminución en la concentración de oxígeno. Los radicales libres que reaccionan con los antioxidantes de la muestra son medida de la cantidad de antioxidantes presentes en la misma (método de Lissi y col. 1992).

2.2.3 Tercer experimento: Desarrollo poblacional de áfidos provenientes de poblaciones con diferente densidad inicial.

Plantas y áfidos

Se utilizaron plantas de rúcula de 3 semanas de edad. Los tratamientos consistieron en dos densidades y duración de infestación con áfidos con 5 repeticiones cada uno:

1. Alta: 50-100 áfidos durante 72 o 24 hs
2. Baja: 2-10 áfidos durante 72 o 24 hs

En ambos casos los áfidos se reprodujeron libremente. Luego se tomaron 5 áfidos de cada uno de estos tratamientos y se colocaron sobre plantas libres de herbivoría donde se contabilizó el número de áfidos todos los días, durante 11 días.

Los datos se analizaron mediante un Anova de medidas repetidas en el tiempo.

2.3. Resultados

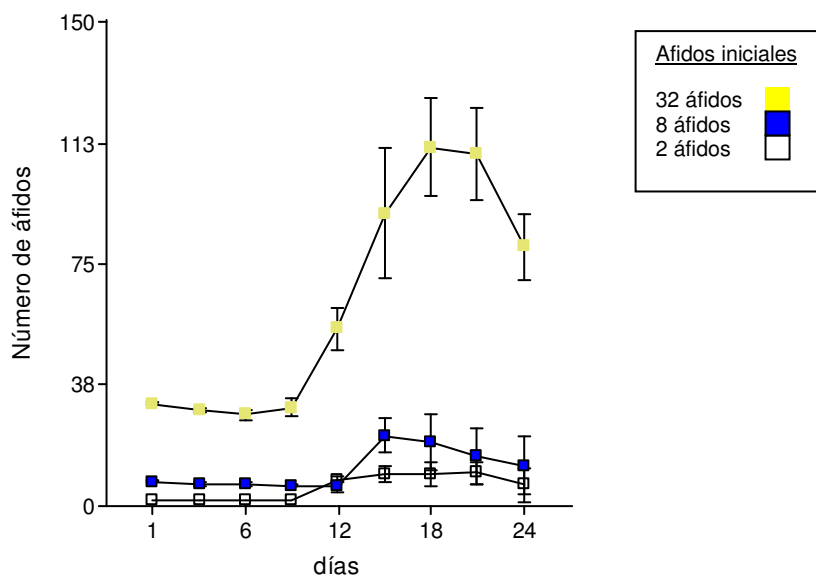
2.3.1 Infestación de plantas de tomate y rúcula con diferentes densidades de áfidos

En todas las plantas del experimento el número de insectos durante la primera semana no se modificó o mostró una leve tendencia a decrecer debido a la falta de reproducción y a la muerte de algunos individuos. Los primeros neonatos aparecieron al final de la primera semana y posteriormente el lugar de mayor concentración de áfidos fueron las hojas basales amarillentas.

La dinámica de crecimiento de la población de áfidos en plantas de tomate y rúcula fue similar (Figura 2.1). En ambos casos el tamaño poblacional máximo alcanzado y la velocidad con que crecía la población estuvo fuertemente regulada por número de áfidos con que inicialmente se infestaron las plantas (Figura 2.1). En las plantas de tomate el crecimiento de la población de áfidos fue positiva hasta alrededor de los 18 días, después de los cuales la población detuvo su crecimiento. En cambio en las plantas infectadas con un número menor de áfidos, el tamaño poblacional tuvo poco cambio o comenzó a decrecer a partir del día 12. Tanto en las plantas de tomate como las de rúcula la población de áfidos alcanzó un tamaño significativamente mayor ($P=0.0001$) y tuvo una tasa de crecimiento per cápita mayor cuando fueron infestadas inicialmente con mayor número de áfidos (Tabla 2.1). Sin embargo la población de áfidos sobre tomate creció durante un tiempo menor y a menor tasa de crecimiento per cápita que sobre las plantas de rúcula (Tabla 2.1).

Por otra parte, el efecto de la densidad de áfidos sobre las plantas de tomate fue muy reducido. Si bien el verdor de las hojas basales disminuyó con el tiempo de tratamiento de infestación, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos de densidad en este parámetro (Figura 2.1), en la biomasa de las plantas (dato no mostrado), ni en la relación tallo /raíz (Figura 2.3.A). En cambio las densidades iniciales menores de áfidos provocaron una disminución significativa en el tamaño de la raíces de las plantas de rúcula (mayor relación T/R) (Figura 2.3.B).

A.



B.

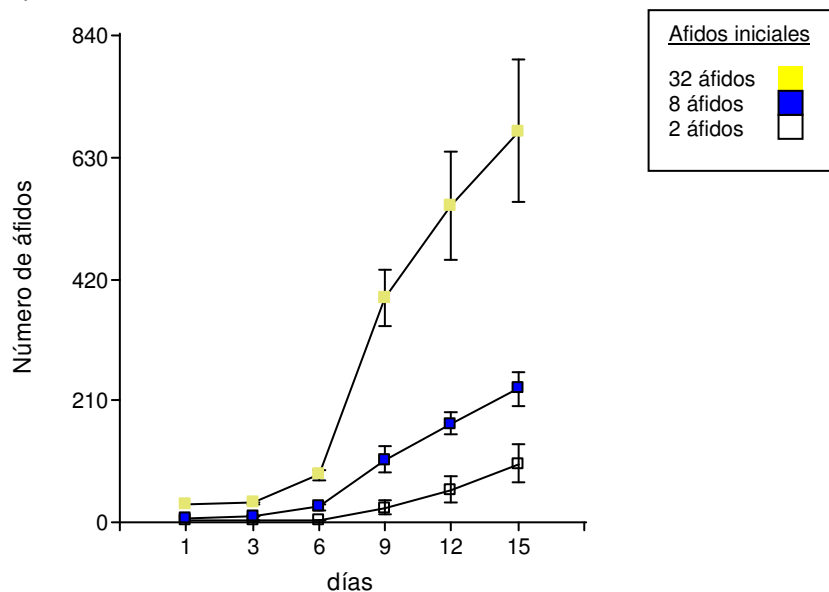


Figura 2.1. Crecimiento de una población de áfidos a partir de distintas densidades iniciales en plantas de tomate (A) ($P=0.0001$) y de rúcula (B) ($P=0.0002$), (media + SE, $n=5$).

Tabla 2.1. Tasas de crecimiento per cápita de la población de áfidos en plantas de rúcula y tomate, del comienzo al punto máximo, según las diferentes densidades iniciales. Letras diferentes $P < 0.05$, entre tratamientos de la misma especie de planta.

Afidos iniciales	Tasa de crecimiento de <i>M. euphorbiae</i> en tomate	Tasa de crecimiento de <i>M. persicae</i> en rúcula
2	2.30	4,57
8	3,22	5,29
32	4,52	6,27

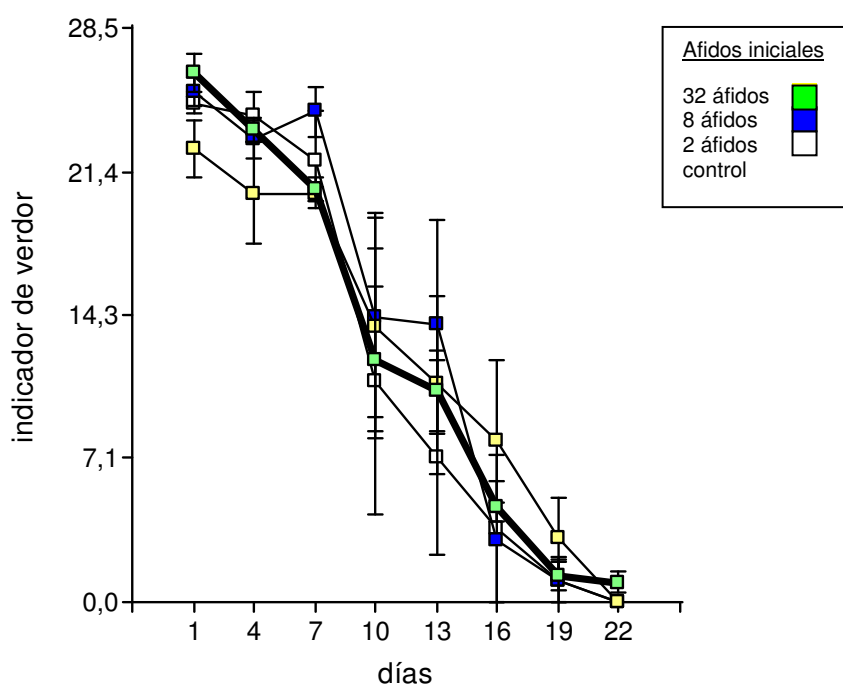


Figura 2.2. Dinámica temporal del verdor de las hojas en plantas de tomate infestadas originalmente con 2 áfidos, con 8 áfidos iniciales y con 32 áfidos iniciales, respecto del tratamiento control, (media + SE, n=5).

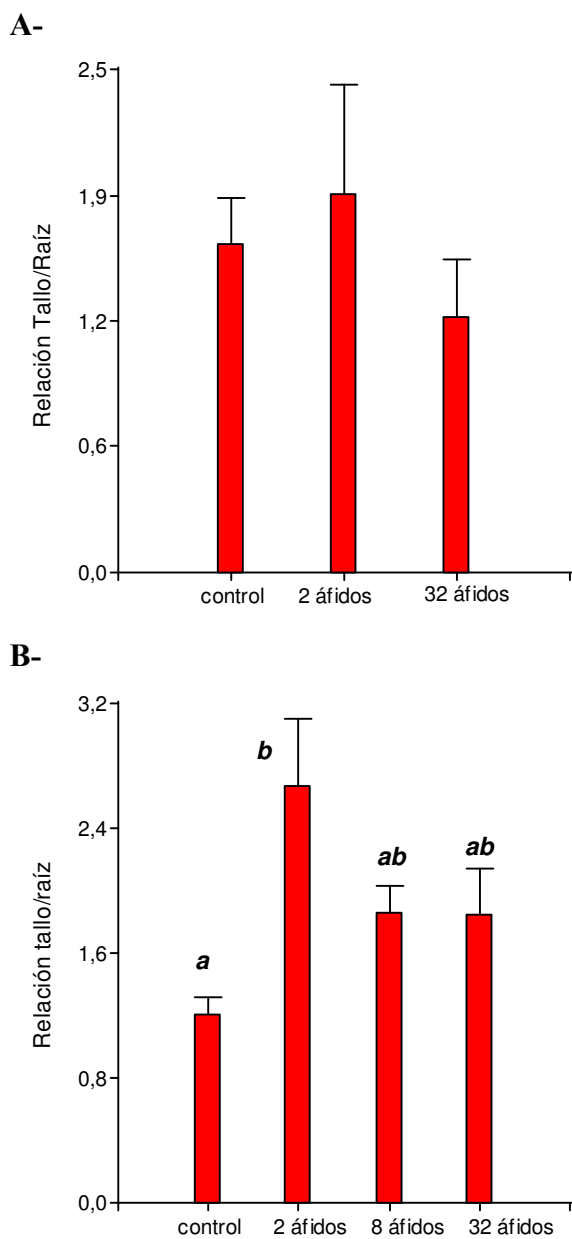
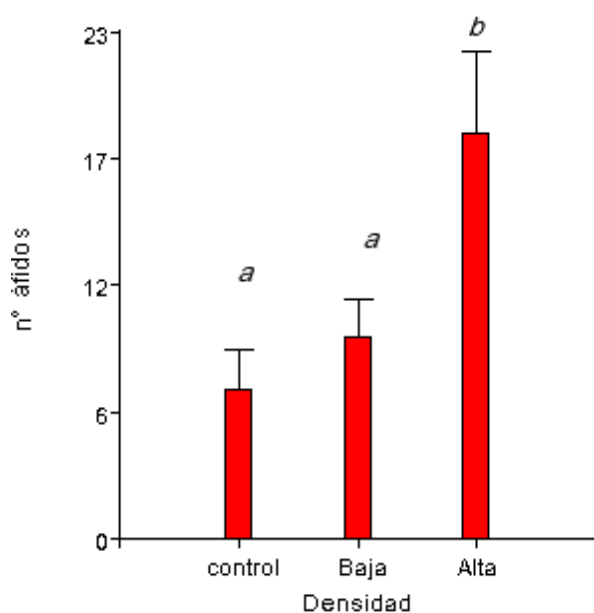


Figura 2.3. Relación tallo/raíz de plantas de tomate (A) ($P=0.55$) y rúcula (B) ($P=0.023$) con poblaciones de áfidos de distinta densidad inicial, (media + SE).

2.3.2 Plantas de rúcula con diferentes pre-tratamientos de infestación

El crecimiento de la población de áfidos se vio afectado como consecuencia de los diferentes pre-tratamientos, observándose un mayor número de individuos en las plantas que fueron previamente tratadas con altas densidades de áfidos (10 áfidos iniciales) y durante el mayor periodo de tiempo (72 horas ($P < 0.05$)). También se observó un mayor crecimiento de la población de áfidos en las plantas con tratamiento de infestación inmediatamente después del tratamiento de infestación previo (Figura 2.4. A, B y C). Este mayor crecimiento se corresponde con valores bajos de daño oxidativo (TBARS) y valores de concentración de antioxidantes totales crecientes (Tabla 2.2).

A.



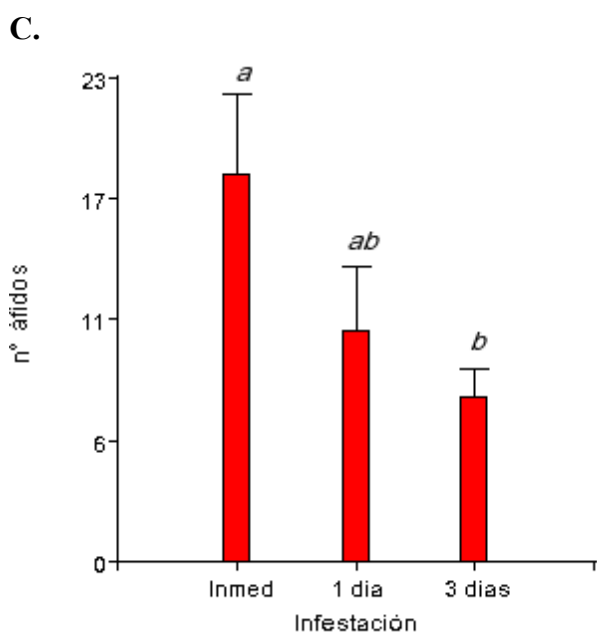
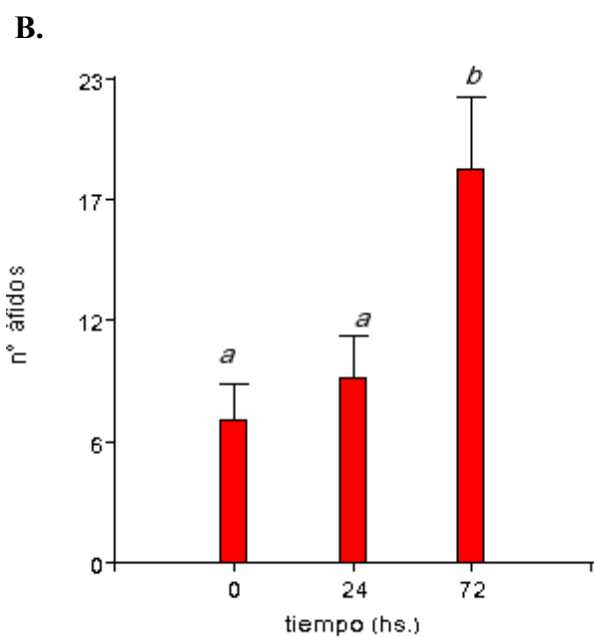


Figura 2.4. A. N° de áfidos alcanzado en las plantas según diferentes densidades de infestación previa. B. N° de áfidos alcanzado en las plantas según diferentes duraciones de las infestaciones previas. C. N° de áfidos alcanzado en todos los tratamientos según el momento de la infestación: inmediatamente, al día o a los tres días después de la remoción de los áfidos. (media + SE, n=5)

Tabla 2.2. Concentraciones de tbars ($\mu\text{M/g.hoja}$) y trap ($\mu\text{M/g.hoja}$) para diferentes combinaciones de tiempo de duración de pre-exposición a herbivoría y posterior infestación por áfidos. * respecto al tiempo de exposición control, ** respecto a cosecha inmediata y al control, *** respecto a cosecha inmediata, **a**: respecto a 24 hs de exposición y **b** respecto a 2 áfidos.

Parámetro	Días	Control		2 áfidos		10 áfidos	
		24 hs	72 hs	24 hs	72 hs	24 hs	72 hs
TBARS	0	5,1 \pm 0,8	5,0 \pm 0,1	14,3 \pm 2,4 * p < 0.01	6,1 \pm 0,7 a p < 0.001	5,5 \pm 0,5 b p < 0.001	1,6 \pm 0,4 * a, b p < 0.001
	1	5,0 \pm 0,2	3,8 \pm 0,3	8,4 \pm 0,2 ** p < 0.001	1,4 \pm 0,4 ** a p < 0.001	5,4 \pm 0,5 b p < 0.001	1,7 \pm 0,9 * a p < 0.001
	3	6,6 \pm 0,9	4,9 \pm 0,7	2,8 \pm 0,3 ** p < 0.001	2,1 \pm 0,4 ** p < 0.01	1,6 \pm 0,6** b p < 0.001	2,0 \pm 0,3* p < 0.001
TRAP	0	180 \pm 15	190 \pm 17	81 \pm 4 * p < 0.01	171 \pm 9 a p < 0.001	172 \pm 20 b p < 0.05	224 \pm 14 * a, b p < 0.05
	1	184 \pm 14	195 \pm 3	203 \pm 12 *** p < 0.001	255 \pm 15 ** a p < 0.05	182 \pm 12	236 \pm 18 * a p < 0.05
	3	151 \pm 11	189 \pm 6	200 \pm 28 *** p < 0.01	276 \pm 15 ** a p < 0.01	187 \pm 21	224 \pm 16 * a p < 0.01

2.2.3 Desarrollo poblacional de áfidos provenientes de poblaciones con diferente densidad inicial.

Las poblaciones que más crecieron se originaron de áfidos provenientes de plantas con alta densidad (A) y de mayor tiempo de permanencia (72 hs.) en las condiciones de infestación previa. Se observó que el factor tiempo de permanencia en las condiciones de pre-tratamiento tiene un efecto más importante que el factor densidad en determinar el crecimiento de la población de áfidos posterior.

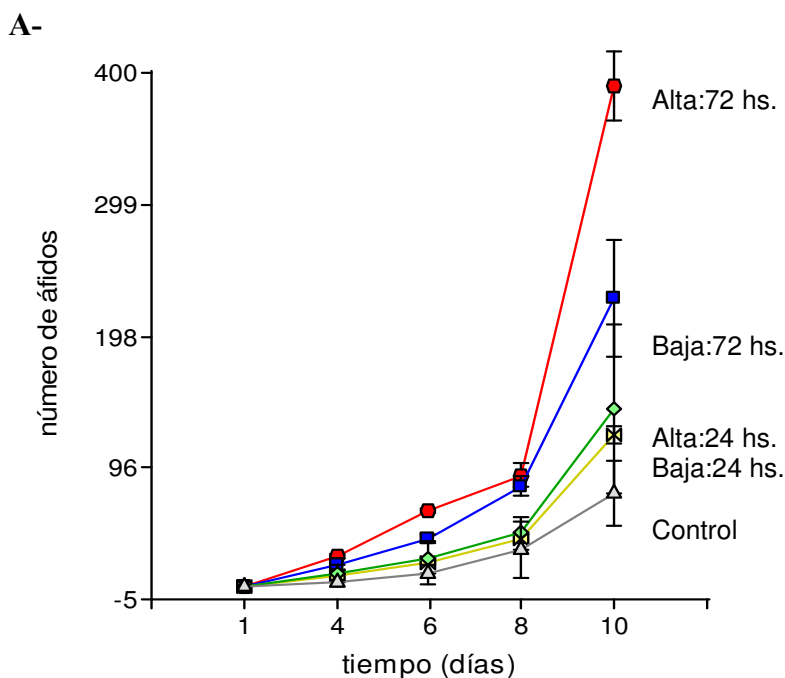


Figura 2.5. Crecimiento de poblaciones de áfidos originadas de individuos provenientes de poblaciones con diferentes densidades iniciales y tiempos de permanencia: alta densidad (Alta), baja densidad (Baja), 72 hs y 24 hs. (n=5, Anova de medidas repetidas $P=0,0091$, (media + SE)).

2.4. Discusión

Los experimentos incluidos en este capítulo aportaron nueva información sobre la dinámica de crecimiento de las poblaciones de áfidos en dos especies de plantas, su relación con la aparición de síntomas de daño y los posibles efectos de las respuestas inducidas por los áfidos sobre el crecimiento de su propia población y sobre la capacidad de colonizar plantas nuevas. Al comienzo de los experimentos que conforman este capítulo se conocía que los áfidos inducen mecanismos bioquímicos de defensa en las plantas que cambian considerablemente la fisiología de la planta hospedadora. Sin embargo, existía información contradictoria sobre la efectividad de dichas defensas en poner freno a infestaciones subsecuentes de los mismos insectos. Algunos estudios mostraron que infestaciones previas podían afectar diferentes parámetros poblacionales como el desarrollo o la fecundidad de la siguiente colonización de insectos y que las respuestas inducidas en las plantas podrían afectar la capacidad de los insectos de colonizar plantas nuevas (Dugravot y col. 2007). Los datos obtenidos en este trabajo de tesis muestran que las plantas de las dos especies estudiadas son capaces de desarrollar defensa inducida por la infestación de áfidos, la que es desarticulada por una alta infestación de

insectos o por infestaciones prolongadas. Tanto en tomate como en rúcula la tasa de crecimiento poblacional per capita creció con la densidad inicial (Tabla 2.1), lo que sugiere que la población de áfidos no tuvo un control denso-dependiente (en cuyo caso la tasa disminuiría con la densidad).

El cambio en la tasa de crecimiento poblacional fue independiente tanto de la densidad inicial como del tamaño máximo alcanzado por la población de áfidos, lo que permite pensar que el control del crecimiento de la población fue causado por algún factor endógeno activado en la planta, como una respuesta de defensa, o por la activación de algún mecanismo intrínseco de la población de áfidos que regularía la reproducción de los áfidos. Este *crash* poblacional ha sido también observado en condiciones naturales (Karley y col. 2004); siendo atribuido a la combinación de varios procesos lentos como la disminución en las tasas de natalidad, un aumento de la mortalidad asociada con enemigos naturales, y una calidad nutricional baja de las plantas estacional.

En rúcula el cambio en la tasa de crecimiento de la población se produjo a partir del noveno día. En esta especie el crecimiento poblacional de los áfidos alcanzó valores superiores en menor tiempo, para los tres tratamientos de densidad. Estas diferencias en la tasa de crecimiento pueden deberse a diferencias de ciertas condiciones ambientales, como la temperatura y/o el fotoperíodo, debido que los experimentos se realizaron en diferentes épocas del año, aunque también es posible que la rúcula sea un hospedador de mejor calidad para el establecimiento y crecimiento para la especie *M. Persicae*, lo que sugiere diferencias específicas en las respuestas inducidas de defensa a los áfidos. Está descrito en la literatura que los insectos succionadores del floema provocan necrosis visible en el tejido vegetal (Miles 1999; Ryan y col. 1990). Sin embargo, en este trabajo no se observó necrosis en las hojas de las plantas de ambas especies infestadas bajo ningún tratamiento de densidad. Por otro lado, las mayores tasas de crecimiento de los áfidos alcanzadas sobre las plantas de rúcula se relacionaron con síntomas visibles de la asignación de recursos en las plantas, que aunque no fueron de importancia reflejaron una disminución en el crecimiento de las raíces de rúcula, en relación a las plantas sin áfidos. Contrariamente a lo esperado, este efecto fue especialmente marcado cuando las densidades de áfidos eran bajas.

Los áfidos provocan un efecto complejo en el flujo de nutrientes de la planta hospedadora (Girousse y col. 2005). Es posible pensar que en las plantas con baja densidad de áfidos, la intensidad de la señal de alarma en la planta pudo haber sido menor, retrasando la inducción de las defensas y aumentando el impacto de los áfidos en la asignación de los nutrientes, dando como resultado una menor asignación de recursos al tejido radical.

Además, es interesante notar que una baja densidad de áfidos, suficiente para modificar la asignación de recursos dentro de la planta parece no haberlo sido para generar un balance oxidativo favorable al crecimiento posterior de la población. Los resultados del segundo experimento, con tratamientos de infestaciones previas de diferentes densidades de áfidos, muestran que en rúcula los áfidos inducen cambios que favorecerían la proliferación de una subsiguiente infestación de la misma especie de áfido. El trabajo de Drugavot y col. (2007) muestra que los efectos de una infestación previa observados a nivel local son opuestos a los de nivel sistémico. A nivel local distinguió una mayor aceptación en las hojas previamente infestadas y mecanismos de

resistencia inducidos en el resto de la planta. Sin embargo nuestros resultados muestran una facilitación en toda la planta, luego de la primera infestación. Se observó que una pre-infestación de densidad alta y durante más tiempo de permanencia en la planta, facilita el crecimiento de una infestación posterior indicando una relación entre la respuesta inducida por los áfidos, el número de áfidos atacantes, el tiempo de exposición a la herbivoría, y el tiempo vacante entre infestaciones. Bajo estas condiciones y en el momento inmediato a la infestación previa, se produjo un balance bioquímico en la planta que benefició la capacidad de reproducción de los áfidos (Tabla 2.2). Las ROS comúnmente se encuentran implicadas en la respuesta de resistencia durante la interacción planta-áfido. Molojić (2006) encontró un aumento en el contenido de peróxido de hidrógeno H_2O_2 en plantas infestadas por el áfido ruso del trigo (RWA), sugiriendo que el H_2O_2 está involucrado en las respuestas de resistencia al mismo, actuando como señal para la activación de los genes de defensa. En nuestro experimento, el análisis bioquímico de las hojas para el tratamiento de mayor densidad y tiempo de infestación, coincide con valores bajos de daño oxidativo (TBARS) y valores de concentración de antioxidantes (TRAP) crecientes. Estos valores altos en la concentración de antioxidantes integrarían condiciones propicias para la proliferación de los áfidos. Estos resultados constituyen una evidencia experimental directa de que las respuestas inducidas afectan la dinámica a corto y largo término en las comunidades agrícolas, sugiriendo que infestaciones previas alteran la aceptación de la planta a posteriores áfidos colonizadores, modificando la respuesta en dicha interacción.

La evidencia del tercer ensayo apoya la idea de un balance oxidativo positivo requerido en la planta huésped para que la población de áfidos pueda crecer. Los datos sugieren que los antioxidantes producidos en la primera planta colonizada por los áfidos cuando estos se encontraban en altas densidades, fueron absorbidos por los áfidos lo que les permitió aumentar su capacidad de neutralizar las reacciones de defensa del nuevo hospedador, facilitando el crecimiento de la población de insectos. Dicho balance fue más positivo para los áfidos cuanto mayor fue el tiempo de infestaciones previas a altas densidades de insectos. Estos datos concuerdan con estudios previos que mostraron que los antioxidantes juegan un rol muy importante como agente de protección contra los radicales oxígeno exógenos, generados por ingestión de aleloquímicos pro-oxidantes que promueven estrés oxidativo en los tejidos del áfido (Lukasik y col. 2009). Nuestros experimentos aportan información relevante para comprender las epidemias en poblaciones de plantas ya que muestran como el crecimiento poblacional de los áfidos en plantas que no habían sido previamente atacadas, estuvo condicionado por el balance bioquímico de la planta hospedadora original y su efecto en los áfidos al momento en que fueron trasladados de planta.

Los áfidos producen profundas alteraciones bioquímicas y fisiológicas en las plantas, incluyendo cambios hormonales. Sin embargo, los mecanismos por los que manipulan a sus hospedadores no están bien comprendidos. Un desafío para el estudio de estas interacciones es integrar las investigaciones dirigidas a diferentes niveles de organización biológicos, desde los mecanismos subcelulares hasta las funciones en las comunidades ecológicas. El presente

estudio sobre la interacción planta-insecto provee un avance integrador de los niveles de organización individual y poblacional.

CAPITULO 3

3. Daño por áfidos y episodios de ozono en plantas de rúcula (*Eruca sativa Mill*)

3.1. Introducción

Los áfidos producen daños en las plantas debido a la succión de fotoasimilados y a la acción tóxica de las enzimas salivares. La tasa de deposición de nitrógeno se revierte en las zonas de crecimiento, pasando de ser un tejido sumidero a un tejido fuente de nitrógeno (Girousse y col. 2005). Esta reducción del flujo de nutrientes dentro de la zona apical primaria resulta en una reducción del crecimiento o de la tasa de elongación de las plantas (Pollard 1973). Por ejemplo, la infestación con el áfido de la arveja (*Acyrtosiphon pisum*) reduce el crecimiento, la elongación de los tallos y el peso seco de la alfalfa (*Medicago sativa*) bajo condiciones de campo (Harper y Kaldy 1982). En respuesta a la herbivoría, las plantas pueden expresar cambios bioquímicos, fisiológicos o morfológicos conocidos como respuestas inducidas, algunas de las cuales son activadas por las enzimas salivares (Karban y Myers 1989). La señal es transmitida a través de la planta, estableciendo comunicación entre los diferentes tejidos y confiriendo resistencia sistémica adquirida (SAR) (Mudgett 2005). Sin embargo, las respuestas de las plantas en algunos casos pueden beneficiar a los herbívoros, resultando en una susceptibilidad inducida (Sauge y col. 2006). La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), particularmente H₂O₂, ha sido relacionada con la activación de las defensas en diversas interacciones planta-patógeno y planta-insecto (Bruxelles y Roberts 2001; Scheel 2002). Se ha sugerido asimismo que la producción de enzimas detoxificantes de ROS podría representar un intento de mitigar el daño oxidativo, producido por elevados niveles de H₂O₂ en las plantas (Zhu-Salsman y col. 2004).

La explosión oxidativa asociada al ataque de insectos es similar a la respuesta de las plantas expuestas al ozono troposférico (O₃). La acumulación de ROS inducida por el O₃ se concentra en la región perinerval de las hojas (Schraudner y col. 1998; Wohlgemuth 2002) afectando las membranas celulares y produciendo lesiones definidas en la cara adaxial de las hojas. Los síntomas producidos por el O₃ originalmente fueron descritos en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), y caracterizados como manchas (Wohlgemuth y col. 2002). Como se describió en los capítulos anteriores, las acciones de oxidación por las ROS son neutralizadas en las plantas a través de un eficiente sistema de reparación mediado por la producción de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Noctor y Foyer 1998), lo que provee una protección contra el daño oxidativo (Luwe y col. 1993). Por ejemplo algunas especies de plantas pueden reducir el daño del O₃ mediante la producción de isoprenos volátiles, y se ha demostrado recientemente que los episodios de O₃ son capaces de estimular la emisión de isoprenos en las hojas (Fares y col. 2008).

A pesar de existir una vasta literatura sobre los efectos del O₃ en las plantas y el impacto potencial en las interacciones de la cadena alimenticia, pocos estudios han investigado las interacciones planta-insecto bajo elevadas condiciones de O₃, y menos aún, enfocándose en el impacto sobre las plagas de insectos en los cultivos. Algunas investigaciones han demostrado que existen puntos de convergencia en las rutas de señales en las plantas expuestas a O₃ y las atacadas por áfidos. Este diálogo cruzado o “crosstalk” entre las vías de señalización se manifiesta como respuestas coincidentes a nivel molecular o metabólico (Bostock 2005). Es posible pensar que la producción de ROS inducida por O₃ podría servir como una señal de alarma general en las plantas, conduciendo a la muerte celular (apoptosis) y a la expresión de genes de defensa (Rao y col. 2000) contra ciertos patógenos (Yalpani y col. 1994; Sharma y col. 1996; Langebartels y col. 2002) e insectos (Moran y col. 2002). Sin embargo, estudios acerca de las respuestas individuales de los áfidos a elevadas concentraciones de O₃ arrojó resultados variables (Awmack 2004), mostrando tanto una disminución (Sharma y col. 1996; Von Tiedemann y Firsching, 2000; Holopainen, 2002) como un aumento (Percy y col. 2002; Awmack y col. 2004) de la tasa de crecimiento de los insectos o de oviposición, comparada con áfidos desarrollados en plantas control, bajo condiciones de aire filtrado. Variaciones sutiles en el diseño experimental y en la combinación de estresores en particular, podrían influir en el resultado. Por ejemplo, el efecto del O₃ sobre el desarrollo de la población de áfidos, podría depender del momento de la elongación de los tallos en que ocurre la exposición al O₃. Los resultados de Holopainen y Kössi (1998) sugieren que elevadas concentraciones de O₃ durante el periodo de elongación temprana de los tallos podría estimular el desarrollo poblacional del áfido *C. pilicornis*, pero durante la maduración de los tallos, altas concentraciones de O₃ tuvieron un efecto negativo sobre el desarrollo de los áfidos. Esto podría deberse al envejecimiento acelerado de los tallos expuestos a O₃.

Los patrones de inducción asociados con los organismos que se alimentan del floema en la familia *Brassicaceae* todavía están en estudio, pero se conoce que comparten varios aspectos generales con las respuestas al estrés. Estos pueden incluir una combinación de defensas de las plantas mediadas por el aborto de los órganos infestados, o por la inducción de respuestas (Sauge y

col. 2006). Además, se ha demostrado que existen áreas de solapamiento en la inducción por áfidos con otras formas de estrés biótico y abiótico en esta familia de plantas (Moran y col. 2002).

Las preguntas formuladas en esta parte de la tesis están enmarcadas en el paralelismo de la expresión entre las respuestas en las plantas inducidas por áfidos y el O₃, incluyendo el aumento de estrés oxidativo común a ambos estímulos. Se pusieron a prueba dos hipótesis (1) una infestación de áfidos previa a la exposición de O₃ puede reducir el daño debido al O₃ y (2) áfidos de la especie (*Myzus persicae*) provenientes de poblaciones desarrolladas en plantas de rúcula bajo contaminación por O₃, modifican la capacidad de establecer nuevas infestaciones sobre plantas sin estrés. Dichas hipótesis fueron evaluadas utilizando plantas de rúcula (*Eruca sativa*, Mill.), especie perteneciente a la familia *Brassicaceae*.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Exposición a O₃ en cámaras “open top”

Los experimentos fueron conducidos en el campo experimental de IFEVA, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (34° 35' 5" latitud S, 58° 29' longitud O). El promedio de las temperaturas máximas y mínimas durante el periodo experimental fue de 27.9 y 16.8 °C respectivamente. Se utilizaron seis cámaras “open top” (OTCs) de 8 m³ con paredes de cristal PVC montadas en una estructura de metal y con regulación de los niveles de O₃ (Hogsett y col. 1985). Estas OTCs (Figura 3.1.) son de una tecnología de exposición a contaminación de aire, desarrollada para proveer un ambiente semejante a las condiciones ambientales, en experimentos a campo (Heagle y col. 1973; Rogers y col. 1983). Se utilizaron tres cámaras para el tratamiento control (aire libre de ozono) y tres para el tratamiento con O₃ (aire filtrado con el agregado de O₃). El O₃ es generado mediante un tipo de descarga por chispeo por un generador de O₃ (Hogsett y col. 1985) y el aire ambiental es bombeado a través de un filtro de carbón activado. Las cámaras recibían una fumigación diaria de O₃ durante 90 min., que aumentaba la concentración a 100-120 ppb. La concentración de ozono fue continuamente monitoreada con un Monitor de O₃ Modelo 450 API-Teledyne Instruments (Teledyne Advanced Pollution Instrumentation San Diego, Ca).



Figura 3.1. Foto del sistema experimental que asemeja las condiciones ambientales naturales y recrea ambientes con aumentos posibles en la concentración de ozono. Consiste en ocho cámaras “open-top” con flujo de aire constante y monitoreo de la concentración de ozono.

3.2.2. Plantas y áfidos

Las plantas de rúcula crecieron en un invernáculo durante cuatro semanas. Las macetas se llenaron con una mezcla de tierra fértil, arena y turba (50:25:25) donde se colocaron 2 semillas en cada una. Luego de 5 días, el número de plantas se redujo a una por maceta y se mantuvieron bien regadas a lo largo de todo el experimento. Los áfidos (*M. persicae*) fueron criados a partir de una colonización natural, sobre plantas de rúcula de 2 semanas de edad, en invernáculo bajo condiciones controladas de temperatura (24 - 26°C). Para mantener la población de áfidos, se agregaban plantas nuevas con intervalos semanales en reemplazo de las plantas viejas y dañadas.

3.2.3. Procedimiento experimental

Con el objetivo de investigar los efectos de la exposición al O₃ sobre las interacciones entre los áfidos y sus plantas hospedadoras se llevaron a cabo dos experimentos, con dos repeticiones cada uno. En el primer experimento, las plantas de rúcula de cuatro semanas de edad fueron infestadas con seis áfidos por planta, y luego se ubicaron dentro de las OTCs (con O₃ y control) junto a

otro grupo de plantas libres de áfidos. Las plantas de cada tratamiento fueron cubiertas individualmente con bolsas de voile para prevenir la migración de áfidos entre plantas dentro de las cámaras. El número de áfidos por planta fue contabilizado todos los días. Las lesiones y los síntomas de clorosis en las hojas fueron estimados visualmente como porcentaje de tejido verde remanente. Al finalizar el ensayo, se cosecharon las plantas; las raíces fueron cuidadosamente lavadas y separadas de la parte aérea, y todo el material se secó en estufa a 70°C y posteriormente se pesó (para obtener el peso seco).

Paralelamente a este experimento se utilizó otro grupo de plantas, bajo el mismo protocolo experimental, para determinar la producción de antioxidantes en las plantas de rúcula, según los diferentes tratamientos. Se cosecharon y se congelaron las plantas en la mitad (5 días) y al final del experimento (10 días), colocándolas en un freezer a -80°C hasta ser analizadas. La inducción de antioxidantes debido al ataque por áfidos en las hojas, fue estimada a través del potencial antioxidante (TRAP) (Lissi 1992). El índice TRAP refleja los radicales libres que reaccionan con una solución de antioxidantes constituyendo una medida de la cantidad de antioxidantes en la muestra.

En el segundo experimento un grupo de plantas de rúcula naturalmente infestadas con 20-30 áfidos fueron expuestas a O₃, 4 hr. por día, durante 3 días, mientras que otro grupo de plantas infestadas permanecieron en las cámaras control. Inmediatamente después de la exposición a O₃ las ninfas fueron transferidas a plantas de tres semanas de edad que no habían sido infestadas ni expuestas a O₃ anteriormente. Cada planta fue infestada con seis áfidos, a los que se dejó reproducir libremente. Se registró el crecimiento de las poblaciones de los áfidos, contando el número de individuos de áfidos a los 5, 10 y 15 días del comienzo del experimento.

3.3. Análisis estadístico

El porcentaje de tejido verde y la relación del peso tallo/raíz de las plantas creciendo bajo diferentes tratamientos, fueron analizados a través de un ANOVA con diseño de parcelas divididas. El factor asociado a la parcela principal consistió en el tratamiento de fumigación: aire libre de O₃ vs. O₃ elevado. El factor asociado a las sub-parcelas fue la herbivoría: presencia vs. ausencia de áfidos. Cada cámara constituye una réplica experimental de los tratamientos de fumigación y las plantas individuales dentro de cada cámara son las sub-réplicas. Las variables respuesta de las plantas fueron calculadas para cada parcela tratamiento. Luego se obtuvo el valor medio de biomasa de las plantas y el porcentaje de tejido verde por cámara sobre cada dato muestreado.

El efecto de la exposición a O₃ sobre el crecimiento de la población de áfidos fue analizado con un ANOVA de medidas repetidas. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa Infostat Profesional versión 2008 (Argentina).

3.4. Resultados

Todas las plantas expuestas a O_3 desarrollaron los síntomas visibles típicos de daño por O_3 , que consiste en parches necróticos y manchas sobre la superficie foliar. La infestación con áfidos no afectó el verdor de las hojas de rúcula ($P=0.10$) (Figura 3.3, Tabla 3.1). Sin embargo la reducción en el tejido verde debido al daño por O_3 fue menor en las plantas infestadas con áfidos (interacción $P=0.03$) (Figura 3.3, Tabla 3.1).



Figura 3.2. A. Plantas de rúcula expuestas a ozono libres de áfidos. B. Plantas de rúcula infestadas con áfidos y expuestas a ozono. Ambas en la misma cámara.

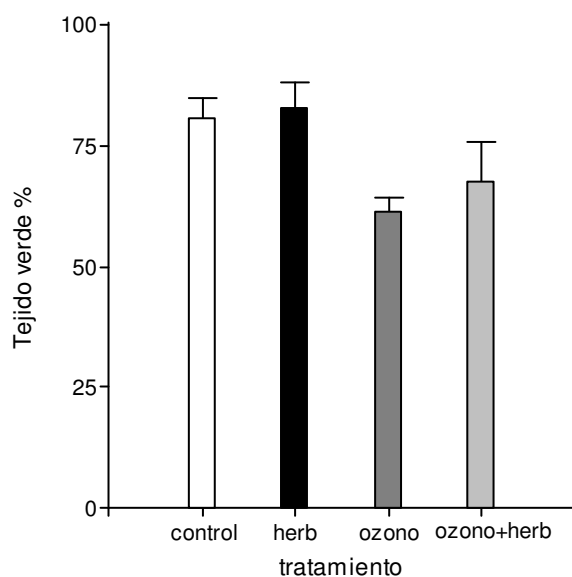


Figura 3.3. Daño causado por la infestación de áfidos y exposición a ozono, estimado como porcentaje del tejido verde remanente (media + SE).

La alometría y el tamaño de las plantas fueron afectados tanto por factores de estrés bióticos como abióticos. La exposición a O_3 y el ataque de áfidos, produjo una reducción de la biomasa de 4-5 veces, principalmente debido a una disminución en el crecimiento de las raíces (Tabla 3.1). La relación tallo/raíz de las plantas expuestas a algunos de estos factores de estrés duplicó a la de las plantas control (Figura 3.4, Tabla 3.1).

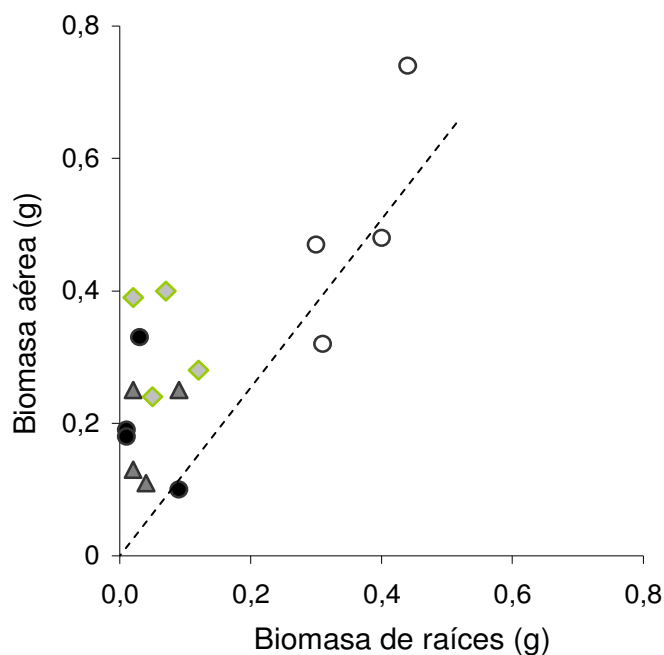


Figura 3.4. Infestación por áfidos (◇), exposición a O₃ (▲) y áfidos + O₃ (●) modularon la relación de la biomasa tallo/raíz de las plantas de rúcula. La línea punteada representa el modelo de regresión lineal para las plantas de rúcula control (○) (R²=0.66)

Tabla 3.1. Efecto de la exposición a O₃ y a herbivoría por áfidos sobre el crecimiento de plantas de rúcula determinado por split-plot ANOVAS.

Tratamiento	Biomasa total (g)		Biomasa raíces (g)		Relación tallo/raíz		Tejido verde (%)	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
O₃	33.07	0.001	63.50	0.0002	1.72	0.23	5.68	0.07
Herbivoría	11.45	0.01	36.30	0.0009	5.91	0.05	2.7	0.10
O₃X Herbivoría	12.20	0.01	32.82	0.0012	0.01	0.09	467	0.03

El balance de TRAP del tejido de las plantas sugiere que la herbivoría indujo la síntesis de alta concentración de antioxidantes. Esta concentración disminuyó al final del experimento. La exposición al O₃ también hizo que el balance de los antioxidantes aumentara debido a los ROS producidos, pero con valores menores a los inducidos por los áfidos, manteniéndose hasta el final del experimento. Cuando los factores de estrés ocurrieron de manera simultánea, el balance de los antioxidantes en la mitad del ensayo fue bajo con una tendencia a aumentar hacia el final (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Índice TRAP: potencial antioxidante total ($\mu\text{M/g.hoja}$), registrado en las plantas de rúcula a los 5 días y a los 10 días desde la siembra.

Tratamiento	TRAP ($\mu\text{M/g.hoja}$)	
	5 días	10 días
Control		
No Herbivoría	54 \pm 3	54 \pm 7
Herbivoría	99 \pm 2 **	67 \pm 7 *
Ozono		
No Herbivoría	63 \pm 1 *	67 \pm 7 *
Herbivoría	39 \pm 2 *	44 \pm 3 *

* $P < 0.05$ (F -test); ** $P < 0.01$ (F -test)

El crecimiento poblacional de áfidos fue similar en ambiente con O₃ y libre de O₃ ($P > 0.05$) (Figura 3.5).

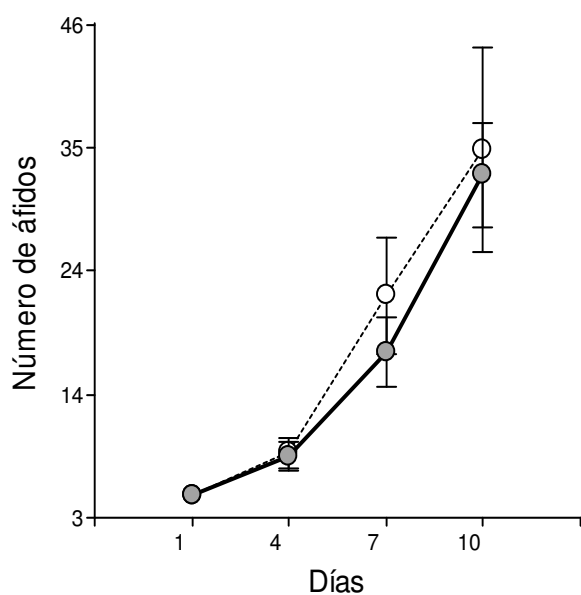


Figura 3.5. Crecimiento de la población de áfidos en ambientes con alto O₃ (●) y libres de O₃ (○), (media + SE).

Sin embargo, el crecimiento de la población de áfidos en ambientes libres de O₃ disminuyó fuertemente cuando los áfidos provenían de plantas que habían sido expuestas a ozono ($P=0.0059$). Al final del experimento, el nivel de infestación de áfidos en las plantas de rúcula desafiadas por O₃ fue la mitad del crecimiento poblacional observado en las plantas control (Figura 3.6).

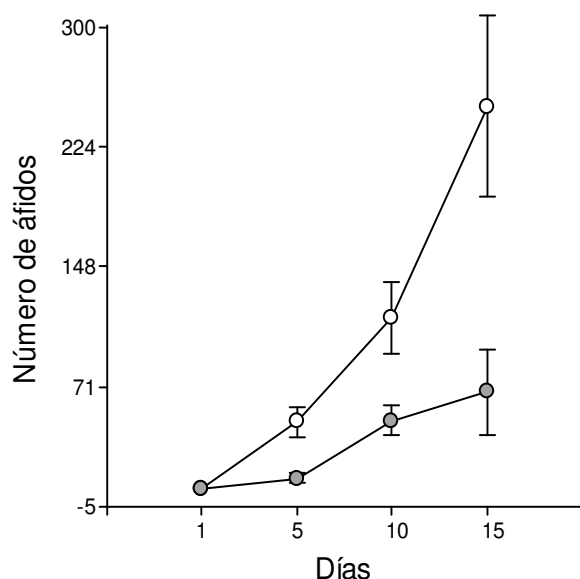


Figura 3.6. El efecto del ozono sobre el crecimiento de la población de áfidos. Los áfidos fueron expuestos a condiciones con ozono (●) o con aire filtrado libre de ozono (○) y luego transferidos a plantas control, (media + SE).

3.5. Discusión

Nuestra evaluación de las respuestas de las plantas a la interacción de ambos estresores (O_3 y áfidos) fue realizada bajo condiciones de campo que incluían las fluctuaciones climáticas diarias y estacionales. Si bien, un agroecosistema y su ambiente no pueden ser completamente recreados dentro de una cámara “open top”, podemos considerar que las plantas y áfidos crecieron bajo condiciones de campo cercanas a la realidad (Strain y col 1991). Las plantas de rúcula utilizadas en nuestros experimentos fueron altamente sensibles al O_3 . Las plantas expuestas desarrollaron síntomas visibles típicos de daño por O_3 que consisten en parches necróticos y manchas en la superficie foliar. Podría argumentarse que una limitación importante de las OTCs es la temperatura mas elevada del aire que puede ocurrir dentro de las mismas. Esto se debe a que el movimiento del flujo de aire es menor que en áreas abiertas, pudiendo conducir a un mayor calentamiento solar (Olszyk y col. 1980). El aumento de la temperatura dentro de las cámaras podría confundir las respuestas de la variable de interés primario y comprometer los objetivos experimentales. Aunque la misma elevación de la temperatura debería ocurrir en todas las cámaras (con O_3 elevado y control), la sensibilidad relativa de las plantas al O_3 podría ser difícil de predecir a partir de la sensibilidad determinada en las OTCs. Algunos experimentos dirigidos a responder estas preguntas, no encontraron interacciones, al menos para CO_2 -temperatura (Norby y col. 1999). De todos modos el monitoreo de la temperatura durante nuestro periodo experimental reveló que las diferencias de temperatura dentro y fuera de las cámaras nunca superaron $1.5^\circ C$.

La respuesta inducida por el ataque de áfidos disminuyó fuertemente el porcentaje de tejido dañado resultante de varios episodios de exposición a O₃, a pesar que el crecimiento de la población de áfidos fue afectado negativamente por el contaminante. Los áfidos no causaron ningún daño visible en las hojas de rúcula. Esto concuerda con experimentos con *A. thaliana*, especies de la misma familia de plantas que rúcula, en los que no se observó necrosis u otros síntomas luego de 72 a 96 hr de infestación con el áfido *M. persicae* (Moran y col. 2002) lo cual podría estar asociado con un mantenimiento de la condición de óxido-reducción favorable en las plantas por la saliva del estilete (Miles y Oertli 1993). El tamaño y la alometría de las plantas de rúcula fueron afectadas tanto por los factores de estrés bióticos como abióticos. El estrés redujo el crecimiento individual de las plantas. Especialmente en las plantas infestadas la magnitud de la reducción fue mayor para las raíces que para los tallos, sugiriendo que el crecimiento compensatorio y el metabolismo de reparación que previene el daño en las hojas pudieron haber comprometido el crecimiento de las raíces. Sin embargo, los cambios hormonales también podrían haber sido responsables por la mayor proporción tallo-raíz en plantas infestadas por áfidos (Ilarduya y col. 2003). Esto explicaría en parte, la reducción del daño por O₃ en las plantas pre-infestadas con áfidos, los cuales aumentaron la producción de antioxidantes. La exposición a factores de estrés biótico y abiótico generalmente induce producción de ROS en las células lo que a su vez activa un sistema antioxidante (Perl-Treves y Perl 2002). Ilarduya y col. (2003) observó que los áfidos indujeron cambios bioquímicos y fisiológicos en las plantas hospedadoras que incluyeron producción de ROS. Gómez y col. (2004) argumentó que estos cambios incluyeron un aumento en la respuesta antioxidante de la hoja.

En los experimentos que forman parte de esta tesis, los niveles bajos de TRAP detectados en las plantas infestadas con áfidos en presencia de O₃, pueden reflejar el consumo de antioxidantes en el proceso de neutralización de la explosión oxidativa debida a la combinación de los factores de estrés. Esto se correlaciona con la ausencia de daño foliar visible en las plantas infestadas bajo exposición al O₃, comparado con el daño y los valores de TRAP observados en las plantas expuestas a O₃ libres de herbivoría. Además, los herbívoros pueden aumentar la emisión de compuestos volátiles con capacidad de neutralizar el poder oxidativo del O₃, contribuyendo a la protección contra el daño. Por ejemplo, algunas especies Mediterráneas de *Quercus* emiten isoprenos tales como los monoterpenos, con actividad antioxidante que permite eliminar el O₃ en las hojas (Loreto y col. 2004; Fares y col. 2008). La producción de estos isoprenos es estimulada por los episodios de O₃ (Fares y col. 2008). Los herbívoros, e.g. los ácaros, pueden inducir la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs), similares a los inducidos por O₃ (Vuorinen y col. 2004). Las plantas de rúcula producen varios compuestos aromáticos (Mastelic y col. 2008); sin embargo, en nuestros experimentos las plantas de rúcula expuestas a O₃ expresaron daño foliar por ozono. Esto sugiere que los compuestos volátiles producidos por exposición a O₃ no tuvieron actividad detoxificante, o no se produjeron en suficiente cantidad.

Los áfidos en estadio ninfático, descendientes de adultos expuestos y alimentados sobre plantas expuestas a O₃, fueron menos capaces de infestar plantas nuevas que las ninfas provenientes de las plantas control. Esto podría

ser una consecuencia del efecto directo del O₃ sobre los áfidos, un efecto indirecto a través de la respuesta de la planta a O₃ o la combinación de ambos. Dado que los áfidos fueron capaces de mantener el crecimiento poblacional en las plantas expuestas a O₃ en tasas similares a los crecidos en plantas control, podría suponerse que la facilitación inducida por los áfidos en el hospedador puede ocultar el efecto negativo causado por el O₃ sobre los áfidos, el cual se manifestó cuando los insectos fueron transferidos a plantas libres de estrés. Sin embargo, estudios previos han sugerido que el O₃ por si mismo no produce efectos sobre la habilidad reproductiva o de alimentación de estos insectos (Agrell y col. 2005). Dicha información y nuestros resultados son consistentes con la idea de que la habilidad reducida de la población de áfidos para colonizar e infestar plantas nuevas, fue el resultado de la interacción planta-áfido antes que el efecto directo del O₃ sobre los individuos.

La integración de estudios sobre el rol de las plantas, las respuestas y el comportamiento de los insectos, acompañado con la información bioquímica utilizada en mis experimentos, parecería ser crítica para comprender mejor la interacción planta-áfido bajo estrés por exposición al O₃. Nuestros experimentos brindan evidencias nuevas que los áfidos pueden reducir el daño del O₃ sobre las plantas, pero asimismo que la intensidad del ataque por áfidos podría ser modificado en áreas con periodos de alta concentración de O₃ troposferico. Sin embargo, este modelo no tiene en cuenta la adaptación potencial de los áfidos a los cambios atmosféricos. Es posible que en condiciones de alta contaminación ambiental prosperen clones más tolerantes al O₃ y que perezcan los menos tolerantes. Esta posibilidad tiene implicancias en los brotes epidémicos y amerita más investigación. Se podría esperar que la convergencia de respuestas a los diferentes factores de estrés en sistemas agrícolas, inductores de estrés oxidativo en el tejido de las plantas, genere un fenotipo de planta funcionalmente adaptativo o no-adaptativo a un estrés particular. Una mejor comprensión de estas interacciones proporcionará información sobre los roles de los áfidos en las comunidades ecológicas, y conducirá al desarrollo de formas de manejo novedosas y duraderas para administrar las características de resistencia de los cultivos a factores bióticos y abióticos.

CAPITULO 4

DISCUSIÓN GENERAL

Esta tesis fue desarrollada para entender cómo pueden ser extrapoladas las respuestas de las plantas a múltiples factores de estrés, desde el nivel individual al nivel poblacional. Se estudiaron las modificaciones en la incidencia de las plagas de áfidos sobre los cultivos, con el aumento de la contaminación troposférica O₃. En la primera etapa se caracterizaron las respuestas de las plantas al ataque por áfidos para las especies involucradas en mi sistema de estudio (Capítulo 2). En la segunda etapa, se estudiaron las modificaciones en la respuesta de defensa de la planta al herbívoro en presencia de O₃ troposférico (Capítulo 3). Los resultados destacan una fuerte interacción entre las vías de señalización inducidas en las plantas por el ataque de áfidos y la contaminación por O₃.

4.1. Motivación e Hipótesis

La composición atmosférica está cambiando como consecuencia de la actividad humana. Existe contaminación por diferentes vías, algunas de las cuales como la combustión de productos vegetales y de combustible fósiles a altas temperaturas (en los motores de automóviles), la acumulación-fermentación de necro-masa, la desnitrificación de fertilizantes orgánicos o inorgánicos, generan condiciones para la acumulación de O₃ en la troposfera (la capa de la atmósfera más cercana a la tierra; Jacob y Wofsy 1988; Vitousek 1992). El aumento de la población lleva a la colonización de nuevas áreas, reemplazando los ecosistemas naturales por sistemas agrícolas y urbanos. Como consecuencia de esto, el funcionamiento y la productividad de los agro-ecosistemas pampeanos han aumentado su dependencia de los subsidios de energía (Aramendia y col. 2000). Los cinturones que rodean a las grandes

ciudades como el cinturón verde de Buenos Aires-La Plata son núcleos de producción hortícola, por su cercanía a los centros de consumo. Estas zonas con alta densidad de población producen mayor contaminación atmosférica (Aramendia y col. 2000).

En escenarios donde la concentración de CH₄ y emisiones antrópicas de CO y NO_x se duplican, se espera un aumento del O₃ de aproximadamente el 50 % en relación con los valores actuales (Vandermeiren y col. 2005). Es probable que el aumento del O₃ en la troposfera tenga un efecto en la incidencia de las plagas herbívoras. El O₃ tiene un efecto negativo en la productividad de las plantas y puede alterar la composición de los tejidos cambiando las propiedades nutricionales, la disponibilidad y calidad de los recursos para los insectos herbívoros, como también altera los procesos de defensa. Por lo tanto, el aumento de las concentraciones de O₃ predichas para los próximos años afectará la ecología nutricional de los insectos herbívoros y su incidencia como plaga.

Las plantas pueden expresar modificaciones fisiológicas o morfológicas conocidas como respuestas inducidas por factores de estrés (Karban y Myres 1989). Estas reacciones inducidas cambian el estado de la planta ya sea aumentando la resistencia o la susceptibilidad al siguiente factor de estrés (Holopainen 2002). Una respuesta al ataque de algún organismo puede compartir compuestos celulares de señalización que desencadenan otros mecanismos de defensa. Este intercambio de información entre vías de señales o “crosstalk” puede ser utilizado para definir los procesos que ocurren a diferentes niveles de organización (Taylor y col. 2004). El O₃ es un compuesto que genera radicales libres o ROS en las plantas, a través de reacciones REDOX. Las ROS a bajos niveles actúan como importantes moléculas de señal y facilitan un conjunto de procesos biológicos esenciales. A niveles altos, estas moléculas altamente reactivas, producen estrés oxidativo en la célula, generando profundos cambios en la expresión genética (Dowling 2009). Por lo tanto, un aumento en la concentración de compuestos oxidantes en la troposfera podría inducir respuestas plásticas en las plantas, generando fenotipos más resistentes a un segundo factor de estrés oxidativo o por el contrario aumentando la susceptibilidad al mismo.

Los biólogos moleculares y celulares consideran los tres primeros procesos de la Figura 1: reconocimiento de la señal, rutas de señales y cambios en la expresión genética. Fisiólogos y ecólogos estudian las escalas metabólicas y fisiológicas en el contexto de las interacciones, hasta el efecto sobre el “*fitness*” del atacante y el hospedador (últimos dos procesos Figura 1). Pero ni biólogos moleculares ni ecólogos se enfocan en el efecto acumulativo sobre la homeostasis de la planta y el balance que la planta debe lograr en respuesta a múltiples estímulos en el ambiente natural (Dowling et al. 2009). Si bien se conocen en detalle las respuestas fisiológicas de las plantas ante cambios en los niveles de O₃ y en respuesta al ataque por herbívoros, es poco lo que se sabe acerca de cuales pueden ser los compromisos que existen entre las adaptaciones necesarias para tolerar el ambiente oxidante troposférico y las que determinan la capacidad de los individuos vegetales para producir microambientes oxidantes contra los herbívoros. Por este motivo, mi tesis estuvo orientada a comprender el efecto de una alta concentración de O₃ sobre las respuestas plásticas inducidas en plantas, capaz de generar fenotipos más

resistentes a la herbivoría.

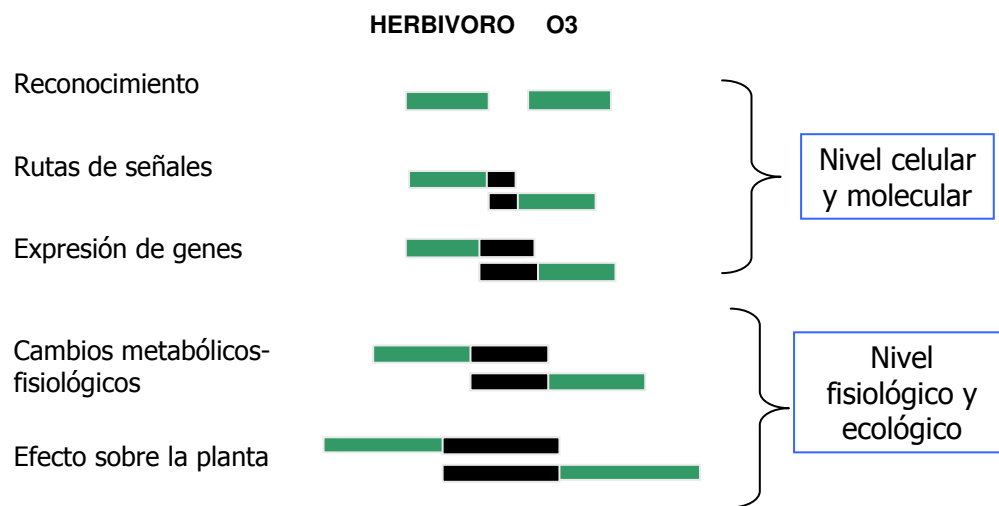


Figura 4.1. Representación esquemática de diferentes escalas de organización en la interacción planta-O₃-herbívoro, modificada (Paul y col. 2000). En la progresión de las interacciones “río abajo” desde los procesos iniciales de reconocimiento, hasta la respuesta en toda la planta, la herbivoría y el O₃ tienen una progresiva disminución en el grado de especificidad de la respuesta.

Para estudiar los cambios en las respuestas plásticas inducidas en las plantas por la concentración alta de O₃ elegí un modelo de estudio con tres componentes: planta, áfido y O₃ (Figura 4.2).

En los capítulos anteriores se analizaron las interacciones 1 - 2 - 3 y 4 de la figura 4.2 y se obtuvo información empírica a nivel fisiológico y ecológico.

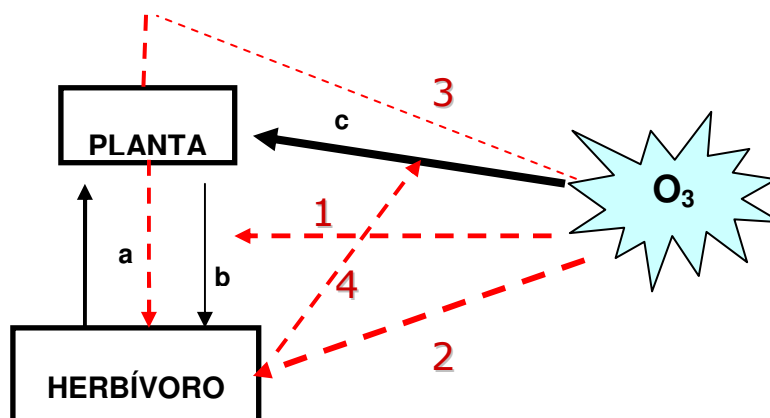


Figura 4.2. Interacciones entre los componentes del sistema. (a) Efecto del herbívoro sobre la planta. (b) Respuesta de la planta contra el herbívoro. (c) Efecto del O₃ sobre la planta. El grosor de las flechas representa la cantidad de información sobre el tema. 1) Efecto del O₃ sobre la respuesta de la planta frente al ataque del herbívoro. 2) Efecto del O₃ sobre el herbívoro en forma directa e indirecta. 3) vía alteraciones en el hospedador. 4) La capacidad del herbívoro de modificar el efecto del O₃ en la planta.

A continuación se tratan los principales aportes brindados por esta tesis sobre las modificaciones producidas en la interacción planta-herbívoro por un aumento de la concentración de O₃ en la troposfera. Están planteados de la siguiente manera: 1) comprobación de hipótesis y resultados principales de la tesis 2) contribuciones al estado actual del conocimiento de los sistemas agrícolas, 3) conclusiones y 4) futuras líneas de investigación sobre la interacción planta-herbívoro, importantes para continuar la comprensión del sistema.

4.2. Comprobación de las hipótesis y resultados principales

Se investigaron las posibles modificaciones en la incidencia de los herbívoros sobre los cultivos, con el aumento de la contaminación troposférica por O₃. En la literatura emergen algunas controversias en relación al efecto del O₃ sobre las interacciones planta-herbívoro. Hay registro tanto de resistencia como de aumento de susceptibilidad a las plagas (Sandermann 1996). Algunos trabajos publicados sobre el efecto del O₃ en el desarrollo poblacional de los áfidos (tasa relativa de crecimiento, fecundidad, o crecimiento poblacional), mostraron respuestas contradictorias, frente al contaminante. Existe casi el mismo número de publicaciones indicando un aumento, reducción o ningún efecto en el desarrollo de los áfidos (Holopainen 2002; Figura 4.3). Esta tesis

se basó en la consideración que las diferencias entre dichos resultados podrían deberse, en parte, a diferencias en el orden, intensidad y duración de la exposición al agente oxidante, pero también que las diferencias podrían estar asociadas con la escala de tiempo de los experimentos. En los capítulos anteriores se mostró la importancia del rol de estas variables en determinar el impacto relativo de los efectos *directos* e *indirectos* sobre los áfidos.

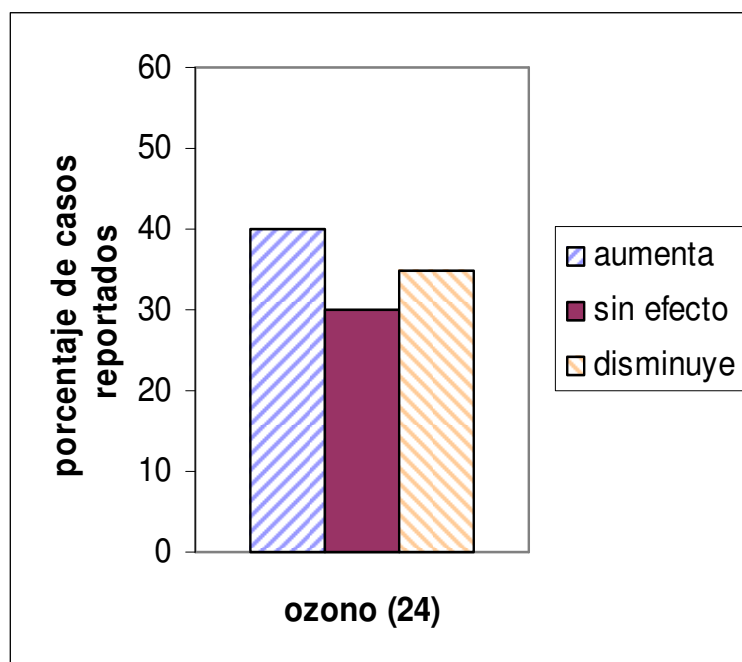


Figura 4.3. 24 experimentos publicados sobre los efectos de exposición a O₃ en el desarrollo de las poblaciones de áfidos.

El orden en que la planta se enfrenta a los factores de estrés tiene consecuencias sobre el siguiente organismo que la ataca, esto se debe a que ocurren cambios en el estado fisiológico-molecular. El fenotipo del hospedador es dependiente de la historia individual (Hatcher y col. 2004).

Las variables intensidad y tiempo de exposición a los factores de estrés también fueron evaluados en los experimentos. La herbivoría se reguló a través de la densidad de infestación inicial, dejando crecer a la población durante diferentes intervalos de tiempo. La concentración y tiempo de exposición a O₃ fueron determinados en dosis que indujeran las respuestas, sin provocar daño en las membranas celulares por peroxidación lipídica. Esto se realizó aplicando una técnica que permite medir la diferencia de conductividad en las membranas celulares (Hibberd 1987). Ambas variables, concentración y tiempo de exposición a O₃, se mantuvieron constantes para todos los ensayos.

Los resultados del capítulo 2 muestran que diferentes densidades iniciales de infestaciones colonizadoras alteran la aceptación de la planta por

los áfidos, modificando la respuesta en una infestación posterior. La respuesta inducida por una pre-infestación de áfidos de densidad alta y durante 72 horas, facilitó el crecimiento de la infestación posterior, en plantas de rúcula. Por otro lado, cuando las plantas de rúcula se exponen a O₃ seguido de una infestación de áfidos, dichas poblaciones crecen a una tasa mayor durante un periodo de tiempo. Esto es consistente con los efectos de la fumigación con O₃ sobre el desarrollo del áfido *Metopolophium dirhodum* en cereales (Jackson 1995). Por lo tanto, cuando alguno de los dos factores de estrés, biótico (áfidos) o abiótico (O₃), precede a la infestación, el crecimiento poblacional aumenta. Sin embargo, cuando los factores de estrés se aplicaron de manera simultánea no se observó ningún efecto sobre el crecimiento de la población de áfidos (Figura 3.5). Además, la combinación de estresores redujo el daño oxidativo en las plantas respecto del control (Figura 3.3).

Para entender mejor los cambios inducidos en las plantas durante estas interacciones, se analizó el balance bioquímico en cada situación, encontrando diferentes concentraciones de ROS. Estas moléculas son señales que tienen en común los mecanismos inducidos por ambos factores, O₃ y áfidos (Moli y col 2006, Wohlgenuth y col., 2002). Tanto en el capítulo 2 (Tabla 2.1) como en el 3, se observó que en los tratamientos donde el crecimiento de las poblaciones de áfidos fue significativamente mayor, el balance bioquímico de la planta reveló niveles bajos de daño por ROS (TBARs) y niveles de antioxidantes (TRAPs) significativamente más altos.

Los áfidos son sensibles a las concentraciones de ROS en el hospedador. En el capítulo 3 los experimentos relevan información sobre como el crecimiento poblacional de los áfidos en plantas sin herbivoría, estuvo condicionado por el balance bioquímico de la planta hospedadora original y su efecto en los áfidos al momento en que fueron trasladados de planta. Estos datos son cruciales para comprender las epidemias en poblaciones vegetales.

4.3. Contribuciones al estado actual del conocimiento en ecología

El manejo de sistemas biológicos involucra la aplicación de principios ecológicos y evolutivos (Shea y col. 2000). Un principio de la teoría de la historia de vida sostiene que la evolución de los caracteres relacionados al *fitness* o ajuste ecológico, podría restringirse por la existencia de compromisos entre ellos, es decir un cambio beneficioso en la expresión de una característica incurrirá en un cambio negativo en la expresión de otra (Dowling 2009). Por ejemplo, la evolución de resistencia a los herbicidas en muchas malezas, viene acompañada por una disminución en la tasa fotosintética y por lo tanto, en la ganancia de carbono lo que puede redundar en una desventaja en la competencia con otras especies en un escenario de ausencia de herbicidas (Vila-Aiub y Powles 2005). Tradicionalmente se ha explicado este tipo de compromisos en términos de balance energético: los recursos usados para una función no pueden usarse para otra. Sin embargo, en los últimos años han aumentado las evidencias que otros mecanismos distintos de la alocaación de recursos podrán ser la base de dichos compromisos. En el capítulo introductorio, se mencionó al balance de oxido-reducción, entre la producción

de ROS y la de antioxidante como uno de estos mecanismos alternativos. Las ROS a bajos niveles actúan como importantes moléculas señal y facilitan un conjunto de procesos biológicos esenciales como la capacidad de defenderse contra herbívoros y patógenos. Esta dependencia de los sistemas de defensa de las plantas de metabolitos altamente reactivos se vuelve un potencial peligro para ellas mismas: si no se controlan, los ROS podrían dañar no solo a los patógenos o herbívoros sino también a la planta huésped. Como se explicó anteriormente en esta tesis, las plantas han desarrollado varios mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para detoxificar los ROS. Se podría pensar entonces que las plantas se verían en un permanente desafío entre mantener la capacidad antiherbivoría mediada por la explosión oxidativa (producción de ROS) y la protección de sus propios tejidos a la oxidación. Mas aún, es esperable que la capacidad de detoxificación de las plantas muestre variación específica y ambiental y por lo tanto esté sujeta a presión de selección.

El O₃ es un compuesto que genera radicales libres o ROS en las plantas, a través de reacciones REDOX, ante los cuales la planta tiene capacidad de producir antioxidantes. El compromiso antes descrito podría entonces amplificarse durante periodos de estrés (alta contaminación, deficiencia de antioxidantes). En el desarrollo de esta tesis se observó que los ROS juegan un rol central en la interacción planta herbívoro bajo condiciones de estrés. La exposición de las plantas a un factor de estrés cambió su vulnerabilidad frente a un segundo agente de estrés. En el capítulo 2 se observó que una infestación previa facilitó el crecimiento de la población posterior en la misma planta, volviéndola más vulnerable. Resultados similares se obtuvieron al exponer las plantas a altas concentraciones de O₃ previo a la infestación con áfidos (datos no mostrados). El análisis bioquímico (TRAP) evidenció un aumento de antioxidantes para neutralizar el exceso de ROS inducidos por herbivoría o por O₃, lo que cambió el estado bioquímico de la planta frente al segundo ataque por herbívoros facilitando su proliferación. Por lo tanto, un aumento en la concentración de compuestos oxidantes en la troposfera podría inducir respuestas plásticas en las plantas que incrementen la producción de antioxidantes, a fin de neutralizar el daño oxidativo, y afecten la respuesta de defensa frente al siguiente factor de estrés.

Estos cambios podrían manifestarse de forma permanente en tiempos evolutivos bajo la incidencia del factor de estrés, afectando los parámetros que determinan el *fitness* de la especie. Por ejemplo, la selección por resistencia a O₃, determinada por la baja acumulación de ROS, podría conducir a una limitación en la extensión o supresión de los mecanismos de defensa activados por ROS. Según Langebartels et al. (2002), no hay explosión oxidativa en plantas genéticamente resistentes al O₃. Por lo tanto no se activaría la respuesta SA-dependiente, que normalmente inducen los áfidos, esto daría lugar a un aumento en la intensidad de ataque. Alternativamente, la presión de selección ejercida por los áfidos podría redundar en una disminución de la posibilidad de desarrollo de resistencia al O₃.

Asimismo, en esta tesis se mostró que las plantas infestadas con áfidos presentaron menos daño por O₃ (menor disminución en la concentración de clorofila y menor reducción en la relación tallo raíz). En este caso la exposición a la herbivoría redundó en una menor presión de selección generada por O₃, y

por lo tanto un cambio en la tasa potencial de evolución hacia poblaciones resistentes al contaminante, lo cual podría significar un costo adaptativo para la población, en ausencia de áfidos.

Por otro lado, si la posibilidad de evolución de resistencia al O₃ existe, esto podría acarrear un costo energético afectando la producción de semillas y por lo tanto su *fitness*. Por ejemplo, estudios de nuestro grupo de investigación mostraron que poblaciones de *Spergula arvensis* seleccionadas bajo altas concentraciones de O₃ producen una cantidad de semillas significativamente menor a las poblaciones seleccionadas en ambientes control. Sin embargo, la longevidad de las semillas en el campo de las primeras es sensiblemente mayor, lo que sugiere mayores niveles de antioxidantes. El gasto energético asociado a la producción de antioxidantes podría explicar en parte su menor esfuerzo reproductivo.

En el mismo sentido, los cambios en la composición atmosférica afectan determinados parámetros en los herbívoros mediados por la producción de ROS en el hospedador. Por ejemplo, entre mis resultados se observa una disminución en la tasa reproductiva de los insectos sobre plantas control, luego de haber sido expuestos a O₃ (capítulo 3). Los áfidos expuestos a O₃, perderían entonces la capacidad de explorar nuevos genotipos de plantas hospedadoras, concentrándose solo en aquellas plantas que hayan sido previamente facilitadas por el contaminante, o que sean naturalmente tolerantes al O₃ y que presenten por lo tanto un aumento de antioxidantes. Como se explicó antes, esto podría significar un compromiso para las plantas: la posibilidad de tolerar al O₃ las hace más susceptibles a los áfidos y por lo tanto aumenta sus riesgos de extinción local.

Alternativamente, el costo de reproducción representa uno de los compromisos más importantes en la historia de vida. Varios estudios demostraron que un aumento en el esfuerzo reproductivo resultó en un aumento en la susceptibilidad al estrés (Dowling 2009, Metcalfe 2010). A pesar que en mi tesis no se evaluaron poblaciones de áfidos con distinta tolerancia al O₃, es posible pensar que si los herbívoros son tolerantes a los radicales libres generados por el O₃, posiblemente sean también tolerantes a los ROS producidos como parte del sistema de defensa vegetal (por ej. inducido por áfidos). En ese caso, los insectos tolerantes al O₃ se reproducirán más que los sensibles, por lo que causarán un daño mayor en la planta, excepto que esa característica tenga algún costo de *fitness*. Los cambios producidos en el genoma del insecto que permiten una adaptación a las rápidas modificaciones ambientales, suelen tener un costo en el número de descendientes. Si en este caso existiera algún costo, entonces dichas plagas tendrán menor capacidad de reproducción en ambientes con bajo nivel de O₃ que los biotipos sensibles a O₃, lo que modificaría la intensidad de ataque.

Por lo tanto, el estrés oxidativo que generan pueden ser fuerzas selectivas actuando en diseño de las características fenotípicas (Metcalfe 2010). La trayectoria evolutiva tomada por algún carácter dado estará limitada por las trayectorias de un conjunto de otros caracteres con los cuales se encuentra vinculado. En muchos casos, la producción de ROS parece ser el factor limitante de su evolución (Dowling 2009).

Esta tesis pretende ser un aporte para comprender mejor cómo se coordinan las respuestas contra las amenazas bióticas y abióticas, sirviendo como herramienta para predecir potenciales efectos sobre la interacción O₃-planta-herbívoro. El tema adquiere especial relevancia en un contexto de cambio global. La crisis energética mundial y la preocupación por el medio ambiente, determinaron en las últimas décadas cambios importantes en las políticas de desarrollo agrícola de muchos de los países con importante participación en la producción mundial. Es importante, dado el perfil exportador de nuestro sector agrícola, responder y, mejor aún, anticiparse a las demandas del mercado internacional. Las tendencias para el futuro exigen una agricultura más competitiva, con una mayor eficiencia productiva y una mayor sustentabilidad en los cultivos, con alternativas de producción de mínimo impacto ambiental (INTA 2003).

La producción agrícola es la actividad de mayor importancia relativa del sector agropecuario, con un valor de alrededor de 20.000 millones de dólares y un aporte del 15% al PBI. Considerando que existe una brecha productiva cercana al 40% entre la producción potencial de los principales cultivos y sus rendimientos reales, resulta claro que aquel valor podría incrementarse notoriamente si se minimizan los factores limitantes de mayor importancia relativa, entre los que se destacan aquellos a considerar por el área de Protección Vegetal. El rendimiento de las plantas cultivadas está alejado del rendimiento potencial debido a que las plantas crecen normalmente en condiciones de estrés bióticos (ej. herbivoría) y abióticos (adversidades del suelo o climáticas). A estas condiciones se le suman los estresores de origen antrópico (pesticidas y contaminantes atmosféricos). El impacto de organismos y factores abióticos perjudiciales se refleja en modificaciones deletéreas en frutos, granos y fibras, que determinan que la producción agrícola argentina se caracterice por un bajo nivel de calidad. Esta situación, agravada por importantes subsidios agrícolas en países altamente desarrollados, variaciones erráticas anuales de nuestra producción y la aún baja eficiencia productiva argentina, atenta contra nuestra competitividad como país agro-exportador.

Con el fin de anticiparnos a los acontecimientos y generar soluciones acordes a ellos, esta tesis plantea uno de los problemas agrícolas que se espera que aparezcan en el mediano o largo plazo: el impacto de plagas sobre los cultivos en un escenario de aumento de la contaminación ambiental.

Aportes agronómicos

Los ecosistemas que se simplifican y modifican para satisfacer las necesidades alimenticias de humanos, quedan inevitablemente sujetos a daños por plagas y generalmente, mientras más intensamente se modifican tales ecosistemas más abundantes y serios son los problemas de plagas (Sala 1993). Esta tesis aporta conocimientos necesarios para identificar las oportunidades de minimizar pérdidas en los cultivos por plagas, en un escenario donde cambian las características físicas y químicas de la atmósfera, producto de las acciones del hombre. Por otra parte, es importante considerar las limitaciones del estudio dentro de las cámaras para realizar predicciones a otra escala espacial.

A pesar que las cámaras están abiertas a la atmósfera, poseen diferencias ambientales con el exterior. El flujo de aire se ve alterado, la temperatura fue aproximadamente 1,5° C mayor que el exterior y la humedad también aumentó. El acceso de plagas y enfermedades se ve alterado y el hecho que las plantas crezcan en macetas puede alterar la respuesta de las plantas (Long y col. 2006). Sin embargo, en los experimentos de esta tesis no se detectaron enfermedades ni presencia de herbívoros ajenos a los tratamientos experimentales. Sin embargo, Gregg y col. (2006) encontró una similitud de respuestas en plantas creciendo en zonas rurales con alta concentración de O₃ y cámaras del tipo open top, con niveles similares de O₃, como por ejemplo, el aumento en la conductancia estomática y disminución en la fotosíntesis, indicativo de pérdida del control estomático para muchas especies expuestas a elevadas concentraciones de O₃.

En la figura 4.4 se propone un modelo teórico dinámico, que reúne posibles condiciones naturales en un monocultivo de rúcula. Teniendo en cuenta que la exposición a O₃ y el ataque por los áfidos son eventos episódicos que ocurren localmente, se representan cuatro situaciones puntuales y las interacciones entre ellas. Las flechas negras indican la dirección y sentido de las migraciones de los áfidos entre parches del cultivo. La flecha más gruesa tiene un signo que predice cuál será el cambio en el crecimiento poblacional de los áfidos en ese parche.

Se podría esperar que campos agrícolas donde prevalezcan las condiciones propicias para la proliferación de las colonias de áfidos, bajo la interacción sinérgica provocada por el aumento en la concentración de O₃ y la exposición a la herbivoría, originen un brote epidémico. Estos resultados surgen de aplicar los conocimientos adquiridos en esta tesis.

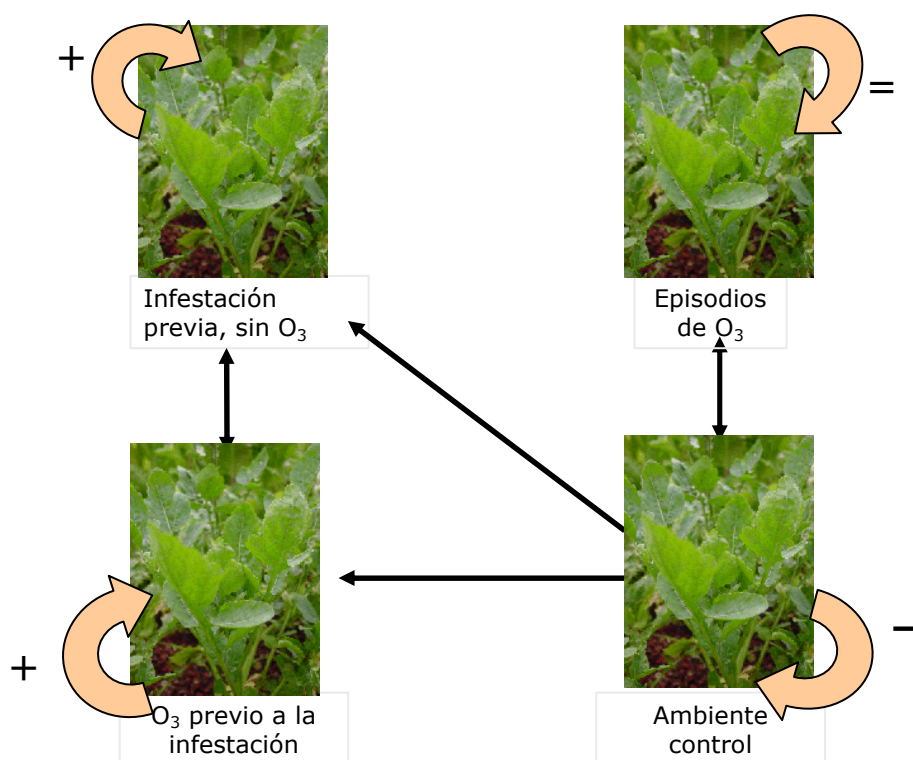


Figura 4.4. Modelo teórico a escala de meta-población. Representa un sistema de parches heterogéneo según exposiciones a O₃ y herbivoría, con dinámica migratoria y con variaciones de la población de áfidos.

En el manejo de sistemas biológicos involucran la aplicación de teoría ecológica y menos comúnmente teoría evolutiva. La epidemiología y el control de plagas en sistemas agrícolas requieren esencialmente los mismos procesos, con el objetivo de reducir el impacto de enfermedad en la población hospedadora. Para desarrollar estudios sobre este tema es necesario un sistema que categorice la información. Según Shea y col. (2000), la consideración de cómo la historia de vida, el comportamiento y la estructura espacial interactúan en determinar la dinámica del sistema o la trayectoria evolutiva, son necesarios para apuntar a nuevos enfoques de gestión. Esta tesis contribuye con la obtención de dichos conocimientos.

4.4. Conclusiones principales

A través de esta tesis se evidenció que las respuestas de las plantas frente al ataque de insectos herbívoros podrían estar fuertemente influenciadas por el

aumento futuro del nivel de O₃ troposférico, originando las siguientes conclusiones generales:

1. Conocer los efectos del O₃ y herbívoros como factores aislados no permite predecir los resultados de la interacción.
2. La superposición de las repuestas a ambos factores de estrés en escala bioquímica, no puede extrapolarse a la escala de individuo-población.
3. El balance entre la producción de ROS y la capacidad antioxidante juega un rol determinante de las interacciones.
4. El impacto del O₃ sobre el crecimiento de la población de áfidos va a depender del *orden de exposición* de las plantas a los factores de estrés.
5. La capacidad de infestación dependerá de la impronta en los áfidos de las condiciones previas y del estado oxidativo de la planta a colonizar.

El resultado de la triple interacción planta-áfido-O₃ dependerá, a nivel molecular, del balance entre las ROS y producción de antioxidantes, resultando de respuestas compartidas a ambos factores de estrés. Este balance estará determinado no solamente por magnitud relativa sino también por el tiempo y el orden de exposición a los factores de estrés.

Las interacciones de estrés fueron evidentes tanto a nivel de crecimiento individual de la planta como de la población de áfidos. Sin embargo, la estocasticidad en la aparición de niveles altos de O₃ y plantas desafiadas por áfidos dificulta hacer inferencias de las consecuencias de esas interacciones a nivel individual y poblacional. No obstante, la reducción del daño observado por un factor de estrés como resultado de la respuesta al segundo factor (Figura 3.3) contradice la idea común que las tasas de extinción podrían aumentar con el número de factores de estrés asociados con los cambios ambientales causados por el hombre.

Por último, es importante considerar que la dinámica de poblaciones simples no necesariamente se aplica cuando la dinámica es considerada sobre un área espacial extensa (Shea y col. 2000). La escala apropiada de estudio de las interacciones en espacio y tiempo depende de cada sistema en particular.

4.5. Líneas de investigación futuras

Durante el desarrollo de esta tesis he analizado información de distintas áreas del conocimiento como: química, entomología, ecología, agricultura, a los fines de estudiar de manera integral los alcances y los mecanismos de la interacción entre los cultivos, los áfidos y el O₃ troposférico y sus posibles consecuencias en los sistemas agrícolas. Además, he recopilado información teórica y empírica, sobre dichos temas en las que he basado las hipótesis, con la intención de sumar conocimiento a los actuales debates sobre el cambio global.

Para comprender mejor las interacciones planta-áfido-O₃ habrá que profundizar en otras ramas como en el rol de los áfidos dentro de las comunidades ecológicas y desarrollar nuevas y duraderas vías de manejo

biótico y abiótico en los tratamientos de resistencia para los cultivos. Para esto deberán realizarse estudios a diferentes niveles de organización.

Muchas preguntas quedan para contestar en el futuro tanto en un contexto ecológico como agrícola. Podríamos comenzar con las siguientes:

1. ¿Cuáles son los efectos netos del O₃ sobre áfidos que no interactúan con la planta? Aislar el efecto del O₃ sobre los áfidos ayudará a entender los efectos directos sobre las plagas.
2. Los patrones de respuesta a los factores de estrés discutidos en esta tesis, ¿podrán ser extrapolados a nivel de lote agrícola?
3. Los datos de mi tesis permitirían simular la probabilidad de brote epidémico a través de la aplicación de un modelo.
4. ¿Cómo se modifica el nivel de daño con plantas y herbívoros seleccionados en ambientes con alto nivel de O₃?

Sería importante abordar el análisis de la triple interacción planta-áfido-O₃ dentro de otra escala temporal, estudiando los cambios a nivel adaptativo. La adaptación a ciertos cambios ambientales puede tener un costo significativo del *fitness*, una disminución en la reproducción de los menos adaptados, cuando se compara a ambos en condiciones libres del agente selectivo. Los herbívoros podrían tener dificultad para ajustar su sistema digestivo al alimento, si este variase en la composición química (Heil y Baldwin 2002). Es poco lo que se conoce acerca de cuales pueden ser los compromisos que existen entre las adaptaciones necesarias para tolerar el ambiente oxidante troposférico y las que determinan la capacidad de los individuos vegetales para producir micro-ambientes oxidantes contra los herbívoros.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal A., Tuzun S. Bent E. 1999. Induced Plant defenses against response to Pathogens and Herbivores. 390 pp. St. Paul, Minnesota, APS Press.
- Agrell J., Kopper B., McDonald E.P., Lindroth R.L. 2005. CO₂ and ozone effects on host plant preferences of the forest tent caterpillar. *Global Change Biol.* 11, 588-599.
- Andorno A; Hernández C., Botto E.; Schultz S., La Rossa. 2007. Estudios biológicos de *Myzus persicae* (sulzer) (hemiptera: aphididae) sobre rúcula (*Eruca Sativa* mill.) En condiciones de laboratorio. *Ria*, 36 (2): 85-95. INTA
- Aramendia P.F., R.F. Prini, J. Gordillo. 2000. Buenos Aires en Buenos Aires? *Ciencia Hoy*, 6: 31.
- Ashmore M.R., 2002. Effects of oxidants at the whole plant and community level. *Air Pollution and Plant Life*, 89-118.
- Awmack C.S., Harrington R., Lindrith L. 2004. Aphid individual performance may not predict population responses to elevated CO₂ or O₃. *Global Change Biology*, 10, 1414-1423.
- Baier M., Kandlbinder A., Gollack D., Dietz K. 2005. Oxidative stress and ozone: perception, signaling and response. *Plant, Cell and Environment*, 28, 1012-1020.
- Benton J., Fuhrer J., Gimeno B.S., Skärby L., Palmer-Brown D., Roadknight C., & Mills G. 2000. An international cooperative programme indicates the widespread occurrence of ozone injury on crops. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 78, 19-30.
- Blackman R.L., and Eastop V.F. 2000. Aphids on the world's crops: an identification and information guide. Wiley John Wiley y Sons Chichester. England

- Bostock R.M. (2005). Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annual Review Phytopathology*, 43, 545–80.
- Botha A.M., Lacock L., van Niekerk C., Matsioloko M.T., du Preez F.B., Loots S. Venter E, Kunert K.J. y Cullis C.A. 2006. Is photosynthetic transcriptional regulation in *Triticum aestivum* L. cv. ‘TugelaDN’ a contributing factor for olerance to *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae)? *Plant Cell Reports*, 25, 41-54.
- Bruxelles G.L., y Roberts M.R. 2001. Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. *Plant Sciences*, 20, 487-521.
- Burkey K.O. and G. Eason. 2002. Ozone tolerance in snap bean is associated with elevated ascorbic acid in the leaf apoplast. *Physiologia Plantarum* 114: 387-394.
- Cabrera H. M., Muñoz O., Zúñiga G. E., Corcuera L. J. V. H. Argandaña. 1995. Changes in ferulic acid and lipid content in aphid-infested barley. *Phytochemistry*. 39,1023-1026.
- Casteel CL., O’neill B., Zavala J., Bilgin D., Berenbaum M y DeLucia E.H 2008. Transcriptional profiling reveals elevated CO₂ and elevated O₃ alter resistance of soybean (*Glycine max*) to Japanese beetles (*Popillia japonica*). *Plant, Cell and Environment* 31, 419–434
- Chisholm S.T., Coaker G., Day B., Staskawicz B.J. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124, 803-814.
- Cox G. W. and Atkins M.C. 1979. An analysis of world food production systems. *Agricultural Ecology*. 12, 297-327.
- Cross C. E., Van der Vliet A., Louie S., Thiele J.J., Halliwell B. 1998. Oxidative stress and antioxidants at biosurfaces: plants, skin, and respiratory tract surfaces. *Environ Health Perspect*, 106, 1241–1251.
- Darral N.M. 1989. The effect of air pollutants on physiological processes in plants. *Plant, Cell and Environment* 12, 1-30.
- Dugravot S., Brunissen L., Létocart E., Tjallingii Ch., Giordanengo P., Cherqui A. 2007. Local and systemic responses induced by aphids in *Solanum tuberosum* Plants. *The Netherlands Entomological Society* 123, 271–277.
- Docherty M., Salt D.T., and Holopainen J.K. 1997. The impacts of climate change and pollution on forest insect pests. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 104, 137-142.
- Dorschner K., Ryan J., Johnson R., Eikenbary R. 1987. .Modification of Host Nitrogen Levels by the Greenbug (Homoptera: Aphididae): Its Role in

- Resistance of Winter Wheat to Aphids. *Environmental Entomology*, 16, 1007-1011.
- Dowling D. K., Simmons L.W. 2009. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc. R. Soc.*, 276,1737-1745.
- Ellis C., Karafyllidis I., Turner J.G. 2002. Constitutive activation of jasmonate signaling in an *Arabidopsis* mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphae cichoracearum*, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*. *Molecular Plant-Microbe Inter*, 15, 1025-1030.
- Fares S., Loreto F., Kleist E., Wildt J. 2008. Stomatal uptake and stomatal deposition of ozone in isoprene and monoterpene emitting plants. *Plant Biol*. 10, 44-54.
- Felton GW, Eichenseer H 2000. Herbivore saliva and induction of resistance to herbivores and pathogens. In: Agrawal AA, Tuzun S, Bent E, editors. Induced plant defenses against pathogens and herbivores: *Biochemistry, Ecology, and Agriculture*. St. Paul, MN: APS Press; 1999, 19–36.
- Felton G.W., Donato K.K., Broadway R.M., Duffey S.S. 1992. Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dietary protein to a noctuid herbivore, *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology*, 38, 277-285.
- Fidantsef A.L., Stout M.J., Thaler J.S. 1999. Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxigenase, protease inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 54, 97-114.
- Finlayson-Pitts B.J., Pitts Jr. J.N. 1997. Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particulates. *Science*, 276, 1045-1051.
- Fiscus E.L., Booker F.L., Burkey K.O. 2005. Crop responses to ozone: uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning. *Plant Cell and Environment*, 28, 997-1011.
- Forman R.T.T. 1995. Creating sustainable environments. In: Land Mosaics. The Ecology of Landscapes and Regions. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 481- 514.
- Forslund K., Pettersson J., Bryngelsson T., and Jonsson L. 2000. Aphid infestation induces PR-proteins differently in barley susceptible or resistant to the birdcherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi*). *Physiologia Plantarum* 110: 496–502.

- Foyer C.H., Noctor G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 17, 1866–1875.
- Fuhrer J. 2003. Agroecosystem responses to combinations of elevated CO₂, ozone and global climate change. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 97, 1-20.
- Gatehouse J.A. 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist*, 156, 145-169.
- Glazebrook J, Chen W, Estes B, Chang H-S, Nawrath C, Metraux J-P, Zhu T, Katagiri F. 2003. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *The Plant Journal* 31, 217-228.
- Gianoli E. and Niemeyer H. M. 1997. Characteristics of hydroxamic acid induction in wheat triggered by aphid infestation. *J. Chem. Ecol.* 23: 2695- 2705.
- Girousse C., Moulia B., Silk W., Bonnemain, J.L. 2005. Aphid Infestation Causes Different Changes in Carbon and Nitrogen Allocation in Alfalfa Stems as Well as Different Inhibitions of Longitudinal and Radial Expansion. *Plant Physiol.* 137, 1474 -1484.
- Gomez S.K., Oosterhuis D.M., Rajguru S.N., Johnson D.R. 2004. Molecular Biology and Physiology foliar antioxidant enzyme responses in cotton after aphid herbivory. *J. Cotton Science* 8, 99 –104.
- Gregg J.W., Jones C.G., Dawson T.E. 2006. Physiological and developmental effects of O₃ on cottonwood growth in urban and rural sites. *Ecological Applications* 16 (6), 2368-2381.
- Grimes H.D., Perkins K.K. and Boss W.F. 1983. Ozone degrades into hydroxyl radical under physiological conditions. *Plant Physiology*, 72, 1016-1020.
- Harper A.M. and Kaldy M.S. 1982. Effect of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera (Homoptera: Aphididae)) on yield and quality of forage alfalfa. *Can. Entomol.* 114, 485 – 489.
- Hatcher P.E., Moore J., Taylor J.E., Tinney G.W., Paul N.D. 2004. Phytohormones and plant-herbivore-pathogen interactions: integrating the molecular with the ecological. *Ecology*, 85, 59-69.
- Hays D.B., Porter David R., Webster J. A., Carver B. F.1999. Feeding Behavior of Biotypes E and H Greenbug (Homoptera: Aphididae) on Previously Infested Near-Isolines of Barley *Journal of Economic Entomology*, 92, 1223-1229.

- Heagle A.S., Miller J.E., Rawlings J.O., Vozzo S.F. 1991. Effect of growth stage on soybean responses to chronic ozone exposure. *Journal of Environmental Quality*, 20, 562-570.
- Heagle A.S., Body D.E., Heck W.W. 1973. An Open-Top Field Chamber to Assess the Impact of Air Pollution on Plants. *Journal Environ. Qual.* 2, 365-368.
- Heath R.L. 1987. The biochemistry of ozone attack on the plasma membrane of plant cells. *Recent Advances in Phytochemistry*, 21, 29-54.
- Heil M. and Baldwin I.T. 2002. Fitness costs induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science*, 7 N°2.
- Hewit C.N. and Street R.A. 1992. *Atmospheric Environment* 26A, 3069-3077.
- Hibberd A.M., 1987. Different fenotypes associated with Incompatible races and resistance genes in bacterial spot disease of pepper. *Plant Disease* 71:1075-1078.
- Hogsett W.E., Tingey D.T., Colman S.R. 1985. A programmable exposure control system for determination of the effects of pollutant exposure regimes on plant growth. *Atmos. Environ.* 19, 1135 - 1145.
- Holopainen J.K. 2002. Aphid response to elevated ozone and CO₂. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 104,137-142.
- Hunter M.D. 2000. Mixed signals and cross-talk: interactions between plants, insect herbivores and plant pathogens. *Agricultural and Forest Entomology*, 2, 155-160.
- Ilarduya O. Martinez de, Xie QiGuang, and Kaloshian Isgouhi. 2003. Aphid-Induced Defense Responses in Mi-1-Mediated Compatible and Incompatible Tomato Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Vol. 16, No. 8, 2003, pp. 699–708.
- Jackson G. E. 1995. The effect of ozone, nitrógeno dioxide or nitric oxide fumigation of cereal son the rose grain aphid *Metopolophium dirhodum*. *Agricult. Ecosys. And Environment* 54, 187-194.
- Jackson R.B., Linder C. Lynch M. Purugganan M R Somerville S. y Thayer SS., 2002. Linking molecular insight and ecological research. *Trends in Ecology & Evolution* 17 No.9.
- Jacob D.J. and Wofsy S.C. 1988. Photochemistry of biogenic emissions over the Amazon forest. *Journal of Geophysical Research* 93: 1477-1486

- Kangasjärvi J., Jaspers P., & Kollist H. 2005. Signaling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant, Cell and Environment*, 28, 1021-1036.
- Karban I. and Baldwin T. 1997. Induced responses to herbivory. The University of Chicago Press. Chicago.
- Karban R. and Myers J.H. 1989. Induced plant responses to herbivory. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 20, 331 - 348.
- Karley A. J., Parker W. E., Pitchford J. W., Douglas A. E. 2004. The mid-season crash in aphid populations: why and how does it occur? *Ecological Entomology* 29, 383–388.
- Kessler A., and Baldwin I.T. 2002. Plant responses to insect herbivory. The emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 299-328.
- Khattab H. 2007. The defense mechanism of cabbage plant against phloem-sucking aphid (*Brevikoryne brassicae* L.). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 1, 56-62.
- Langebartels C., Wohlgemuth H., Kschieschan S., Grün S., Sandermann H. 2002. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 567–575.
- Larsson S. 1989. Stressful times for the plant stress-insect performance hypothesis. *Oikos*, 56, 277-283.
- Lissi E., Pascual C., Del Castillo M., 1992. Luminol luminescence induced by 2,2'- Azo-bis (2-amidinopropane) thermolysis. *Free Rad. Res. Comms.* 17, 299 - 311.
- Long S.P., Ainsworth E.A., Leakey A.D. B., Nosberger J., Ort D R. 2006. Food for Thought: Lower-Than-Expected Crop Yield Stimulation with Rising CO₂ Concentrations. *Science* 312, 1918.
- Loreto F., Pinelli P., Manes F., Kollist H. 2004. Impact of ozone on monoterpene emissions and evidence for an isoprene-like antioxidant action of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* leaves. *Tree Physiol.* 24, 361–367.
- Lukasik I., Goławska S., Wójcicka A. 2009. Antioxidant defense mechanisms of cereal aphids based on ascorbate and ascorbate peroxidase. *Biologia* 64/5, 994-998.
- Lukasik I. 2007. Changes in activity of superoxide dismutase and catalase within cereal aphids in response to plant o-dihydroxyphenols. *J. Appl. Entomol.* 131(3), 209-214.

- Luwe M.W.F., U. Takahama, U. Heber. 1993. Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacea oleracea* L.) leaves. *Plant Physiology* 101: 969-976.
- Madkour SA. y Laurence JA. 2002. Egyptian plant species as new ozone indicators. *Environmental Pollution* 120, 339-353.
- Mastelic J., Jerkovic I., Blazjevic I., Radonic A., Krstulovic L. 2008. Hydrodistillation-adsorption method for the isolation of water-soluble, non-soluble and high volatile compounds from plant materials. *Talanta* 76, 885-891.
- Mazza C.A., Izaguirre M.M., Zavala J., Scopel A.L., Ballaré C.L. 2002. Insect perception of ambient ultraviolet-B radiation. *Ecology Letters*, 5:722-726.
- Menéndez A. I., A.M.Romero, A.M.Folcia and M.A. Martinez-Ghersa. 2009. Getting the interactions right: does ozone interfere with antiherbivore defenses? *Basic and Applied Ecology* 10, 255-264.
- Metcalf NB. y Alvarez CA., 2010. Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Functional Ecology*, 24, 984-996.
- Miles P. W. 1999. Aphid saliva Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society 74:1:41-85
- Miles P.W., Oertli J.J. 1993. The significance of antioxidants in the aphid-plant interaction: the redox hypothesis. *Entomol. Exp. Appl.* 67, 273 - 285.
- Moloi M.J., Van der Westhuizen A.J. 2006. The reactive oxygen species are involved in resistance responses of wheat to the Russian wheat aphid. *Journal of Plant Physiology* 163, 1118-1125.
- Mondor E.B., Tremblay M.N., Awmack C.S., Lindroth R.L. 2005. Altered genotypic and phenotypic frequencies of aphid populations under enriched CO₂ and O₃ atmospheres. *Global Change Biology*, 11, 1990-1996.
- Montllo C., Bruce R., Campbell T., Mittler E.1983. Natural and induced differences in probing behavior of two biotypes of the greenbug, *schizaphis graminum*, in relation to resistance in Sorghum. *Ent. Exp.y Appl.* 34, 99-106
- Moran P.J., Cheng, Y., Cassell J.L., Thompson G.A. 2002. Gene Expression Profiling of *Arabidopsis thaliana* in Compatible Plant-Aphid Interactions. *Archives Insect Biochem. Physiol.* 51, 182 – 203

- Moran P.J. and Thompson G.A. 2001. Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways. *Plant Physiology*, 125, 1074-1085.
- Mudgett M.B. 2005. New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 509-531.
- Noctor G. 2006. Metabolic signaling in defense and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell and Environment*, 29, 409-425.
- Noctor G. and Foyer C.H. 1998. Ascorbate and glutathionate: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology*, 49, 249-279.
- Nombela G., Garzo E., Duque M., y Muñiz M. 2008. Preinfestations of tomato plants by whiteflies (*Bemisia tabaci*) or aphids (*Macrosiphum euphorbiae*) induce variable resistance or susceptibility responses. *Bulletin of Entomological Research*.
- Norby R.J., Wullschlegel S.D., Gunderson C.A., Johnson D.W., Ceulemans R. 1999. Tree responses to rising CO₂ in field experiments: implications for the future forest. *Plant, Cell, Environ.* 22, 683-714.
- Olszyk D.M., Tibbitts T.W., Hertsberg W.M. 1980. Environment in open-top field chambers utilized for air-pollution studies. *J. Environ. Qual.* 9, 610-615.
- Paul N.D., Taylor J.E., Hatcher P.E. 2000. Coping with multiple enemies: an integration of molecular and ecological perspectives. *Trends in Plant Science* 5, 220-225.
- Pell E.J., Schlagnhauer C.D., Arteca R.N. 1997. Ozone-induced oxidative stress: mechanisms of action and reaction. *Physiol Plant* 100: 264-273.
- Percy K.E., Awmack C.S., Lindroth R.L. 2002. Altered performance of forests pests under atmospheres enriched by CO₂ and O₃. *Nature* 420, 403 - 407.
- Perl-Treves R., Perl A. 2002. Oxidative stress: An introduction. In: Inzé, D., Van Montagu (Eds.), *Oxidative stress in plants*. Taylor and Francis, 1 - 32.
- Pleijel H., Danielson H. 1997. Growth of 27 herbs and grasses in relation to ozone exposure and plant strategy. *New Phytologist* 135, 361-367.
- Pollard D.G. 1973. Plant penetration by aphid feeding aphids (Hemiptera, Aphidoidea): a review. *Bull Entomol. Res.* 62, 631 - 714.
- Pollard D.G. 1972. The stylet structure of a leafhopper (*Eupteryx melissae* Curtis: Homoptera, Cicadellidae). *Journal of Natural History*, 6, 261-271.

- Ponder KL, Pritchard J, Harrington R y Bale J.S. 2001. Feeding behavior of the aphid *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera, Aphididae) on nitrogen and water-stressed barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. *Bulletin of Entomological Research* 91, 125–130.
- Rao M.V., Koch J.R., Davis K.R. 2000. Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. *Plant Molecular Biology*, 44, 345-358.
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer E.E. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12, 707–719
- Rogers H.H., Heck W.W., Heagle A.S. 1983. A field technique for the study of plant responses to elevated carbon dioxide concentrations *J. Air Pollution Control Assoc.* 33, 42-44.
- Ryan J.D., Morgan A.T., Richardson P.E., Johnson R.C., Mort A.J., Eikenbary R.D. 1990. Greenbug and wheat: Model system for the study of phytotoxic Homoptera, 171-186. In R.K. Campbell & R.D. Eikenbary (eds.), *Aphid-plant genotype interactions*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 378p.
- Sala O. E. 1993. El Cambio global : su efecto en plantas y animales. *Agro mercado* N° 76, 28.
- Sandermann H. D. Ernst, W. Heller and c Langebartels. 1998. Ozone: an abiotic elicitor of plant defense reactions. *Trend Plant Sci.* 3, 47-50.
- Sandermann H. 1996. Ozone and plant Elath, *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 347-366.
- Sauge M.H., Mus F., Lacroze J.P., Pascal T., Kervella J., Poëssel J.L. 2006. Genotypic variation in induced resistance and induced susceptibility in the peach -*Myzus persicae* aphid system. *Oikos* 113, 2, 305 - 313(9).
- Scheel D. 2002. Oxidative burst and the role of reactive oxygen species in plant-pathogen interactions. In: D. Inzé & M. Van Montagu (Eds.), *Oxidative stress in plants* (pp. 137-153). New York Taylor & Francis.
- Schraudner M., Moder W., Wiese C., W van Camp., Inze, D., Langebartels, C. 1998. Ozone induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant tobacco Bel W3. *Plant J.* 16, 235 - 245.
- Sharma Y.K., León J., Raskin I., Davis K.R. 1996. Ozone induced responses in *Arabidopsis thaliana*: the role of SA in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Plant Biology*, 93, 5099-5104.

- Shea K., Trall P.H., Burdon J. 2000. An integrates approach to Management in epidemiology and pest control. *Ecology Letters* 3, 150-158.
- Sih A., Bell A.M., Kerby J.L. 2004. Two stressors are far deadlier than one. *Trends in Ecology and Evolution*, 19, 274-276.
- Smith C. and Boyko E. 2007. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feedeing: current status. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 122: 1-16.
- Stout M.J., Fidanstef A.L., Duffey S.S., Bostock R.M. 1999. Signal interaction in pathogen and insect attack: systemic plant-mediated interactions between pathogens and herbivores of the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 54, 115–30.
- Stout M.J., Workman K.V., Bostock R.M., Duffey S. 1998. Specificity of induced resistance in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Oecologia*, 113, 74-81.
- Strain B.R., Allen L.H.J., Baldocchi D. 1991. Available technologies for field experimentation for elevated CO₂ in global change research. In: H.A. Mooney (Ed.), *Ecosystem Experiments*. 245-261. Wiley, New York.
- Thaler J.S. 1999. Induced resistance in agricultural crops: effects of jasmonic acid on herbivory and yield in tomato plants. *Environmental Entomology*, 28, 30-37.
- Tamaoki M., Matsuyama T., Kanna M. 2003. Differential ozone sensitivity among Arabidopsis accessions and its relevance to ethylene synthesis. *Planta*, 216, 552-560.
- Taylor J.E., Hatcher P.E., Paul N.D. 2004. Crosstalk between plant responses to pathogens and herbivores: a view from the outside in. *Journal of Experimental Botany*, 55/395, 159-168.
- Taylor J.E., Hatcher P.E., Paul N.D. 2003. Crosstalk between plant responses to pathogens and herbivores: a view from the outside in *Journal of Experimental Botany*, 395, 159 -168.
- Thompson G.A., and Goggin F.L. 2006. Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects. *Journal of Experimental Botany*, 57, 755-766.
- Van Wees S.C.M., Chang H.S., Zhu T., Glazebrook, J. 2003. Characterization of the early response of Arabidopsis to *Alternaria brassicicola* infection using expression profiling. *Plant Physiology*, 132, 606-617.

- Vandermeiren K, Black C, Pleijel H, DE Temmerman L. 2005. Impact of rising tropospheric ozone on potato: effects on photosynthesis, growth, productivity and yield quality. *Plant, Cell and Environment* 28, 982–996.
- Velikova V, Pinelli P, Pasqualini S, Reale L, Ferranti F. 2005. Isoprene decreases the concentration of nitric oxide in leaves exposed to elevated ozone. *New Phytologist*, 166: 419-426
- Vila Aiub MM 2005, Neve P & Powles SB (2005). Fitness Costs of Evolved Herbicide Resistance. *Encyclopedia of Pest Management* (D. Pimentel editor), Marcel Dekker, New York, Taylor and Francis. 1-3, 903.
- Vinzargan R. 2004. A review of surface ozone background levels and trends. *Atmospheric Environment*, 38, 3431-3442.
- Vitousek P.M., Mooney A.M., Lubchenco J., Melillo J. M. 1997. Human domination of earth ecosystems. *Science* 277, 494-497.
- Vitousek P. 1992. Perspective in the nitrogen cycle. Pages 151-163 in: B. Moore III and D. Schimel (Eds) Trace gases in the biosphere. UCAR, Boulder, Colorado.
- Von Tiedemann A.V., Firching K.H. 2000. Interactive effects of elevated ozone and carbone dioxide on growth and yield of leaf rust-infected versus non-infested wheat. *Environ. Pollut.* 108, 357 - 363.
- Vuorinen T., Nerg A. M., Holopainen J. K. 2004. Ozone exposure triggers the emission of herbivore-induced plant volatiles, but does not disturb tritrophic signaling. *Environ. Pollut.* 131, 305-311.
- Walling L. 2000. The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation* 19,195 -216.
- Wayner D.D.M., Burton G.W., K.U. Ingold and Locke S. 1985. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *Federation of European Biochemical Societies*, vol 187-1. 33-37.
- Webb SE. 2004. Insect Management for Crucifers (Cole Crops) (Broccoli, Cabbage, Cauliflower, Collards, Kale, Mustard, Radishes, Turnips). *Entomology y Nematology Department document* ENY. 36.
- Wohlgemuth H., Mittelstrass K., Kschieschan S., Bender J. 2002. Activation of oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant Cell and Environment*, 25, 717-726.
- Yagi K., 1976. A simple fluorometric assay for lipoperoxide involved in blood plasma. *Biochem. Med.* 15, 212-216.

- Yalpani N., Enyedi A.J., León J., Raskin I. 1994. Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta*, 193, 373-376.
- Zamoum T, J-C Simon, D Crochard, Y Ballanger, L Lapchin, F Vanlerberghe-Masutti and T Guillemaud¹ 2005 Does insecticide resistance alone account for the low genetic variability of asexually reproducing populations of the peach-potato aphid *Myzus persicae*?
- Zhu-Salzman K., Bi J-L., Liu, T-X. 2005. Molecular strategies of plant defense and insect counter-defense. *Insect Science*, 12, 3-15.
- Zhu-Salzman K., Salzman R. A., Ji-Eun A., Hisashi K. 2004. Transcriptional Regulation of Sorghum Defense Determinants against a Phloem-Feeding Aphid. *Plant Physiol.* 134, 420-431.