

**Relación entre la emisión de señales volátiles de las mezclas de *Artemisia annua*-soja, *Chenopodium album*-soja sobre la herbivoría de *Anticarsia gemmatalis* y sus enemigos naturales**

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

Marianne Torcat Fuentes  
Ingeniera Agrónoma  
Universidad Central de Venezuela  
2010

Lugar de trabajo: Cátedra de Cultivos Industriales  
Departamento de Producción Vegetal  
Facultad de Agronomía  
Universidad de Buenos Aires



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





## COMITÉ CONSEJERO

Directora de tesis

**Elba Beatriz de la Fuente**

Título de grado (Universidad)

*Magister Scientiæ* (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

Co- Director de tesis

**Hugo Chludil**

Farmacéutico (Universidad Nacional de la Patagonia SJB)

Doctor en Farmacia (Universidad Nacional de la Patagonia SJB)

Consejero de Estudios

**Jorge Zavala**

Título de grado (Universidad)

*Magister Scientiæ* (Universidad de Buenos Aires)

Doctor Rerum Naturalis (Friedrich Schiller Universität, Alemania)



**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**

**Torcat Fuentes, M., Lenardis, A., de la Fuente, E.B.** 2018. Insect assemblies related to volatile signals emitted by different soybean– weeds – herbivory combinations. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 255: 20-26.



## INDICE GENERAL

<b>PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS .....</b>	<b>v</b>
<b>INDICE GENERAL .....</b>	<b>vii</b>
<b>INDICE DE CUADROS .....</b>	<b>xi</b>
<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>xvii</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>xix</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xxi</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>1</b>
Introducción general.....	1
<b>1.1 INTRODUCCION .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1 Agroecosistema pampeano .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.2 Posibles soluciones .....</b>	<b>6</b>
<i>Interacciones entre componentes del agroecosistema .....</i>	<i>8</i>
Interacciones entre el cultivo y los insectos .....	11
<i>Defensas químicas del cultivo soja .....</i>	<i>14</i>
<b>Hipótesis 1 .....</b>	<b>17</b>
<b>Hipótesis 2 .....</b>	<b>18</b>
<b>Hipótesis 3 .....</b>	<b>19</b>
<b>Hipótesis 4 .....</b>	<b>20</b>
<b>1.1 OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICOS .....</b>	<b>22</b>
<b>1.2 METODOLOGÍA GENERAL .....</b>	<b>23</b>
<b>1.2.1 Sitio experimental .....</b>	<b>24</b>
<b>1.2.2 Descripción general del experimento a campo .....</b>	<b>25</b>
<b>1.2.3 Material utilizado .....</b>	<b>27</b>
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>31</b>
Cambios en la herbivoría en el cultivo de soja .....	31
<b>2.1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>33</b>
<i>Oruga de las leguminosas .....</i>	<i>33</i>
<i>Interacción cultivo - herbívoro - maleza .....</i>	<i>34</i>
<i>Cultivo de soja en el agroecosistema pampeano .....</i>	<i>35</i>
<b>2.1.1 Objetivo e hipótesis .....</b>	<b>37</b>
<b>2.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>

2.2.1	<b>Ensayo a campo</b> .....	37
2.2.2	<b>Análisis de los datos</b> .....	41
2.3	<b>RESULTADOS</b> .....	41
2.4	<b>DISCUSION</b> .....	44
2.5	<b>CONCLUSIONES</b> .....	49
<b>CAPÍTULO 3</b> .....		51
Respuesta del cultivo frente a la herbivoría: crecimiento compensatorio .....		51
3.1	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	53
<i>Tolerancia</i> .....		54
<i>Tolerancia en el cultivo de soja</i> .....		56
3.1.1	<b>Objetivo e hipótesis</b> .....	59
3.2	<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	60
3.3	<b>RESULTADOS</b> .....	63
3.4	<b>DISCUSION</b> .....	70
<b>CAPÍTULO 4</b> .....		77
Defensas químicas del cultivo en respuesta a la herbivoría.....		77
Supervivencia de <i>Anticarsia gemmatalis</i> frente a las defensas químicas del cultivo .		77
4.1	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	79
<i>Proceso evolutivo</i> .....		80
<i>Defensas directas</i> .....		81
<i>Señalización entre plantas</i> .....		84
Costos.....		86
4.1.1	<b>Objetivos e hipótesis</b> .....	88
4.2	<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	88
4.3	<b>RESULTADOS</b> .....	95
4.4	<b>DISCUSION</b> .....	107
4.4.1	<i>Relación entre los compuestos químicos y los tratamientos</i> .....	107
4.4.2	<i>CLAR</i> .....	109
4.4.3	<i>Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante</i> .....	111
4.4.4	<i>Supervivencia</i> .....	112
4.5	<b>CONCLUSIONES</b> .....	114
<b>CAPÍTULO 5</b> .....		117
Relación entre los volátiles del sistema y la comunidad de insectos .....		117

<b>5.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	119
<b>5.1.1 Objetivo e hipótesis</b> .....	122
<b>5.2 MATERIALES Y METODOS</b> .....	123
<b>5.3 RESULTADOS</b> .....	127
5.2.1 <i>Relación entre las huellas olfativas y la comunidad de insectos</i> .....	127
5.2.2 <i>Composición de las comunidades de insectos</i> .....	129
5.2.3 <i>Riqueza de insectos</i> .....	133
5.2.4 <i>Señales químicas (huellas olfativas) presentes en el sistema</i> .....	135
<b>5.3 DISCUSION</b> .....	137
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	145
Síntesis y discusión general .....	145
<b>6.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	147
<b>6.2 ESQUEMA GENERAL Y CONTRASTE DE HIPÓTESIS</b> .....	147
<b>6.2.1 Objetivo 1: Evaluar la herbivoría de <i>A. gemmatalis</i> en el cultivo de soja puro o en mezclas con distintas densidades de malezas productoras de diversos metabolitos secundarios</b> .....	149
<b>6.2.2 Objetivo 2a: Determinar el efecto de la herbivoría de <i>A. gemmatalis</i> sobre el crecimiento en un cultivo de soja acompañado de malezas productoras de distintos metabolitos secundarios</b> .....	150
<b>6.2.3 Objetivo 2b: Evaluar la relación competitiva entre el cultivo de soja y las malezas acompañantes en respuesta a la herbivoría de <i>A. gemmatalis</i>.</b>	151
<b>6.2.4 Objetivo 3a: Determinar el efecto de la herbivoría de <i>A. gemmatalis</i> sobre la producción de compuestos de defensa del cultivo de soja acompañado de malezas productoras de distintos metabolitos secundarios</b>	151
<b>6.2.5 Objetivo 3b: Evaluar la supervivencia de <i>A. gemmatalis</i> en el cultivo de soja puro o en mezclas soja - <i>A. annua</i> y soja - <i>C. album</i></b> .....	152
<b>6.2.6 Objetivo 4: Evaluar la comunidad de insectos y su relación con las señales químicas emitidas por el cultivo de soja puro o en mezclas con malezas productoras de metabolitos secundarios junto con la herbivoría de <i>A. gemmatalis</i>.</b> Los resultados mostraron distintas huellas olfativas relacionadas a las diferentes combinaciones cultivo – maleza - herbivoría (Figura 5. 8), lo cual podría asociarse al conjunto de señales volátiles o “blend” generado por cada combinación en el momento de muestreo. Las huellas olfativas presentan un patrón similar, sin embargo, se aprecian variaciones con respecto al estado ontogénico (Fehr et al., 1977), al tipo de maleza acompañante, a la densidad y al tratamiento de herbivoría. Estos resultados coinciden con lo propuesto por	

Maffei (2010), que señala que los compuestos orgánicos volátiles (VOC, en inglés) varían en su concentración y composición según el tipo de planta, su estado sanitario (*i.e.* enfermedad, defoliación) y por los demás componentes del sistema presentes (*i.e.* insectos, aves, patógenos). Además, Heil y Kost (2006) y (Heil, 2010a) muestran que las huellas olfativas generadas por un cultivo en un determinado agroecosistema puede verse afectado cuando las plantas que acompañan al cultivo emiten distintos compuestos volátiles..... 153

<b>6.3</b>	<b>CONTRIBUCIÓN AL AVANCE DEL CONOCIMIENTO .....</b>	<b>155</b>
6.3.1	Interacción cultivo - malezas – herbívoro .....	155
6.3.2	Respuestas del cultivo soja.....	157
6.3.3	Relación entre las señales volátiles y la comunidad de insectos....	159
<b>6.4</b>	<b>APLICACIÓN.....</b>	<b>159</b>
6.4.1	Inter-cultivos .....	159
6.4.2	Utilización de compuestos químicos de la maleza <i>A. annua</i> .....	160
6.4.3	Umbral de daño .....	161
<b>6.5</b>	<b>NUEVOS INTERROGANTES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>161</b>
<b>6.6</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>162</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>164</b>

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. 1. Determinaciones químicas del suelo correspondiente a un Argiudol vértico (de acuerdo a la taxonomía del USDA, 1999) .....	24
Cuadro 1. 2. Datos climáticos (temperatura y precipitación) correspondientes a los años de experimento a campo.....	25
Cuadro 2. 1. Punto medio y límites inferior y superior para cada clase obtenidos con el programa DOSLOG (Boito <i>et al.</i> , 2013).....	40
Cuadro 4. 1. Compuestos químicos identificados sobre la base de los cromatogramas obtenidos en el HPLC y a la bibliografía consultada. El nombre del pico corresponde con el perfil cromatográfico de la Figura 4.3. Tr es el tiempo de retención (minutos); $\lambda$ max (nm) es la longitud de onda de máxima absorción del compuesto.....	97
Cuadro 4. 2. Correlación entre las variables (compuestos) con los ejes para el año 1, estimado a través de Pearson y Kendall .....	100
Cuadro 4. 3. Correlación entre las variables (compuestos) con los ejes para el año 2, estimado a través de Pearson y Kendall .....	101
Cuadro 5. 1. Grupo, orden, familia, función, especie y constancia de insectos que visitaron los diferentes tratamientos durante el año 2.....	131
Cuadro 5. 2. Grupo, orden, familia, función, especie y constancia de insectos que visitaron los diferentes tratamientos durante el año 3.....	132



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1. Representación esquemática de un agroecosistema (caja grande), sus subsistemas (cajas punteadas), sus componentes (cajas pequeñas), los factores que los modulan (flechas de bloque), las salidas del sistema (llaves) y las principales interferencias asociadas con las malezas (flechas punteadas). Adaptado de Swift y Anderson, 1993. ....	9
Figura 1. 2. Representación esquemática de las principales interacciones entre cultivo, maleza y herbívoro. ....	9
Figura 1. 3. Diagrama esquemático de los objetivos específicos presentados en la tesis. ...	23
Figura 1. 4. Representación esquemática del diseño experimental y la distribución a campo de las unidades experimentales. ....	26
Figura 1. 5. Vista general del experimento con el revestimiento total de la estructura. ....	27
Figura 1. 6. Diagrama de los experimentos realizados según su nivel de aproximación y desarrollo dentro de la estructura de la tesis. ....	29
Figura 2. 1. Representación esquemática de los tratamientos y las mediciones implementadas para cumplir con el objetivo del presente capítulo. ....	38
Figura 2. 2. Vista general del experimento y de las parcelas delimitadas con la tela de tul. ...	39
Figura 2. 3. Escala diagramática de daño por orugas defoliadoras en el cultivo de soja (Boito <i>et al.</i> , 2013). ....	39
Figura 2. 4. Nivel de defoliación sobre el cultivo soja generada por la oruga <i>Anticarsia gemmatalis</i> en los distintos tratamientos para el año 2. Las barras representan el error estándar de la media. ....	42
Figura 2. 5. Nivel de defoliación generada de forma espontánea sobre el cultivo soja en los distintos tratamientos para el año 3 (izquierda) y año 4 (derecha). Las barras representan el error estándar de la media. ....	43
Figura 2. 6. Rendimiento del cultivo en función de la densidad de la maleza. ....	43
Figura 2. 7. Porcentaje de pérdida de rendimiento del cultivo soja en función de la densidad de la maleza <i>Artemisia annua</i> , con (línea segmentada) y sin (línea continua) herbivoría de <i>Anticarsia gemmatalis</i> . Las barras representan el error estándar de la media. ....	44
Figura 3. 1. Representación esquemática de las defensas de las plantas en respuesta al ataque de insectos defoliadores (Modificado de Kessler y Baldwin, 2002) ....	54
Figura 3. 2. Progreso de la diferenciación de primordios foliares a partir del meristema apical del tallo principal (línea llena) y a partir de meristemas axilares (línea punteada) durante el primer mes desde la siembra (Modificado de Borthwick y Parker, 1983). ....	56
Figura 3. 3. Representación esquemática de los tratamientos y las mediciones implementadas para cumplir con el objetivo del presente capítulo. ....	61
Figura 3. 4. Biomasa aérea (g) del cultivo de soja en los tratamientos soja pura (SP), 2 plantas <i>A. annua</i> m <sup>2</sup> (2A), 4 plantas <i>A. annua</i> m <sup>2</sup> (4A), 2 plantas <i>C. album</i> m <sup>2</sup> (2C), 4 plantas <i>C. album</i> m <sup>2</sup> (4C), con (+H, barras punteadas) y sin (barras lisas) herbivoría de <i>A. gemmatalis</i> , para el año 1 (arriba) y año 2 (abajo). Las barras representan el error estándar de la media. ....	64

Figura 3. 5. Altura de la planta (barras) y número de ramas (puntos) del cultivo de soja en los tratamientos soja pura (SP), 2 plantas <i>A. annua</i> .m <sup>-2</sup> (2A), 4 plantas <i>A. annua</i> .m <sup>-2</sup> (4A), 2 plantas <i>C. album</i> .m <sup>-2</sup> (2C), 4 plantas <i>C. album</i> .m <sup>-2</sup> (4C), con (+H, barras punteadas) y sin (barras lisas) herbivoría de <i>A. gemmatalis</i> , para el año 2. Las barras representan el error estándar de la media. ....	65
Figura 3. 6. Cambio relativo de la producción total (RCT) en plantas defoliadas con respecto a su control para el año 1 (izquierda) y el año 2 (derecha). Las barras representan el error estándar de la media. ....	65
Figura 3. 7. Relación entre la producción total de biomasa aérea (g) con y sin herbivoría de <i>A. gemmatalis</i> durante los años 1 y 2. La línea segmentada representa la relación 1:1 ...	66
Figura 3. 8. Relación entre el rendimiento (kg.ha <sup>-1</sup> ) de los tratamientos con y sin herbivoría durante el año 2. La línea segmentada representa la relación 1:1. ....	67
Figura 3. 9. Relación entre el peso (izquierda) y el número (derecha) de granos con y sin herbivoría durante el año 2. La línea segmentada representa la relación 1:1. ....	68
Figura 3. 10. Relación entre el número de ramas por planta (izquierda) y la altura por planta (derecha) con y sin herbivoría durante el año 2. La línea segmentada representa la relación 1:1. ....	69
Figura 3. 11. Diagrama bivariado: relación entre el rendimiento relativo del cultivo y el rendimiento relativo de la maleza. Modificado de Synadon y Satorre (1989). ....	70
Figura 3. 12. Vista general del experimento (fotografía superior), del tratamiento 4A (fotografía inferior izquierda) y del tratamiento 4C (fotografía inferior derecha). ....	73
Figura 4. 1. Representación esquemática de los tratamientos y las mediciones implementadas para cumplir con el objetivo del presente capítulo. ....	90
Figura 4. 2. Relación entre el área de cromatogramas y concentración de rutina (µg). ....	94
Figura 4. 3. Perfil cromatográfico de compuestos químicos presentes en el extracto metanólico de una muestra de hojas de soja que fue consumida por <i>A. gemmatalis</i> . Las letras señalizan el minuto en el que eluyen los distintos compuestos analizados. ....	95
Figura 4. 4. Absorbancia a 270 nm de los compuestos químicos presentes en el extracto metanólico de una muestra de hoja del cultivo soja en los distintos tratamientos con herbivoría de <i>A. gemmatalis</i> . Los valores graficados para cada compuesto corresponden a la media del área bajo la curva obtenido en el HPLC en cada tratamiento para el año 1 (superior) y año 2 (inferior). ....	98
Figura 4. 5. Representación gráfica de los dos primeros ejes de ordenamiento del análisis de componentes principales, considerando los valores de área bajo la curva de los compuestos presentes en hojas de soja, obtenidos en el cromatograma (vectores) en función de los tratamientos (triángulos) para el año 1. ....	99
Figura 4. 6. Representación gráfica de los dos primeros ejes de ordenamiento del análisis de componentes principales, considerando los valores de área bajo la curva de los compuestos presentes en hojas de soja, obtenidos en el cromatograma (vectores) en función de los tratamientos (triángulos) para el año 2. ....	101
Figura 4. 7. Rutina equivalente (µg) en función de los tratamientos para los principales compuestos que conformaron el blend asociado al tratamiento 4A (m7 - derivado fenólico 1; m19 - Derivado de kaempferol (triósido); m20 - Derivado de quercetina (triósido); m21 - Derivado de isorhamnetina (triósido); m24 - Genistina; m26, m27 y	

m28 - Derivados de kaempferol (diósidos), en el año 1. Las barras representan el error estándar de la media. ....	103
Figura 4. 8. Rutina equivalente ( $\mu\text{g}$ ) en función de los tratamientos para los principales compuestos que conformaron el blend asociado al tratamiento 4A ((m7 - derivado fenólico 1; m19 - Derivado de kaempferol (triósido); m20 - Derivado de quercetina (triósido); m21 - Derivado de isorhamnetina (triósido); m24 – Genistina; m26, m27 y m28 - Derivados de kaempferol (diósidos), en el año 2. Las barras representan el error estándar de la media. ....	103
Figura 4. 9. Rutina equivalente ( $\mu\text{g}$ ) en función de los tratamientos para los principales compuestos que conformaron el blend asociado al tratamiento 2A (m17 - Derivado de quercetina (triósido); m22 - Rutina (diósido de quercetina); m23 - Derivado de quercetina (diósido) y m23a - Derivado de quercetina (monósidos), en el año 2. Las barras representan el error estándar de la media. ....	104
Figura 4. 10. Contenido de fenoles totales en el cultivo de soja en respuesta a la herbivoría de <i>Anticarsia gemmatalis</i> para los distintos tratamientos en el año 1 (izquierda) y el año 2 (derecha). En el año dos se agregó un tratamiento de soja pura sin herbivoría como testigo (SPNH). Los datos se expresan en $\mu\text{moles}$ de ácido clorogénico/gramo de hoja seca. Las barras representan el error estándar de la media. ....	105
Figura 4. 11. Actividad antioxidante en el cultivo de soja en respuesta a la herbivoría de <i>Anticarsia gemmatalis</i> para los distintos tratamientos en el año 1 (izquierda) y el año 2 (derecha). En el año dos se agregó un tratamiento de soja pura sin herbivoría como testigo (SPNH). Los datos se expresan en $\mu\text{moles}$ de ácido ascórbico/gramo de hoja seca. Las barras representan el error estándar de la media. ....	106
Figura 4. 12. Supervivencia de <i>Anticarsia gemmatalis</i> en función de los tratamientos. Las barras representan el error estándar de la media. ....	106
Figura 5. 1. Representación esquemática de las mediciones y determinaciones que se llevaron a cabo para cumplir con el objetivo del presente capítulo. ....	124
Figura 5. 2. Vista general del experimento sin el revestimiento general y con las “pan tramps” colocadas. ....	125
Figura 5. 3. Representación gráfica de los dos primeros ejes de ordenamiento de componentes principales, considerando los insectos como matriz principal y las señales volátiles como matriz secundaria para el año 2. Los vectores o <i>biplots</i> representan cada uno de los sensores de la e-nose. ....	128
Figura 5. 4. Representación gráfica de los dos primeros ejes de ordenamiento de componentes principales, considerando los insectos como matriz principal y las señales volátiles como matriz secundaria para el año 3. Los vectores o <i>biplots</i> representan cada uno de los sensores de la e-nose. ....	129
Figura 5. 5. Riqueza total de insectos obtenida de dos relevamientos durante la campaña 2011-2012 (Año 1). Muestreo 1 - 19/03 (izquierda) y muestreo 2 – 24/03 (derecha). La sección lisa de las barras representa los insectos herbívoros y la sección rayada los no herbívoros. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Las barras representan el error estándar de la media. ....	133
Figura 5. 6. Riqueza total de insectos obtenida de dos relevamientos durante la campaña 2012-2013 (Año 2). Muestreo 1 – 08/04 (izquierda) y muestreo 2 – 10/04 (derecha). La	

sección lisa de las barras representa los insectos herbívoros y la sección rayada los no herbívoros. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Las barras representan el error estándar de la media. ....	134
Figura 5. 7. Riqueza total de insectos obtenida de dos relevamientos durante la campaña 2013-2014 (Año 3). Muestreo 1 – 18/04 (izquierda) y muestreo 2 – 24/04 (derecha). La sección lisa de las barras representa los insectos herbívoros y la sección rayada los no herbívoros. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Las barras representan el error estándar de la media. ....	135
Figura 5. 8. Representación esquemática de la dinámica de las huellas olfativas presentes en el sistema en función del estado ontogénico en que se encontraba el cultivo soja en el momento de la medición durante el año 1, año 2 y año 3. ....	137
Figura 6. 1. Diagrama esquemático de los mecanismos de respuesta del cultivo soja frente a la herbivoría abarcado en la tesis, junto con los objetivos propuestos. ....	148

## ABREVIATURAS

**DM4670:** genotipo DON MARIO 4670

**R1:** comienzo de floración (escala de Fehr y Caviness)

**R3:** comienzo de fructificación (escala de Fehr y Caviness)

**R4:** plena fructificación (escala de Fehr y Caviness)

**R5:** comienzo de llenado de granos (escala de Fehr y Caviness)

**R6:** pleno llenado de granos (escala de Fehr y Caviness)

**R7:** comienzo de madurez (escala de Fehr y Caviness)

**R8:** plena madurez (escala de Fehr y Caviness)

### Tratamientos

**SP:** soja pura

**2A:** soja en mezcla con 2 pl/m<sup>2</sup> de *A. annua*

**4A:** soja en mezcla con 4 pl/m<sup>2</sup> de *A. annua*

**2C:** soja en mezcla con 2 pl/m<sup>2</sup> de *C. album*

**4C:** soja en mezcla con 4 pl/m<sup>2</sup> de *C. album*

**SPH:** soja pura + herbivoría de *A. gemmatalis*

**2AH:** soja en mezcla con 2 pl/m<sup>2</sup> de *A. annua* + herbivoría de *A. gemmatalis*

**4AH:** soja en mezcla con 4 pl/m<sup>2</sup> de *A. annua* + herbivoría de *A. gemmatalis*

**2CH:** soja en mezcla con 2 pl/m<sup>2</sup> de *C. album* + herbivoría de *A. gemmatalis*

**4CH:** soja en mezcla con 4 pl/m<sup>2</sup> de *C. album* + herbivoría de *A. gemmatalis*

**SPNH:** testigo soja pura sin herbivoría

**AP:** *A. annua* pura



## RESUMEN

### **Relación entre la emisión de señales volátiles de las mezclas de *Artemisia annua*-soja, *Chenopodium album*-soja sobre la herbivoría de *Anticarsia gemmatilis* y sus enemigos naturales**

La expansión del cultivo de soja (*Glycine max* L.) en el agroecosistema pampeano estuvo asociada a la pérdida de la diversidad de cultivos y de especies silvestres. Una alternativa para revertir esta situación, es el desarrollo de estrategias de manejo que diversifiquen el sistema productivo. Para ello es importante identificar las especies candidatas, y conocer su comportamiento en mezclas con los demás componentes del agroecosistema. El objetivo general de la tesis fue *evaluar el crecimiento, la producción de compuestos de defensa y la emisión de señales del cultivo de soja puro o en mezclas con Artemisia annua y Chenopodium album y su relación con la herbivoría y supervivencia del lepidóptero Anticarsia gemmatilis y la comunidad de insectos asociada*. En condiciones semi-controladas durante cuatro campañas consecutivas, se realizaron experimentos factoriales con tres repeticiones. Los factores fueron, cinco niveles de densidad: soja pura, soja + 2 y 4 plantas de *A. annua*/m<sup>2</sup> y soja + 2 y 4 plantas de *C. album*/m<sup>2</sup> y dos niveles de herbivoría de *A. gemmatilis*: con y sin herbívoros. La herbivoría se logró introduciendo 100 orugas de *A. gemmatilis*. Los resultados mostraron que la herbivoría sobre el cultivo fue significativamente menor cuando estuvo en mezclas. La presencia de malezas no ocasionó pérdidas del rendimiento del cultivo, gracias a su capacidad compensatoria. La presencia de *A. annua* dentro de la mezcla promovió la producción de determinados “blends” de compuestos de defensa en soja. Las señales químicas generadas por las distintas mezclas estuvieron asociadas a distintas comunidades de insectos. La riqueza de insectos en general y de no herbívoros en particular, fue mayor cuando el cultivo estuvo

en mezclas. Los resultados de esta tesis brindan nuevos aportes al conocimiento de las interacciones tróficas dentro de un agroecosistema y nuevos elementos para el diseño de estrategias de manejo más sustentables.

**Palabras clave:** malezas, competencia, biodiversidad, crecimiento compensatorio, interacciones tróficas.

## ABSTRACT

### **Relationship between the emission of volatile signals from the mixtures of *Artemisia annua*-soybean, *Chenopodium album*-soybean on the herbivory of *Anticarsia gemmatalis* and its natural enemies**

The expansion of soybean (*Glycine max* L.) crop in the pampas agroecosystem was associated with the loss of crop diversity and wild species. An alternative to reverse this situation is the development of management strategies that diversify the production system. Thus, it is important to identify the candidate species, and know how they behave in mixtures with the other components of the agroecosystem. The objective of this thesis was to *evaluate the growth, the production of defense compounds and the emission of signals from soybeans crop pure or in mixtures with Artemisia annua and Chenopodium album, and their relationship with the herbivory and survival of lepidopteron Anticarsia gemmatalis and the community of associated insects.* Under semi-controlled conditions during four consecutive campaigns, factorial experiments were performed with three repetitions. The factors were, five levels of density: pure soybean, soybean + 2 and 4 plants of *A. annua* /m<sup>2</sup> and soybean + 2 and 4 plants of *C. album* /m<sup>2</sup> and two levels of herbivory of *A. gemmatalis*: with and without herbivores. Herbivory was achieved by introducing 100 caterpillars of *A. gemmatalis*. The results showed that herbivory over the crop was significantly lower when it was in mixtures. The presence of weeds did not cause crop yield losses, thanks to its compensatory capacity. The presence of *A. annua* within the mixture promoted the production of certain blends of defense compounds in soybeans. The chemical signals generated by the different mixtures were associated with different insect communities. The richness of insects in general and non-herbivores in particular, was greater when the crop was in mixtures. The results of this thesis provide new contributions to the knowledge of

trophic interactions within an agroecosystem and new elements for the design of more sustainable management strategies.

**Keywords:** weeds, competition, biodiversity, compensatory growth, trophic interactions

# **CAPÍTULO 1**

## Introducción general

---



## 1.1 INTRODUCCION

### 1.1.1 Agroecosistema pampeano

En los últimos 100 años la producción agrícola pampeana evolucionó de manera comparable a lo que ocurrió en las regiones agrícolas del resto del mundo. Hubo tanto una continua expansión del área cultivada como un aumento sostenido de la productividad por unidad de superficie, logrados gracias a las innovaciones tecnológicas en la genética de los cultivos, el manejo de los mismos y el uso de subsidios energéticos. A principios del siglo XX, los pastizales pampeanos se transformaron rápidamente en un mosaico heterogéneo y muy diverso, compuesto por fragmentos de hábitats naturales, campos con pasturas y cultivos manejados de manera diversa y una red de hábitats lineales estructurados por los alambrados (Soriano et al., 1991; Viglizzo et al., 2001; Paruelo et al., 2005; Baldi y Paruelo, 2008). Esta situación fue cambiando, ya que desde fines del siglo XX la intensificación de la agricultura de la mano de factores tecnológicos y condiciones de mercado, promovió el rápido remplazo de los hábitats naturales y las pasturas por la agricultura continua (Baldi y Paruelo, 2008). Así, el mosaico fue perdiendo heterogeneidad, y se fueron incrementando las áreas con monocultivo de soja (Aizen et al., 2009).

En la Argentina las áreas cultivadas con soja (*Glycine max* L.) se han expandido, ocupando el 91% del área cosechada y el 93.5 % de la producción de oleaginosas desde el 2010 al 2015 (Anón, 2015). Durante los últimos 25 años, la introducción y la adopción de nuevas tecnologías impulsaron la especialización de los sistemas agrícolas. En este contexto, la expansión del cultivo soja estuvo acompañada por la generalización del uso de cultivares de soja resistentes a glifosato, que promovió el uso de labranza cero (siembra directa) como sistema cultural y de herbicidas totales para el manejo de las malezas. Este paquete tecnológico permitió que el cultivo de soja se extendiera a

zonas consideradas como pobres o poco aptas para la agricultura (Satorre, 2005). La superficie sembrada con soja en el país fue casi de 20 millones de has. durante la campaña 2015-2016, con una producción total de alrededor de 50 millones de toneladas (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2016). La Argentina ocupa actualmente el tercer lugar entre los principales países productores y exportadores de soja a nivel mundial, después de Estados Unidos y Brasil. El ingreso de divisas que genera en la Argentina la exportación de soja y sus derivados (aceite, harina y biodiesel) representa alrededor del 5,5 % del PBI. Las cosechas y utilidades récords obtenidas cada año hacen que el modelo de soja sea considerado un éxito (Leguizamón, 2014).

Sin embargo, el éxito del cultivo soja en el agroecosistema pampeano estuvo asociado al empobrecimiento de la diversidad de la agricultura argentina. Por una parte, la diversidad de cultivos ha disminuido cerca de un 20% entre 1900 y 2006 (Aizen et al., 2009), el uso indiscriminado de glifosato ha afectado especies “non-target” (no blanco) del sistema lo que promovió la disminución de la diversidad especies silvestres (Ferreira et al., 2017) y, además, la destrucción de ecosistemas naturales ha llevado a una drástica pérdida de biodiversidad de especies vegetales y animales (Aizen et al., 2009; de la Fuente et al., 2006; 2010). En términos ecológicos, la dominancia de una especie que monopoliza los recursos determina la exclusión de otras. Por lo general esto conlleva a una disminución local y regional de la diversidad biológica, tanto en términos de riqueza específica (número de especies) como de equitatividad en la abundancia (importancia relativa de las distintas especies) (Hillebrand et al., 2008).

En síntesis, en la Argentina estos cambios han generado pérdidas de biodiversidad en sentido amplio, es decir, diversidad de cultivos (principalmente soja) (Aizen et al., 2009), de sistemas de manejo (generalmente el cultivo de soja se siembra siguiendo un paquete tecnológico muy similar: siembra directa, materiales RR,

glifosato, etc) (Satorre, 2005) y de especies silvestres (de la Fuente et al., 1999, 2006). En particular, de La Fuente et al. (2010) encontraron disminuciones en la riqueza de especies de malezas (dicotiledóneas, perennes y exóticas) y artrópodos con el incremento de la superficie sembrada con soja. El uso intensificado de la tierra afecta negativamente la biodiversidad de especies, reduciendo la diversidad no solo a escala local sino a escala regional. Esta disminución es un indicador de deterioro ambiental, donde se ven afectados negativamente la diversidad de cultivos, de especies y de procesos ecológicos asociados a los paisajes heterogéneos (Altieri, 1999a).

En sistemas poco diversos ocurren alteraciones del equilibrio natural, que afectan el funcionamiento, a través de cambios de los bienes y servicios del sistema, como la regulación natural de plagas, los polinizadores, entre otros. En los agroecosistemas, la biodiversidad desempeña un rol importante sobre una variedad de servicios ecológicos más allá de la producción de alimentos, incluyendo el reciclaje de nutrientes, la regulación del microclima y de los procesos hidrológicos locales, la supresión de organismos indeseables y la desintoxicación de productos químicos nocivos (Altieri, 1999a). Por ejemplo, sistemas con poca diversidad presentan un aumento de la dependencia de insumos, disminución de la regulación natural de plagas, aumento de biotipos resistentes (Ferreira et al., 2017) y disminución de polinizadores, de organismos y microorganismos benéficos. A escala global, la agricultura y la homogeneización del paisaje, amenazan a más especies que cualquier otro sector productivo (Balmford et al., 2012). Este problema fue reconocido formalmente con el establecimiento de la convención de diversidad biológica (CDB) en 1992 y avanzó sustancialmente en 2002 cuando los gobiernos se comprometieron a trabajar hacia un objetivo internacional de reducir la tasa de pérdida de biodiversidad para 2010 (Mace et al., 2010). Sin embargo, el objetivo no se alcanzó y sigue faltando mucho por avanzar

en el intento de frenar la pérdida de diversidad de especies, generado en gran medida por un mal manejo de los agroecosistemas.

Por todas estas razones, es necesario enfrentar el desafío de manejar los compromisos entre las necesidades humanas inmediatas y la capacidad del ecosistema de proveernos bienes y servicios a largo plazo (Foley et al., 2005). Actualmente, existe un acuerdo sobre la necesidad de desarrollar sistemas agrícolas que garanticen la seguridad alimentaria y la nutrición, que proporcionen equidad social y económica, y que sobretodo protejan los servicios ecosistémicos de los que en definitiva, depende la agricultura (Holt et al., 2016; Landis, 2017).

### **1.1.2 Posibles soluciones**

La problemática actual, sugiere la búsqueda de estrategias que no recaigan únicamente en la utilización de agroquímicos, sino que sean capaces de reducir el uso de pesticidas sobre los cultivos y que además generen algún impacto positivo sobre el ambiente. Una alternativa relativamente reciente, es la utilización de organismos genéticamente modificados (OGM), como los organismos Bt, que resultan tóxicos para insectos lepidópteros por la incorporación de proteínas pertenecientes a la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Esta tecnología ha reducido considerablemente el uso de insecticidas para control de orugas defoliadoras. Por el contrario, la adopción de materiales resistentes a glifosato, conocidos como Roundup Ready (RR), ha generado un masivo incremento en la utilización de este herbicida (Reboratti, 2010). Otro ejemplo ha sido el cambio en el uso de la tierra a través de la implementación de la siembra directa. Esta estrategia puede impactar positivamente sobre el recurso suelo ya que reduce el laboreo, mantiene residuos vegetales en superficie y evita la erosión causada

por el viento y el agua (Satorre, 2005). Sin embargo, el uso reiterado en el tiempo y en el espacio de estas herramientas no han logrado contener la problemática de plagas y malezas en los sistemas productivos sino por el contrario, las orugas defoliadoras siguen representando una de las principales plagas problemas de los cultivos de soja e incluso han aparecido biotipos resistentes (Tabashnik y Carrière, 2017; Xiao y Wu, 2019), y las malezas siguen generando nuevos desafíos ocasionados por el uso indiscriminado de productos químicos para su control (e.g. aparición de especies leñosas, tolerantes y biotipos resistentes) (Busi et al., 2013; Heap y Duke, 2018; Baucom, 2019; Vila-Aiub et al., 2019).

Otra alternativa hace foco en la diversificación del sistema productivo, mediante la incorporación de cultivos y/o especies acompañantes que tengan algún impacto favorable sobre algún servicio del ecosistema, como la regulación de las adversidades bióticas (plagas, malezas, enfermedades) o el incremento de los insectos benéficos (Landis et al., 2000; Moraes et al. 2005; McPherson y Buss 2007). En este sentido, los policultivos son considerados una aplicación práctica de los principios ecológicos basados en la biodiversidad, las interacciones entre plantas y otros mecanismos de regulación naturales, que generan importantes ventajas no solo en la productividad y beneficios económicos a escala local, sino también sobre el ambiente para futuras generaciones (Malézieux et al., 2009; Gaba et al., 2015). De esta forma, se plantea la posibilidad de que el cultivo conviva (en policultivos o sólo coexistiendo) con algunas especies consideradas “ingenieras del sistema”, muchas veces consideradas malezas por ser distintas al cultivo de interés, pero que su presencia podría impactar positivamente sobre el sistema. El incremento de la biodiversidad dentro de este sistema agrícola podría traer beneficios como la disminución de riesgo por invasión de especies vegetales, plagas y enfermedades a través del aumento del control biológico. Existe

evidencia que muestra disminuciones de las poblaciones de insectos perjudiciales en sistemas de cultivos mixtos cuando son comparados con monoculturas (Malézieux et al., 2009). En el caso específico del cultivo de soja, algunas especies de malezas productoras de metabolitos secundarios como *Artemisia annua* L. pueden convivir e interactuar positivamente con el cultivo en altas densidades, enriqueciendo las comunidades de insectos que interactúan con el cultivo (Lenardis et al., 2011) sin causar disminuciones en el rendimiento (Morvillo et al., 2011).

Para generar estrategias y/o herramientas que permitan llevar a cabo una agricultura más amigable con el medio ambiente, es necesario conocer en detalle las posibles interacciones entre todos los componentes del agroecosistema que estén involucrados: cultivo, malezas, depredadores, plagas, patógenos, flora y fauna del suelo (Figura 1.1).

#### *Interacciones entre componentes del agroecosistema*

En un agroecosistema ocurren diferentes tipos de interacciones entre los componentes (Brown y Mitchell, 1989; Swift y Anderson, 1993) asociadas a la producción o consumo de recursos (competencia y herbivoría) y la producción de estimulantes o toxinas (alelopatía) (Figura 1. 1 y Figura 1. 2). Estas interacciones pueden actuar aislada o conjuntamente de manera aditiva, sinérgica o antagonista, y a su vez provocan interferencias que causan variaciones en la tasa de crecimiento y desarrollo individual de cada organismo (Einhelling, 1999; Radosevich et al., 2007).

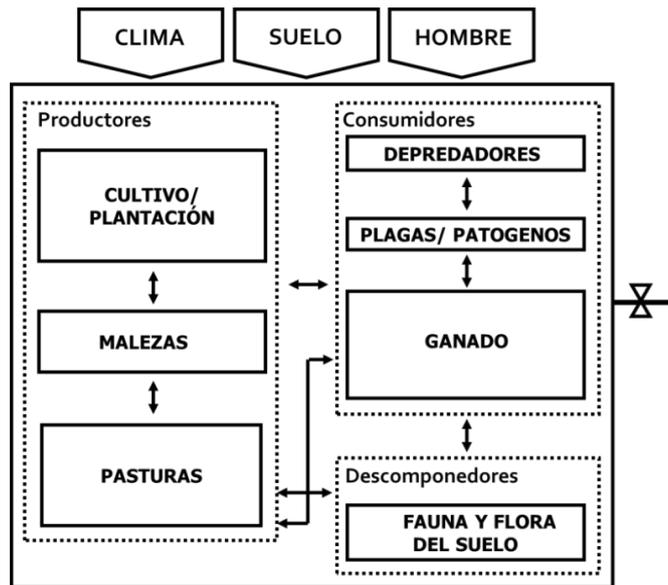


Figura 1. 1. Representación esquemática de un agroecosistema (caja grande), sus subsistemas (cajas punteadas), sus componentes (cajas pequeñas), los factores que los modulan (flechas de bloque) y las salidas del sistema (llaves). Adaptado de Swift y Anderson (1993).

#### *Interacciones entre el cultivo y las malezas*

La **competencia** es una de las interacciones negativas más importantes y documentadas (Burkholder, 1952; Vandermeer, 1989; Malézieux et al., 2009; Morvillo et al., 2011). Fue definida como el proceso a través del cual dos o más organismos próximos interactúan por recursos (agua, luz, nutrientes y espacio) o por servicios (polinizadores) del ambiente que están provistos en cantidades insuficientes para satisfacer los requerimientos combinados de individuos de la misma especie (intraespecífica) o de distintas especies (interespecífica) (de Wit, 1960) (Figura 1. 2).

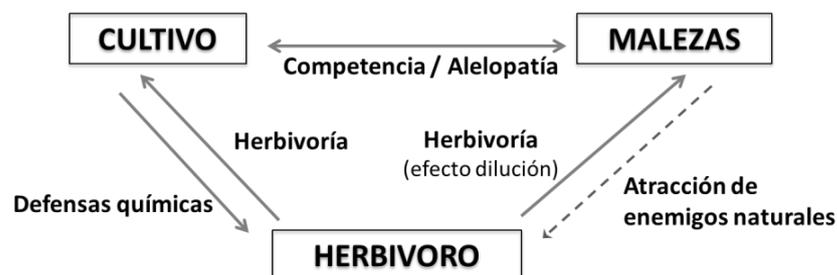


Figura 1. 2. Representación esquemática de las principales interacciones directas (flechas llenas) e indirectas (flechas punteadas) que ocurren entre el cultivo, las malezas y los herbívoros.

La competencia por un recurso puede restringir la habilidad competitiva del cultivo por otros recursos limitantes del sistema (Ballaré et al., 1987; Liu et al., 2009; Green-Tracewicz et al., 2012a). La competencia entre el cultivo y las malezas afecta de manera denso dependiente la producción de biomasa de los componentes de la mezcla (Guglielmini, 2010) y la producción de compuestos de defensa (Morvillo et al., 2011). Esta respuesta puede verse incrementada si además las plantas acompañantes liberan compuestos volátiles, que representen un “stress” para el cultivo y promuevan la pre-inducción de respuestas frente a un futuro ataque (Engelberth et al., 2004; Heil y Kost, 2006; Turlings y Ton, 2006; Heil, 2010).

La **alelopatía**, se define como el efecto directo o indirecto, perjudicial o beneficioso, de una planta (liberadora) sobre otras (receptoras) a través de la liberación de compuestos químicos (Castro et al., 1983; Rice, 1984; Seigler, 1996). Esta interferencia puede causar en algunos casos inhibición del crecimiento (Acciaresi y Asenjo, 2003; Malézieux et al., 2009; Sobrero y Acciaresi, 2015), la germinación, el establecimiento de plántulas y la reproducción de los cultivos (Rice, 1984; Inderjit y Callaway, 2003). A su vez, la alelopatía puede interactuar con otros procesos como la competencia, la simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno (Morvillo et al., 2011), la herbivoría y la generación de compuestos volátiles que actúan como una suerte de herbicidas naturales para las “plantas receptoras” (Arimura et al., 2010). Dentro de los campos agrícolas de la Argentina, existen numerosas malezas reportadas por su efecto alelopático, entre las que se pueden mencionar: *Cyperus rotundus* L. (Gastal y Casela, 1986), *Tagetes minuta* L. (Gil et al., 2002), *Sorghum halepense* (L.) Pers. (Acciaresi y Asenjo, 2003), *Cynodon dactylon* (L.) Pers., *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Cyperus esculentus* L. (Castro et al., 1983), *Chenopodium album* L. (Leicach et al., 2006), *Artemisia annua* L. (Morvillo et al., 2011).

En particular, la interacción alelopática puede afectar otras interacciones como la competencia (Sobrero y Acciaresi, 2015). Por ejemplo, la competencia entre el cultivo de soja y distintas densidades de la maleza alelopática *Artemisia annua* L. no afecta negativamente el rendimiento del cultivo, sino que por el contrario potenciaría la simbiosis del cultivo con bacterias fijadoras de nitrógeno del suelo (Morvillo et al., 2011). Por otra parte, la maleza *C. album*, además de registrar efecto alelopático (Reinhardt et al., 1997; Leicach et al., 2006) sobre varias especies, también presenta una elevada habilidad competitiva en la interacción con el cultivo de soja (Guglielmini, 2010).

#### *Interacciones entre el cultivo y los insectos*

La **herbivoría** es la interacción interespecífica en la cual un animal se alimenta de las partes vivas de las plantas, siendo positivo para el animal pero perjudicial para la planta. Juega un papel determinante dentro de las interacciones del sistema, ya que puede afectar la competencia entre plantas alterando su capacidad de acceder a los recursos, (hojas defoliadas capturan menos radiación) (Morris et al., 2005) o directamente la disponibilidad de recursos. Este caso específico es conocido como competencia aparente, y se define como la interacción indirecta entre dos especies consumidas por una tercera especie de otro nivel trófico, generando un efecto diferente al que ocurriría en ausencia de esta tercera especie. La competencia por recursos entre especies del mismo nivel trófico y la competencia aparente mediada por una especie de otro nivel trófico pueden estructurar y generar patrones espaciales diferentes en las comunidades asociadas al cultivo (*i.e.* malezas, insectos) (Holt, 1977; Holt y Lawton, 1992; Morris et al., 2005).

A lo largo de su ciclo ontogénico, el cultivo de soja es atacado por numerosos herbívoros. Entre los cuales se destacan una gran variedad de orugas defoliadoras como la oruga medidora *Rachiplusia nu* (Guenée), la oruga militar tardía *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), la oruga bolillera *Helicoverpa gelotopoeon* (Dyar), la gata peluda norteamericana *Spilosoma virginica* (F.) y la oruga de las leguminosas *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Aragón, 2002). Esta última, es una plaga muy importante del cultivo soja, es especialista de leguminosas y en estado larval es una voraz defoliadora que produce pérdidas del área foliar que pueden llegar al 40%, principalmente de la zona alta del canopeo, lo que puede conducir a una merma del rendimiento especialmente si la defoliación ocurre durante el llenado de granos (R5) (Perotti y Gamundi 2007).

En general, frente a la herbivoría, las plantas pueden responder a través de diferentes maneras. Por ejemplo, para tolerar el ataque de insectos herbívoros, el cultivo de soja presenta como principal mecanismo de respuesta el crecimiento compensatorio (Haile et al., 1998; Singer, 2001). Es decir, el cultivo puede optimizar el rendimiento a bajas densidades ante daños por herbivoría (Haile et al., 1998), a través del ajuste en la eficiencia de interceptación (crecimiento de ramificaciones y expansión foliar), en la eficiencia en el uso de los recursos y en la generación de nuevos destinos (flores, frutos, ramas por planta, vainas por rama). Otros autores señalan el retraso en la senescencia como una estrategia alternativa de tolerancia ante la defoliación (Higley, 1992).

Además, el cultivo de soja cuenta con una batería de compuestos químicos que le permiten desencadenar la producción y acumulación de metabolitos secundarios, que constituirán las defensas químicas luego del ataque de algún herbívoro (Hammerschmidt, 1999; Zavala et al., 2001; Underwood et al., 2002; Piubelli et al., 2003, 2009; Moraes et al., 2005, 2009; Michereff et al., 2011; Ballaré et al., 2012).

Las **defensas químicas** son estrategias desarrolladas por las plantas para soportar o reducir los daños causados por agentes externos, como pueden ser insectos herbívoros (Russin, 1989; Cipollini, 2004). En este contexto, Moraes et al. (2005) sugieren que las plantas en su hábitat natural frecuentemente sufren daños por insectos, por lo cual han desarrollado dos estrategias principales de defensa. En la primera, la planta afecta directamente al insecto disminuyendo la concentración de metabolitos esenciales para el herbívoro o sintetizando compuestos anti-nutritivos o anti-digestivos que reducen la alimentación (Dicke, 1994). En la segunda estrategia, la planta se defiende indirectamente a través de la liberación de compuestos químicos que atraen enemigos naturales (Moraes et al., 2005; Heil y Kost, 2006; Turlings y Ton, 2006). De esta forma las plantas que liberan metabolitos secundarios modulan de manera individual o en conjunto el entorno donde se desenvuelven los insectos incidiendo en la atracción, repelencia, alimentación, crecimiento y reproducción de los insectos (Bernays y Chapman, 1994; Cipollini, 2004; Radosevich et al., 2007; Lenardis et al., 2011; Booth et al., 2013).

Arimura et al., (2010) afirman que los compuestos de defensa, además están implicados en la señalización entre órganos de la misma planta. Entre los principales compuestos que producen las plantas se destacan el néctar extra floral (“Extra Floral Néctar” EFN), los compuestos orgánicos volátiles (“Volatile Organic Compounds” VOC), los volátiles de hoja verde (“Green Leaf Volatile” GLV), y los volátiles inducidos por herbivoría en plantas (“Herbivory Induce Plant Volatile” HIPV). Estos compuestos pueden promover la llegada de insectos benéficos (depredadores o parasitoides), además reducen la presión por herbivoría y generan defensas indirectas (Heil y Kost, 2006; Arimura et al., 2010; Heil y Karban, 2010).

*Defensas químicas del cultivo soja*

En el caso de las defensas directas del cultivo soja, se conocen numerosos compuestos sintetizados en respuesta a un ataque. Por ejemplo, los inhibidores de tripsinas (TPI, en inglés) han sido ampliamente estudiados en su rol de defensa contra lepidópteros (Jongman et al., 1995; Zavala y Baldwin, 2004; Dillon et al., 2017) y los inhibidores de cisteína (CysPI, en inglés) frente a ataques de coleópteros y hemípteros (Botella et al., 1996; Zhao et al., 1996). Otro ejemplo son los flavonoides, como la genistina, quercetina y la rutina, presentes en diferentes genotipos de soja que afectan negativamente a distintos herbívoros (Hoffmann-Campo et al., 2001; O'Neill et al., 2010). Piubelli et al. (2005) encontraron aumentos de hasta el 30% en la tasa de mortalidad de la oruga defoliadora *A. gemmatalis* alimentadas con genotipos con mayor concentración de rutina y genistina.

En el caso de las defensas indirectas, se ha demostrado que el cultivo de soja atrae insectos benéficos a partir de compuestos químicos liberados luego del ataque. Por ejemplo, cuando la planta de soja es consumida por la chinche marrón, *Euschistus heros* (F.) libera un conjunto de compuestos químicos que atraen a su parasitoide específico *Telenomus podisi* (Ashmead), sin embargo el parasitoide no es atraído cuando el cultivo es consumido por la oruga defoliadora *A. gemmatalis* (Moraes et al., 2005). Asimismo, *A. gemmatalis*, una de las plagas más importantes del cultivo soja en América del Sur y el Caribe (Saunders et al., 1998), es una de las especies que atrae mayor cantidad de enemigos naturales dentro del cultivo soja, especialmente de especies parasitoides pertenecientes a los órdenes Hymenoptera y Diptera (Luna y Sanchez, 1999). Esto sugiere una fuerte relación entre las plantas atacadas por insectos fitófagos y la emisión de señales químicas atrayentes de enemigos naturales específicos y que la

combinación de los compuestos químicos liberados por las plantas y por los herbívoros, condiciona la llegada de los enemigos naturales.

De igual forma, la llegada espontánea de insectos a un sistema también puede estar relacionada con la presencia de plantas acompañantes. Por ejemplo, conduciendo las señales volátiles desde un cultivo productor de terpenos como el coriandro a un cultivo de trigo para lograr un trigo con olor a coriandro, se encontró una relación estrecha entre la comunidad de insectos y las señales volátiles independientemente de la especie cultivada (Lenardis et al., 2007). Dentro de los metabolitos secundarios que constituyen las defensas químicas de las plantas están los alcaloides (Baldwin, 1998), los terpenos (Gershenzon y Dudareva, 2007) y los compuestos fenólicos (Ayres et al., 1997; Shirley, 1998). Estos compuestos pueden variar en su concentración y forma química según el estado ontogénico de la planta (Bhakuni et al., 2001; Ferreira y Janick, 2004) y la disponibilidad de recursos (luz, agua, nutrientes) del sistema (Herms y Mattson, 1992).

#### *Interacciones entre malezas e insectos*

Las malezas son afectadas por herbívoros especialistas y generalistas, pero además pueden ser fuente alternativa de alimento para los enemigos naturales que visitan el sistema. De esta forma, las plantas vecinas a los cultivos pueden representar un **factor de dilución** en la concentración de plantas del cultivo predominante (Bernays y Chapman, 1994; Norris y Kogan, 2000, 2005). Root (1973) destaca que el efecto de dilución está dado por la presencia de especies diferentes a la planta hospedadora, haciendo que el insecto sea menos eficiente en su intento de colonizar o alimentarse, y en la medida en que existan más plantas dentro de la mezcla este efecto se verá incrementado. El efecto de dilución es uno de los principales beneficios que aportan las

policultivos, por su efecto directo sobre la disminución de insectos perjudiciales (Malézieux et al., 2009). De acuerdo con la teoría de concentración de recursos, Norris (2005) y Norris y Kogan (2000; 2005) explican que el herbívoro permanece preferentemente en hospedadores que crecen en parches densos y puros (cultivo sin malezas).

Dependiendo de las características nutritivas y del tipo de señales que liberan las plantas pueden actuar diferentes mecanismos de interacción con el cultivo. Por ejemplo, las malezas productoras de metabolitos secundarios como los terpenos volátiles como *A. annua*, pueden liberar al medio señales que actúan atrayendo o repeliendo insectos y a su vez promoviendo la producción de compuestos de defensa por parte del cultivo soja. Mientras que malezas como *C. album*, pueden ser fuente alternativa de alimento generando un efecto de dilución en el cultivo de soja, y así reducir el consumo del insecto sobre el cultivo.

Lenardis et al. (2011) reportaron varias comunidades de artrópodos asociadas a las distintas mezclas del cultivo de soja y la maleza *A. annua*, demostrando que la utilización de diferentes especies dentro de un mismo sistema (policultura) puede generar un impacto “bottom up” favorable en la estructura de comunidades de insectos benéficos, favoreciendo la biodiversidad del sistema. Las interacciones tróficas dentro del sistema son importantes y están controladas en gran medida por la disponibilidad de recursos. Así, las interacciones “bottom up” ocurren en un nivel trófico donde los recursos son limitados (Power, 1992). Por su parte, la teoría “top-down” establece que las poblaciones están limitados por los consumidores de los niveles superiores.

Actualmente, hay una importante base teórica acerca de las interacciones cultivo-maleza-herbívoro, sin embargo, no hay evidencias concretas que muestren de

qué manera es afectado el crecimiento, la producción de compuestos de defensa y la emisión de señales del cultivo de soja puro y en mezclas con *A. annua* y *C. album* y su relación con la herbivoría y supervivencia de *A. gemmatalis* y la comunidad de insectos asociada.

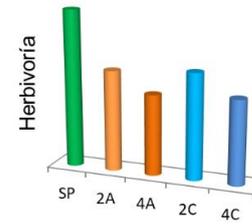
Sobre la base de los antecedentes presentados se plantean a continuación las hipótesis y objetivos de la tesis.

## **HIPÓTESIS**

### **Hipótesis 1**

Numerosos factores pueden influir en la herbivoría directa o indirectamente. El efecto de dilución puede afectar la herbivoría, haciendo que el insecto sea menos eficiente en su intento de colonizar o alimentarse; en la medida en que existan más plantas de distintas especies dentro de la mezcla este efecto se verá incrementado (Root, 1973; Bernays y Chapman, 1994; Norris y Kogan, 2000, 2005). Las señales químicas generadas en el sistema también pueden afectar la herbivoría al condicionar la producción de compuestos de defensa del cultivo y de las plantas que lo acompañan (Turlings et al., 1990; Moraes et al., 2005). Además, las señales ejercen un rol determinante en la comunidad de insectos asociada al sistema, ya que las plantas productoras de terpenos pueden actuar atrayendo o repeliendo insectos, mientras que las plantas que producen metabolitos de base nitrogenada como los alcaloides actúan como fuente alternativa de alimento para los herbívoros y de esta forma se disminuye la herbivoría directa en el cultivo (Lee, 2000; Chansang et al., 2005). Sin embargo, no existen evidencias acerca del efecto del cultivo de soja puro o en mezclas con distintas densidades de malezas productoras de terpenos o alcaloides sobre la herbivoría del lepidóptero *A. gemmatalis*.

*Hipótesis 1.* La presencia de malezas productoras de distintos metabolitos secundarios dentro del cultivo, al generar un efecto de dilución denso-dependiente en el sistema, afectan la herbivoría sobre el cultivo soja. La herbivoría sobre el cultivo soja será mayor en monoculturas de soja, con respecto a las mezclas con altas densidades de malezas productoras de diferentes metabolitos secundarios.



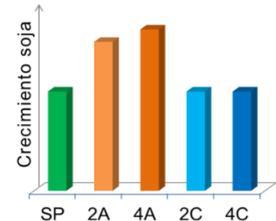
## Hipótesis 2

La tolerancia es una estrategia utilizada por la mayoría de las plantas para compensar el daño provocado por un factor externo ya sea incrementando la tasa fotosintética, promoviendo el crecimiento compensatorio, utilizando reservas almacenadas, generando cambios fenotípicos o activando meristemas dormidos (Tiffin, 2000; Wang et al., 2015). Una planta es tolerante si logra sostener la pérdida de tejido activo con poco o ningún impacto en su “fitness” (Kessler y Baldwin, 2002a). Entre las principales respuestas que presenta el cultivo soja para tolerar el ataque de insectos herbívoros se encuentra el crecimiento compensatorio (Haile et al., 1998; Singer, 2001). Con respecto a la presencia de especies acompañantes, la competencia por recursos entre organismos vegetales, además de restringir el crecimiento, la fecundidad, la supervivencia y la habilidad competitiva del cultivo, puede modular la respuesta del cultivo frente a la herbivoría (Ballaré et al., 1987, 2012; Liu et al., 2009; Green-Tracewicz et al., 2012b). Sin embargo, la interacción competitiva también puede impactar positivamente sobre las especies involucradas, por ejemplo Morvillo et al., (2011) encontraron que la presencia de *A. annua* en el cultivo de soja aumentó la biomasa radical y la formación de nódulos en el cultivo. Sin embargo, no existen evidencias acerca del impacto de la herbivoría de *A. gemmatalis* y de señales

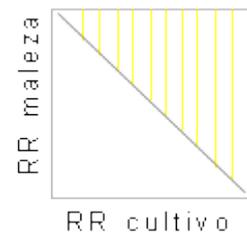
provenientes de malezas productoras de distintos metabolitos secundarios sobre el crecimiento compensatorio y la interacción competitiva entre el cultivo y las malezas acompañantes.

*Hipótesis 2a.* El crecimiento compensatorio en respuesta a la herbivoría es estimulado en presencia de plantas que emiten señales volátiles.

El crecimiento compensatorio del cultivo de soja en respuesta a la herbivoría de *A. gemmatalis* será mayor en mezcla con *A. annua*, con respecto a la monocultura de soja o a las mezclas con *C. album*.



*Hipótesis 2b.* La relación competitiva del cultivo de soja - malezas acompañantes en respuesta a la herbivoría de *A. gemmatalis* es amortiguada en presencia de especies poco competitivas. La relación competitiva del cultivo de soja en mezcla con *A. annua* en respuesta a la herbivoría de *A. gemmatalis* será incompleta o de tipo complementaria.



### Hipótesis 3

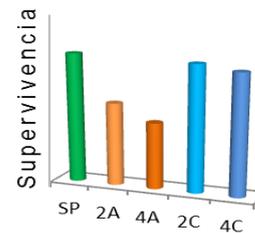
Como respuesta de defensa ante la herbivoría las plantas pueden afectar directamente al herbívoro disminuyendo la concentración de metabolitos esenciales para éste o sintetizando compuestos anti-nutritivos o anti-digestivos que impactan negativamente sobre el atacante (Dicke, 1994). La producción y acumulación de estos compuestos químicos de defensa afectan, entre otras cosas, el metabolismo y el comportamiento de un amplio rango de insectos fitófagos reduciendo su capacidad de supervivencia (Hammerschmidt, 1999; Underwood et al., 2002; Piubelli et al., 2003, 2009; Moraes et al., 2005, 2009; Ballaré et al., 2012). A su vez, la emisión de estos

compuestos puede afectar la producción de compuestos volátiles de plantas vecinas (Heil y Kost, 2006; Dudareva y Pichersky, 2008; Mumm et al., 2008; Arimura et al., 2010). Actualmente se ha avanzado sobre la detección y caracterización de los compuestos químicos que sintetiza el cultivo soja en respuesta al ataque de herbívoros (Dillon et al., 2017, 2018), y como afecta luego sobre la supervivencia y el comportamiento de los insectos herbívoros (Piubelli et al., 2009; O'Neill et al., 2010; Michereff et al., 2011). Sin embargo, no existen evidencias acerca del efecto de la emisión de señales químicas sobre la supervivencia de *A. gemmatalis* dentro del sistema soja - malezas – herbívoro.

*Hipótesis 3a.* La producción de compuestos de defensa en respuesta a la herbivoría es estimulada en presencia de plantas productoras de terpenos que emiten señales volátiles. La producción de compuestos de defensa en soja como respuesta a la herbivoría de *A. gemmatalis* será mayor en mezclas con *A. annua*, con respecto a la monocultura de soja o a las mezclas con *C. album*.



*Hipótesis 3b.* La supervivencia de *A. gemmatalis* está condicionada por la acción de las defensas producidas por el cultivo, que a su vez son estimuladas por las señales volátiles emitidas por plantas productoras de terpenos. La supervivencia de *A. gemmatalis* será menor cuando el cultivo esté en mezclas con *A. annua*, con respecto a la monocultura de soja o a las mezclas con *C. album*.



#### Hipótesis 4

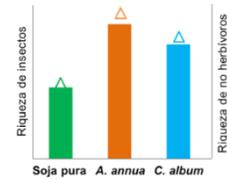
En general, cuando las plantas que acompañan al cultivo emiten distintos compuestos volátiles pueden afectar el conjunto de señales (huella olfativa) generado

por un cultivo en un determinado agroecosistema (Heil y Kost, 2006; Heil, 2010). De esta forma, las plantas que liberan metabolitos secundarios modulan de manera individual o en conjunto el entorno donde se desenvuelven los insectos incidiendo en la atracción, repelencia, alimentación, crecimiento y reproducción de los mismos (Bernays y Chapman, 1994; Booth y Swanton, 2002; Cipollini, 2004; Radosevich et al., 2007; Lenardis et al., 2011). Por ello, el ensamble de la comunidad de insectos dentro del sistema cultivo – maleza está influenciado en gran medida por la liberación de un conjunto de señales químicas que son captadas por los insectos en busca de refugio y alimento (Altieri, 1999b; Khan et al., 2000; Landis et al., 2000). Por ejemplo, Pare y Tumlinson (1999) señalan que los terpenos volátiles junto con otros compuestos presentes en el conjunto de olores (huella olfativa) liberado por las plantas en respuesta a la herbivoría, representan una señal determinante en la atracción de avispas parasitoides. Estudios recientes muestran como el comportamiento de los insectos, como la preferencia por cierto genotipo de plantas, es controlado por los cambios en las señales volátiles de las plantas (Bálint et al., 2016). Sin embargo, no existen evidencias acerca de las diferencias entre las huellas olfativas generadas a partir del cultivo de soja puro o en combinación con malezas productoras de terpenos o alcaloides y la herbivoría, sobre la estructura de la comunidad de insectos asociada.

*Hipótesis 4a.* La presencia de malezas productoras de diferentes metabolitos secundarios dentro del cultivo de soja, altera las huellas olfativas particulares cuando el cultivo crece puro y en mezclas con distintas densidades de las malezas. Las huellas olfativas son distintas dependiendo de la combinación cultivo – maleza - herbivoría y la densidad de las malezas en la mezcla con el cultivo.



*Hipótesis 4b.* Las mezclas del cultivo de soja con malezas productoras de terpenos volátiles (soja - *A. annua*), al liberar señales químicas al sistema atrae a los insectos en general y los no herbívoros en particular. La riqueza de insectos en general y de no herbívoros en particular será mayor en la mezcla soja - *A. annua*, con respecto a la mezcla soja - *C. album* o a las monoculturas de soja.



## 1.1 OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICOS

El objetivo general de la tesis es evaluar el crecimiento, la producción de compuestos de defensa y la emisión de señales del cultivo de soja puro y en mezclas con *Artemisia annua* y *Chenopodium album* y su relación con la herbivoría y supervivencia del lepidóptero *Anticarsia gemmatalis* y la comunidad de insectos asociada (Figura 1. 3).

### Objetivos específicos

**Objetivo 1.** Evaluar la herbivoría de *A. gemmatalis* en el cultivo de soja puro y en mezclas con distintas densidades de malezas productoras de diversos metabolitos secundarios.

**Objetivo 2a.** Determinar el efecto de la herbivoría de *A. gemmatalis* sobre el crecimiento en un cultivo de soja acompañado de malezas productoras de distintos metabolitos secundarios.

**Objetivo 2b.** Evaluar la relación competitiva entre el cultivo de soja y las malezas acompañantes en respuesta a la herbivoría de *A. gemmatalis*.

**Objetivo 3a.** Determinar el efecto de la herbivoría de *A. gemmatilis* sobre la producción de compuestos de defensa en un cultivo de soja acompañado de malezas productoras de distintos metabolitos secundarios.

**Objetivo 3b.** Evaluar la supervivencia de *A. gemmatilis* en el cultivo de soja puro y en mezclas soja - *A. annua* y soja - *C. album*

**Objetivo 4.** Evaluar la comunidad de insectos y su relación con las señales químicas emitidas por el cultivo de soja puro y en mezclas con malezas productoras de metabolitos secundarios junto con la herbivoría de *A. gemmatilis*.

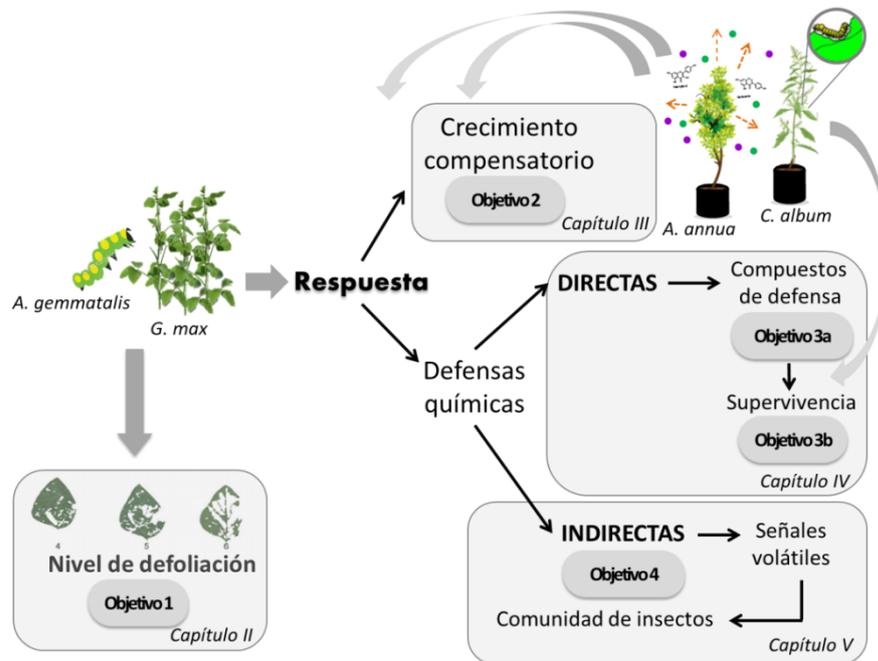


Figura 1. 3. Diagrama esquemático de los objetivos específicos presentados en la tesis.

## 1.2 METODOLOGÍA GENERAL

Para llevar a cabo los objetivos propuestos y poner a prueba las hipótesis formuladas se realizaron experimentos en condiciones semi-controladas a escala de campo y determinaciones en condiciones controladas de laboratorio.

### 1.2.1 Sitio experimental

El estudio se llevó a cabo en el campo experimental ubicado en el interior de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (FAUBA), Argentina (34° 35' lat. S, 58° 25' long. O y 25 m.s.n.m).

En cuanto a las características del sitio experimental, el suelo puede clasificarse como un Argiudol vértico (USDA, 1999) (Cuadro 1.1). Las condiciones meteorológicas (temperatura y precipitación) fueron registradas por la estación meteorológica Villa Ortúzar (34° 35'S, 58° 25'O), distante a 300 m del área experimental (Cuadro 1. 2).

Cuadro 1. 1. Determinaciones químicas del suelo correspondiente a un Argiudol vértico (USDA, 1999).

Prof.	pH	CT	NT	P	NH4	NO3	N-NO3
	1:2,5						
cm	H2O	W. Black	Kjeldhal	B y K	KCL	CuSO4	
		g/Kg	g/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	Kg.ha-1
0-20	6,55	19,29	1,67	86,1	28	118	72,17
20-40	7,1	12,73	1,9	39,5	7	72,7	46,05

Prof.	C.E.	CIC	Ca 2+	Mg 2+	Na+	K+	S(SO4-2)
	(e.s)						
cm	dS/m	cmolc/Kg	cmolc/Kg	cmolc/Kg	cmolc/Kg	cmolc/Kg	mg/Kg
0-20	0,46	25,6	17,3	3	0,24	2,4	12
20-40	0,5	24,6	17,8	2,1	0,06	2,1	11

Cuadro 1. 2. Datos climáticos (temperatura y precipitación) correspondientes a los años de experimento a campo (2011-2015).

		<b>Enero</b>	<b>Febrero</b>	<b>Marzo</b>	<b>Abril</b>
<b>Año 1</b>	PP(mm)	46,9	118	154,3	61,4
	Tmin (°C)	20,7	20,0	16,8	12,8
	Tmax (°C)	31,8	30,0	26,6	23,2
	Tmedia (°C)	26,3	25	21	18
<b>Año 2</b>	PP (mm)	52,1	104,2	73,4	264,3
	Tmin (°C)	20,2	19,3	15,2	13,9
	Tmax (°C)	30,2	29,0	25,2	24,3
	Tmedia (°C)	25,18	24,1	20,16	19,0
<b>Año 3</b>	PP (mm)	251,5	254,7	166,1	126,8
	Tmin (°C)	20,7	19,0	16,1	14,2
	Tmax (°C)	31,1	27,0	25,5	22,4
	Tmedia (°C)	25,89	23,0	20,7	18,3
<b>Año 4</b>	PP (mm)	175,9	38,1	18,1	64,9
	Tmin (°C)	19,2	20,0	18,0	15,4
	Tmax (°C)	29,4	29,5	28,0	26,0
	Tmedia (°C)	24,3	24,7	22,9	20,7

### 1.2.2 Descripción general del experimento a campo

Los ensayos se realizaron en condiciones semi-controladas durante cuatro campañas consecutivas: 2011-2012 (Año 1), 2012-2013 (Año 2), 2013-2014 (Año 3) y 2014-2015 (Año 4). El diseño fue completamente aleatorizado en arreglo factorial con tres repeticiones. Los factores fueron: i) 5 niveles de densidad: soja pura, soja + 2 y 4 pl/m<sup>2</sup> de *A. annua* y soja + 2 y 4 pl/m<sup>2</sup> de *C. album* y ii) 2 niveles de herbivoría de *A. gemmatilis*: con y sin herbívoros, dando como resultado 10 combinaciones. Además, se establecieron parcelas puras de *A. annua* con 3 repeticiones, como testigos para los análisis de competencia con el cultivo. Esto conformó un total de 33 unidades experimentales (parcelas) de 1 m<sup>2</sup> delimitadas entre sí por una tela de tul para evitar el traslado de orugas entre unidades experimentales. El diseño del experimento así como el

tamaño de las parcelas, las densidades de plantas, el tipo y tamaño de las borduras fueron decididos sobre la base de experiencias previas en este tipo de ensayos (Lenardis et al., 2007, 2011; Morvillo et al., 2011) (Figura 1. 4).

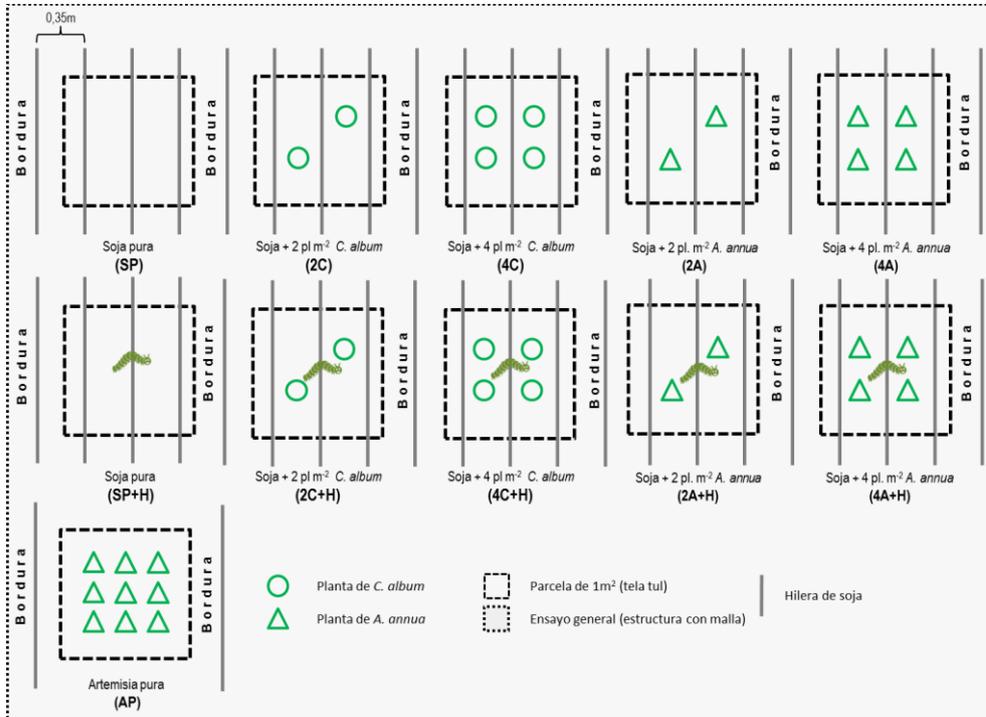


Figura 1. 4. Representación esquemática del diseño experimental y la distribución a campo de las unidades experimentales.

Para limitar la entrada de insectos y manejar la herbivoría sin restringir demasiado las condiciones lumínicas del ensayo, se cubrió la totalidad de las parcelas con una estructura revestida con tela mosquetero (35% interferencia de luz). Las alteraciones microclimáticas generadas por efecto de la cobertura afectaron igualmente a todos los tratamientos ya que la tela se distribuyó homogéneamente sobre todo el ensayo. Luego, a inicios de la etapa de fructificación (R3, Fehr y Caviness 1977), se retiró la malla que mantuvo cubierta la estructura del experimento (Figura 1. 5).



Figura 1. 5. Vista general del experimento con el revestimiento total de la estructura.

### 1.2.3 Material utilizado

#### *Malezas*

Las semillas de *A. annua* fueron provistas por la Universidad Estatal de Campinas (UNICAMP) Sao Paulo, Brasil. Por su parte, las semillas de *C. album* se obtuvieron del laboratorio de semillas FAUBA. Con el fin de sincronizar la emergencia del cultivo y las malezas, dado el lento crecimiento inicial de estas últimas, dos meses antes de la siembra del cultivo se sembraron las malezas. Esta siembra se realizó en bandejas de plástico para almácigos dentro del campo experimental, donde permanecieron hasta el momento del trasplante a las macetas de 20 litros donde permanecieron hasta el fin del ensayo. El riego estuvo controlado por capilaridad durante los dos meses.

**Cultivo**

Las semillas de soja utilizadas eran de la variedad DM 4670 perteneciente al grupo de madurez IV y hábito de crecimiento indeterminado. La siembra del cultivo se realizó en el mes de enero, cuando las plantas de maleza ya habían iniciado la etapa vegetativa. La soja se sembró a razón de 40 pl/m<sup>2</sup>, a una distancia de 35 cm entre hileras. Además, se dejó una hilera de 35 cm de soja como bordura entre parcelas. El experimento en su conjunto ocupó un área total de 100 m<sup>2</sup>. Luego de la emergencia del cultivo, las macetas donde crecían las malezas se ubicaron en los entresurcos centrales de cada parcela para evitar la competencia intraespecífica por los recursos del suelo y los efectos alelopáticos sobre el medio edáfico. Durante todo el experimento el riego se realizó de acuerdo a las necesidades de las plantas.

**Herbívoro**

Los desoves de *A. gemmatalis* fueron provistos por el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA) de INTA Castelar, los mismos se mantuvieron en el laboratorio de Biología Integrada de la Cátedra de Cultivos industriales FAUBA a temperatura ambiente hasta su eclosión. Para la cría de las larvas se mantuvieron las mismas en bandejas plásticas cubiertas con tul para garantizar el intercambio de aire y se alimentaron periódicamente con hojas de soja provenientes de las borduras del ensayo, hasta el momento de su utilización en los respectivos tratamientos.

## ESTRUCTURA DE LA TESIS

La tesis se estructuró en seis capítulos articulados entre sí (Figura 1. 6).

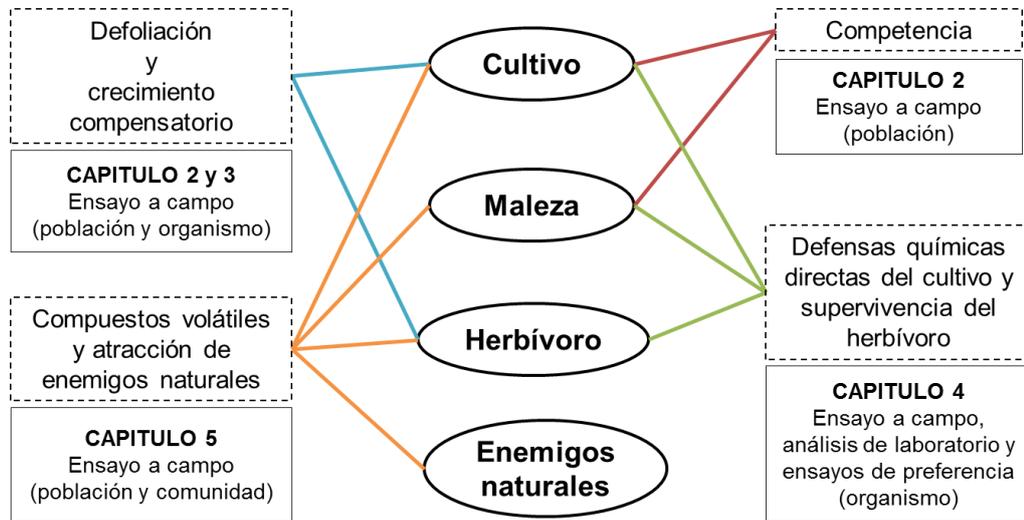


Figura 1. 6. Diagrama de los experimentos realizados según su nivel de aproximación y desarrollo dentro de la estructura de la tesis.

Para el “Capítulo 1. Introducción general”, se realizó una revisión de literatura, y se detalla el estado del arte actual del tema de estudio sobre el que se sustentan las hipótesis y los objetivos. A su vez, se describen y fundamentan las hipótesis que se pusieron a prueba en esta tesis, llegando a los objetivos planteados. Por último, se detalla la metodología general utilizada para cumplir con los objetivos y poner a prueba las hipótesis.

En el “Capítulo 2. Cambios en la herbivoría sobre el cultivo de soja”, se desarrolló el contenido relacionado al objetivo 1, donde se evaluó la herbivoría sobre el cultivo soja generada por la oruga defoliadora *A. gemmatalis* y otros herbívoros espontáneos.

En el “Capítulo 3. Respuesta del cultivo frente a la herbivoría: crecimiento compensatorio”, se desarrolló el contenido relacionado al objetivo 2. Aquí se evaluó el

efecto de la herbivoría de *A. gemmatalis* sobre las respuestas ligadas al crecimiento del cultivo soja en monoculturas o en mezclas con *A. annua* y *C. album*.

En el “Capítulo 4. Defensas químicas del cultivo en respuesta a la herbivoría. Supervivencia de *A. gemmatalis* frente a las defensas químicas del cultivo”, se desarrolló el contenido relacionado a los objetivos 3a y 3b. Aquí se evaluó el efecto de la herbivoría de *A. gemmatalis* sobre la producción de defensas químicas directas del cultivo de soja puro y en mezclas con *A. annua* y *C. album* y el efecto de éstas defensas sobre la supervivencia de *A. gemmatalis*”.

En el “Capítulo 5. Relación entre las señales volátiles y la comunidad de insectos”, se desarrolló el contenido relacionado al objetivo 4 evaluando las diferencias entre las huellas olfativas de las distintas combinaciones cultivo - malezas - herbivoría, y su impacto sobre la comunidad de insectos benéficos.

En el capítulo final, “Capítulo 6. Síntesis y discusión general”, se discutió en qué medida los resultados obtenidos en esta tesis permiten aceptar o rechazar las hipótesis planteadas inicialmente. Además, se examinaron y fundamentaron los principales hallazgos en relación con el estado actual de los conocimientos. Por último, se hicieron proyecciones de la aplicabilidad de los resultados obtenidos en el manejo actual de los agroecosistemas.

## **CAPÍTULO 2**

### **Cambios en la herbivoría en el cultivo de soja**

---



## 2.1 INTRODUCCIÓN

Una gran diversidad de plagas ataca al cultivo de soja a lo largo de su ciclo ontogénico provocándole disminuciones en el rendimiento. Entre ellas se encuentran diversos insectos herbívoros de los órdenes Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera y Orthoptera (Aragón et al., 1998). Durante el período vegetativo, muchas orugas defoliadoras, con diferente capacidad de daño y susceptibilidad a insecticidas, alcanzan altos niveles de infestación y en consecuencia generan grandes reducciones en el stand de plantas. Las principales especies de lepidópteros son la oruga medidora (*Rachiplusia nu*), la oruga militar tardía (*Spodoptera frugiperda*), la oruga bolillera (*Helicoverpa gelotopoeon*), la gata peluda norteamericana (*Spilosoma virginica*) y la oruga de las leguminosas (*Anticarsia gemmatalis*). A su vez, en el periodo reproductivo se incrementan las poblaciones de chinches, principalmente *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii* y *Dichelops furcatus*, insectos que representan una seria amenaza al cultivo por su gran impacto tanto en el rendimiento como en la calidad de la semilla (Aragón et al., 1998).

### *Oruga de las leguminosas*

*Anticarsia gemmatalis* es un lepidóptero defoliador monófago de leguminosas. A pesar de no ser una plaga especialista de la soja es una de las plagas más importantes del cultivo de soja en América del Sur y el Caribe (Saunders et al., 1998). Las larvas de esta especie se alimentan de hojas y vainas de la mayoría de las leguminosas, generando defoliación de las plantas en condiciones severas de infestación. *A. gemmatalis* presenta seis estadios larvales y requiere de 15 a 20 días para alcanzar su máximo desarrollo. Las pupas se ubican en los primeros centímetros del suelo y después de 10-12 días aparecen los adultos. Generalmente tiene varias generaciones al año (Aragón et al., 1998;

Saunders et al., 1998), y en la Región Pampeana, inicia los ataques al cultivo de soja a fines de febrero, marzo y abril, principalmente en lotes de segunda época de siembra (Aragón et al., 2002). Esta oruga llega a medir de 35 a 40 mm de longitud y se presenta en dos formas: una de color verde intenso y otra de color oscuro a negro, con una serie de líneas blancas longitudinales. Requieren 3 a 4 semanas para alcanzar su máximo desarrollo. Una oruga puede consumir entre 100 y 110 cm<sup>2</sup> de hojas, y total o parcialmente las vainas que no formaron granos o están en inicio de formación de los mismos.

#### *Interacción cultivo - herbívoro - maleza*

La herbivoría sobre el cultivo puede verse afectada por la presencia de las malezas, principalmente a través del efecto de dilución, el cual hace que el insecto sea menos eficiente en su intento de colonizar y/o alimentarse del cultivo cuando está acompañado de otras especies vegetales. Este efecto es denso-dependiente por lo tanto cuantas más plantas de distintas especies se encuentren dentro de la mezcla mayor será el efecto de dilución (Root, 1973; Bernays y Chapman, 1994; Norris y Kogan, 2000; Wisler y Norris, 2005). El efecto de dilución impacta directamente sobre los insectos plaga, eso lo convierte en uno de los principales beneficios que aportan las mezclas de especies o los policultivos frente a cultivos puros (Malézieux et al., 2009; Gaba et al., 2015).

Las señales químicas emitidas por malezas y cultivos presentes en el sistema pueden condicionar por una parte el comportamiento de los herbívoros afectando directamente el grado de herbivoría, y por otra parte la producción y síntesis de compuestos de defensa en plantas vecinas (Turlings et al., 1990; Moraes et al., 2005; Charleston et al., 2006). Por lo tanto, las señales liberadas por las plantas ejercen un rol

determinante de la estructura y composición de la comunidad de insectos asociada al cultivo ya que pueden actuar atrayendo o repeliendo insectos. Las plantas que producen metabolitos de base nitrogenada como los alcaloides, pueden actuar como fuente alternativa de alimento para los herbívoros presentes en el sistema, y así disminuir la herbivoría directa generada sobre el cultivo (Lee, 2000; Lee et al., 2001).

Dependiendo de las características nutritivas y del tipo de señales que liberan las plantas acompañantes del cultivo, actúan diferentes mecanismos de interacción entre el cultivo - herbívoro - malezas. Por ejemplo, las malezas productoras de metabolitos secundarios como los terpenos volátiles (*i.e. Artemisia annua* L.) pueden liberar al medio señales que atraen o repelen insectos, y a su vez promueven la producción de compuestos de defensa por parte del cultivo soja. Mientras que malezas como *C. album* L., pueden ser fuente alternativa de alimento para los herbívoros del sistema, y reducir el consumo del insecto sobre el cultivo por efecto de dilución (Harder et al., 2007; Štolcová, 2009a).

#### *Cultivo de soja en el agroecosistema pampeano*

En la actualidad, el manejo de plagas en el cultivo de soja continúa siendo un tema de preocupación dentro de la planificación integral del cultivo. Si bien existen novedosas estrategias para el manejo de lepidópteros (insecticidas, cultivares de soja BT), su eficiencia de control puede disminuir con su uso recurrente en el tiempo por la generación de resistencia en los insectos (Heckel et al., 2007; Tabashnik y Carrière, 2017). Asimismo, a esta problemática se suma la disminución de la biodiversidad (de La Fuente et al., 2010) y la contaminación ambiental asociada a incrementos en el uso de insumos (energía, agroquímicos) (Satorre, 2005; Aizen et al., 2009). Landis (2017) propone rediseñar el paisaje agrícola para compensar la pérdida de servicios

ecosistémicos por efecto de la simplificación del sistema. Por ello, resulta necesario generar conocimiento sobre nuevas alternativas en el manejo de plagas que reduzcan el nivel de infestación y la defoliación producida en el cultivo, pero que a su vez generen impactos positivos sobre el sistema.

Una de las alternativas de manejo sustentable más aceptadas hace foco en la diversificación del sistema productivo, utilizando especies acompañantes que impacten positivamente sobre algún servicio del ecosistema, como la regulación de las adversidades bióticas o el incremento de la fauna de insectos benéficos (Landis et al., 2000; Moraes et al., 2005; McPherson y Buss, 2007). Por ejemplo, la presencia de plantaciones de flores nativas aumenta la abundancia de abejas silvestres en una gran variedad de paisajes agrícolas, que podría garantizar una polinización adecuada y aumentar el rendimiento de los pequeños agricultores (Garibaldi et al., 2014, 2017). Otra posibilidad, es que el cultivo conviva con algunas especies consideradas “ingenieras del sistema” (Jones et al., 1994), ya sea sembrándolo en policulturas o permitiendo la coexistencia del cultivo con especies consideradas malezas. Existen evidencias que muestran la disminución de insectos perjudiciales, y su consecuente impacto sobre el cultivo, al comparar sistemas de cultivos mixtos con monoculturas (Malézieux et al., 2009; Malézieux, 2012; Landis, 2017).

Estos antecedentes sugieren que la diversificación del sistema productivo, a partir de la presencia de acompañantes del cultivo genera impactos positivos en el sistema. Sin embargo, no existen evidencias de si dicho efecto sobre la herbivoría de *A. gemmatilis* en el cultivo de soja varía dependiendo de la densidad o del tipo de metabolito secundario que producen las plantas acompañantes. Por cuanto, se plantean los siguientes objetivos e hipótesis:

### 2.1.1 Objetivo e hipótesis

El objetivo del presente capítulo es evaluar la herbivoría de *A. gemmatalis* en el cultivo de soja puro y en mezclas con distintas densidades de malezas productoras de diversos metabolitos secundarios.

La hipótesis plantea que:

- i. Hipótesis 1:* La presencia de malezas productoras de distintos metabolitos secundarios dentro del cultivo, al generar un efecto de dilución denso-dependiente en el sistema, afectan la herbivoría sobre el cultivo soja. La herbivoría sobre el cultivo soja será mayor en monoculturas de soja, con respecto a las mezclas con altas densidades de malezas productoras de diferentes metabolitos secundarios.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Ensayo a campo

La descripción general del ensayo, el diseño experimental y los respectivos tratamientos fueron detallados en la metodología general, dentro del Capítulo 1. A continuación se detalla la metodología que se llevó a cabo para poner a prueba el objetivo e hipótesis correspondientes al presente capítulo.

Para evaluar la defoliación en el cultivo de soja puro y en mezclas con distintas densidades de malezas productoras de metabolitos secundarios (*A. annua* y *C. album*) se trabajó con dos tipos de herbivoría: impuesta y espontánea (Figura 2. 1).

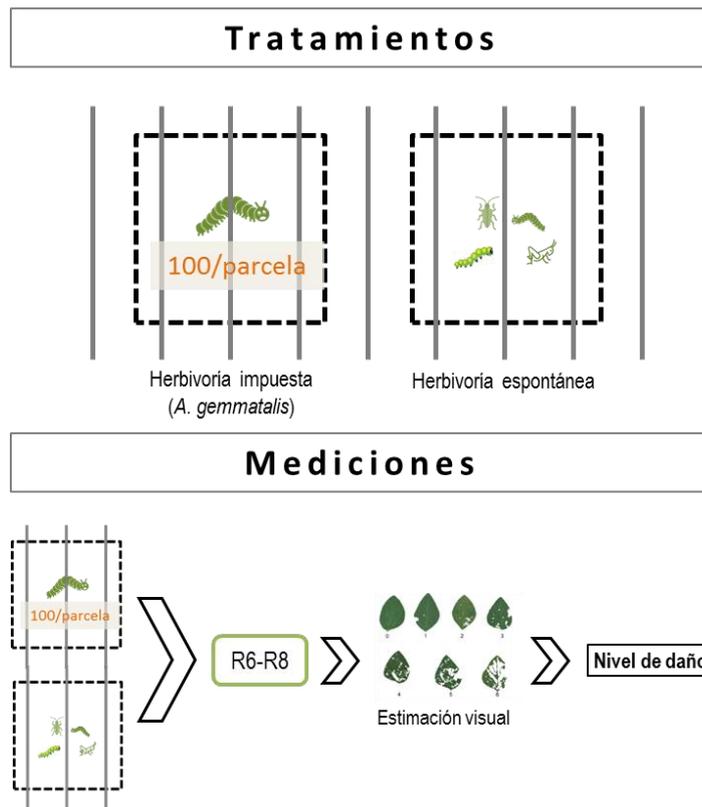


Figura 2. 1. Representación esquemática de los tratamientos y las mediciones implementadas para cumplir con el objetivo del presente capítulo. Las líneas verticales dentro de las parcelas representan las hileras del cultivo de soja. R6-R8, el estado fenológico (Fehr y Caviness, 1977).

Para el caso de la herbivoría impuesta, en el año 2 se evaluó la herbivoría generada por la introducción de la oruga defoliadora *A. gemmatalis* sobre el cultivo de soja. En la etapa de plena floración (R2) (Fehr y Caviness, 1977), para asegurar la herbivoría a corto plazo se introdujeron 100 orugas de *A. gemmatalis* sobre las hojas de la parte media de las plantas ubicadas en el centro de cada parcela con tratamiento de herbivoría. De esta forma, se generó un nivel de infestación por encima del umbral de daño económico (5 o más orugas de 1,5 cm por m de surco) con aproximadamente 5-7 larvas.planta<sup>-1</sup> (Russin, 1989; Zavala et al., 2001).

Para el caso de la herbivoría espontánea, en los años 3 y 4 se evaluó la defoliación generada, de forma natural sobre el cultivo soja, por los herbívoros presentes en el sistema. Para ello, a inicios de la etapa de fructificación (R3) (Fehr y

Caviness 1977), se retiró la malla que mantuvo cubierta la estructura del experimento, y limitaba la entrada de insectos.

En ambos casos, se evaluó el nivel de daño entre los estados fenológicos R6 y R8. En el caso de la herbivoría impuesta, para garantizar que el daño observado fuera el generado por *A. gemmatalis*, se realizó la evaluación justo antes de retirar la malla que cubría la estructura (Figura 2. 2).



Figura 2. 2. Vista general del experimento y de las parcelas delimitadas con la tela de tul.

Por el contrario, en el caso de la herbivoría espontánea, la evaluación se realizó luego de retirar la malla para garantizar la acción de los herbívoros espontáneos del sistema. Ambos tipos de herbivoría se estimaron a través de la escala logarítmica diagramática de evaluación de daño por orugas defoliadoras al cultivo de soja, elaborada por (Boito et al., 2013) (Figura 2. 3 y Cuadro 2. 1).

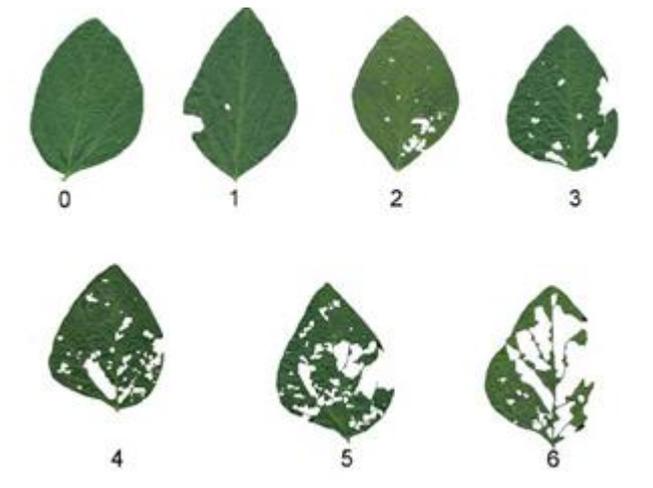


Figura 2. 3. Escala diagramática de daño por orugas defoliadoras en el cultivo de soja (Boito *et al.*, 2013).

Cuadro 2. 1. Punto medio y límites inferior y superior para cada clase obtenidos con el programa DOSLOG (Boito *et al.*, 2013).

<b>Clase</b>	<b>Límite inferior</b>	<b>Punto medio</b>	<b>Límite superior</b>
<b>0</b>	0,00	0,00	0,00
<b>1</b>	0,00	1,91	2,63
<b>2</b>	2,63	3,64	5,02
<b>3</b>	5,02	6,94	9,58
<b>4</b>	9,58	13,23	18,26
<b>5</b>	18,26	25,22	34,83
<b>6</b>	34,83	48,10	

La escala propuesta por Boito et al. (2013) consta de siete clases y fue validada por su exactitud, precisión y reproducibilidad. La misma se determinó a partir de defoliación real sobre folíolos de soja y fue analizada a través de WinFolia y el programa DOSLOG versión 1.0 por Windows® (Osada-Velasquez y Mora-Aguilera, 1997). Es una escala que reduce el riesgo de sobreestimación visual de los evaluadores, basándose en la ley de estímulo de Weber-Fechner que establece que “la agudeza visual es inversamente proporcional al logaritmo del estímulo”.

### 2.2.2 Análisis de los datos

Los datos se analizaron estadísticamente a través de análisis de la varianza (ANVA) usando el paquete estadístico “InfoStat - Statistical Software Profesional” (versión 2017) (Di Rienzo et al., 2017). Cuando los efectos o sus interacciones fueron significativos las medias se compararon con el test HSD Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para evaluar el efecto combinado de la competencia y la herbivoría, se realizó un análisis de porcentaje de pérdida de rendimiento en función de la densidad de la maleza *A. annua*. Para ello, previamente se calculó el rendimiento relativo del cultivo y de la maleza. Para el cálculo del rendimiento relativo se relaciona el rendimiento producido por cada especie estando en mezcla respecto al rendimiento producido en monocultivo (ver sección 3.2: Materiales y Métodos. Capítulo 3). Para ello se analizaron los datos de las parcelas con mezclas del cultivo soja y la maleza *A. annua* (2A y 4A) y las parcelas puras de ambas especies (SP y AP).

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Defoliación por herbivoría de *Anticarsia gemmatilis*

Los resultados muestran diferencias significativas en el nivel de defoliación de *A. gemmatilis* sobre el cultivo de soja puro con respecto a las mezclas con malezas acompañantes ( $p = 0,002$ ). Para el año 2, el tratamiento de soja pura presentó el mayor nivel de defoliación (alrededor del 12%), mientras que los tratamientos de soja con malezas acompañantes presentaron valores de defoliación mucho más bajos (entre 2 y 6%) (Figura 2. 4). Por su parte, no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos en relación al tipo de maleza acompañante, ni a la densidad dentro de la mezcla.

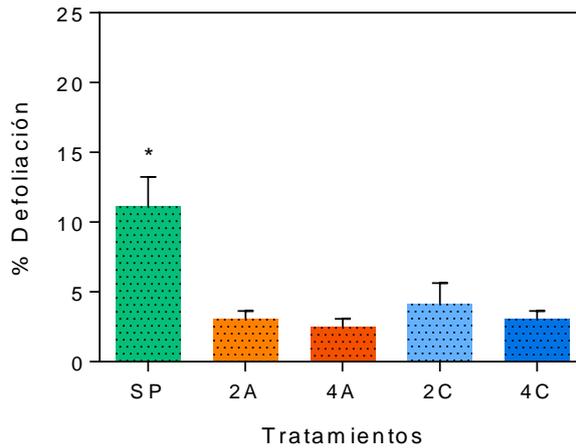


Figura 2. 4. Nivel de defoliación sobre el cultivo soja generada por la oruga *Anticarsia gemmatalis* en los distintos tratamientos para el año 2. Las barras representan el error estándar de la media,  $p < 0,05$  (\*).

### 2.3.2 Defoliación por herbivoría espontánea

En cuanto a la defoliación generada de forma espontánea por los herbívoros presentes en el sistema durante los años 3 y 4, los resultados muestran diferencias significativas en el nivel de defoliación en el cultivo puro con respecto a las mezclas ( $p=0,007$  y  $p=0,002$ , respectivamente). Así, en ambos años el tratamiento de soja pura presentó un nivel de defoliación mayor (18 y 15 %, respectivamente), con respecto a los tratamientos con malezas acompañantes que estuvieron alrededor del 5% de defoliación en ambas campañas. No hubo diferencias estadísticas asociadas al tipo de maleza acompañante, ni a la densidad (Figura 2. 5).

En resumen, tanto con la herbivoría espontánea como con la herbivoría impuesta los valores de defoliación en soja pura fueron mayores que los encontrados en las mezclas, y no se registraron diferencias con el tipo de maleza presente en la mezcla ni con la densidad de la misma.

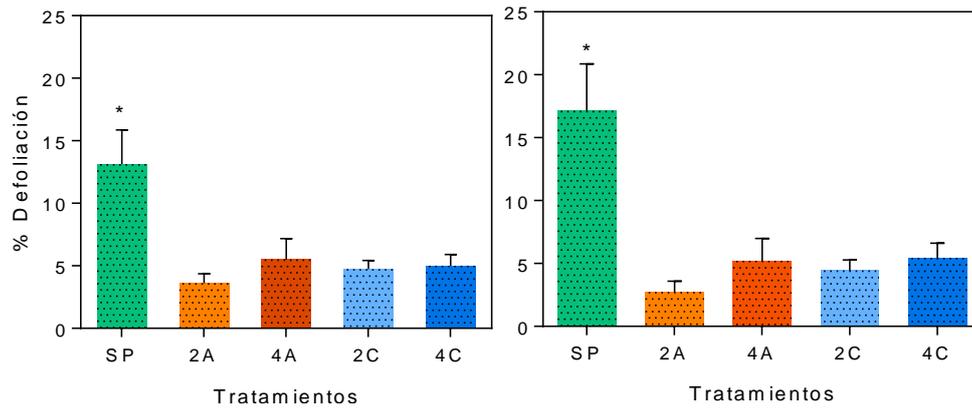


Figura 2. 5. Nivel de defoliación generada de forma espontánea sobre el cultivo soja en los distintos tratamientos para el año 3 (izquierda) y año 4 (derecha). Las barras representan el error estándar de la media,  $p < 0,05$  (\*).

### 2.3.3 Pérdida de rendimiento

Los resultados del efecto de la competencia muestran por una parte que el rendimiento del cultivo ( $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ ) disminuye a medida que aumenta la densidad de la maleza *A. annua* sin herbivoría. Esta disminución no ocurrió cuando los tratamientos de herbivoría y competencia ocurrieron simultáneamente (2AH, 4AH) (Figura 2. 6).

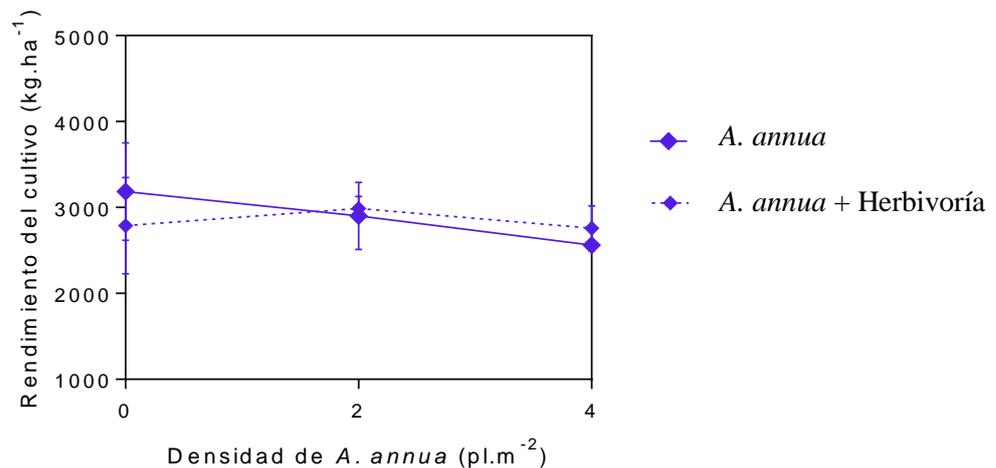


Figura 2. 6. Rendimiento del cultivo de soja en función de la densidad de la maleza *A. annua*, con (línea segmentada) y sin (línea continua) herbivoría de *A. gemmatilis*. Las barras representan el error estándar de la media.

El porcentaje de pérdida de rendimiento del cultivo en función de la densidad de la maleza, tiende a aumentar con la densidad de la maleza. Sin embargo, la pérdida no supera el 20% y tiende a ser menor con herbivoría (Figura 2. 7).

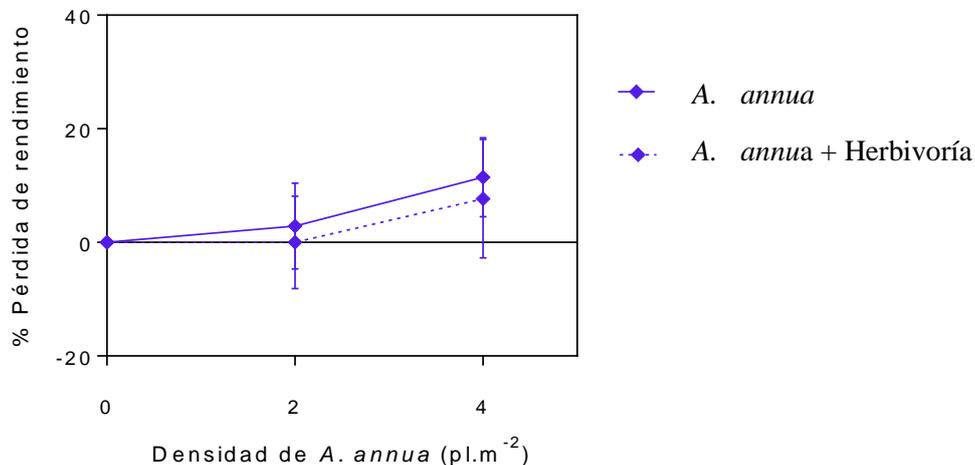


Figura 2. 7. Porcentaje de pérdida de rendimiento del cultivo soja en función de la densidad de la maleza *A. annua*, con (línea segmentada) y sin (línea continua) herbivoría de *A. gemmatalis*. Las barras representan el error estándar de la media.

## 2.4 DISCUSION

En este capítulo se evaluó la herbivoría de *A. gemmatalis* sobre el cultivo de soja puro y en mezclas con distintas densidades de malezas productoras de metabolitos secundarios. Además, se analizó la pérdida de rendimiento del cultivo en función de la densidad de la maleza *A. annua*. Los resultados mostraron que la herbivoría de la oruga defoliadora, expresado en porcentaje de tejido removido según Boito et al. (2013), fue significativamente mayor en las monoculturas de soja que en las mezclas con malezas. Estas diferencias, pueden estar relacionadas directamente con la presencia de las malezas acompañantes y/o indirectamente con el impacto que pueden generar estas especies sobre el sistema (*i.e.* cambios en el ambiente químico, insectos relacionados).

La disminución de la herbivoría sobre el cultivo asociada directamente con la presencia de las malezas acompañantes, puede explicarse a través del efecto de dilución

o por ser refugio o fuente alternativa de alimento para el insecto. En este sentido, las malezas *A. annua* y *C. album* acompañaron al cultivo a lo largo del experimento y al generar un stand más diverso y heterogéneo (*i.e.* cultivo con malezas) podrían haber afectado la herbivoría por dilución. Malézieux et al. (2009) resalta que el efecto dilución es uno de los principales beneficios que aportan las policulturas, por su efecto directo sobre la disminución de insectos perjudiciales.

A su vez, la presencia de plantas acompañantes dentro del sistema puede provocar la disminución de la herbivoría al representar no sólo un refugio, sino una fuente alternativa de alimento aún para insectos monófagos, es decir que se alimentan solamente de una especie, o de plantas del mismo género (Norris y Kogan, 2000). El término monófago está relacionado a una definición química, por lo tanto, las plantas que contienen metabolitos secundarios similares pero que están en diversos taxones botánicos pueden ser parte del rango de alimentación de un insecto monófago (Norris y Kogan, 2000). Las malezas *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv., *Echinochloa colona* (L.) Link y *Digitaria* sp., por ejemplo representan una fuente alternativa de alimento para la “chinche del arroz” – *Leptocorisa oratorius* (F.) en cultivos de arroz (Morrill et al., 1990), *Kochia scoparia* (L.) Schrad., *Amaranthus retroflexus* (L.), *Salsola rigida* Pall., para *Cosmobaris americana* Casey. en cultivos de girasol (Armstrong, 1997), mientras que *Medicago lupulina* (L.) y *Melilotus albus* Medik. para *A. gemmatilis* (Slansky, 1989). En todos los casos, la presencia de malezas generó un efecto positivo sobre el cultivo del sistema productivo. Este tipo de comportamiento dentro del sistema podría aplicarse para el caso específico de la maleza *C. album*, ya que durante la realización de los ensayos a campo, se observó que esta maleza fue consistentemente defoliada por distintos herbívoros (*e.g.* hormigas, orugas).

Poonia y Upadhyay (2015) resaltan a *C. album* como una especie de un alto valor energético, con un elevado contenido de minerales, fibras, proteínas y ácidos grasos, que incluso en la actualidad es utilizada en la alimentación humana. Estas características nutricionales la convierten en una especie altamente atractiva para numerosos herbívoros. En este sentido, Štolcová (2009b) encontró defoliaciones de hasta un 78% sobre plántulas de *C. album* producida por diferentes insectos, entre ellos larvas defoliadoras. Asimismo, Harder et al. (2007) reportaron comunidades de insectos defoliadores pertenecientes al orden Curculionidae y Agromyzidae asociados a esta especie de maleza.

Por otra parte, las diferencias encontradas en el nivel de defoliación pueden explicarse también por los compuestos volátiles liberados al medio, específicamente en los tratamientos con *A. annua*. Los metabolitos secundarios liberados por las plantas como *A. annua* modulan de manera individual o en conjunto el entorno donde se desenvuelven los insectos incidiendo en la atracción, repelencia, alimentación, crecimiento y reproducción de los insectos (Bernays y Chapman, 1994; Booth y Swanton, 2002; Cipollini, 2004; Radosevich et al., 2007; Lenardis et al., 2011).

Ferreira y Janick (2004) definen a la especie *A. annua* como una planta alelopática que produce una gran cantidad de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran los terpenos, flavonoides, cumarinas, glicosidos, esteroides y fenoles. Muchos de estos metabolitos son compuestos volátiles que la planta libera al medio principalmente a través de tricomas ubicados en las flores, hojas y raíces (Ferreira y Janick, 1996). Probablemente el compuesto más conocido de esta especie es la artemisinina, un sesquiterpeno lactona endoperoxido actualmente utilizado en la industria farmacéutica para el control de la malaria (Ivanescu et al., 2015). Incluso se ha evaluado el potencial efecto herbicida de la artemisinina (Chen y Leather, 1990). Los

compuestos volátiles liberados por *A. annua* podrían afectar el comportamiento de la oruga defoliadora, y alterar su capacidad de herbivoría sobre el cultivo. Estos compuestos pueden a su vez afectar tanto las defensas químicas directas del cultivo y la supervivencia del herbívoro (ver Capítulo 4), como las defensas químicas indirectas del cultivo y la llegada de enemigos naturales al sistema (ver Capítulo 5).

Los resultados encontrados también podrían estar relacionados con la llegada de insectos benéficos producto de la alteración de los compuestos volátiles del sistema (ver Capítulo 5). Trabajos anteriores han demostrado que existe una fuerte relación entre la liberación de estos compuestos volátiles por parte de la maleza *A. annua* en presencia del cultivo soja y la atracción de insectos benéficos (Lenardis et al., 2011). Esto demuestra que la presencia de esta especie dentro del sistema, ya sea de forma espontánea como maleza o introducida en el marco de una policultura, puede generar un efecto “bottom up”. Es decir, cambios en el nivel más bajo de la red trófica (*i.e.* plantas) favorecen la estructura de algún nivel trófico superior (*i.e.* insectos). Por ejemplo, cambios en los metabolitos primarios y secundarios de plantas pueden afectar tanto la persistencia y la alimentación de los herbívoros, como la efectividad de los enemigos naturales (*i.e.* entomopatógenos, entomófagos) (Shikano, 2017). Si además, los insectos atraídos son en su mayoría benéficos (parasitoides, depredadores, polinizadores) se genera un impacto positivo sobre las plantas involucradas a través de la disminución de la población de herbívoros presentes (“top down”) (Hunter y Price, 1992).

#### *Pérdida de rendimiento en función de la densidad de A. annua*

El análisis de la pérdida del rendimiento del cultivo de soja en función del aumento de la densidad de la maleza *A. annua*, en presencia y ausencia de herbivoría,

muestra una leve tendencia negativa del rendimiento del cultivo en respuesta al aumento de la densidad de maleza. Sin embargo, al evaluar el efecto conjunto de la competencia y la herbivoría, resultó una combinación ligeramente positiva para el cultivo. Aparentemente, la presencia de la maleza *A. annua* junto con la herbivoría de *A. gemmatalis* genera un efecto “amortiguador” de la competencia sobre el rendimiento del cultivo.

Estas diferencias indican una posible interacción positiva entre las malezas acompañantes y la herbivoría, que se vio reflejado sobre el rendimiento del cultivo. A escala de campo es muy frecuente que ocurran ambas interacciones. De hecho, la condición en que las plantas enfrentan simultáneamente la competencia interespecífica y la herbivoría podría considerarse lo que se conoce como “el dilema de las plantas”, en esta situación, las plantas deben asignar recursos al crecimiento o la defensa (Herms y Mattson, 1992). Un factor determinante en este tipo de casos es la estructura del cultivo previo a la herbivoría, específicamente, la generación de área foliar o el índice de área foliar (IAF) logrado por el cultivo. Si el IAF está por encima del IAF crítico, el cultivo de soja es capaz de tolerar defoliaciones severas sin afectar significativamente el rendimiento. En este ensayo, dado que el cultivo no contaba con limitaciones de recursos previo al tratamiento de herbivoría, el IAF superaba al crítico, esto sumado a que probablemente la herbivoría estimuló el crecimiento compensatorio hizo que la situación de “competencia + herbivoría” resultara positiva en términos de generación de biomasa y rendimiento.

Por otra parte, las diferencias de magnitud encontradas entre la herbivoría impuesta y la espontánea pueden estar relacionadas con el tipo y la abundancia de herbívoros. En el caso de la herbivoría generada por *A. gemmatalis*, la abundancia estuvo controlada por el tratamiento impuesto y la máxima defoliación encontrada

estuvo alrededor del 12%. Mientras que, en el caso de la herbivoría espontánea, el tipo de herbívoro y la abundancia fueron aleatorios y la máxima defoliación encontrada estuvo alrededor del 18% y 15%, para los años 3 y 4, respectivamente. Entonces, el nivel de herbivoría generado sobre el cultivo puede variar dependiendo del insecto y la intensidad con que realice el daño.

## 2.5 CONCLUSIONES

Los resultados del presente capítulo permiten extraer las siguientes conclusiones:

- i.* La coexistencia del cultivo de soja con las malezas acompañantes a lo largo de todo su ciclo ontogénico generó un impacto positivo minimizando el daño generado por los herbívoros presentes en el sistema productivo.
- ii.* La herbivoría sobre el cultivo de soja, tanto la generada por la oruga *A. gemmatalis* como la que se generó por los herbívoros que llegaron de forma espontánea, disminuyó significativamente con la presencia de malezas acompañantes dentro del sistema.
- iii.* Existe una interacción positiva entre la presencia de las malezas acompañantes y la herbivoría mediada a través de la respuesta compensatoria del cultivo, en términos de generación de biomasa y rendimiento.
- iv.* La pérdida de rendimiento del cultivo aumentó en función del incremento de la densidad de la maleza presente en la mezcla, sin embargo, las pérdidas se mantuvieron en niveles bajos, y a su vez, esta respuesta se vio “amortiguada” cuando del tratamiento de herbivoría estuvo presente en forma simultánea.

Por lo expuesto, ya que no hubo diferencias entre las densidades utilizadas, se acepta parcialmente la hipótesis 1 que plantea que “*La presencia de malezas*

*productoras de distintos metabolitos secundarios dentro del cultivo, al generar un efecto de dilución denso-dependiente en el sistema, afectan la herbivoría sobre el cultivo soja. La herbivoría sobre el cultivo soja será mayor en monoculturas de soja, con respecto a las mezclas con altas densidades de malezas productoras de diferentes metabolitos secundarios”.*





### 3.1 INTRODUCCIÓN

La plasticidad fenotípica es la propiedad de un genotipo para producir diferentes fenotipos fisiológicos o morfológicos en respuesta a diversas condiciones ambientales. Los principales factores que promueven la expresión de la plasticidad fenotípica son las variaciones del ambiente biótico y abiótico, y las variaciones genéticas en las plantas vecinas (Callaway et al., 2003). Es decir, las plantas poseen la capacidad de responder a los continuos estímulos del entorno: variaciones ambientales, el estrés, la herbivoría, el parasitismo, relaciones mutualistas, la competencia y las señales de plantas vecinas. Muchas de estas variaciones ocurren de forma simultánea, lo que genera en las plantas compromisos entre los distintos procesos y mecanismos, como por ejemplo el compromiso entre la necesidad de crecer y desarrollarse y la urgencia de defenderse (Herms y Mattson, 1992).

En relación a la defensa, numerosos autores coinciden en que esta respuesta se divide en dos mecanismos principales: la tolerancia y la resistencia (Moraes et al., 2005; Heil y Karban, 2010; Wang et al., 2015). Por un lado, la tolerancia se entiende como la capacidad de minimizar el efecto negativo del daño generado por la herbivoría. Por su parte, la resistencia consiste en afectar negativamente al atacante a través de la síntesis de compuestos químicos que detengan la herbivoría afectándolo en forma directa, o indirecta, a través de la liberación de compuestos que atraigan enemigos naturales. La síntesis de los compuestos de defensa se lleva a cabo por la recepción de las señales introducidas por el herbívoro al momento del ataque más las señales generadas por las condiciones abióticas que activan diversas rutas de comunicación cruzada en el metabolismo de la planta. Luego, dependiendo del atacante y del estrés abiótico se produce una reconfiguración metabólica para determinar la respuesta al ataque: defensas directas, indirectas o tolerancia (Figura 3. 1) (Kessler y Baldwin, 2002a; Jassbi et al.,

2010; Schuman y Baldwin, 2016). En un principio se consideraba a estos mecanismos funcionalmente redundantes, pero estudios recientes respaldan la idea de que son complementarios entre sí, favoreciendo la presencia de patrones de defensas mixtos (Carmona y Fornoni, 2013).

Este capítulo hace énfasis en uno de los mecanismos de la tolerancia, el crecimiento compensatorio del cultivo de soja por efecto de la herbivoría de *Anticarsia gemmatalis* en presencia de malezas productoras de metabolitos secundarios.

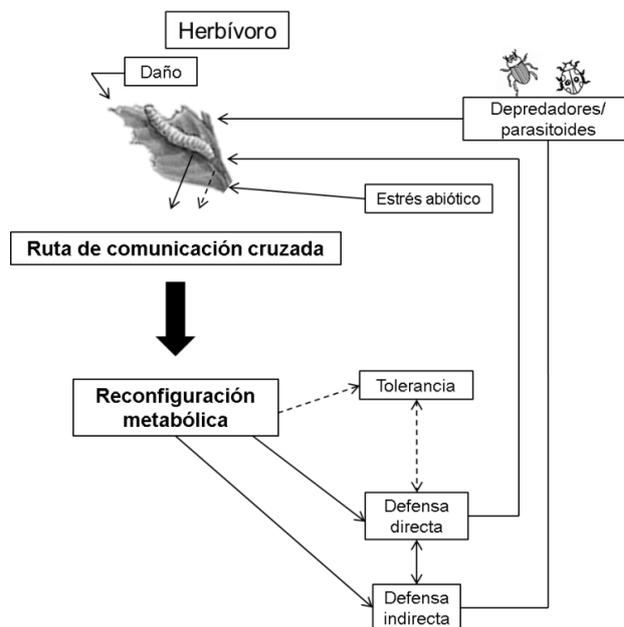


Figura 3. 1. Representación esquemática de las defensas de las plantas en respuesta al ataque de insectos defoliadores (Modificado de Kessler y Baldwin, 2002).

### *Tolerancia*

La tolerancia es una estrategia utilizada por la mayoría de las plantas para compensar el daño provocado por un factor externo ya sea incrementando la tasa fotosintética, promoviendo el crecimiento compensatorio, utilizando reservas almacenadas, generando cambios fenotípicos o activando meristemas dormidos (Tiffin, 2000; Wang et al., 2015). Una planta es tolerante si logra sostener la pérdida de tejido activo con poco o ningún impacto en su “fitness” (Kessler y Baldwin, 2002a). Este

mecanismo depende tanto de características fisiológicas como morfológicas que le permiten a la planta reiniciar el crecimiento después del daño (Vilarino y Ravetta, 2008). El reinicio del crecimiento puede tener distintas implicancias: cuando la tasa de crecimiento disminuye por debajo de lo esperado, en función de la proporción de tejido removido se considera **daño**, pero si la disminución es menor a lo esperado, se considera **compensación parcial**. A su vez, cuando la tasa de crecimiento de las plantas defoliadas es igual a las no defoliadas se denomina **compensación total**, y si es mayor se denomina **sobrecompensación** (Ferraro y Oesterheld, 2002).

La plasticidad fenotípica juega un rol determinante en la capacidad de cada especie de compensar luego del daño (Heil, 2010). Ferraro y Oesterheld (2002) analizaron numerosos trabajos del efecto de la defoliación sobre el crecimiento de las pasturas y encontraron que la frecuencia de la defoliación y el tiempo de recuperación explican gran parte del éxito de la respuesta compensatoria a la defoliación.

Específicamente la tolerancia a la herbivoría ha sido central en numerosos estudios, la mayoría de los cuales estuvieron enfocados desde una perspectiva ecológica, ya que juega un rol importante en la evolución y en la dinámica ecológica entre plantas y herbívoros (Carmona y Fornoni, 2013), pero se sabe mucho menos en cuanto a la tolerancia en sistemas cultivados.

Muchas evidencias de la tolerancia frente a la herbivoría han generado controversia a lo largo del tiempo. Las ideas que respaldan el rol positivo de la tolerancia muestran incrementos en la tasa fotosintética de los tejidos luego de haber sufrido el daño, generando en consecuencia incrementos en la tasa de crecimiento y en el rendimiento. En contraparte, otras ideas señalan que muchas veces es mayor el costo que el beneficio (Heil, 2010), por ejemplo cuando son necesarios insumos que

particularmente se encuentran limitantes como el nitrógeno (Baldwin, 2001). A su vez, está el riesgo que corre la planta en generar una respuesta sin éxito, ya sea porque el daño por herbivoría sea más rápido que la compensación o porque las condiciones abióticas no sean favorables. En términos ecológicos, los costos pueden escalar a otros niveles tróficos, por ejemplo herbívoros especialistas que secuestren los compuestos químicos de defensas de las plantas y las utilicen para contraatacar o para defenderse de la llegada de insectos depredadores (Turlings et al., 1990; Alborn, 1997; Kessler y Baldwin, 2002a).

### *Tolerancia en el cultivo de soja*

El cultivo de soja presenta una elevada plasticidad fenotípica ya que, por ejemplo, posee la capacidad de compensar variaciones en el stand y el área foliar, e igualar rendimientos a densidades muy contrastantes (Fehr et al., 1977; Saito et al., 1983). La generación de estructuras vegetativas (hojas y ramas) se extiende hasta muy avanzado el ciclo del cultivo debido a que, continúan diferenciándose durante la etapa reproductiva a partir de los meristemas axilares (Figura 3. 2), lo que provoca una gran superposición en la generación de estructuras vegetativas y reproductivas. Esta característica le permite al cultivo de soja contar con muchos meristemas axilares para responder ante variaciones bióticas y abióticas.

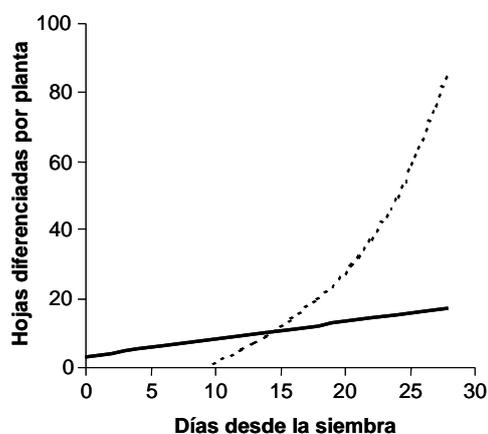


Figura 3. 2. Progreso de la diferenciación de primordios foliares de la planta de soja a partir del meristema apical del tallo principal (línea llena) y a partir de meristemas axilares (línea punteada) durante el primer mes desde la siembra (Modificado de Borthwick y Parker, 1983).

El cultivo de soja puede optimizar el rendimiento a bajas densidades (Carpenter y Board, 1997a; b; Board, 2000) o ante daños por herbivoría (Haile et al., 1998), principalmente a través del ajuste en la eficiencia de intercepción (ramificaciones y expansión foliar), en la eficiencia en el uso de los recursos y en la generación de nuevos destinos (flores, frutos, ramas por planta, vainas por rama). Otros autores señalan el retraso en la senescencia como una estrategia alternativa de tolerancia ante la defoliación (Higley, 1992).

Según Pedigo (1986) la tolerancia del cultivo para evitar la pérdida de rendimiento luego de una defoliación depende de: i) la magnitud de la defoliación, ii) la fenología del cultivo al momento de la defoliación, iii) el genotipo, vi) las condiciones ambientales y v) las interacciones con plantas vecinas. Con respecto al primero, algunos autores señalan que el cultivo de soja puede tolerar hasta el 33% de defoliación sin reducciones de rendimiento (Haile et al., 1998). En relación al segundo factor, las defoliaciones afectan negativamente el rendimiento durante el periodo reproductivo. Específicamente, entre R2 y R5, el daño por herbivoría resulta más difícil de compensar que durante el resto del ciclo, ya que en ese lapso las reducciones en el número de granos no pueden ser compensadas por aumentos en el peso de los granos (Jiang Hongfei y Egli, 1995). El tercer factor tiene que ver con las características propias de cada material para tolerar o compensar. Por ejemplo, el hábito de crecimiento del cultivar tiene gran injerencia sobre la respuesta compensatoria. Cultivares indeterminados suelen ser plantas más altas, con mayor número de nudos en el tallo principal y con mayor superposición entre etapas fenológicas. Por ello, una defoliación del 50% durante el periodo reproductivo provoca menor pérdida de rendimiento en los cultivares indeterminados (Fehr et al., 1977). El cuarto factor se refiere a los factores

ambientales como la disponibilidad recursos y su relación con la estructura del cultivo, que modifica la tasa de crecimiento y en consecuencia la capacidad compensatoria del cultivo luego de un daño. Por último, la respuesta a la herbivoría puede verse afectada por la interacción con otras plantas acompañantes en el sistema.

Así la competencia por recursos entre organismos vegetales, además de restringir el crecimiento, la fecundidad, la supervivencia y la habilidad competitiva del cultivo, puede modular la respuesta del cultivo frente a la herbivoría (Ballaré et al., 1987, 2012; Liu et al., 2009; Green-Tracewicz et al., 2012b). El grado de competencia entre dos especies puede analizarse y cuantificarse con distintas medidas, como por ejemplo: i) la habilidad competitiva de los componentes de una mezcla para obtener recursos (agua, luz, nutrientes) creciendo en mezclas, ii) la complementariedad de recursos se refiere a la medida en qué los componentes de una mezcla comparten y utilizan los recursos limitantes cuando crecen juntos y iii) la severidad de competencia que mide el stress de un individuo creciendo en competencia con otros (Snaydon y Satorre, 1989).

La tolerancia del cultivo soja al daño causado por el lepidoptero *Spodoptera litura* (Fabricius) en cultivos de soja permite que defoliaciones de 50% causen disminuciones en el rendimiento de hasta el 20%, dependiendo del momento en el que se realiza el daño, siendo el periodo más crítico entre R2 y R5, donde la recuperación a la defoliación es limitada (Saito et al., 1983).

En síntesis, se sabe que la tolerancia representa uno de los principales mecanismos de las plantas para compensar el daño provocado por un factor externo incrementando la tasa fotosintética y promoviendo el crecimiento compensatorio (Tiffin, 2000; Wang et al., 2015). A su vez, existen evidencias que muestran que el

cultivo de soja presenta una elevada plasticidad fenotípica ya que puede tolerar altos niveles de defoliación sin alterar significativamente la generación de rendimiento, debido a que la generación de estructuras vegetativas (hojas y ramas) se extiende hasta muy avanzado el ciclo del cultivo, lo que le permite al cultivo contar con muchos meristemas axilares para responder ante factores externos, como una defoliación (Fehr et al., 1977; Saito et al., 1983; Pedigo, 1986; Haile et al., 1998). Sin embargo, no existen evidencias acerca del impacto de la herbivoría de *A. gemmatalis* y la presencia de malezas productoras de metabolitos secundarios dentro del sistema, sobre la respuesta compensatoria del cultivo. Por cuanto, se plantean los siguientes objetivos e hipótesis:

### 3.1.1 Objetivo e hipótesis

Los objetivos del presente capítulo son:

- i. Determinar el efecto de la herbivoría de *A. gemmatalis* sobre el crecimiento en un cultivo de soja acompañado de malezas productoras de distintos metabolitos secundarios.
- ii. Evaluar la relación competitiva entre el cultivo de soja y las malezas acompañantes en respuesta a la herbivoría de *A. gemmatalis*.

Las hipótesis plantean que:

- i. *Hipótesis 2a.* El crecimiento compensatorio en respuesta a la herbivoría es estimulado en presencia de plantas que emiten señales volátiles. El crecimiento compensatorio del cultivo de soja en respuesta a la herbivoría de *A. gemmatalis* será mayor en mezcla con *A. annua*, con respecto a la monocultura de soja o a las mezclas con *C. album*.
- ii. *Hipótesis 2b.* La relación competitiva del cultivo de soja - malezas acompañantes en respuesta a la herbivoría de *A. gemmatalis* es amortiguada en presencia de

especies poco competitivas. La relación competitiva entre el cultivo de soja en mezcla con *A. annua* en respuesta a la herbivoría de *A. gemmatalis* será incompleta o de tipo complementaria.

## 3.2 MATERIALES Y METODOS

### 3.2.1 *Ensayo a campo*

La descripción general del ensayo, el diseño experimental y los respectivos tratamientos fueron detallados en la metodología general, dentro del Capítulo 1. A continuación se detalla la metodología que se llevó a cabo para poner a prueba el objetivo e hipótesis correspondientes al presente capítulo.

Para asegurar la herbivoría y el daño de *A. gemmatalis* en el cultivo de soja puro o en mezclas con distintas densidades de malezas, durante la fase de floración (R2-R4) se adicionaron 100 orugas de *A. gemmatalis* (por encima del umbral económico de daño, 5 o más orugas de 1,5 cm. m<sup>-1</sup>), sobre las hojas de la parte media de las plantas ubicadas en el centro de cada parcela con herbivoría, generando un nivel de infestación aproximado de 4-7 larvas. planta<sup>-1</sup> (Russin, 1989; Zavala et al., 2001).

### 3.2.2 *Determinaciones*

Para estudiar el crecimiento del cultivo de soja ante la herbivoría de *A. gemmatalis* y la presencia de las malezas *C. album* y *A. annua*, al finalizar el ciclo del cultivo se cosecharon todas las plantas presentes en cada una de las parcelas del experimento. Se estimó la biomasa total de la parte aérea (peso seco) y el peso total de los granos. Se contabilizó el número y el peso de granos por parcela para estimar el rendimiento (kg ha<sup>-1</sup>). Luego se seleccionaron 10 plantas al azar de cada parcela y se

midió la altura de la planta, desde la base hasta el ápice. Además, se cuantificó el número de ramificaciones por planta (Figura 3. 3).

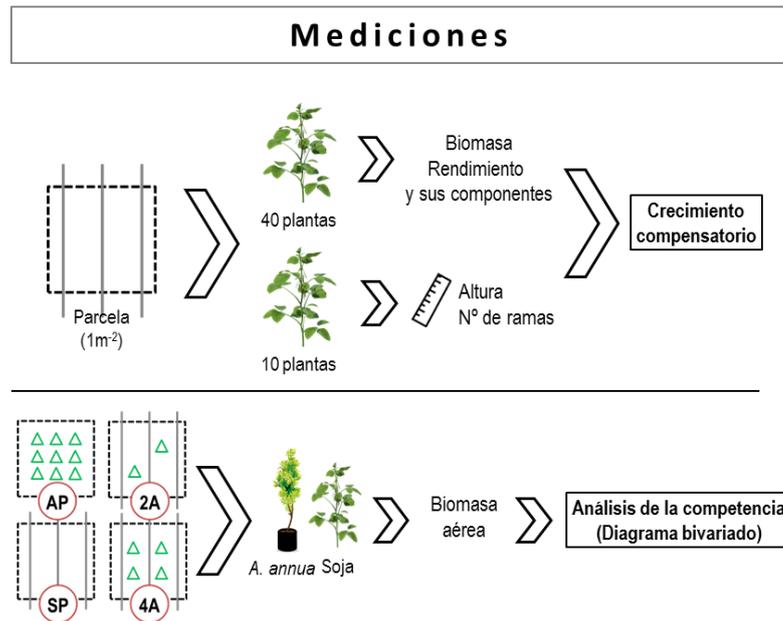


Figura 3. 3. Representación esquemática de los tratamientos y las mediciones implementadas para cumplir con el objetivo del presente capítulo. AP: *A. annua* pura; SP: soja pura; 2A: soja + 2 pl/m<sup>2</sup> de *A. annua*; 4A: soja + 4 pl/m<sup>2</sup> de *A. annua*. Las líneas verticales dentro de las parcelas representan las hileras del cultivo de soja y los triángulos cada unas de las plantas de maleza dentro de la parcela.

En el año 2, se analizó la competencia entre el cultivo y la maleza *A. annua*. Para ello, al finalizar el ciclo del cultivo se cosechó la parte aérea de todas las plantas presentes en cada una de las parcelas, es decir, tanto las plantas del cultivo y como las de la maleza. Las muestras se secaron y pesaron para cuantificar la biomasa aérea total de cada especie en tratamientos puros (SP y AP) y en mezclas a distintas densidades relativas (2A y 4A).

### 3.2.3 Análisis de los datos

Los efectos principales y sus interacciones se analizaron a través de análisis de la varianza (ANVA) usando el paquete estadístico software Infostat (versión 2017) (Di Rienzo et al., 2017). Cuando las diferencias entre tratamientos fueron significativas, las

medias se compararon utilizando la prueba de Tukey's ( $p < 0,05$ ). Previamente se comprobaron los supuestos de homogeneidad de varianza y distribución normal para todos los tratamientos.

Para evaluar la compensación del daño, se analizó por separado, la biomasa, el rendimiento, los componentes del rendimiento, la altura y el número de ramas a través de un análisis de regresión lineal entre tratamientos con y sin herbivoría, y se comparó con una línea 1:1 (supuesto caso de "ningún daño" por herbivoría).

Para determinar si hubo o no crecimiento compensatorio se utilizó el índice de cambio relativo en la producción de biomasa total (relative change of total biomass, RCT) como variable para medir la magnitud de efecto de la defoliación sobre la producción:

$$RCT = TP(\text{sin defoliar}) - TP(\text{defoliadas}) / TP(\text{defoliadas})$$

La producción total (TP) se obtiene a partir de la biomasa aérea producida en cada parcela. Es un índice de fácil interpretación, ya que relaciona la pérdida proporcional de biomasa ocasionada por la defoliación. Valores de  $RCT=0$  indican compensación total, es decir las plantas defoliadas y su respectivo control presentan un comportamiento similar; valores de  $RCT > 0$  indica sobrecompensación, es decir las plantas defoliadas rinden más que el control, y valores  $RCT < 0$  indica compensación parcial o daño (Ferraro y Oesterheld, 2002).

Para analizar la competencia entre el cultivo y la maleza *A. annua*, se realizó un análisis bivariado y se estimaron las distintas medidas de competencia (Snaydon y Satorre, 1989). El rendimiento relativo (RR), indicador de la severidad de la competencia experimentada, se calculó para cada especie a partir de la biomasa seca

producida por una especie en competencia respecto de la biomasa aérea total, en peso seco, producida en monocultura:

$$RR \text{ cultivo} = BS(\text{cultivo/maleza}) / BS (\text{cultivo monocultura})$$

$$RR \text{ maleza} = BS (\text{maleza/cultivo}) / (BS (\text{maleza monocultura}))$$

Además, se calculó el rendimiento relativo total (RRT) del sistema como la sumatoria del rendimiento relativo de cada especie:

$$RRT = RR \text{ cultivo} + RR \text{ maleza}$$

El RRT estima de qué manera los componentes de la mezcla cultivo-maleza comparten los recursos limitantes del sistema, si  $RRT < 1$  hay exclusión mutua o antagonismo, si  $RRT = 1$  hay plena competencia entre especies, y si  $RRT > 1$  hay complementariedad en el uso de los recursos del sistema.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Efecto de la herbivoría sobre la producción de biomasa, la altura y el número de ramas del cultivo soja

En relación al efecto de la herbivoría de *A. gemmatalis* sobre la generación de biomasa aérea del cultivo soja, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ). Tanto en las monoculturas de soja (SP+H) como en las mezclas con malezas (2A+H, 4A+H, 2C+H, 4C+H) la producción total de biomasa aérea del cultivo fue similar. En el año 1 el valor medio de biomasa fue de  $784,6 \text{ g} \pm 88,6$  con un rango de 650 a 950 g, mientras que en el año 2 el valor medio fue menor que el año anterior ( $518 \text{ g} \pm 76,4$ ) con rango de valores que varió entre 340 y 710 g (Figura 3. 4).

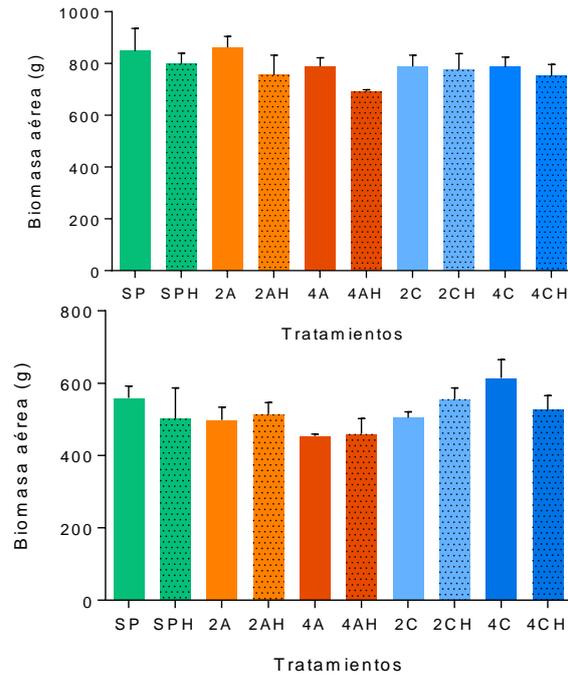


Figura 3. 4. Biomasa aérea (g) del cultivo de soja en los tratamientos soja pura (SP), 2 pl/m<sup>2</sup> de *A. annua* (2A), 4 pl/m<sup>2</sup> de *A. annua* (4A), 2 pl/m<sup>2</sup> de *C. album* (2C), 4 pl/m<sup>2</sup> de *C. album* (4C), con (barras punteadas) y sin (barras lisas) herbivoría de *A. gemmatalis*, para el año 1 (arriba) y año 2 (abajo). Las barras representan el error estándar de la media.

Por su parte, en relación al efecto de la defoliación sobre la altura y la generación de ramas por planta tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ). El tratamiento de herbivoría no generó alteraciones en el valor medio de altura ( $65,6 \text{ cm} \pm 4,6$ ) ni en el valor medio de número ramas ( $2,9 \text{ ramas. planta}^{-1} \pm 0,2$ ), tanto en las monoculturas de soja como en ambas mezclas con malezas (Figura 3. 5).

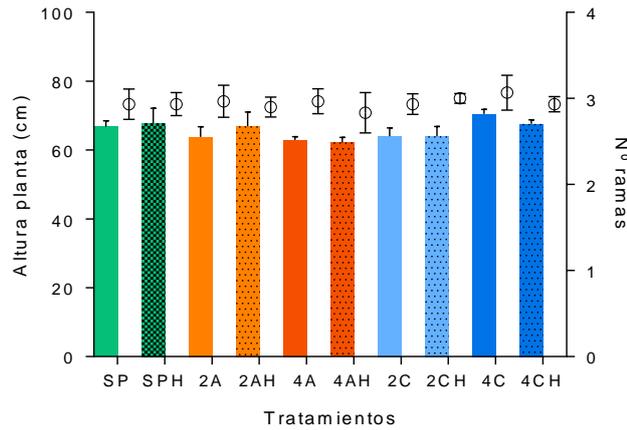


Figura 3. 5. Altura de la planta (barras) y numero de ramas (círculos) del cultivo de soja en los tratamientos soja pura (SP), 2 pl/m<sup>2</sup> de *A. annua* (2A), 4 pl/m<sup>2</sup> de *A. annua* (4A), 2 pl/m<sup>2</sup> de *C. album* (2C), 4 pl/m<sup>2</sup> de *C. album* (4C), con (barras punteadas) y sin (barras lisas) herbivoría de *A. gemmatilis*, para el año 2. Las barras representan el error estándar de la media.

### 3.3.2 Respuesta compensatoria del cultivo de soja

#### Biomasa aérea

El efecto de la herbivoría de *A. gemmatilis* sobre la producción de biomasa del cultivo soja estando puro y en mezclas con malezas, no mostró diferencias significativas al comparar cada tratamiento de herbivoría respecto a su control. En el año 1 y 2 el análisis de los resultados de RCT muestra valores cercanos al 0, entre -0,03 y 0,01 en el primer año, y entre -0,06 y 0,03 en el segundo (Figura 3. 6).

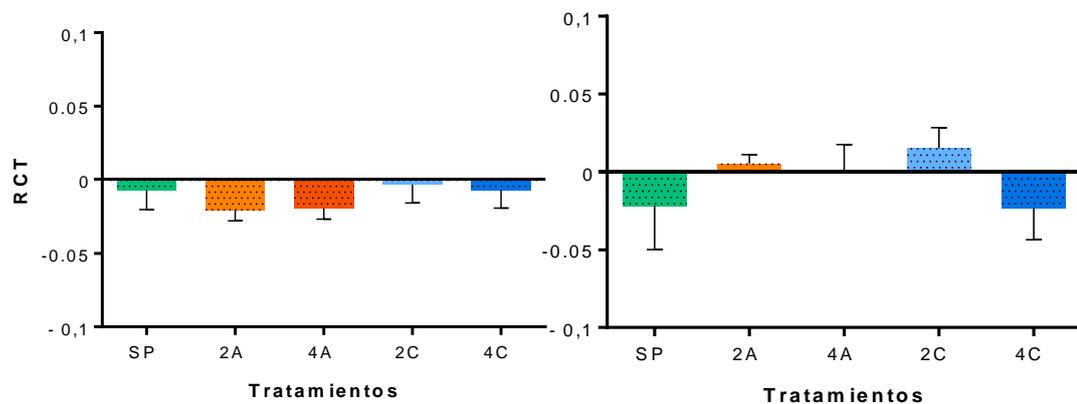


Figura 3. 6. Cambio relativo de la producción total (RCT) en plantas defoliadas con respecto a su control para el año 1 (izquierda) y el año 2 (derecha). Las barras representan el error estándar de la media.

En los dos años los valores de biomasa de los tratamientos con herbivoría tendieron a ser menores que aquellos sin herbivoría. El análisis de regresión lineal señala en ambos años que no hubo relación entre la producción total de biomasa aérea (g) con y sin herbivoría, ya que la pendiente de la recta de la regresión no fue significativamente distinta de 0 ( $p=0,44$  y  $0,47$  en los años 1 y 2 respectivamente). En el año 1, todos los puntos se ubicaron cerca o por debajo de la línea 1:1, mientras que en el año 2 los puntos se repartieron cercanos (2A y 4A), por encima (2C) y por debajo (SP y 4C) de la línea 1:1 (Figura 3. 7).

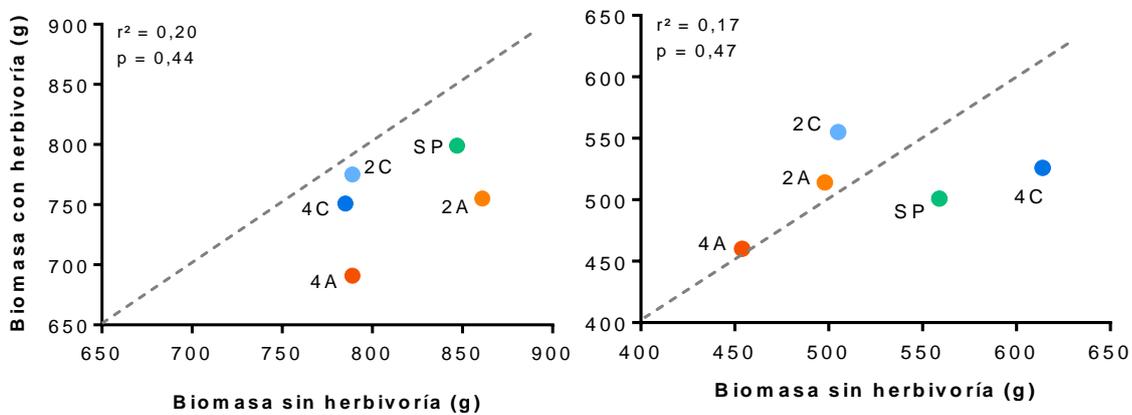


Figura 3. 7. Relación entre la producción total de biomasa aérea (g) con y sin herbivoría de *A. gemmatalis* durante los años 1 y 2. La línea segmentada representa la relación 1:1

En los dos años los valores de biomasa logrados en los tratamientos con herbivoría tienden a ser menores y la producción de biomasa fue mayor en el año 1 que en el 2. En el año 1, las monoculturas de soja (SP) presentaron un valor promedio de producción de biomasa de  $799 \text{ g} \pm 70,6$  con herbivoría; y de  $847 \text{ g} \pm 151,8$  sin herbivoría. Mientras que en el año 2, el valor promedio de biomasa de SP fue  $501 \text{ g} \pm 147,9$  con herbivoría; y  $559 \pm 57,2$  sin herbivoría. En el año 1, los tratamientos de soja en mezcla con *A. annua* (2A y 4A) con herbivoría presentaron valores promedio de biomasa de  $755 \text{ g} \pm 132$  y  $691 \text{ g} \pm 12,3$  respectivamente, y sin herbivoría  $861 \text{ g} \pm 74,2$  y  $789 \text{ g} \pm 57$  respectivamente; ubicándose por debajo de la línea 1:1. Mientras que los

mismos tratamientos en el año 2 con herbivoría presentaron valores promedio de biomasa de  $514 \text{ g} \pm 55,3$  y  $460 \text{ g} \pm 72,6$  respectivamente, y sin herbivoría,  $498 \text{ g} \pm 61,4$  y  $454 \text{ g} \pm 8,7$  respectivamente; ambos tratamientos se mantuvieron sobre la línea de 1:1 (Figura 3. 7).

Por su parte, en el año 1 las mezclas con *C. album* (2C y 4C) con herbivoría presentaron valores promedio de biomasa de  $775 \text{ g} \pm 108,7$  y  $751 \text{ g} \pm 78,2$  respectivamente, y sin herbivoría  $789 \text{ g} \pm 74,1$  y  $785,9 \text{ g} \pm 67,4$  respectivamente; ubicándose por debajo de la línea 1:1. Los mismos tratamientos en el año 2 con herbivoría produjeron  $555 \text{ g} \pm 53,9$  y  $526 \text{ g} \pm 68,7$  de biomasa respectivamente, y sin herbivoría  $505 \text{ g} \pm 27,9$  y  $614 \text{ g} \pm 88$  respectivamente. El tratamiento 2C se ubicó sobre la línea 1:1 y por su parte el 4C por debajo de la misma (Figura 3.7).

#### *Rendimiento y sus componentes*

No hubo relación entre el rendimiento ( $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ ) con y sin herbivoría, ya que la pendiente de la recta de la regresión no fue significativamente distinta de cero ( $p=0,88$ ). Los puntos se repartieron sobre (2A), por encima (2C y 4A) y por debajo (SP y 4C) de la línea 1:1 (Figura 3. 8).

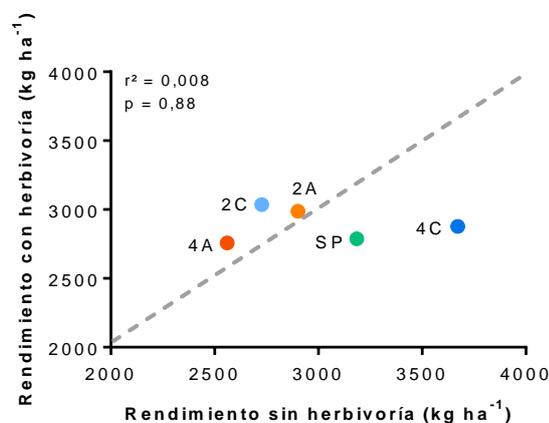


Figura 3. 8. Relación entre el rendimiento ( $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ ) de los tratamientos con y sin herbivoría durante el año 2. La línea segmentada representa la relación 1:1.

Con respecto a los componentes del rendimiento, no hubo diferencias significativas tanto para el peso como para el número de granos ( $p=0,88$  y  $p=0,70$ , respectivamente) en el análisis de regresión lineal. En ambos casos, los tratamientos de soja en mezcla con *A. annua* (2A y 4A) se mantuvieron sobre la línea 1:1, por su parte el tratamiento 2C se ubicó por encima de la línea 1:1 a diferencia de 4C y SP se ubicaron por debajo (Figura 3. 9).

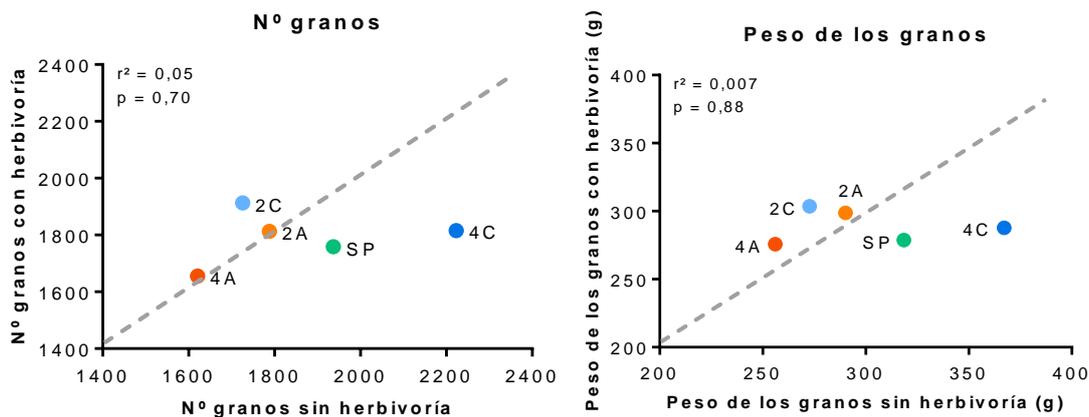


Figura 3. 9. Relación entre el peso (izquierda) y el número (derecha) de granos con y sin herbivoría durante el año 2. La línea segmentada representa la relación 1:1

### 3.3.2.3 Altura y número de ramas

No hubo relación entre la altura y el número de ramas por planta obtenidos con o sin herbivoría, ya que la tendencia no fue significativamente distinta de cero ( $p=0,17$  y  $p=0,76$ , respectivamente). En el caso de la altura por planta, el tratamiento 2A se ubicó ligeramente sobre la línea 1:1, el tratamiento 4C se ubicó nuevamente por debajo de la línea 1:1, y el resto de los tratamientos estuvieron sobre la línea 1:1. En cuanto al número de ramas por planta, el tratamiento 2C se ubicó ligeramente sobre la línea 1:1, el tratamiento SP se ubicó sobre la línea 1:1, mientras que resto de los tratamientos se ubicaron por debajo de la misma (Figura 3. 10).

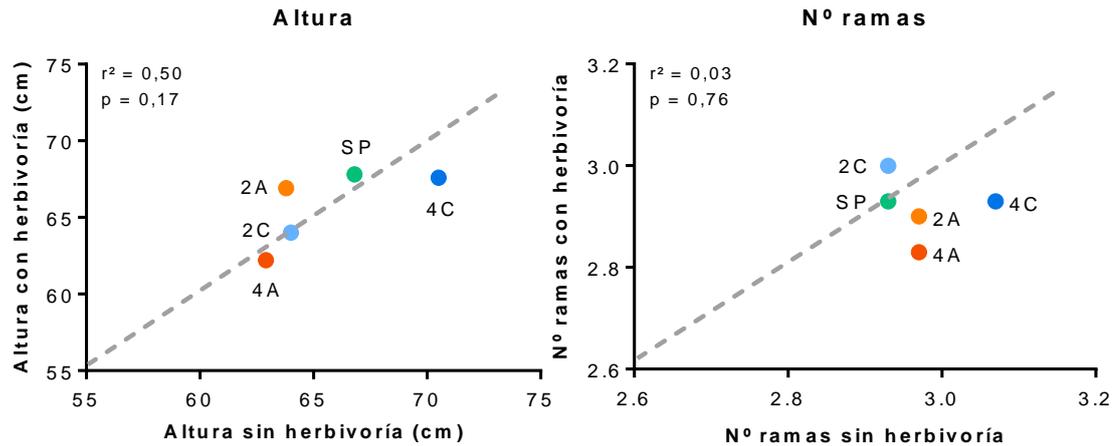


Figura 3. 10. Relación entre el número de ramas por planta (izquierda) y la altura por planta (derecha) con y sin herbivoría durante el año 2. La línea segmentada representa la relación 1:1

### 3.3.3 Medidas de competencia

#### 3.3.3.1 Diagrama bivariado

Los valores de RRT promedio para los tratamientos 2A y 4A fueron igual a 1,63 y 1,81, respectivamente. El diagrama bivariado contrasta los rendimientos relativos (RR) de cada especie, muestra situaciones con  $RRT > 1$  en la sección superior del diagrama indicando complementariedad en el uso de los recursos (Figura 3. 11). El cultivo mantuvo un elevado rango de RR (entre 0,75 y 1), sin embargo en la figura se observa una ligera disminución del RR del cultivo con el incremento de la densidad de la maleza. Por su parte al comparar entre tratamientos de densidad, las altas densidades de maleza en la mezcla mostraron mayor RR (entre 0,75 y 1), que los tratamientos con bajas densidades (entre 0,50 y 0,75). En cuanto al efecto del tratamiento de herbivoría sobre la interacción competitiva del cultivo y la maleza, el análisis bivariado no mostró ningún efecto de la herbivoría sobre el RR de las especies evaluadas, ya que todos los tratamientos mostraron un patrón de distribución similar dentro del diagrama.

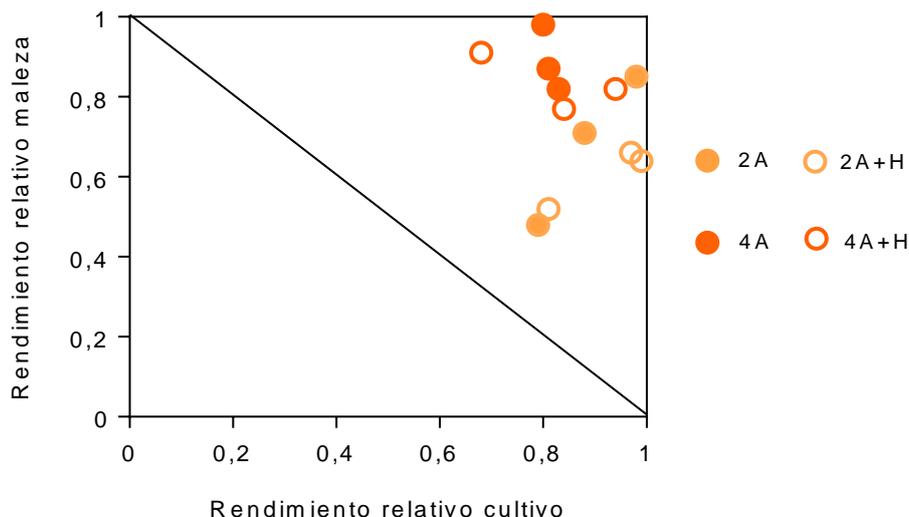


Figura 3. 11. Diagrama bivariado: relación entre el rendimiento relativo del cultivo y el rendimiento relativo de la maleza. Modificado de Snaydon y Satorre (1989).

### 3.4 DISCUSION

En este capítulo se evaluó el efecto de la herbivoría de *A. gemmatalis* sobre el crecimiento, la capacidad compensatoria y el rendimiento del cultivo de soja estando puro y en mezclas con las malezas *A. annua* y *C. album*. Además, se analizó la relación competitiva entre el cultivo y la maleza *A. annua* y su interacción con la herbivoría.

Los resultados mostraron que la herbivoría generada por la oruga defoliadora no afectó negativamente el rendimiento del cultivo de soja en monoculturas o en mezclas con *A. annua* o *C. album*. Estos resultados sugieren una respuesta compensatoria del cultivo de soja frente al daño generado por *A. gemmatalis*. Ya que, a pesar de la defoliación, la biomasa, la altura de las plantas y el número de ramas no presentaron diferencias entre tratamientos, manteniéndose esta respuesta aún cuando el cultivo estuvo creciendo en presencia de malezas.

En el experimento, el tratamiento de herbivoría se aplicó desde las etapas tempranas del período crítico del cultivo (R2-R4, Fehr y Caviness 1977) y generó una

defoliación del 15% en promedio que no afectó significativamente la biomasa aérea total (g) ni el rendimiento (kg. ha<sup>-1</sup>). Esto indicaría que el cultivo de soja puro o en mezclas es capaz de tolerar defoliaciones del 15% logradas con una infestación de 100 larvas m<sup>-2</sup> en R2-R4, sin que se afecte la biomasa y/o el rendimiento. Saito et al., (1983), mostraron que incluso defoliaciones del 25% del tejido foliar no causan disminuciones en el rendimiento del cultivo porque la capacidad compensatoria del cultivo de soja para tolerar o compensar es altamente efectiva.

Sumado a la eficiente capacidad del cultivo de soja para compensar, es también importante que tanto las condiciones ambientales como la estructura del cultivo se encuentren en óptimas condiciones al momento del daño. La disponibilidad hídrica, estuvo controlada durante todo el ensayo para satisfacer la demanda del cultivo solo o en mezclas, minimizando estreses que no fueran la herbivoría. En cuanto a la estructura del cultivo, específicamente el IAF fue siempre superior al IAF crítico (95% de interceptación). La tasa de crecimiento está estrechamente relacionada a la interceptación de radiación solar, que a su vez depende del índice de área foliar (IAF). Por ejemplo, si el cultivo presenta un IAF por encima del crítico puede tolerar con mayor facilidad defoliaciones severas; por el contrario, el éxito de la respuesta compensatoria se podría ver alterada (Batchelor *et al.*, 1993)

Por otra parte, no hubo relación entre las variables medidas con y sin herbivoría, indicando que la compensación no es lineal, sino que depende del tratamiento. En general se observó que los tratamientos con *A. annua* se ubicaron más cercanos a la relación 1:1, ya sea sobre la línea o incluso por encima de la misma (Figura 3. 7, Figura 3. 8, Figura 3. 9 y Figura 3. 10). Es decir, las plantas de soja en mezclas con esta maleza aromática presentaron un rendimiento similar estando con o sin herbivoría. Este comportamiento puede estar relacionado con las diferencias en el grado de defoliación

generado por *A. gemmatalis* en los distintos tratamientos. Se encontró que la defoliación sobre el cultivo de soja fue menor en mezclas con *A. annua* (ver Capítulo 2). Es decir, en presencia de *A. annua* las plantas de soja con herbivoría (2A+H y 4A+H), fueron similares al control (2A y 4A) en cuanto al nivel de daño generado por la oruga defoliadora. Esta similitud entre tratamientos puede explicar la escasa diferencia en el rendimiento (relación 1:1). En cuanto a las mezclas *C. album*, a pesar de que la defoliación generada sobre el cultivo estando en mezclas con *C. album* fue menor (ver Capítulo 2), el tratamiento 4C se ubicó consistentemente por debajo de la línea 1:1 cuando estuvo presente el tratamiento de herbivoría (Figura 3. 7, Figura 3. 8, Figura 3. 9 y Figura 3. 10).

Las mezclas con *C. album* en general presentaron mayores rendimientos (4000 kg ha<sup>-1</sup> en promedio), comparado con las mezclas con *A. annua* (3000 kg ha<sup>-1</sup> en promedio). Estas diferencias pueden estar asociadas al crecimiento logrado por cada maleza durante el experimento, a pesar de las similitudes de estas dos especies en su ciclo (anual primavera-estival), porte (erecto y ramificado), y considerable altura y profundización radical. *A. annua* presentó mayor tamaño y ramificación, mientras que las plantas de *C. album* tuvieron menor tamaño y ramificación. Una vez alcanzado el crecimiento máximo del cultivo, ambas especies de malezas superaron en altura al cultivo y se mantuvieron siempre por encima del dosel (Figura 3. 12).



Figura 3. 12. Vista general del experimento (fotografía superior), del tratamiento 4A (fotografía inferior izquierda) y del tratamiento 4C (fotografía inferior derecha)

En cuanto al análisis de crecimiento compensatorio, los valores obtenidos de RCT se ubicaron siempre entre 0,01 y -0,06. Según Ferraro y Oesterheld (2002) valores cercanos al 0 indican que hubo compensación en cuanto a la biomasa aérea total en todos los tratamientos (Figura 3. 4). Es decir, sin importar la maleza acompañante y su densidad dentro de la unidad experimental, el cultivo de soja sostuvo la capacidad de compensar la defoliación generada por *A. gemmatalis*. Estos resultados muestran que las plantas de soja compensan la pérdida de tejido por defoliación.

Con respecto al análisis bivariado de la interacción competitiva entre el cultivo y la maleza *A. annua*, todas las parcelas analizadas presentaron valores de RRT mayores a 1. Según (Snaydon y Satorre, 1989) valores de RRT por encima de 1 indican que la mezcla es más productiva que las monoculturas y sugiere la existencia de

complementariedad de recursos entre los componentes del sistema (Figura 3. 9). Es decir, el cultivo de soja y la maleza *A. annua* no compitieron por los mismos recursos del sistema, sino que hubo complementariedad en el uso de los recursos. Resultados similares se encontraron en mezclas de soja y *A. cristata* (Guglielmini, 2010). El análisis también mostró que el RR del cultivo no se modificó con el incremento de la maleza Morvillo et al. (2011) mostraron resultados similares, el rendimiento del cultivo soja permaneció estable incluso con densidades mayores de *A. annua* (8 pl.m<sup>2</sup>).

La falta de diferencias en la biomasa producida puede analizarse a través del modelo simple que describe la relación entre generación de biomasa y la captura y uso de recursos por parte del cultivo:

$$Biomasa = R \times \Theta_i \times EUR$$

En donde R es el *recurso* disponible (agua, radiación, nutrientes),  $\Theta_i$  es la *eficiencia de intercepción* del recurso y EUR es la *eficiencia en el uso del recurso* y representa la capacidad de la planta de producir biomasa por cada unidad de recurso interceptado. Analizando lo ocurrido entre tratamientos: no todos los **recursos** disponibles fueron limitantes ya que hubo complementariedad en el uso de los mismos (diagrama bivariado, Figura 3. 11). A lo largo del experimento el recurso hídrico fue suplementado periódicamente según las necesidades del sistema y los nutrientes no fueron compartidos entre cultivo y malezas debido al uso de macetas, por cuanto sólo hubo competencia por radiación. En cuanto a la eficiencia de **intercepción**, la falta de diferencias en la biomasa puede deberse a que las diferencias en  $\Theta_i$  fueron leves a pesar de la defoliación del 15 % y la competencia con las malezas. Esto puede estar relacionado con el hecho de que el IAF fue siempre superior al crítico asociado a la respuesta compensatoria del cultivo. Por su parte, los resultados también podrían deberse a un aumento en la **eficiencia** en el uso del recurso. Sin embargo, este

parámetro no se evaluó, y suele ser bastante estable en soja (Grifford et al., 1984) y no existen evidencias que muestren modificaciones en la eficiencia del uso de la radiación asociadas a la herbivoría en soja y escasas en otros cultivos (Sadras y Wilson, 1997).

### 3.5 CONCLUSIONES

A pesar de la complejidad de las múltiples interacciones y sus respuestas en el sistema cultivo-maleza-herbívoro en condiciones de campo y las dificultades para estudiarlas, los resultados desarrollados en este capítulo permiten extraer las siguientes conclusiones:

*i.* La herbivoría generada dentro de las etapas tempranas del periodo crítico del cultivo no reduce la biomasa aérea ni el rendimiento del cultivo estando en monoculturas o en mezclas con malezas productoras de metabolitos secundarios. El tratamiento de herbivoría tampoco modifica la altura ni el número de ramas del cultivo.

*ii.* Existe una notoria respuesta compensatoria del cultivo soja frente al tratamiento de herbivoría aplicado, en presencia de malezas acompañantes. Las plantas de soja sostienen la pérdida de tejido activo con poco o ningún impacto en su rendimiento.

*iii.* La interacción competitiva de la maleza *A. annua* con el cultivo soja presentan complementariedad en el uso de los recursos, es decir, existe un efecto neutro o positivo en las distintas mezclas con y sin tratamiento de herbivoría.

Por lo expuesto, la respuesta compensatoria del cultivo es independiente del tipo de maleza acompañante y de su densidad. Por lo tanto, se acepta parcialmente la hipótesis 2a que plantea que “*El crecimiento compensatorio en respuesta a la*

*herbivoría es estimulado en presencia de plantas que emiten señales volátiles. El crecimiento compensatorio del cultivo de soja en respuesta a la herbivoría de A. gemmatalis será mayor en mezcla con A. annua, con respecto a la monocultura de soja o a las mezclas con C. album". A su vez, se acepta la hipótesis 2b que plantea que "La relación competitiva del cultivo de soja - malezas acompañantes en respuesta a la herbivoría de A. gemmatalis es amortiguada en presencia de especies poco competitivas. La relación competitiva del cultivo de soja en mezcla con A. annua en respuesta a la herbivoría de A. gemmatalis será incompleta o de tipo complementaria".*

## CAPÍTULO 4

Defensas químicas del cultivo en respuesta a la herbivoría  
Supervivencia de *Anticarsia gemmatalis* frente a las defensas químicas del cultivo

---



## 4.1 INTRODUCCIÓN

Los mecanismos químicos de defensa son estrategias que han desarrollado las plantas para soportar los daños causados por agentes externos, sufriendo un menor impacto sobre sus funciones y adaptándose al entorno que habitan (Russin et al., 1989; Cipollini, 2004). La mayoría de estas estrategias están relacionadas con la activación de la biosíntesis de metabolitos secundarios. No hay evidencias que confirmen que estas sustancias participen directamente en el crecimiento o desarrollo de la planta, pero sí acerca de su rol frente a estímulos del entorno. Su composición cuali-cuantitativa está condicionada genéticamente, pero puede variar con el estado ontogénico y las condiciones bióticas y/o abióticas del ambiente (War et al., 2012a; Cheynier et al., 2013; Fürstenberg-Hägg et al., 2013; Jeandet et al., 2013). Estos compuestos químicos influyen sobre distintos componentes del sistema, pueden por ejemplo repeler insectos perjudiciales o atraer insectos benéficos como enemigos naturales. Además, no sólo pueden influir sobre los insectos sino también sobre las plantas vecinas, ya sean de la misma o distinta especie. Esta interacción recibe en muchos casos el nombre de alelopatía (Inderjit y Callaway, 2003; Glinwood et al., 2011).

En general, los metabolitos secundarios sintetizados “de novo” en las plantas frente a situaciones de estrés biótico reciben el nombre de **fitoalexinas** y se reserva el nombre de **anticipinas** cuando dichos metabolitos son preexistentes, es decir que su presencia es independiente del estrés, aunque también actúen como compuestos de defensa. Otros autores relacionan el término fitoalexinas sólo a los metabolitos sintetizados “de novo” frente a la presencia de microorganismos (Ahuja et al., 2012). Así, las defensas químicas de una planta frente a una situación de estrés biótico pueden estar constituidas por un conjunto de compuestos integrados por anticipinas y fitoalexinas.

Esta respuesta defensiva se inicia con el daño producido por el herbívoro y el contacto de las secreciones bucales del insecto sobre el tejido foliar. Esta combinación produce en la planta un desbalance en la generación y neutralización de radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS) que afectan las rutas metabólicas y el normal desarrollo de la misma. Como primera respuesta frente al estrés oxidativo la planta incrementa el nivel de sustancias que cambian el estado de oxidación de los ROS, a fin de neutralizar el efecto nocivo. Posteriormente, se promueve la biosíntesis de compuestos químicos de defensa para frenar el ataque. Este tipo de estrategias evolutivas le permiten a las plantas tolerar o evitar la herbivoría (Cipollini, 2004). Entre los principales compuestos antioxidantes de ROS figuran los **derivados fenólicos**.

#### *Proceso evolutivo*

Los insectos y las plantas han coexistido durante años. Durante ese tiempo, ambos han desarrollado estrategias para explotar o responder con éxito a las reacciones de adaptación y defensa recíprocas. Los insectos dependen de las plantas para sobrevivir y perpetuarse y, a su vez, muchas plantas dependen de los insectos para reproducirse (*i.e.* polinizadores). Esta evolución ha dado lugar al desarrollo de un sistema de defensa combinado donde las plantas tienden a minimizar el daño causado por la herbivoría, y las plagas seleccionan esa respuesta de la planta para fabricar defensas propias. Por una parte, las plantas han adquirido la capacidad de reconocer las moléculas o señales dentro de las células dañadas, y activar la respuesta contra los herbívoros. Por otra parte, los herbívoros responden al contraataque y activan estrategias para vencer y superar las barreras defensivas de las plantas (War et al., 2012a; Fürstenberg-Hägg et al., 2013).

En su hábitat natural, las plantas sufren frecuentemente daños ocasionados por insectos, por lo cual han desarrollado estrategias de defensa directas e indirectas. En la primera,

la planta afecta **directamente** al insecto sintetizando compuestos anti-nutritivos o anti-digestivos que reducen la alimentación (Dicke, 1994). En la segunda estrategia, la planta se defiende **indirectamente** a través de la liberación de compuestos químicos volátiles que atraen enemigos naturales (Moraes et al., 2005; Heil y Kost, 2006; Turlings y Ton, 2006). Estas estrategias pueden actuar de forma independiente o conjunta (War et al., 2012b). Además, la activación del mecanismo de defensa puede ocurrir en el tejido dañado a través de una señal local, o en tejido no dañado por medio de una señal sistémica.

Este capítulo hace énfasis en la evaluación de los cambios generados sobre las defensas directas del cultivo de soja en respuesta a la herbivoría estando en mezclas con malezas. Los cambios sobre las defensas indirectas se evalúan en el capítulo 5.

### *Defensas directas*

En este tipo de estrategia, la planta afecta directamente al insecto a través de distintos mecanismos de defensa que pueden ser constitutivos, cuando se encuentran activos en la planta todo el tiempo, o inducidos cuando su concentración aumenta solo luego de un ataque. Las **defensas constitutivas** incluyen estructuras morfológicamente especializadas como tricomas y espinas, y compuestos químicos repelentes, antinutritivos y/o toxinas que reducen el ataque de muchos herbívoros. Las **defensas inducidas** abarcan un amplio rango de metabolitos secundarios y proteínas que tienen efecto tóxico, repelente y/o antinutricional sobre el herbívoro. Para el caso del cultivo soja se han reportado dos mecanismos de defensa inducida: la tolerancia a la herbivoría mediante el crecimiento compensatorio (Haile et al., 1998; Singer, 2001) y la defensa química a través de la acumulación compuestos químicos de defensa (Hammerschmidt, 1999).

Con respecto a la supervivencia del insecto, las defensas químicas de las plantas, ya sean constitutivas o inducidas juegan un rol determinante. Existe abundante evidencia del efecto tóxico de los compuestos químicos de defensa (*i.e.* inhibidores de proteína, flavonoides, terpenos, alcaloides, antocianinas, fenoles, quinonas) sobre un amplio rango de insectos fitófagos (Hoffmann-Campo et al., 2001; Piubelli et al., 2005; O'Neill et al., 2010). Estos compuestos están presentes en el tejido foliar de las plantas y afectan no sólo el comportamiento del insecto, sino el correcto funcionamiento de su organismo y su capacidad de supervivencia (Underwood et al., 2002; Piubelli et al., 2003, 2009; Moraes et al., 2005, 2009; Michereff et al., 2011).

Junto con la herbivoría se genera un intercambio de sustancias planta-herbívoro. Dependiendo del herbívoro que realiza el daño, las secreciones bucales varían en cuanto a características químicas como el pH y el tipo de enzimas y proteínas presentes (Terra et al., 1994). Esta información es específica de cada atacante y le permite a la planta identificar al herbívoro, y generar una respuesta defensiva específica. Un ejemplo es el pH, por lo general algunos insectos, como los coleópteros presentan dentro del tracto digestivo un medio con pH ácido (5 – 7,5), sin embargo, en el caso de las larvas de lepidóptero el pH tiende a ser básico (9 - 11,5). Otro ejemplo destaca que las proteínas presentes en la secreción bucal también difieren según el atacante. Por lo general, las tripsinas y las chrimotripsinas son proteasas digestivas características de los lepidópteros, y las cisteín-proteasas de los coleópteros y hemipteros (Terra et al., 1994).

Con esta información las plantas podrían reconocer con mayor detalle al atacante, y diseñar estrategias de defensa específicas. Una de ellas, es la síntesis de sustancias que actúan inhibiendo la actividad de las proteínas presentes en la secreción bucal. Por ejemplo, los inhibidores de proteasas digestivas (IP), que al ser ingeridos por el insecto inhiben la actividad de las enzimas encargadas de hidrolizar las proteínas,

disminuyendo la asimilación de aminoácidos por parte del insecto (War et al., 2012a; Fürstenberg-Hägg et al., 2013). En el caso específico del cultivo de soja, se conocen numerosos IP vinculados con proteínas de insectos. Por ejemplo, los inhibidores de tripsinas (TPI, en inglés) han sido ampliamente estudiados en su rol de defensa ante ataques de lepidópteros al inhibir la síntesis de aminoácidos en el intestino de las larvas, lo cual limita su tasa de crecimiento, pero su efectividad dependerá de la capacidad del insecto de aumentar la síntesis de proteasas o de generar proteasas insensibles a los inhibidores (Jongsma et al., 1995; Zavala y Baldwin, 2004; Dillon et al., 2017).

Asimismo, los inhibidores de cisteín-proteasas (CysPI, en inglés) representan una herramienta de defensa del cultivo soja frente a ataques de coleópteros y hemípteros, específicamente al inhibir la actividad de la sulfhidrilo proteinasa (Botella et al., 1996; Zhao et al., 1996). Los IP del sistema *Manduca sexta-Nicotiana attenuata* son unos de los más estudiados en la interacción planta-insecto. (Zavala y Baldwin, 2004), mostraron que plantas de *N. attenuata* transformadas para limitar la producción de inhibidores de proteasas afectaron la tasa de crecimiento, la fecundidad y la supervivencia (40%) de larvas de *M. sexta*. A su vez, el menor crecimiento las mantiene en un tamaño apetecible para predadores naturales como *Geocoris pallens*.

Otras de las defensas inducibles en las plantas como respuesta al ataque de herbívoros son los compuestos fenólicos (Leitner et al., 2005), que al oxidarse en el intestino del insecto forman *o*-quinonas, que disminuyen la digestibilidad de las proteínas al unirse covalentemente a los grupos nucleófilos de éstas (Duffey y Stout, 1996). Otro ejemplo son los flavonoides, como la genistina, la quercetina y la rutina, presentes en diferentes genotipos de soja y con un marcado efecto negativo sobre la biología y fisiología de distintos herbívoros, confiriéndole cierta resistencia al cultivo (Hoffmann-Campo et al., 2001; O'Neill et al., 2010). Piubelli et al. (2005), encontraron

aumentos de hasta el 30% en la tasa de mortalidad de la oruga defoliadora *Anticarsia gemmatalis* alimentada con genotipos resistentes de soja, es decir, genotipos con mayor concentración de rutina y genistina.

Específicamente la rutina es considerada un compuesto modelo en los estudios de las defensas anti-herbívoro del cultivo soja, ya que es uno de los compuestos de defensa más estudiados y con mayor evidencia que respalda su efecto tóxico sobre insectos (Hoffmann-Campo et al., 2006). De hecho, la resistencia de la soja a algunas plagas de lepidópteros ha sido asociada a la presencia de rutina (diglicósido de quercetina) y de genistina (un isoflavonoide glucosilado) en los tejidos vegetales, lo cual generaría una menor ganancia de peso y una mayor mortalidad de larvas de *A. gemmatalis* y *Trichoplusia ni* (Hoffmann-Campo et al., 2001; Piubelli et al., 2005).

Hay una serie de compuestos químicos sintetizados en respuesta al daño que no afectan directamente al atacante, sino que son liberados al medio como mecanismo de defensa indirecta. Moraes et al. (2005) encontraron que el cultivo soja libera un conjunto de compuestos químicos cuando es consumido por *Euschistus heros* que atraen al parasitoide específico del insecto (*Telenomus podisi*). A su vez, el parasitoide no es atraído cuando el cultivo es consumido por otro herbívoro. Cuatro de los compuestos volátiles inducidos a partir del daño de *E. heros* no estaban presentes en el cromatograma por otro herbívoro como *A. gemmatalis*. Esto sugiere una fuerte relación entre las plantas atacadas por insectos fitófagos y la emisión de señales químicas atrayentes de enemigos naturales específicos.

### *Señalización entre plantas*

Las plantas de diversas afinidades taxonómicas y condiciones ecológicas se vuelven más resistentes a los herbívoros cuando se exponen a sustancias volátiles de

vecinos dañados (Karban et al., 2014). Los metabolitos secundarios que liberan algunas plantas modulan de manera individual o en conjunto el entorno donde se desenvuelven, interfiriendo con todos los componentes del sistema (microorganismos de suelo, insectos, plantas), incluso pueden desempeñar diversos roles en las defensas inducidas de las plantas vecinas (Bezemer et al., 2003; Heil y Kost, 2006; Mumm et al., 2008; Arimura et al., 2010). Es decir, plantas expuestas a compuestos orgánicos volátiles (VOC, en inglés) provenientes de plantas vecinas pueden activar la producción de compuestos de defensa aun sin haber sufrido ningún ataque. En este sentido, los VOC's de otras plantas ejercen un efecto "priming" o pre inductor del sistema defensivo de las plantas receptoras, demostrando que las señales químicas volátiles actúan no sólo como atrayente de enemigos naturales o repelente de insectos plaga, sino también como fuente de información, que permite a otras plantas ajustar sus propias estrategias de defensa (Turlings et al., 1990; Kessler et al., 2006; Karban et al., 2014; Kalske et al., 2019).

Engelberth et al. (2004) mostraron que plántulas de maíz expuestas a VOC's liberados por plantas vecinas produjeron mayor cantidad de ácido jasmónico (JA) y sesquiterpenos que aquellas que no fueron expuestas. Asimismo, Heil y Kost (2006) encontraron que plantas de haba (*Phaseolus lunatus*) expuestas a VOC's y dañadas mecánicamente presentaron una producción de néctar extra floral (EFN) significativamente mayor (182%) que aquellas que no fueron expuestas, así como las que tuvieron exposición y daño por separado. Los datos disponibles sugieren que la presencia de compuestos químicos, condiciona la respuesta frente a ataques causados por agentes externos (Karban et al., 2014).

*Costos*

El paradigma del costo-beneficio es central en el funcionamiento biológico, ecológico y evolutivo de las plantas. Esta relación entre el costo y el beneficio asociado a un rasgo particular, determina su valor dentro del equilibrio de una población. Por ejemplo, si un rasgo ofrece más beneficios que costos, la selección se conducirá a favor de conservar estas características beneficiosas y a su vez, de reducir la variabilidad. Pero si por el contrario, resulta más costoso, con el tiempo se favorecerá la pérdida de ese rasgo.

La herbivoría representa un costo para las plantas en términos de pérdida de tejido pero defenderse, ya sea de forma constitutiva o inducida, también resulta costoso para muchas plantas, en términos de la partición de energía. La herbivoría reduce directamente la biomasa producida por las plantas y, en consecuencia, puede reducir la producción de semillas y el rendimiento. Por su parte, el costo de las defensas recae en la necesidad de desviar de recursos que podrían utilizarse para el crecimiento y la reproducción, hacia la producción de compuestos de defensa o a la formación de estructuras que limiten el acceso del herbívoro.

Las defensas pueden tener costos fisiológicos, ecológicos y evolutivos. Los costos fisiológicos, tienen que ver con la asignación de recursos y la autotoxicidad, es decir, si los recursos se destinan a las defensas y no están disponibles para procesos clave como el crecimiento y la reproducción. A su vez, estos compuestos pueden ser también tóxicos para la planta, y su expresión constitutiva puede imponer una carga metabólica importante. Los costos ecológicos y evolutivos están relacionados con el efecto negativo de los compuestos de defensa sobre las interacciones que las plantas tienen con su entorno. Los herbívoros pueden adaptarse a los distintos sistemas defensivos de las plantas, ya sea a través de la metabolización de los compuestos de

defensa o mediante el secuestro de los compuestos tóxicos y su posterior utilización contra enemigos naturales para su propia defensa (Engelberth et al., 2004; Steppuhum y Baldwin, 2008; Agrawal, 2011). Este tipo de adaptaciones puede implicar ciertos costos ya que la ingesta de altas dosis de aleloquímicos tóxicos para el herbívoro, afectan tanto su comportamiento como su supervivencia (Slansky y Wheeler, 1992).

Muchas teorías sobre la ecología y la evolución de las defensas de las plantas se basan en la relación costo-beneficio, la evidencia de costos continúa siendo escasa, principalmente, debido a que los costos de un rasgo de defensa específico están genética, metabólica y funcionalmente ligados (Steppuhum y Baldwin, 2008). Zavala y Baldwin (2004) mostraron que las plantas de *N. attenuata* afectaron la supervivencia de *M. sexta* a través de la inducción de las TPI, es decir, para esta especie, el beneficio que representa la síntesis de TPI superaría al costo no de producirlas y ser defoliada.

En síntesis, se sabe que entre las principales respuestas que presenta el cultivo de soja para tolerar el ataque de insectos herbívoros se encuentra en la producción y acumulación de metabolitos secundarios de defensa supervivencia (Hammerschmidt, 1999; Zavala et al., 2001; Underwood et al., 2002; Piubelli et al., 2003, 2009; Moraes et al., 2005, 2009; Michereff et al., 2011; Ballaré et al., 2012). A su vez, existen evidencias en diversas especies que muestran que la producción de compuestos de defensa puede verse incrementada por la presencia o exposición de señales químicas (VOC's) emitidas por plantas acompañantes (Engelberth et al., 2004; Heil y Kost, 2006). Sin embargo, no existen evidencias acerca del impacto de la herbivoría de *A. gemmatilis* y de las señales provenientes de malezas productoras de distintos metabolitos secundarios sobre la producción de defensas químicas del cultivo de soja y la supervivencia del herbívoro. Por cuanto, se plantean los siguientes objetivos e hipótesis:

#### 4.1.1 Objetivos e hipótesis

Los objetivos del presente capítulo son:

- i. Determinar el efecto de la herbivoría de *A. gemmatalis* sobre la producción de compuestos de defensa del cultivo de soja acompañado de malezas productoras de distintos metabolitos secundarios.
- ii. Evaluar la supervivencia de *A. gemmatalis* en el cultivo de soja puro o en mezclas soja - *A. annua* y soja - *C. album*.

Las hipótesis plantean que:

- i. *Hipótesis 3a*: La producción de compuestos de defensa en respuesta a la herbivoría es estimulada en presencia de plantas productoras de terpenos que emiten señales volátiles. La producción de compuestos de defensa en soja como respuesta a la herbivoría de *A. gemmatalis* será mayor en mezclas con *A. annua*, con respecto a la monocultura de soja o a las mezclas con *C. album*.
- ii. *Hipótesis 3b*: La supervivencia de *A. gemmatalis* está condicionada por la acción de las defensas producidas por el cultivo, que a su vez son estimuladas por las señales volátiles emitidas por plantas productoras de terpenos. La supervivencia de *A. gemmatalis* será menor cuando el cultivo esté en mezclas con *A. annua*, con respecto a la monocultura de soja o a las mezclas con *C. album*.

## 4.2 MATERIALES Y METODOS

A continuación, se detalla la metodología que se llevó a cabo para poner a prueba los objetivos e hipótesis correspondientes al presente capítulo. La descripción general del experimento, el diseño experimental y los respectivos tratamientos fueron detallados en la metodología general, dentro del Capítulo 1.

El estudio de la producción de compuestos de defensa en el cultivo de soja frente a la herbivoría de *A. gemmatilis* en mezclas con las malezas *C. album* y *A. annua*, se realizó mediante un ensayo de inducción de defensas durante la fase reproductiva del cultivo (R1-R5, Fehr y Caviness 1977). Para ello se seleccionaron dos plantas al azar dentro de cada parcela con herbivoría, a las cuales se les añadieron nueve orugas por hoja trifoliada. Las orugas que estaban aproximadamente en 3<sup>er</sup> estadio (una semana desde que nacieron), se colocaron sobre las hojas y dentro de una bolsa de tul para asegurar su permanencia en los folíolos seleccionados y el intercambio de aire. Adicionalmente, se seleccionaron dos plantas al azar a las que se les colocó solo la bolsa de tul, para conocer el efecto de la bolsa sobre la producción de los compuestos de defensa en el cultivo. Luego de 24 horas de colocadas las orugas, se cosecharon las hojas trifoliadas. Por una parte se evaluó supervivencia contabilizando las orugas vivas y por otra parte se evaluaron los compuestos de defensa sobre el material vegetal secado en estufa a 40 °C con circulación forzada de aire (Chludil et al., 2009).

#### *Preparación de muestras*

Luego de generado el daño sobre las hojas de soja, el material vegetal cosechado y secado fue triturado hasta lograr un tamaño uniforme de partícula. Seguidamente se pesó 0,1 gramos y se realizaron tres extracciones sucesivas con metanol. Los extractos metanólicos se juntaron y evaporaron a presión reducida hasta sequedad. El extracto seco se disolvió en metanol (1,5 mL). Luego, para asegurar la ausencia de compuestos no polares en el extracto se agregó agua (0,9 mL) y se particionó con cloroformo (0,9 mL), separándose en dos fases: una hidroalcohólica (2,4 mL) y otra clorofórmica (0,9 mL). Todas las determinaciones se realizaron en la fase hidroalcohólica (Figura 4. 1)

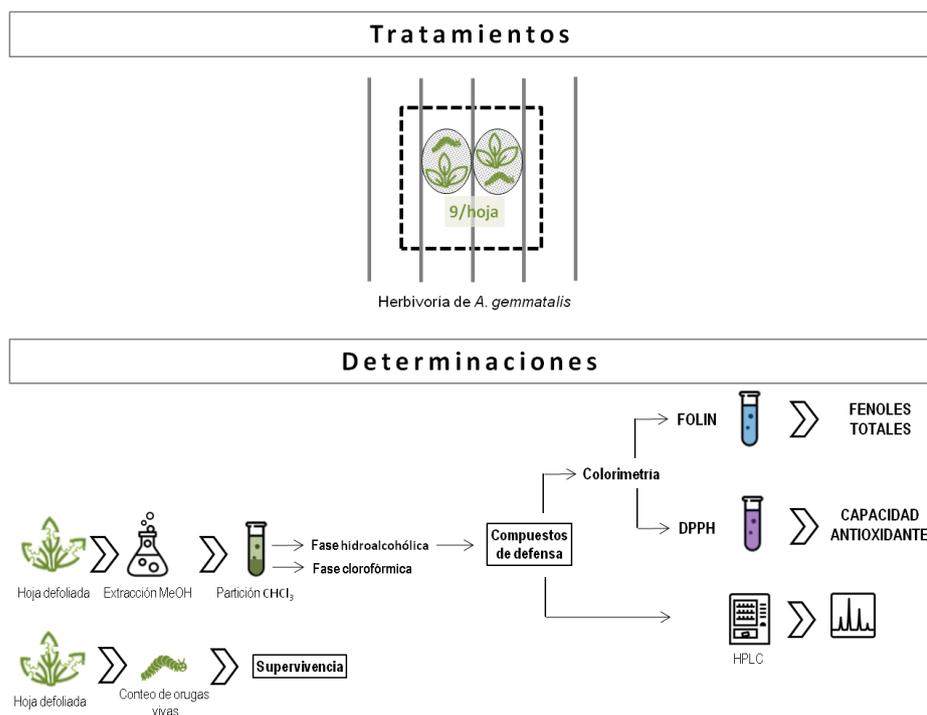


Figura 4. 1. Representación esquemática de los tratamientos y las mediciones implementadas para cumplir con el objetivo del presente capítulo.

## Determinaciones

### Contenido de fenoles totales (CFT)

Los compuestos fenólicos son un grupo de metabolitos secundarios muy común en las plantas e incluyen a los fenoles simples, polifenoles, flavonoides, taninos, entre otros. Los flavonoides son el mayor grupo de fenoles vegetales y los más estudiados. Dado que su concentración en la planta varía frente al estrés oxidativo estos metabolitos se encuentran asociados a procesos de estrés biótico y abiótico. Para su determinación el ensayo de Folin-Ciocalteu con una modificación efectuada por Singleton y Rossi (1965), que consiste en la mezcla de dos compuestos químicos [fosfomolibdato y fosfotungstato ( $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  y  $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 14\text{WO}_3 \cdot 4\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ )], conocida como reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR) o reactivo de Folin-Denis. La oxidación de los fenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 725 nm.

Para la determinación del CFT se partió de 100  $\mu\text{L}$  del extracto hidroalcohólico de cada muestra, al que se le adiciona 4,4 mL de agua y 50  $\mu\text{L}$  del Reactivo de Folin-C 2N. La muestra se homogenizó en un vórtex (10 segundos) y se conservó a temperatura ambiente. A los 3-5 minutos se le agregó 500  $\mu\text{L}$  de una solución de carbonato de sodio (1M) para cortar la reacción. Luego de treinta minutos, a temperatura ambiente y al abrigo de la luz, se procedió a leer en espectrofotómetro (Hewlett-Packard Modelo 8453) a  $\lambda$  725 nm. Los valores de absorbancia de cada medición se extrapolaron en una curva de calibración construida con diluciones de ácido clorogénico donde 1  $\mu\text{mol}$  de ácido clorogénico corresponde a un valor de absorbancia de 2,00101.

#### *Capacidad antioxidante (CA)*

Los radicales libres son en gran parte sustancias reactivas de oxígeno (ROS) generados habitualmente en los procesos metabólicos. Estas sustancias químicas son naturalmente controladas y en los procesos normales existe un equilibrio dinámico de su generación y neutralización. Frente a la herbivoría el contenido de ROS se incrementa y la planta responde a través de biosíntesis de derivados fenólicos que actúan como agentes quelantes o sequestradores de radicales libres (Race Evans *et al.*, 1997).

La capacidad antioxidante se midió a través del método DPPH, ya que es ampliamente aceptado y su determinación resulta rápida y simple. La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón intensifica el color violeta intenso típico del radical, que posee un máximo de absorción en metanol a  $\lambda$  517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante puede aceptar un átomo de hidrógeno y el color violeta se

desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de la capacidad antioxidante de un compuesto.

Para la determinación de la capacidad antioxidante, se diluyeron 100  $\mu\text{L}$  de extracto hidroalcohólico de la muestra en 900  $\mu\text{L}$  de metanol, se adicionaron 2000  $\mu\text{L}$  de solución de  $1,5 \cdot 10^{-4}$  M DPPH. Luego, se homogenizó la mezcla y se dejó reaccionar por espacio de 30 minutos a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Por otra parte, se estableció como blanco de máxima absorbancia una solución  $10^{-4}$  M DPPH y metanol como blanco de absorbancia cero. El porcentaje de inhibición de las muestras se determinó a partir de la siguiente fórmula:

$$(A_{\text{DPPH}} - (A_{\text{DPPH}} - A_{\text{M}})/A_{\text{DPPH}}) 100.$$

Las absorbancias observadas se extrapolaron en una curva de calibración preparada con diluciones de ácido ascórbico (767.99 I% /  $\mu\text{mol}$  de ácido ascórbico). Los resultados se expresaron como  $\mu\text{moles}$  equivalentes de ácido ascórbico por gramo de material vegetal seco.

#### *Análisis y caracterización de compuestos químicos en soja (CLAR)*

Tanto flavonoides como los demás derivados fenólicos son principalmente compuestos polares por lo que su fraccionamiento y análisis se realiza mediante técnicas de cromatografía líquida. Los extractos hidroalcohólicos de cada muestra, libre de pigmentos y compuestos menos polares, se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para lo cual se utilizó un cromatógrafo Agilent Serie 1100 con detector UV de longitud de onda múltiple. La separación se realizó en una columna analítica Eclipse XDB-C18 (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 150 mm). Luego se procedió a resolver la muestra con distintas fases móviles (distintos gradientes de solventes), hasta conseguir

un sistema de corrida que permita la separación y análisis de los compuestos de interés. Los solventes utilizados fueron acetonitrilo (ACN) y agua MilliQ, ambos acidulados con ácido acético glacial 0,1%, los cuales se filtraron al vacío utilizando membranas filtrantes de Nylon (47 mm x 0,45  $\mu\text{m}$ ) (Agilent Technologies, Inc.). El volumen de muestra sembrado en todos los casos fue de 5  $\mu\text{L}$ .

El sistema de fase móvil (ACN- $\text{H}_2\text{O}$ ) que mostró mejores resultados fue: inicio de 10% ACN con incrementos graduales que alcancen 25% a los 30 minutos; luego 70% ACN a los 55 minutos, y finalmente a los 60 minutos 90% ACN. Se realizaron lecturas del detector UV-Visible a longitudes de onda de 254, 270, 330 y 360 nm con el fin de evaluar los distintos compuestos presentes en la muestra.

Debido a que en la muestra se analizan compuestos estructuralmente familiarizados que poseen absorptividades semejantes, se cuantificaron a partir de una curva de calibración realizada con el patrón comercial rutina. Para ello se prepararon diluciones de distinta concentración (0,002 a 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de rutina en metanol grado CLAR. Se sembraron 5  $\mu\text{L}$  de cada una y con el área bajo la curva correspondiente a las absorbancias leídas se confeccionó la ecuación de la recta (Figura 4. 2). Luego, extrapolando en la curva de calibración el área correspondiente a cada compuesto se cuantificó y expresó como “ $\mu\text{g}$  equivalente de rutina” referido a 1 gramo de material vegetal seco.

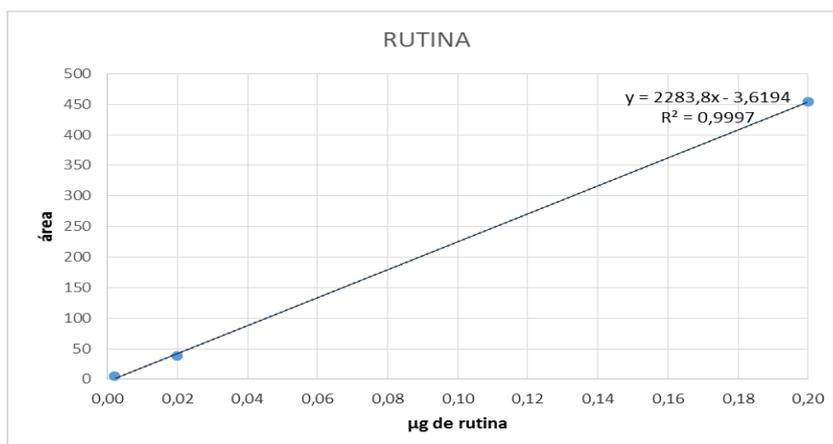


Figura 4. 2. Relación entre el área de cromatogramas y concentración de rutina ( $\mu\text{g}$ ).

La identificación de los compuestos se realizó comparando los tiempos de retención en el cromatograma de CLAR con los tiempos de retención de patrones comerciales (rutina, quercetina, genisteína, ginistina, daidzina), complementados con análisis de datos espectroscópicos y comparación con datos bibliográficos. El cromatograma se obtuvo mediante el análisis de datos de UV-Visible, uso de patrones comerciales y datos bibliográficos. La identificación se confirmó además con sistemas cromatográficos previamente utilizados por otros integrantes del grupo de investigación y mediante datos de espectrometría de masas (Dillon, 2017).

#### *Análisis de los datos*

Para analizar la relación entre los compuestos químicos presentes en cada muestra y los tratamientos, los valores del área bajo la curva correspondientes a las absorbancias de cada compuesto detectado por CLAR, fueron analizados con análisis multivariado (Jongman et al., 1995), con el análisis de componentes principales utilizando PC-ORD Multivariate Analysis of Ecological Data Version 5.0. (McCune y Mefford, 1995). Este tipo de análisis permite identificar la combinación de variables respuesta que mejor representan las diferencias entre tratamientos (ter Braak, 1987a; b).

La correlación entre las variables y los ejes se estimó a través del índice de Pearson y Kendall (McCune y Mefford, 1995).

Para evaluar los efectos principales y sus interacciones, los datos de CFT y CA se analizaron a través de análisis de varianza (ANVA), usando el paquete estadístico software Infostat (versión 2017) (Di Rienzo et al., 2017). Cuando las diferencias entre tratamientos fueron significativas, las medias se compararon utilizando prueba de Tukey's ( $p < 0,05$ ). Previamente se comprobaron los supuestos de homogeneidad de varianza y distribución normal para los datos de todos los tratamientos.

### 4.3 RESULTADOS

#### *Perfil cromatográfico*

Al analizar los perfiles cromatográficos, obtenidos por CLAR, de las muestras de tejido foliar de soja luego de haber sido defoliado por *A. gemmatilis*, se observa para ambos años un perfil cromatográfico complejo donde pueden distinguirse entre catorce y quince picos correspondientes a los metabolitos secundarios presentes (Figura 4. 3).

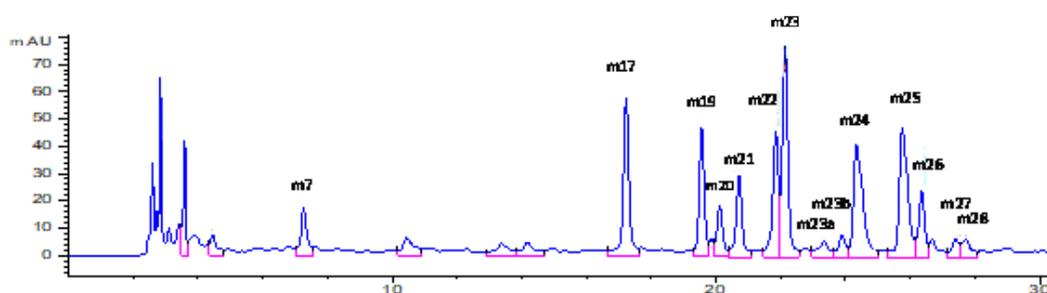


Figura 4. 3. Perfil cromatográfico de compuestos químicos presentes en el extracto metanólico de una muestra de hojas de soja que fue consumida por *A. gemmatilis*. Las letras señalizan el minuto en el que eluyen los distintos compuestos analizados.

La identificación de los compuestos, comparando los tiempos de retención en el perfil cromatográfico con los de patrones comerciales (rutina, quercetina, genisteína,

ginistina, daidzina), complementados con análisis de datos espectroscópicos y comparación con datos bibliográficos, muestran que las sustancias más polares eluyen con los menores tiempos de retención, especialmente los ácidos fenólicos libres y derivados glicosilados de flavonoides e isoflavonoides. A partir de tiempos de retención de 20 minutos se observan picos que corresponderían a las agliconas libres (quercetina, kaempferol, genisteína, etc). Para facilitar la comparación de los perfiles cromatográficos se adopta como criterio el análisis de aquellos compuestos más frecuentes.

Las condiciones cromatográficas y el cultivar utilizado fueron similares a las informadas por (Dillon, 2017), quien analizó los derivados fenólicos presentes en extractos polares del cultivo de soja.

Los compuestos presentes en la muestra de soja eluyeron a diferentes tiempos de retención. Por realizarse la separación en una columna C-18 los compuestos eluyen de mayor a menor polaridad. El primer compuesto, con tiempo de retención ( $T_r$ ) aproximado de 7 minutos fue el derivado fenólico 1 (m7) con máximos de absorción a  $\lambda$  270 nm, posiblemente un derivado de ácido fenólico. A 17 minutos de  $T_r$  eluye un derivado de quercetina (m17), cuyos máximos de absorción se observaron a  $\lambda$  254 y 360 nm, y a un  $T_r$  de 19 minutos eluye un derivado de kaempferol (m19) ( $\lambda$  270 y 360 nm). Los compuestos que eluyen con  $T_r$  de 20 y 21 minutos podrían corresponder a derivados de quercetina o isorhamnetina (m20 y m21) teniendo en cuenta los datos de espectroscopía UV-Vis ( $\lambda$  254 y 360 nm) y lo informado en la bibliografía (Dillon, 2017). Debido al momento de elución estos compuestos (m17, m19, m20 y m21) podrían corresponder con triósidos de flavonoles. A los 22 minutos eluye rutina, un diósido de quercetina (m22), el cual fue confirmado mediante co-inyección de un patrón

comercial. A un Tr muy próximo su isómero (m23), ambos con máximos de absorción a  $\lambda$  254 y 360 nm. A los 23 minutos de Tr se observaron compuestos a bajas concentraciones cuyos máximos de absorción se encuentran a  $\lambda$  254 y 360 nm, los cuales podrían corresponder a derivados monoglicosilados de quercetina o isorhamnetina. El pico a Tr 24 minutos corresponde a la genistina (m24) ( $\lambda$  254 y 330 nm), corroborado mediante co-inyección del respectivo patrón comercial, y los compuestos de Tr m25, m26, m27 y m28 corresponden a derivados glicosilados de kaempferol, posiblemente monoglicósidos, según lo informado en la literatura (Dillon, 2017) (Cuadro 4. 1). El valor de área bajo la curva de cada uno de estos compuestos se utilizó para el análisis estadístico.

Cuadro 4. 1. Compuestos químicos identificados sobre la base de los cromatogramas obtenidos en el HPLC y a la bibliografía consultada. El nombre del pico corresponde con el perfil cromatográfico de la Figura 4.3. Tr es el tiempo de retención (minutos);  $\lambda$  max (nm) es la longitud de onda de máxima absorción del compuesto.

<b>Pico</b>	<b>Tr (min)</b>	<b><math>\lambda</math> max (nm)</b>	<b>Compuesto</b>
m7	7	270	Derivado fenólico 1
m17	17	254 y 360	Derivado de quercetina (triósido)
m19	19	270 y 360	Derivado de kaempferol (triósido)
m20	20	254 y 360	Derivado de quercetina (triósido)
m21	21	254 y 360	Derivado de isorhamnetina (triósido)
m22	22	254 y 360	Rutina (diósido de quercetina)
m23	23	254 y 360	Derivado de quercetina (diósido)
m23a, m23b	23	254 y 360	Derivados de quercetina (monósidos)
m24	24	254 y 330	Genistina
m25, m26, m27, m28	25 26 27 28	254 y 330	Derivados de kaempferol (diósidos)

En ambos años, la estructura y composición del perfil cromatográfico fue similar para todos los tratamientos. El cromatograma estuvo conformado por el mismo número y tipo de compuestos fenólicos, principalmente glicósidos de flavonoles (quercetina, kaempferol e isorhamnetina). Los perfiles presentaron algunas variaciones entre años, se

observó que la concentración de los compuestos detectada por CLAR fue mayor en las muestras del año 1, que las del año 2. Asimismo también hubo diferencias entre tratamientos, en la mayoría de los compuestos se puede observar que la absorbancia fue superior para los tratamientos con *A. annua* (Figura 4. 4).

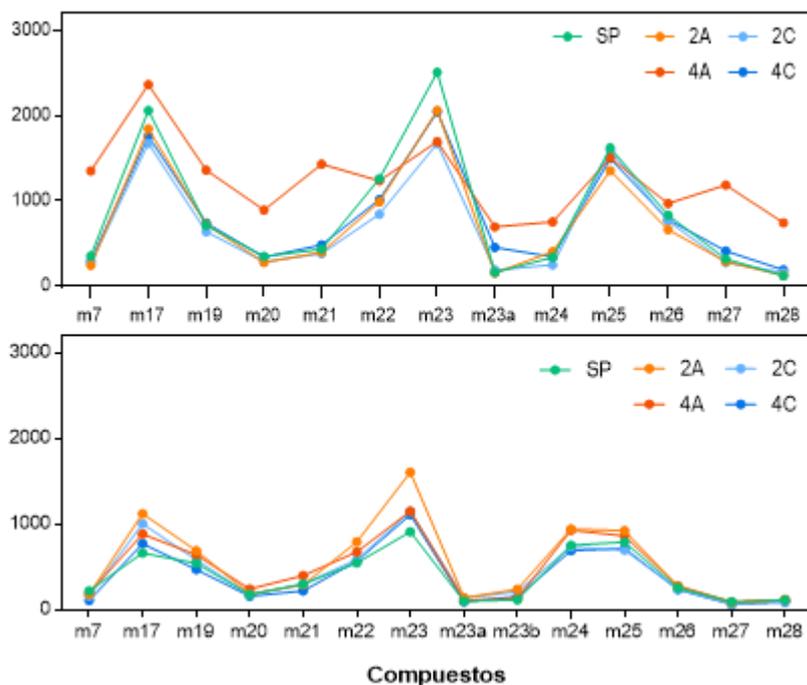


Figura 4. 4. Absorbancia a 270 nm de los compuestos químicos presentes en el extracto metanólico de una muestra de hoja del cultivo soja en los distintos tratamientos con herbivoría de *A. gemmatilis*. Los valores graficados para cada compuesto corresponden a la media del área bajo la curva obtenido en el HPLC en cada tratamiento para el año 1 (superior) y año 2 (inferior).

#### *Relación entre los compuestos químicos y los tratamientos*

En el año 1, el análisis estadístico multivariado de componentes principales (“principal component analysis”, PCA) arrojó un porcentaje de varianza explicado por los dos ejes principales 1 y 2, de 75,0% y 14,4% respectivamente. El ordenamiento mostró sobre el eje 1 un contraste entre el tratamiento con alta densidad de *A. annua* (4A) (parte derecha del diagrama) y los demás tratamientos (parte izquierda del diagrama). Con respecto a la relación con los compuestos químicos (vectores), se observa que varios de los compuestos mostraron una correlación con el eje 1

aumentando en respuesta al tratamiento 4A (m7, m17, m19, m20, m21, m23a, m24, m26, m27, m28). Por su parte, en el eje 2, hay un contraste entre SP (parte superior del diagrama) y el resto de los tratamientos (parte inferior del diagrama). Con respecto a los compuestos químicos (vectores), se observa que algunos compuestos estuvieron correlacionados con el eje 2 aumentando hacia el tratamiento SP (m22, m23 y m25) (Figura 4. 5 y Cuadro 4. 2).

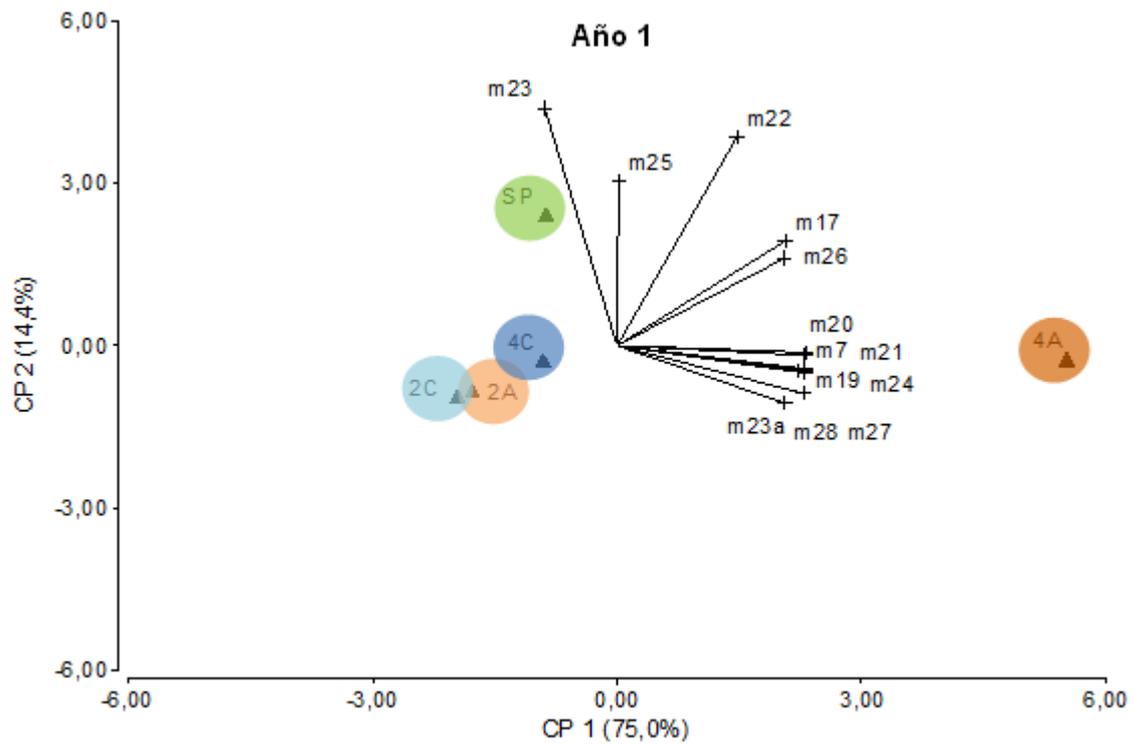


Figura 4. 5. Representación gráfica de los dos primeros ejes de ordenamiento del análisis de componentes principales, considerando los valores de área bajo la curva de los compuestos presentes en hojas de soja, obtenidos en el cromatograma (vectores) en función de los tratamientos (triángulos) para el año 1.

Cuadro 4. 2. Correlación entre las variables (compuestos) con los ejes para el año 1, estimado a través de Pearson y Kendall

Compuestos	Eje 1			Eje 2			Eje 3		
	r	r-sq	tau	r	r-sq	tau	r	r-sq	tau
M7	<b>,973</b>	,946	,451	-,035	,001	-,055	,196	,039	,077
M17	<b>,870</b>	,757	,692	-,335	,112	-,648	-,330	,109	-,604
M19	<b>,974</b>	,949	,582	,125	,016	-,187	-,114	,013	-,319
M20	<b>,994</b>	,987	,692	,039	,002	-,165	,007	,000	-,165
M21	<b>,993</b>	,985	,626	,047	,002	-,143	,052	,003	-,187
M22	,496	,246	,451	<b>-,842</b>	,710	-,802	,143	,021	-,231
M23	,019	,000	,341	<b>-,970</b>	,941	-,868	-,141	,020	-,253
M23a	<b>,805</b>	,648	,560	,189	,036	-,077	,297	,088	-,033
M24	,553	,306	,363	,567	,321	-,055	-,580	,337	-,582
M25	,345	,119	,385	-,485	,235	-,516	-,354	,126	-,253
M26	<b>,701</b>	,492	,516	-,345	,119	-,297	-,085	,007	-,121
M27	<b>,977</b>	,955	,560	,086	,007	-,033	,160	,026	-,077
M28	<b>,809</b>	,654	,385	,522	,273	,099	-,250	,062	-,033

En el año 2, el análisis de componentes principales mostró un porcentaje de varianza explicado por los dos principales ejes de 58,1% y 30,1%, respectivamente. El ordenamiento mostró sobre el eje 1 un contraste entre los tratamientos con *C. album* (2C y 4C) (parte izquierda del diagrama), la monocultura de soja (SP y SPNH) (parte central del diagrama) y los tratamientos con *A. annua* (2A y 4A) (parte derecha del diagrama). El eje 2 mostró un contraste entre los tratamientos 2C, 4C y 2A (parte superior del diagrama), la monocultura de soja sin herbivoría (SPNH) (parte central del diagrama) y los tratamientos SP y 4A (parte inferior del diagrama). Los compuestos m17, m23, m23a, m22 estuvieron correlacionados al tratamiento 2A. Igual que en el año 1, los compuestos m7, m19, m20, m21, m24, m25, m26, m27, m28 estuvieron correlacionados con el eje 1 aumentando hacia el tratamientos 4A (Figura 4. 6 y Cuadro 4. 3).

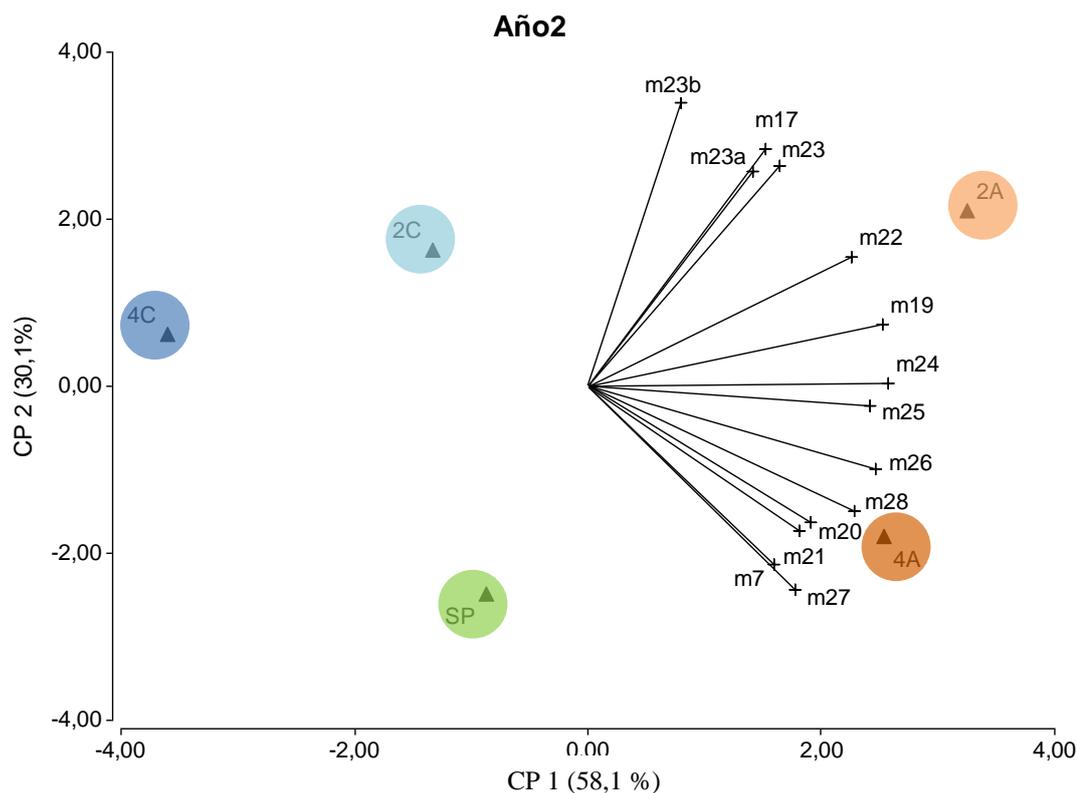


Figura 4. 6. Representación gráfica de los dos primeros ejes de ordenamiento del análisis de componentes principales, considerando los valores de área bajo la curva de los compuestos presentes en hojas de soja, obtenidos en el cromatograma (vectores) en función de los tratamientos (triángulos) para el año 2.

Cuadro 4. 3. Correlación entre las variables (compuestos) con los ejes para el año 2, estimado a través de Pearson y Kendall

Compuestos	Eje 1			Eje 2			Eje 3		
	r	r-sq	tau	r	r-sq	tau	r	r-sq	tau
m7	,383	,147	,276	-,676	,457	-,562	-,107	,011	-,048
m17	<b>,916</b>	,840	,810	,285	,081	,010	,268	,072	,181
m19	<b>,863</b>	,745	,695	-,353	,125	-,371	,250	,062	,295
m20	,449	,202	,143	-,583	,340	-,467	-,120	,014	-,181
m21	,404	,163	,162	-,599	,359	-,524	,061	,004	,067
m22	<b>,879</b>	,773	,752	-,284	,081	-,238	,008	,000	,086
m23	<b>,971</b>	,943	,752	,188	,035	,143	-,137	,019	-,143
m23a	<b>,814</b>	,662	,524	-,096	,009	-,276	,161	,026	,200
m23b	<b>,863</b>	,745	,600	,388	,151	,105	,030	,001	-,143
m24	,501	,251	,390	<b>-,798</b>	,637	-,676	,220	,048	,181
m25	,696	,484	,448	-,639	,408	-,543	-,280	,079	-,143
m26	,480	,231	,219	-,590	,348	-,429	-,402	,161	-,219
m27	,221	,049	,105	<b>-,876</b>	,768	-,657	-,172	,030	,086
m28	,465	,216	,333	<b>-,817</b>	,668	-,695	-,151	,023	,010

En síntesis, si bien todos los compuestos estuvieron presentes en todos los tratamientos, los resultados del análisis multivariado en ambos años mostraron variación de la mezcla o “blend” de los compuestos químicos principalmente asociada a los tratamientos con alta densidad de *A. annua*. Los principales efectos se mostraron en relación al tratamiento 4A y su relación positiva con algunos compuestos específicos o “blend” conformado por la genistina (m24), el triósido y los diósidos de kaempferol (m19, m26, m27, m28, respectivamente), el triósido de isorhamnetina (m21), el derivado fenólico 1 (m7) y el triósido de quercetina (m20). A su vez, en el año 2 los resultados mostraron una correlación positiva entre el tratamiento 2A y un “blend” conformado por la rutina (m22), el diósido, los monósidos y el triósido de quercetina (m23, m23a, m23b y m17, respectivamente) (Figura 4. 5 y Figura 4. 6).

#### *Compuestos obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)*

Al analizar los compuestos del primer “blend” asociado al tratamiento 4A, a pesar de no haber diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), los resultados mostraron una tendencia de incremento en la producción de los compuestos cuando la maleza estuvo en altas densidades, con respecto al resto de los tratamientos. Estas tendencias fueron más evidentes en el año 1, sin embargo en todos los casos el tratamiento 4A presentó altas concentraciones de los compuestos evaluados (Figura 4. 7 y Figura 4. 8).

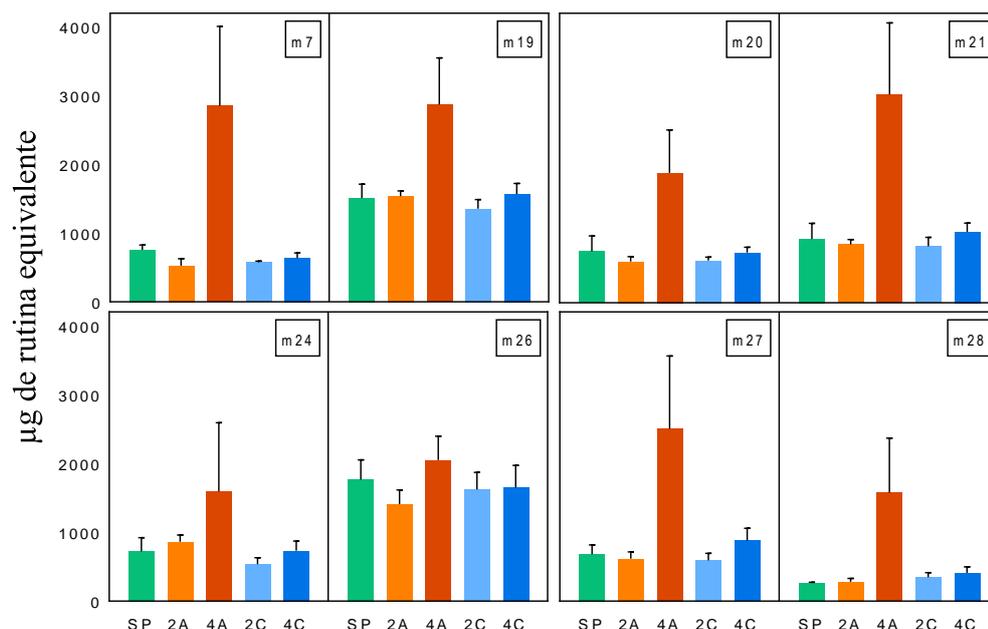


Figura 4. 7. Rutina equivalente ( $\mu\text{g}$ ) en función de los tratamientos para los principales compuestos que conformaron el “blend” asociado al tratamiento 4A (m7 - derivado fenólico 1; m19 - Derivado de kaempferol (triósido); m20 - Derivado de quercetina (triósido); m21 - Derivado de isorhamnetina (triósido); m24 – Genistina; m26, m27 y m28 - Derivados de kaempferol (diósidos), en el año 1. Las barras representan el error estándar de la media.

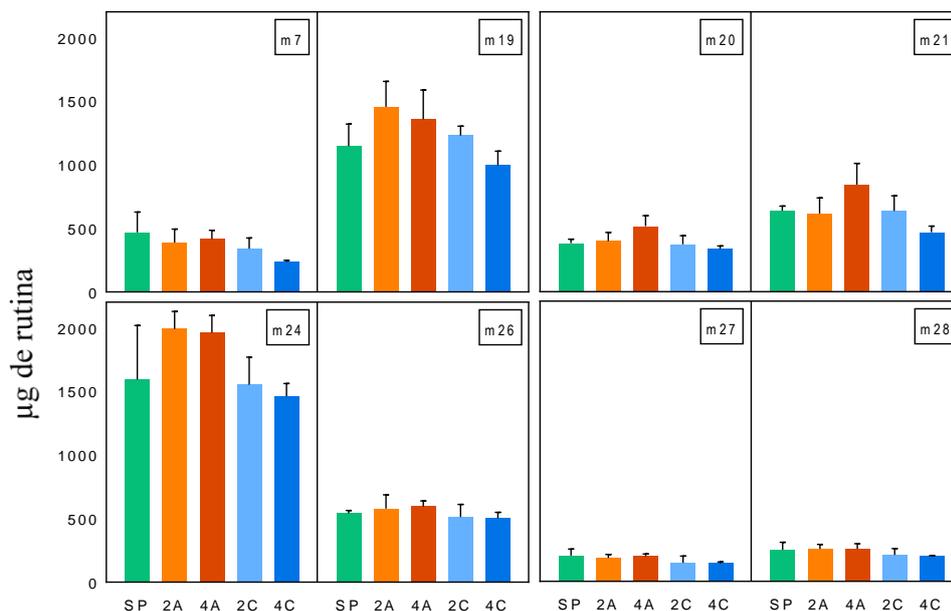


Figura 4. 8. Rutina equivalente ( $\mu\text{g}$ ) en función de los tratamientos para los principales compuestos que conformaron el “blend” asociado al tratamiento 4A ((m7 - derivado fenólico 1; m19 - Derivado de kaempferol (triósido); m20 - Derivado de quercetina (triósido); m21 - Derivado de isorhamnetina (triósido); m24 – Genistina; m26, m27 y m28 - Derivados de kaempferol (diósidos), en el año 2. Las barras representan el error estándar de la media.

Por su parte, se analizaron por separado los compuestos m17, m22, m23 y m23a que conformaron el “blend” que estuvo asociado al tratamiento 2A. Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ), sin embargo, la rutina (m22), los triósido, diósido y monósido de quercetina (m17, m23 y m23a, respectivamente) tendieron a presentar en todos los casos mayor concentración en el tratamiento 2A (Figura 4. 9).

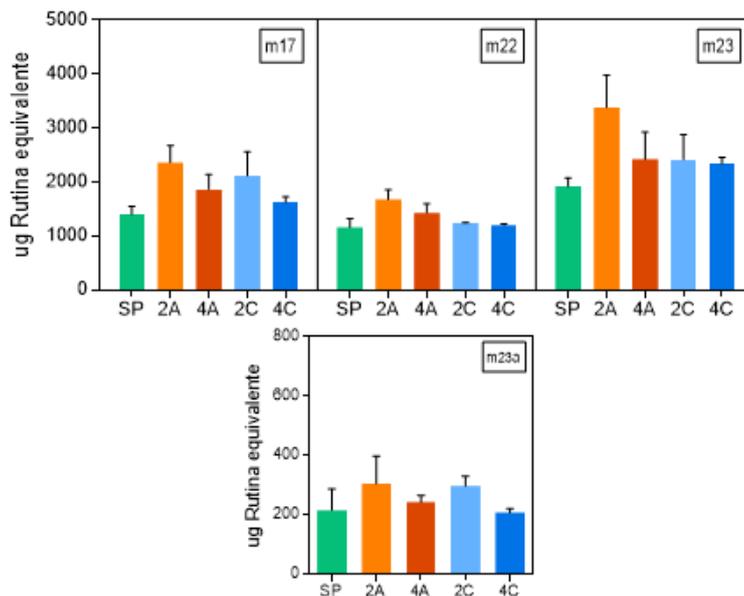


Figura 4. 9. Rutina equivalente ( $\mu\text{g}$ ) en función de los tratamientos para los principales compuestos que conformaron el “blend” asociado al tratamiento 2A (m17 - Derivado de quercetina (triósido); m22 - Rutina (diósido de quercetina); m23 - Derivado de quercetina (diósido) y m23a - Derivado de quercetina (monósidos), en el año 2. Las barras representan el error estándar de la media.

#### Contenido de fenoles totales (CFT)

En relación al efecto de la herbivoría de *A. gemmatalis* sobre el CFT en hojas defoliadas del cultivo soja, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para ninguno de los años ( $p=0,06$  y  $p=0,29$ , respectivamente). En el año 1 el rango de valores fue amplio (entre 80 y 110  $\mu\text{moles}$  de ac. clorogénico por gramo de hoja). En el año 2 el rango de valores fue menor (entre 48 y 63  $\mu\text{moles}$  de ac. clorogénico por gramo de hoja). A pesar que en ambos años los resultados presentaron pocas variaciones entre tratamientos, se pueden destacar ciertas tendencias. Por

ejemplo, no se observan variaciones entre las distintas densidades de *C. album* (2C y 4C), pero al comparar las mezclas con *A. annua* se observa que en ambos años las bajas densidades (2A) presentaron valores de CFT ligeramente mayores que el tratamiento 4A. Por otra parte, en el año 2, se añadió un tratamiento de soja pura sin herbivoría (SPNH) como testigo “blanco”, pero sin embargo no hubo diferencias entre éste tratamiento y el resto (Figura 4. 10).

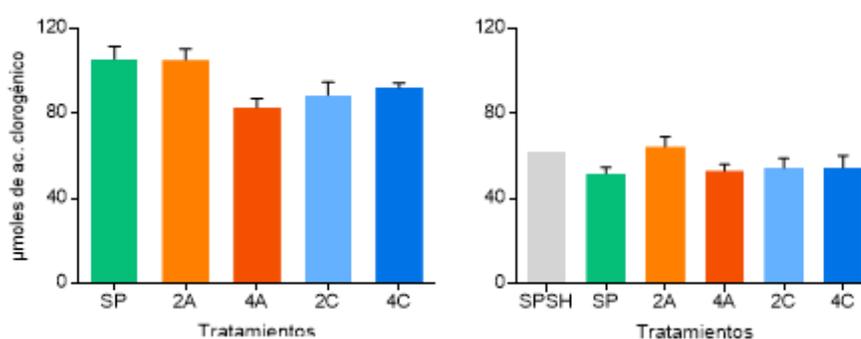


Figura 4. 10. Contenido de fenoles totales en el cultivo de soja en respuesta a la herbivoría de *Anticarsia gemmatalis* para los distintos tratamientos en el año 1 (izquierda) y el año 2 (derecha). En el año dos se agregó un tratamiento de soja pura sin herbivoría como testigo (SPNH). Los datos se expresan en  $\mu$ moles de ácido clorogénico/gramo de hoja seca. Las barras representan el error estándar de la media.

#### *Compuestos con actividad antioxidante (CA)*

En cuanto a la CA, cuantificada como el contenido de sustancias que modifican el estado oxidativo de las ROS, los resultados muestran que en ambos años no hubo diferencias significativas entre tratamientos ( $p=0,45$  y  $p=0,60$ , respectivamente). Al igual que en el CFT, en el año 1 el rango de valores fue mayor (entre 19 y 26  $\mu$ moles de ácido ascórbico por gramo de hoja), mientras que el año 2 los valores estuvieron entre 6 y 15  $\mu$ moles de ácido ascórbico por gramo de hoja (Figura 4. 11).

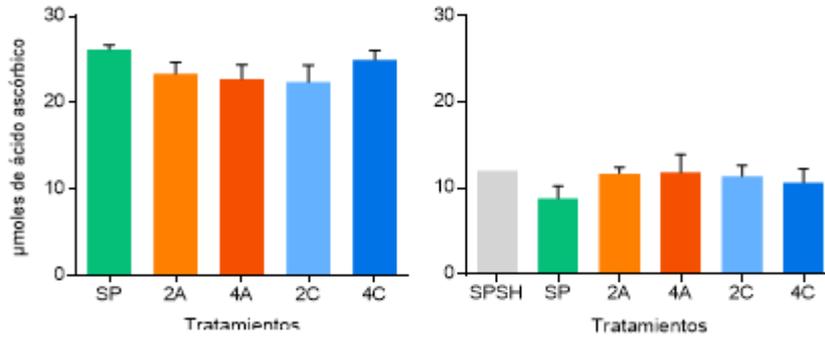


Figura 4. 11. Actividad antioxidante en el cultivo de soja en respuesta a la herbivoría de *Anticarsia gemmatalis* para los distintos tratamientos en el año 1 (izquierda) y el año 2 (derecha). En el año dos se agregó un tratamiento de soja pura sin herbivoría como testigo (SPNH). Los datos se expresan en  $\mu$ moles de ácido ascórbico/gramo de hoja seca. Las barras representan el error estándar de la media.

### *Supervivencia de Anticarsia gemmatalis*

En relación al efecto de las defensas químicas del cultivo soja sobre la supervivencia de *Anticarsia gemmatalis*, los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ( $p=0,17$ ). Los valores de supervivencia se mantuvieron siempre alrededor del 100% (Figura 4. 12).

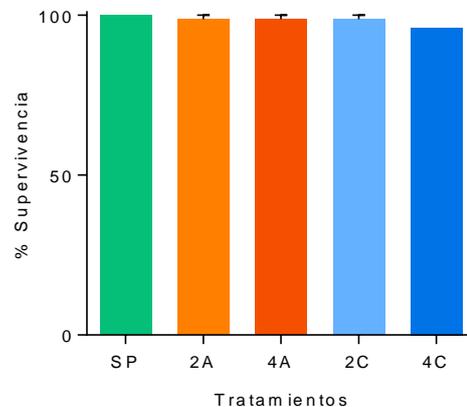


Figura 4. 12. Supervivencia de *Anticarsia gemmatalis* en función de los tratamientos. Las barras representan el error estándar de la media.

## 4.4 DISCUSION

En este capítulo se evaluó el efecto de la herbivoría de *A. gemmatalis* en el cultivo de soja estando solo o en mezclas con las malezas *A. annua* y *C. album* sobre las defensas químicas presentes en el tejido foliar del cultivo.

### 4.4.1 Relación entre los compuestos químicos y los tratamientos

Hay evidencias que muestran que la exposición a compuestos volátiles de plantas vecinas genera un efecto pre-inductivo (“priming”) sobre la batería de compuestos químicos de defensa de algunas plantas. Es decir, plantas expuestas a volátiles provenientes de otras plantas pueden responder de manera más rápida, e incluso más fuertemente frente a la herbivoría (Dicke y Bruin, 2001; Engelberth et al., 2004; Heil y Kost, 2006; Baldwin, 2010; Pierik et al., 2014). En este sentido, las correlaciones positivas encontradas en los dos años de experimentos entre los compuestos presentes en el perfil cromatográfico del cultivo y los tratamientos de soja con *A. annua*, podrían estar relacionadas con el efecto de los volátiles liberados por la maleza sobre el sistema de defensa del cultivo soja.

Por una parte, se encontró un “blend” de compuestos que respondió positivamente al incremento de la densidad de la maleza, ya que estuvo consistentemente asociado al tratamiento 4A. Es decir, la producción de estos compuestos en relación a la presencia de la maleza respondió de forma denso-dependiente (Figura 4. 5, Figura 4. 6 y Figura 4. 7). Mientras que el año 2, otro “blend” estuvo asociado al tratamiento 2A, y sus compuestos aumentaron cuando la maleza estuvo en menor proporción dentro de la mezcla. La respuesta de estos compuestos a las bajas densidades de la maleza, podría relacionarse a que algunos metabolitos secundarios aumentan su síntesis cuando está en menor proporción dentro de la mezcla,

efecto dilución (Norris y Kogan, 2000, 2005). De esta forma, ciertos metabolitos de *A. annua* que son liberados estando a bajas densidades, podrían estimular la producción de los compuestos que conformaron este “blend” (Figura 4.9). A su vez, las correlaciones negativas encontradas los dos años entre todos los compuestos presentes en el perfil y la presencia de la maleza *C. album* (tratamientos 2C y 4C), también explicaría el efecto inductor de los volátiles de la maleza *A. annua* sobre las defensas del cultivo, en comparación con una especie no aromática como *C. album*.

En cuanto a la naturaleza de los compuestos, se mostró que la conformación de cada “blend” se generó a través de la agrupación de compuestos químicos similares (*i.e.* diósidos de quercetina, triósidos de kaempferol). La literatura señala, que muchos de los compuestos que son químicamente parecidos, suelen ser inducidos o inhibidos por los mismos factores. Como es el caso de los ocho compuestos del “blend” asociado al tratamiento 4A: los derivados fenólicos, derivados de kaempferol, derivados de isorhamnetina y la genistina, respondieron positivamente al incremento de la maleza. Asimismo, los derivados de quercetina y la rutina conformaron el “blend” de cuatro compuestos y estuvieron relacionados al tratamiento 2A. Estas correlaciones muestran que los compuestos químicamente parecidos presentan comportamientos similares (Figura 4. 5 y Figura 4. 6). En cuanto al tiempo que eluyen los compuestos dentro del perfil (tiempo de retención), los resultados coinciden con la bibliografía: para el caso de los triglicósidos de flavonoles el tiempo de elución relativo estuvo en línea con lo esperado: quercetina<kaempferol<ishormanetina (Mabry et al., 1940; Dillon, 2017). En el caso de la rutina y la genistina el tiempo de retención se comparó por coelusión con estándares (Sigma-Aldrich).

#### 4.4.2 CLAR

Si bien los VOC's de una planta pueden alterar el metabolismo de las plantas vecinas, en algunos casos pueden ser insuficientes para provocar un cambio en la química de algún compuesto particular del sistema defensivo de otra planta, pero pueden preparar su fisiología defensiva para producir rápidamente compuestos de defensa, si llegan a ser dañados (Barbosa et al., 2009). En este sentido, cuando se analizaron los compuestos en forma individual, no se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos (Figura 4. 7, Figura 4. 8 y Figura 4. 9). Estos resultados coinciden con los mostrados por (Dillon, 2017), donde encontraron diferencias en la genistina y malonil genistina por efecto de la herbivoría de *A. gemmatalis*, pero no encontró diferencias en flavonoides totales y en agliconas como la quercetina, kaempferol, isorhamnetina y genisteína en cultivo de soja. Esto puede estar relacionado a que en general las respuestas químicas de las plantas suelen generarse por cambios en un conjunto o “blend” de compuestos, y no por un solo compuesto actuando de forma aislada, aunque la variación de su proporción relativa dentro de la mezcla sea la más importante (Ćavar et al., 2012).

Sin embargo, existen evidencias que muestran incrementos significativos en algunos compuestos particulares. Por ejemplo, O'Neill et al. (2010) reportaron la inducción de genistina en hojas en respuesta al daño producido por un lepidóptero en soja, mientras que derivados de quercetina y kaempferol no se vieron alterados. Asimismo, Murakami et al. (2014) también reportaron la inducción de daidzeina y un grupo malonilo en respuesta al daño de *S. frugiperda*. Estas respuestas, pueden estar relacionadas con varios factores como pueden ser la severidad del daño ocasionado, el lapso de tiempo en cual se generó el ataque, el genotipo o cultivar utilizado, entre otros. En cuanto al primer factor, en esta tesis se garantizó que las orugas ingresaran al

experimento en estadíos tempranos, momento en el cual son más voraces y generan mayor severidad de daño (Aragón et al., 1998; Saunders et al., 1998). En cuanto al tiempo del ataque, si bien el lapso de exposición de las orugas en el cultivo estuvo restringido por las condiciones experimentales, se consultó la bibliografía para garantizar que el tiempo fuese el suficiente para generar una respuesta en el cultivo y poder cuantificarla. Sin embargo, los tiempos de respuesta son muy diferentes entre materiales y compuestos. (Woldemariam et al., 2011) señala que las primeras respuestas defensivas se dan en **minutos** (*i.e.* ácido jasmónico) y los factores de transcripción en **horas** (*i.e.* AtNAC, AtORA, AtMYB), algunos de los compuestos de defensa necesitan **días** (*i.e.* VSP, glucosinolatos, flavonoides). Por último, señala que el material utilizado también puede generar amplias variaciones en cuanto a la respuesta química de las plantas. Dillon (2017) encontró diferencias significativas en algunos compuestos de defensa en 24 horas de herbivoría, mientras que en otros recién a las 72 horas o 6 días. Asimismo, mostraron diferencias contrastantes entre los cultivares de soja utilizados en cuanto a la respuesta frente a la herbivoría de *A. gemmatalis*, algunos materiales no presentaron respuestas de defensa, mientras que otros sí.

Entre las publicaciones que estudian la interacción entre plantas mediadas por compuestos volátiles, predominan aquellas que muestran un efecto priming por la acción de compuestos químicos liberados por las plantas luego de un ataque, por ejemplo, los volátiles de plantas inducidos por herbivoría (HIPV, en inglés), o los volátiles de hoja verde (GLV, en inglés). Incluso muchos de los estudios se refieren a aquellos VOC's que fueron liberados por efecto de un estrés (*i.e.* daño, herbivoría, patógeno). En el caso de la relación entre el cultivo de soja y la maleza *A. annua*, al ser ésta última una especie aromática que libera al medio volátiles provenientes de compuestos constitutivos, la interacción ocurre continuamente. Los resultados de esta

tesis muestran que la presencia de esta maleza dentro del sistema, tiene un efecto positivo sobre la producción de un conjunto de compuestos conocidos por tener un rol dentro de la defensa del cultivo soja.

#### 4.4.3 *Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante*

Ambas variables exploraron rangos de valores más amplios en el año 1, con respecto al año 2. Algo similar a lo encontrado en el capítulo anterior en cuanto a biomasa y rendimiento. Es decir, hay una relación directa entre la biomasa producida por planta y el nivel de los compuestos químicos encontrados en las muestras de tejido foliar.

En cuanto al contenido de fenoles totales, a pesar de no presentar diferencias significativas entre tratamientos, la tendencia entre tratamientos de *A. annua* fue similar entre años: el tratamiento de menor proporción de la maleza 2A, fue siempre ligeramente superior al tratamiento 4A. Esto podría estar relacionado con el comportamiento del “blend” de cuatro compuestos asociado al tratamiento 2A. Por otra parte, el tratamiento sin herbivoría (SPNH) no presentó diferencias significativas frente a los tratamientos con herbivoría. Es decir, las diferencias encontradas en los compuestos estuvieron relacionadas con la presencia de la maleza, dependiendo de la densidad de la misma dentro del sistema, y no a la herbivoría de *A. gemmatalis*.

Todas las variables evaluadas mostraron que las diferencias estuvieron relacionadas con la presencia de las distintas malezas dentro del sistema y/o con su densidad dentro de la mezcla, y no con el tratamiento de herbivoría. Es decir, las variaciones en las defensas del cultivo estuvieron asociadas a los cambios en el ambiente y no al daño generado por *A. gemmatalis*. Algo similar encontraron (Dillon

et al., 2017) al mostrar que las principales diferencias en los compuestos de defensa evaluados estuvieron explicadas por cambios en la calidad de la luz. A su vez, las principales variaciones se mostraron en relación a la maleza *A. annua*, lo que podría indicar una posible señalización con el cultivo a través de los compuestos volátiles de la maleza (Karban et al., 2014; Kalske et al., 2019).

#### 4.4.4 *Supervivencia*

Si bien los resultados mostraron una relación positiva entre algunos “blends” de compuestos de defensa y los tratamientos con *A. annua*, las larvas de *A. gemmatalis* que se alimentaron del cultivo soja estando en dichos tratamientos no sufrieron alteraciones en la supervivencia. Es decir, la inducción de estos compuestos no afectó la mortalidad del herbívoro, al menos dentro del rango de tiempo evaluado. En cuanto a los compuestos fenólicos, su toxicidad depende del estado redox (Appel, 1993; Felton et al., 1994; Pourcel et al., 2007) y para el caso de los flavonoides no está claro qué papel cumplen en la resistencia de la planta frente al ataque insectos, ya que hay resultados contradictorios en cuanto a su función (Simmonds, 2003).

Otra explicación podría apuntar a que, a pesar de ser compuestos de defensa, éstos no impacten directamente sobre funciones vitales del herbívoro, sino sobre aspectos no evaluados en esta tesis como su comportamiento, reproducción o ganancia de peso (Bernays y Chapman R. F., 1994; Zavala y Baldwin, 2004; Zavala et al., 2008, 2013). Los efectos de los cambios en el metabolismo secundario de las plantas sobre los insectos, son muy variables y poco predecibles (Zavala et al., 2013). En cuanto al comportamiento de los herbívoros, la bibliografía señala que, al modificar la calidad del alimento, los principales cambios ocurren en el consumo. En algunos casos, cambios en la calidad del alimento aceleran el consumo para compensar las deficiencias

nutricionales del tejido (Slansky y Wheeler, 1992; Zavala et al., 2013). En otros casos, la tasa de consumo del herbívoro se desacelera, disminuye la frecuencia o detiene el consumo y busca nuevas fuentes de alimento, por lo general otra hoja dentro de la misma planta. Las hojas más jóvenes suelen ser más nutritivas (mayor contenido de proteína), pero al mismo tiempo éstas hojas están en zonas donde el herbívoro quedaría más expuesto frente a otros ataques (*i.e.* enemigos naturales) (Slansky y Wheeler, 1992; Zavala et al., 2008).

En este sentido, las reducciones significativas en el nivel de defoliación generadas sobre el cultivo soja cuando el cultivo estuvo en mezclas con la maleza *A. annua* (Capítulo 2), confirmarían que los “blends” asociados a los tratamientos 2A y 4A alteraron la tasa de consumo tanto de *A. gemmatalis* como de los herbívoros espontáneos que llegaron al sistema. Estos resultados que muestran una posible señalización entre la maleza, el cultivo y los insectos del sistema, son similares a los encontrados por Kessler et al. (2006), que mostraron como los VOCs provenientes de *Artemisia tridentate*, redujeron la herbivoría de la oruga defoliadora *Manduca sexta* sobre las plantas de tabaco, a través de la inducción en la síntesis de inhibidores de la tripsina.

En términos de costos para el cultivo, la herbivoría reduce directamente la biomasa producida por las plantas y esto puede impactar negativamente sobre la producción de semillas y el rendimiento. En este caso, los resultados obtenidos en el Capítulo 3 de esta tesis mostraron que la herbivoría de *A. gemmatalis* sobre el cultivo de soja no redujo la biomasa ni el rendimiento en ninguno de los tratamientos. Sin embargo, el costo de las defensas químicas podría haber afectado la asignación de recursos a la producción de metabolitos secundarios, en lugar de utilizarse para procesos clave como el crecimiento y la reproducción. En ese sentido, los resultados mostraron

que el aumento en la producción de los compuestos de defensa del cultivo de soja estando en mezclas con *A. annua* (Figura 4. 5 y Figura 4. 6) no implicó costos en la producción de biomasa, ni en el rendimiento (Capítulo 3).

A su vez, la producción de defensas puede implicar costos ecológicos al tener algún impacto negativo sobre otro componente del sistema. En este sentido, los resultados mostraron que los compuestos de defensa no impactaron sobre la tasa de supervivencia del herbívoro (Figura 4. 12), pero sí sobre la estructura de la comunidad de insectos del sistema (Capítulo 5). Sin embargo, cuantificar el costo de algún rasgo de defensa específico resulta muy difícil ya que puede estar ligado a distintos roles dentro del funcionamiento y metabolismo de las plantas.

#### 4.5 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente capítulo permitieron extraer las siguientes conclusiones:

- i.* La herbivoría generada dentro de las etapas tempranas del periodo crítico del cultivo en conjunto con la presencia de las malezas acompañantes resultó en un perfil cromatográfico similar para todos los tratamientos.
- ii.* La producción de los compuestos de defensa evaluados en el tejido foliar del cultivo aumentaron cuando la soja estuvo en mezcla con la maleza *A. annua*. Específicamente los resultados mostraron un conjunto de compuestos “blends” asociados a los tratamientos 4A y 2A.
- iii.* La presencia de las malezas acompañantes en conjunto con la herbivoría de *A. gemmatilis* no alteró la producción de los compuestos fenólicos ni de aquellos que desempeñan un rol antioxidante dentro de las defensas del cultivo.

- iv. La inducción de los compuestos de defensa en el cultivo de soja por la presencia de la maleza *A. annua* no generó alteraciones en la supervivencia de la oruga *A. gemmatalis*.

Por lo tanto, se acepta la hipótesis 3a que plantea que *“La producción de compuestos de defensa en respuesta a la herbivoría es estimulada en presencia de plantas productoras de terpenos que emiten señales volátiles. La producción de compuestos de defensa en soja como respuesta a la herbivoría de A. gemmatalis será mayor en mezclas con A. annua, con respecto a la monocultura de soja o a las mezclas con C. album”*, y además, se rechaza la hipótesis 3b que dice que *“La supervivencia de A. gemmatalis está condicionada por la acción de las defensas producidas por el cultivo, que a su vez son estimuladas por las señales volátiles emitidas por plantas productoras de terpenos. La supervivencia de A. gemmatalis será menor cuando el cultivo esté en mezclas con A. annua, con respecto a la monocultura de soja o a las mezclas con C. album”*.



Relación entre los volátiles del sistema y la comunidad de insectos<sup>1</sup>

---

---

<sup>1</sup> Parte del contenido de este capítulo fue publicado en Torcat Fuentes, M., Lenardis, A., de la Fuente,



## 5.1 INTRODUCCIÓN

Una gran variedad de plantas libera metabolitos secundarios al medio, ya sea de forma constitutiva (*i.e.* plantas aromáticas) o inducida (*i.e.* en respuesta a algún estrés o daño). Estos metabolitos pueden modular de manera individual o en conjunto el entorno donde se desenvuelven, afectando tanto en el comportamiento de las plantas vecinas como en la atracción, repelencia, alimentación, crecimiento y reproducción de los insectos del sistema (Bernays y Chapman R. F., 1994; Booth y Swanton, 2002; Cipollini, 2004; Radosevich et al., 2007; Lenardis et al., 2011). Estos compuestos volátiles son responsables de la comunicación entre plantas e insectos, además de estar implicados en la señalización entre órganos de la misma planta (Arimura et al., 2010). Actualmente es ampliamente reconocido el efecto de estos compuestos como mediadores en la interacción de las plantas con herbívoros, enemigos naturales, polinizadores, y con plantas vecinas (Pierik et al., 2014; Aljbory y Chen, 2018).

Si bien todas las plantas presentan estrategias de defensa, en muchas especies cultivadas como cereales y oleaginosas, el mejoramiento ha potenciado la producción de metabolitos primarios (carbohidratos, proteínas y lípidos) y reducido indirectamente la producción de metabolitos secundarios (terpenos, alcaloides), que sirven de base para las defensas químicas de las plantas. En este contexto, las plantas acompañantes pueden desempeñar un rol positivo en los agroecosistemas, ayudando a cubrir la falta de defensas químicas volátiles que tienen la mayoría de los cultivos actualmente.

En este sentido, numerosos trabajos muestran que la llegada espontánea de insectos a un sistema puede estar estrechamente relacionada con la presencia de plantas acompañantes en el sistema. Lenardis et al. (2007) trabajaron con cultivos similares en cuanto al ciclo de vida y estructura de planta, pero pertenecientes a diferentes grupos

funcionales en relación a la familia y la producción de metabolitos secundarios. En dicho trabajo, conduciendo las señales volátiles desde el coriandro al trigo para lograr un trigo con “olor” a coriandro, encontraron una relación estrecha entre la comunidad de insectos y las señales volátiles independientemente de la especie cultivada. Es decir, las plantas vecinas pueden atraer o repeler insectos al sistema, pero además pueden actuar como fuente alternativa de alimento tanto para los enemigos naturales como para los consumidores primarios (herbívoros) representando un factor de dilución en la concentración del cultivo predominante (Bernays y Chapman, 1994; Norris y Kogan, 2000, 2005).

La idea de proveer fuentes de VOC`s a través de la incorporación de plantas acompañantes al agroecosistema es una práctica interesante, pero las especies candidatas no siempre se analizan por su función en relación a los insectos en el sistema. Por ejemplo, muchas especies de malezas han sido analizadas por su efecto alelopático dentro de los campos agrícolas argentinos: *Cyperus rotundus* L. (Gastal y Casela, 1986), *Tagetes minuta* (Gil et al., 2002), *Sorghum halepense* (L.) Pers. (Acciari y Asenjo, 2003), *Cynodon dactylon*, *Cirsium arvense*, *Cyperus esculentus* (Castro et al., 1983), *Chenopodium album* L. (Leicach et al., 2006), *Artemisia annua* L. (Morvillo et al., 2011), pero no se ha analizado el efecto de estos compuestos químicos sobre la comunidad de insectos.

Sin embargo, en el caso específico de *Artemisia annua* L., se vio que los metabolitos secundarios (principalmente terpenos) que libera la maleza, interactúan positivamente con el cultivo soja, favoreciendo la comunidad de insectos benéficos (Lenardis et al., 2011), sin disminuir el rendimiento (Morvillo et al., 2011). Por otra parte, los metabolitos secundarios producidos por la maleza *Chenopodium album* L. son atractivos para algunos insectos (Sigsgaard et al., 2008; Štolcová, 2009b) al representar

una fuente alternativa de alimento. De esta forma la presencia de malezas acompañantes puede mitigar la presión de los herbívoros del sistema, al diluir la concentración del cultivo. Asimismo, el cultivo de soja produce y libera un conjunto de compuestos químicos al ser consumido por insectos (Moraes et al., 2005).

Existen numerosos trabajos que evalúan el papel de los compuestos volátiles en las interacciones entre las plantas y su entorno biótico en condiciones controladas (Gouinguéné y Turlings, 2002; Moraes et al., 2005; Heil y Kost, 2006; Michereff et al., 2011; Gols et al., 2012) y en mucho menor medida en condiciones de campo (Gil et al., 2002; Lenardis et al., 2011). La información obtenida a nivel de órgano o planta no siempre puede ser extrapolada a escala de agroecosistema. En la actualidad, hay relativamente pocos estudios de campo que incluyan distintos niveles de integración biológica, con nuevos conocimientos sobre el papel de los volátiles en el ensamble de comunidades ecológicas (Pierik et al., 2014). Jessing et al. (2014) remarcan esta falencia en el caso de estudios de la maleza *A. annua*, destacando que existe mucha evidencia a escala de laboratorio que analiza el efecto de los extractos vegetales (fresco o seco) y de los aceites esenciales de la maleza sobre el comportamiento de los insectos, pero que la información es limitada en estudios a escala de campo. Asimismo, el rol de los compuestos químicos producidos tanto por *A. annua* como por otras plantas acompañantes dependerá de la proporción relativa de la especie dentro del sistema, de su estado ontogénico y de la biomasa producida (Ferreira y Janick, 1996; Lenardis et al., 2011).

En síntesis, se sabe que las plantas responden indirectamente a la herbivoría a través de la liberación de compuestos volátiles, y que a su vez estos volátiles son capaces de atraer enemigos naturales específicos (Heil y Kost, 2006; Arimura et al., 2010; Heil, 2010a). A su vez, existen evidencias que muestran que las señales químicas

generadas por un cultivo en un determinado agroecosistema pueden verse afectadas cuando a su vez las plantas que acompañan al cultivo emiten distintos compuestos volátiles (Engelberth et al., 2004; Heil y Kost, 2006). Entonces, el conjunto de señales químicas de un sistema (huella olfativa), determinada por las distintas especies presentes (cultivo – maleza – herbívoro), pueden modular el entorno donde se desenvuelven los diferentes componentes y determinan el ensamble final de la comunidad de insectos (Bernays y Chapman R. F., 1994; Booth y Swanton, 2002; Cipollini, 2004; Radosevich et al., 2007; Lenardis et al., 2011). Los datos disponibles sugieren que la combinación de los compuestos químicos producidos tanto por las malezas como por los cultivos, condicionaría la llegada de los enemigos naturales al sistema.

En este sentido, considerando que la diversificación del sistema agrícola genera señales químicas complejas y distintas comunidades de insectos asociadas y que no existen evidencias acerca del impacto de la herbivoría de *A. gemmatalis* y de las señales provenientes de malezas productoras de distintos metabolitos secundarios sobre las huellas olfativas del sistema y la comunidad de insectos asociada, se plantean los siguientes objetivos e hipótesis:

### **5.1.1 Objetivo e hipótesis**

El objetivo del presente capítulo es evaluar la comunidad de insectos y su relación con las señales químicas emitidas por el cultivo de soja puro o en mezclas con malezas productoras de metabolitos secundarios junto con la herbivoría de *A. gemmatalis*.

Las hipótesis plantean que:

- i. *Hipótesis 4a*: La presencia de malezas productoras de diferentes metabolitos secundarios dentro del cultivo de soja, altera las huellas olfativas particulares cuando el cultivo crece puro y en mezclas con distintas densidades de las malezas. Las huellas olfativas son distintas dependiendo de la combinación cultivo – maleza - herbivoría y la densidad de las malezas en la mezcla con el cultivo.
- ii. *Hipótesis 4b*: Las mezclas del cultivo de soja con malezas productoras de terpenos volátiles (soja - *A. annua*), al liberar señales químicas al sistema atrae a los insectos en general y los no herbívoros en particular. La riqueza de insectos en general y de no herbívoros en particular será mayor en la mezcla soja - *A. annua*, con respecto a la mezcla soja - *C. album* o a las monoculturas de soja.

## 5.2 MATERIALES Y METODOS

La descripción general del ensayo, el diseño experimental y los respectivos tratamientos fueron detallados en la metodología general, dentro del Capítulo 1. A continuación se detalla la metodología que se llevó a cabo para poner a prueba los objetivos e hipótesis correspondientes al presente capítulo.

### 5.2.1 Determinaciones

Para evaluar las señales químicas (huellas olfativas) emitidas por el cultivo de soja puro o en mezclas con malezas productoras de metabolitos secundarios junto con la herbivoría de *A. gemmatilis*, se realizaron mediciones periódicas con la nariz electrónica (e-nose). La nariz electrónica es un instrumento equipado con un sistema capaz de reconocer olores simples y complejos a través de un conjunto de sensores químicos electrónicos (Szpeiner et al., 2009). La “e-nose” permite monitorear de forma no invasiva los compuestos orgánicos volátiles (VOC`s) liberados por las plantas y

obtener información funcional sobre el crecimiento, defensa y salud de las plantas (Cui et al., 2018). Si bien puede haber cierta deriva en días con viento esto se minimizó mediante la instalación de borduras de soja entre parcelas y la medición de señales e insectos en días soleados y sin viento (Figura 5.1). Una vez que se establecieron los tratamientos mediante la incorporación de las malezas al sistema, se realizaron mediciones con la “e-nose” en estados claves del cultivo como R1, R4, R6.

Por otra parte, para evaluar la estructura y riqueza de la comunidad insectos, en estados avanzados de la fase reproductiva cultivo (R5 - Madurez) se procedió a retirar la malla protectora del ensayo. Luego de 48 horas de retirada la malla, entre las 10.00 y 15.00 horas de días soleados y sin viento se realizaron muestreos de insectos aéreos a través de “pan tramps” con agua y jabón, ubicadas en el centro de cada parcela (Figura 5.1 y Figura 5.2).



Figura 5. 1. Representación esquemática de las mediciones y determinaciones que se llevaron a cabo para cumplir con el objetivo del presente capítulo.



Figura 5. 2. Vista general del experimento sin el revestimiento general y con las “pan traps” colocadas.

#### *Estructura faunística y funcional*

La estructura faunística se analizó en términos de la abundancia, riqueza y composición de especies. En los casos en los que fue posible, los insectos fueron identificados a nivel de especie, de lo contrario se identificó a nivel de morfoespecie. El análisis a nivel de morfoespecie permite el estudio de comunidades de insectos, ya que las diferencias entre el número de morfoespecies y especies taxonómicas son, en muchos casos, muy pequeñas (Derraik et al., 2002). La estructura funcional se analizó sobre la base de las características anatómicas, la etapa de crecimiento y la consulta de bibliografía (Arroyo Varela y Viñuela Sandoval, 1991; Colomo de Correa y Roig-Alsina, 2009; Duarte Gómez y Zenner de Polanía, 2009; Urretabizkaya et al., 2010; Gramajo y Mulieri, 2011). Los insectos se clasificaron según su hábito de alimentación principal en dos grupos: herbívoro o no herbívoro. Aquellos que causan algún daño al tejido foliar, como los succionadores y defoliadores, son considerados **herbívoros**, y el resto de los insectos, como los depredadores, parasitoides y polinizadores se clasificaron

como **no herbívoros**. Los insectos lepidópteros recolectados en estado de adulto se clasificaron como no herbívoros.

### 3.2.4 Análisis de los datos

Los efectos principales y sus interacciones se analizaron a través de análisis de varianza (ANVA) usando el paquete estadístico software Infostat (versión 2017) (Di Rienzo et al., 2017). Cuando las diferencias entre tratamientos fueron significativas, las medias se compararon utilizando la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ). Previamente se comprobaron los supuestos de homogeneidad de varianza y distribución normal para todos los tratamientos.

Para evaluar la relación entre las huellas olfativas y las comunidades de insectos presentes en el sistema, se realizó un análisis multivariado (Jongman et al., 1995), de componentes principales utilizando PC-ORD Multivariate Analysis of Ecological Data Version 5.0. (McCune y Mefford, 1995). Este tipo de análisis permite identificar la combinación de variables respuesta que mejor representan las diferencias entre tratamientos (ter Braak, 1987a; b). Para determinar la relación entre los insectos y las variables explicatorias asociadas a las huellas olfativas (sensores), se construyó una matriz secundaria con los datos de los sensores y se generó gráficamente un “biplot” al superponer un diagrama vectorial basado en coeficientes de las funciones canónicas que describen cada eje canónico.

Las diferencias en cuanto a la composición de especies de las comunidades de insectos asociadas a cada tratamiento fueron analizadas con el Procedimiento de Permutación de Respuesta Múltiple (Multi-Response Permutation Procedure - MRPP) (Mielke, 1984). Para este análisis, la abundancia de especies se evaluó utilizando los tratamientos como variable categórica.

A partir de la información relevada se estimaron la abundancia total de especies (número total de individuos por morfoespecie y por tratamiento), la riqueza total (número total de morfoespecies por tratamiento), la riqueza media por parcela (promedio de morfoespecies por tratamiento) y la constancia (proporción de parcelas dentro del mismo tratamiento, donde apareció la morfoespecie) (Whittaker, 1975; Magurran, 1988). Los datos de abundancia y la riqueza de insectos fueron transformados de variables discretas a continuas mediante la raíz cuadrada.

### 5.3 RESULTADOS

#### 5.2.1 Relación entre las huellas olfativas y la comunidad de insectos

El análisis de componentes principales de los datos del segundo año para evaluar la relación entre las huellas olfativas presentes en el sistema y las comunidades de insectos arrojó un porcentaje de varianza explicado por los tres principales ejes de 81,3%. El eje 1 explica un 54,4%, mientras que los ejes 2 y 3 explican un 18,6 y 7,4%, respectivamente. El eje 1 mostró un contraste entre los tratamientos con *A. annua* asociado con los insectos *O. insidious* y *Gymnopterus* sp. (parte izquierda del diagrama, línea punteada) y los tratamientos con *C. album* y de soja pura, asociado con los insectos *Polistes* sp. y *C. mus* (parte derecha del diagrama, línea segmentada). Las principales variables explicatorias de las comunidades de insectos fueron los sensores 5 y 6 para el eje 1 ( $r= 0,26$  y  $r= 0,24$ , respectivamente), y los sensores 7 y 8 para el eje 2 ( $r= -0,25$ ,  $r= -0,23$ , respectivamente) (Figura 5. 3).

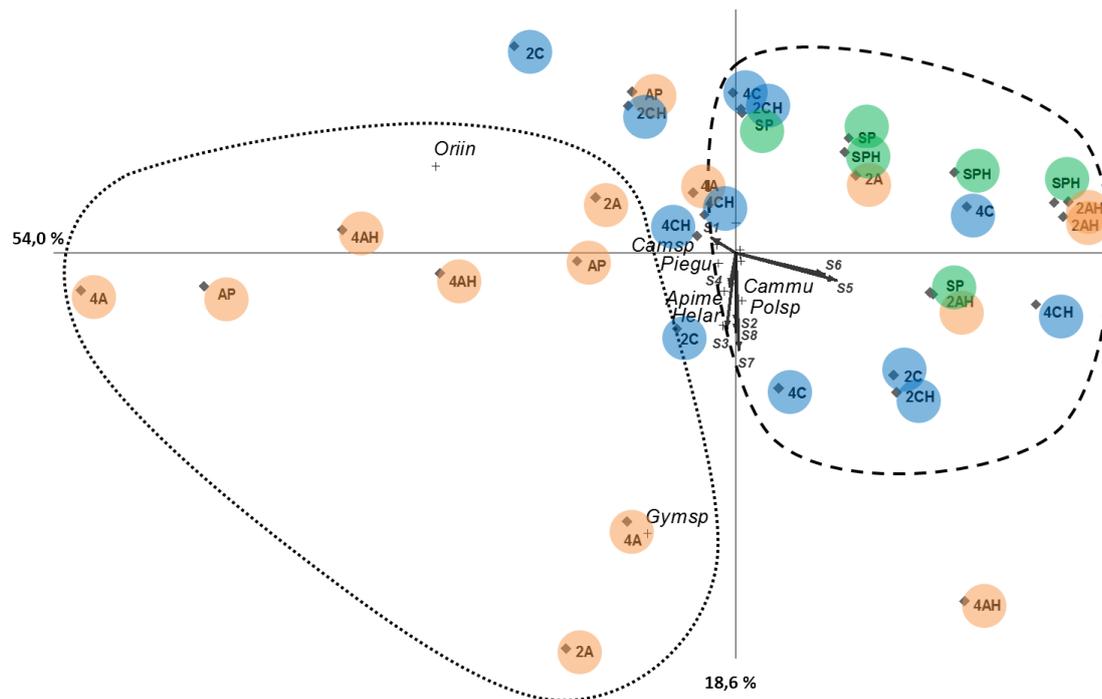


Figura 5. 3. Representación gráfica de los dos primeros ejes de ordenamiento de componentes principales, considerando los insectos como matriz principal y las señales volátiles como matriz secundaria para el año 2. Los vectores o *biplots* representan cada uno de los sensores de la e-nose.

Por su parte, el análisis del tercer año arrojó un porcentaje de varianza explicado por los tres principales ejes de 52,4%. El eje 1 explica un 21,2%, mientras que los ejes 2 y 3 explican un 16,7 y 14,4%, respectivamente. El eje 1 mostró un contraste entre los tratamientos con altas densidades de *A. annua* asociado con los insectos *Gymnopterus* sp. y *V. ruralis* (parte derecha del diagrama, línea sólida), los tratamientos con *C. album* y de soja pura, asociados al insecto *A. mellifera* (parte baja-derecha del diagrama, línea segmentada) y los tratamientos con baja densidad de *A. annua* asociado con Hemiptera 1, Hymenoptera 1 y *Polistes* sp (parte baja-izquierda del diagrama, línea punteada). Las principales variables explicatorias de las comunidades de insectos fueron los sensores 7 y 8 para el eje 1 ( $r = 0,38$  y  $r = 0,32$ , respectivamente), y los sensores 5 y 7 para el eje 2 ( $r = -0,20$  y  $r = -0,17$ , respectivamente) (Figura 5. 4).



*album*, el grupo A, por especies que estuvieron presentes solo en tratamientos con *A. annua* y el grupo R por especies presentes en tratamientos con soja pura y en mezclas con *A. annua*.

En el año 2, se muestrearon un total de 178 insectos pertenecientes a 13 morfoespecies distintas. La estructura funcional fue 31% herbívoros y 69% no herbívoros. En el año 3, se muestrearon un total de 52 insectos pertenecientes a 25 morfoespecies distintas. La estructura funcional fue 20% herbívoros y 80% no herbívoros. En ambos años, los insectos asociados a los tratamientos con *A. annua* fueron principalmente no herbívoros, mientras que los herbívoros estuvieron asociados a los tratamientos con *C. album* y soja pura (Cuadro 5. 1 y Cuadro 5. 2).

Cuadro 5. 1. Grupo, orden, familia, función, especie y constancia de insectos que visitaron los diferentes tratamientos durante el año 2.

Grupo	Orden	Familia	Función	Especies	Cod	Tratamientos											
						A. annua					C. album					Soja	
						2A+H	2A	4A+H	4A	2C+H	2C	4C+H	4C	SP+H	SP		
											Constancia (%)						
	HEM	Anthororidae	nh/h	<i>Orius insidiosus</i>	Oriin	33	100	66	100	100	100	66	100	66	100		
	DIP	Dolichopodidae	nh	<i>Gymnopterus</i> sp.	Gymsp	33	66	100	100	33	66	100	33	33	33		
	HYM	Vespidae	nh	<i>Polistes</i> sp.	Polsp	66	66	66	66	66	33	33	66	66	66		
G	COL	Coccinellidae	nh	<i>Coleomegilla quadrifasciata</i>	Colqu	33	33	33	33	33	66	33	33	33	33		
	COL	Chrysomelidae	h	<i>Lema bilineata</i>	Lembi	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33		
	HYM	Halictidae	nh	<i>Augochlora/Augochloropsis</i>	Augsp	33	33	33	100	66	66	33	33	33	33		
	HYM	Apidae	nh	<i>Apis mellifera</i>	Apime		100	33	33	33		33	33	66	66		
	HYM	Scoliidae	nh	<i>Campsomeris</i> sp.	Campsp	33	33	33	33	33		33	33	33	33		
M	LEP	Noctuidae	nh	<i>Helicoverpa armigera</i>	Helar	33	33	33	33	33		33	33				
C	COL	Curculionidae	h	<i>Anthonomus grandis</i>	Antgr								33				
	HEM	Pentatomidae	h	<i>Piezodorus guildinii</i>	Piegu				33								
A	HYM	Formicidae	h	<i>Camponotus mus</i>	Cammu	33											
ARA	Dictynidae	nh	Morphospecie 1	Ara1	33												
<b>Riqueza total</b>						7	8	7	10	5	4	7	8	5	5		
<b>Riqueza de no herbívoros</b>						6	7	7	8	5	4	6	6	4	4		

Cuadro 5. 2. Grupo, orden, familia, función, especie y constancia de insectos que visitaron los diferentes tratamientos durante el año 3.

Grupo	Orden	Familia	Función	Especies	Cod	Tratamientos											
						A. annua					C. album					Soja	
						2A+H	2A	4A+H	4A	4A	2C+H	2C	4C+H	4C	4C	SP+H	SP
Constancy (%)																	
G	DIP	Dolichopodidae	nh	<i>Gymnopterus</i> sp.	Gymsp			66	33		33	33	33	33	33	33	
	HYM	Apidea	nh	<i>Apis mellifera</i>	Apime	33					33	66	33	33	66	33	
M	DIP	Chloropidae	nh	Morphospecie 3	Dip1	33	33				33						
	DIP	Tachinidae	nh	<i>Voria ruralis</i>	Vorru			33	33		33			33			
HEM		Aphidoidea	h	Morphospecie 1	Hem1			66								33	
	HEM	Nabidae	nh	<i>Tropiconabis</i> sp.	Trosp						33						
COL		Chrysomelidae	h	<i>Lemna quadrivittata</i>	Lemqu						33						
	HYM	Sarcophagidae	nh	<i>Oxysarcodexia</i> sp.	Oxysa						33						
HYM		Sphécidae	nh	Morphospecie 8	Hym2						33						
	HYM	Tenthredinidae	nh	Morphospecie 9	Hym3						33					33	
HYM	Ichneumonidae	nh	<i>Campoletis</i> sp.	Campsp							33					33	
HYM		Halictidae	nh	Morphospecie 4	Hym1	33	33										
	HYM	Vespidae	nh	<i>Polistes</i> sp.	Polsp						33						
DIP		Muscidae	nh	<i>Musca domestica</i>	Musdo						33						
	LEP	Pyralidae	nh	<i>Elasmopalpus lignocellus</i>	Elali											33	
HYM		Braconidae	nh	<i>Aleiodes</i> sp.	Alesp						33						
	HOM	Cicadellidae	h	<i>Bucephalagonia xanthophis</i>	Bucxa						33						
DIP			nh	Morfotipo 5	Dip3						33						
	DIP	Dolichopodidae	nh	<i>Condylastylus</i> sp.	Consp						33						
COL		Chrysomelidae	h	<i>Diabrotica speciosa</i>	Diasp						33						
	DIP	Halictidae	nh	<i>Augochlora/Augochloropsis</i>	Augsp						33						
DIP		Calliphoridae	nh	Morphospecie 7	Dip4						33						
	COL	Carabidae	nh	<i>Pterostichini</i> sp.	Ptesp											33	
DIP		Tipulidae	h/nh	Morphospecie 2	Dip1						33					33	
	HEM	Lygaeidae	h	<i>Nysius similans</i>	Nyssi						33					33	
<b>Riqueza total</b>						3	6	6	7	0	9	3	5	3	3	3	
<b>Riqueza de no-herbívoros</b>						3	4	5	6	0	8	3	4	3	4	2	2

### 5.2.3 Riqueza de insectos

Al igual que en los resultados mostrados en capítulos anteriores, no se encontraron diferencias asociadas al tratamiento de herbivoría. Por tanto, a continuación se muestran resultados de los tratamientos agrupados por tipo de maleza acompañante.

En relación al efecto de las combinaciones cultivo – maleza - herbivoría sobre la riqueza de insectos en general, y de herbívoros y no herbívoros en particular, se encontraron diferencias asociadas a la presencia de malezas acompañantes. Los resultados de riqueza de insectos y riqueza de no herbívoros mostraron una tendencia similar en las campañas analizadas. Consistentemente se observó que el tratamiento de monocultura de soja presentó menor riqueza de insectos, además la riqueza de no herbívoros fue siempre mayor a la de herbívoros.

En el primer muestreo del año 1, los resultados mostraron diferencias significativas en cuanto a la riqueza total de insectos ( $p=0,01$ ). El tratamiento con bajas densidades de la maleza *A. annua* (2A) presentó mayor riqueza con un valor medio de 5,8 insectos, mientras que la monocultura de soja (SP) presentó la menor riqueza, con un valor medio de 1,8 insectos. Estas diferencias en riqueza total, estuvieron asociadas particularmente a las diferencias en la riqueza de herbívoros (Figura 5. 5).

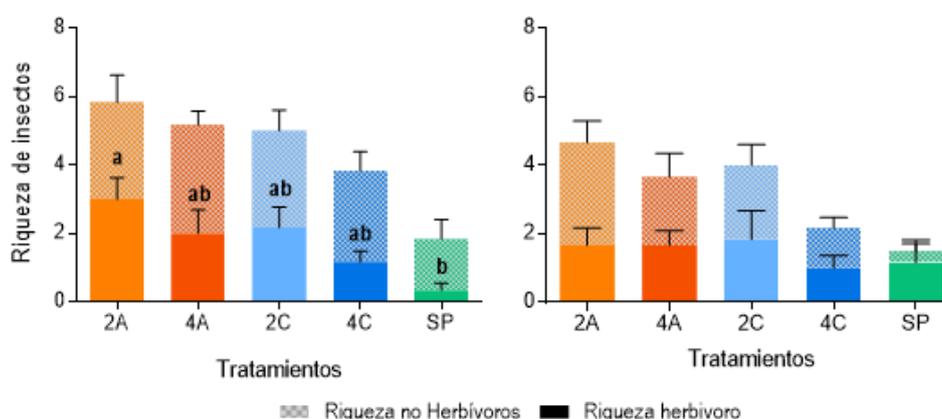


Figura 5. 5. Riqueza total de insectos obtenida de dos relevamientos durante la campaña 2011-2012 (Año 1). Muestreo 1 - 19/03 (izquierda) y muestreo 2 – 24/03 (derecha). La sección lisa de las barras representa los insectos herbívoros y la sección rayada los no herbívoros. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ). Las barras representan el error estándar de la media.

En los dos primeros muestreos del año 2, los resultados también mostraron diferencias significativas en cuanto a la riqueza total de insectos ( $p=0,02$  y  $p=0,05$ , respectivamente). En ambos muestreos el tratamiento con altas densidades de la maleza *A. annua* (4A) presentó mayor riqueza con valores medios de 5 y 3,6 insectos para los muestreos 1 y 2, respectivamente. Mientras que la monocultura de soja (SP) presentó la menor riqueza, con valores medios de 2,5 y 1,6 insectos, respectivamente. En el muestreo 1, las diferencias en riqueza total, estuvieron asociadas particularmente a las diferencias en la riqueza de no herbívoros (Figura 5. 6).

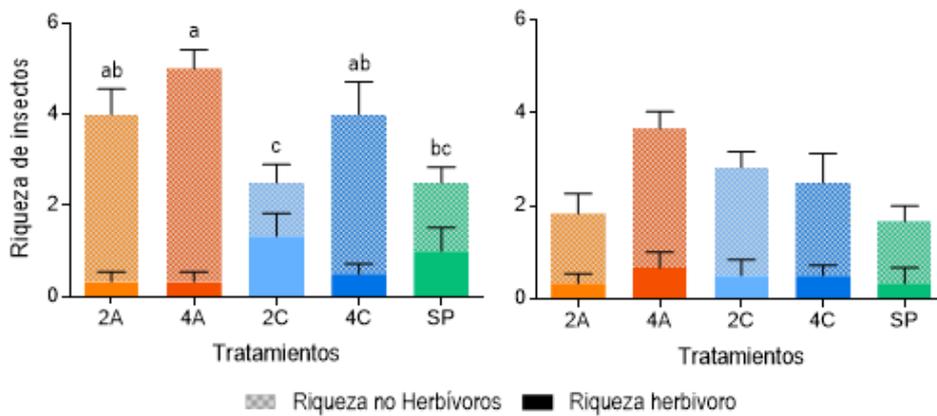


Figura 5. 6. Riqueza total de insectos obtenida de dos relevamientos durante la campaña 2012-2013 (Año 2). Muestreo 1 – 08/04 (izquierda) y muestreo 2 – 10/04 (derecha). La sección lisa de las barras representa los insectos herbívoros y la sección rayada los no herbívoros. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Las barras representan el error estándar de la media.

En el año 3, a pesar de que los resultados no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) la tendencia fue similar. Además, se observó mayor riqueza en general en el muestreo 2, con respecto al muestreo 1 (Figura 5. 7).

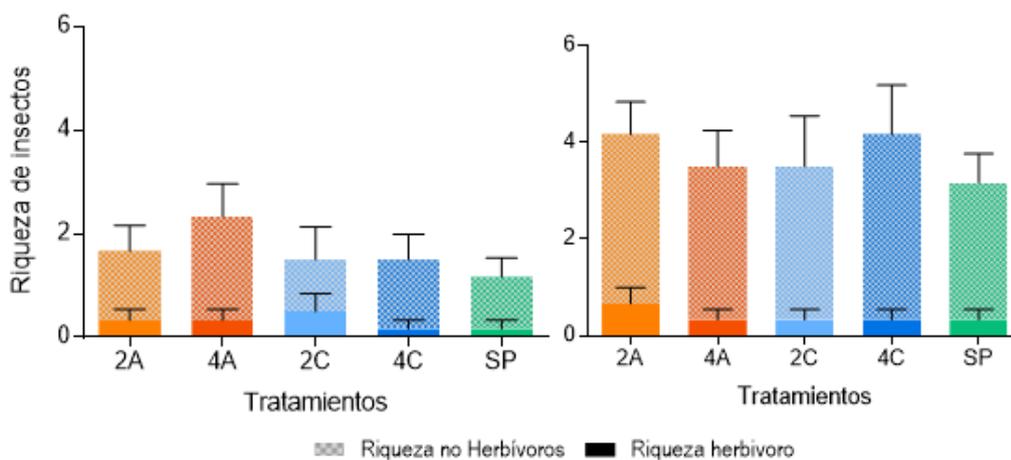


Figura 5. 7. Riqueza total de insectos obtenida de dos relevamientos durante la campaña 2013-2014 (Año 3). Muestreo 1 – 18/04 (izquierda) y muestreo 2 – 24/04 (derecha). La sección lisa de las barras representa los insectos herbívoros y la sección rayada los no herbívoros. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Las barras representan el error estándar de la media.

#### 5.2.4 Señales químicas (huellas olfativas) presentes en el sistema

En relación al efecto de las combinaciones cultivo – maleza - herbivoría sobre las señales químicas del sistema, se encontraron distintas huellas olfativas dependiendo del momento ontogénico del cultivo, de la maleza acompañante y de la densidad de la misma. No se encontraron diferencias con respecto al tratamiento de herbivoría.

Durante las tres campañas analizadas las huellas olfativas presentaron un patrón asociado a los tratamientos con un rango de valores similar entre años (entre 0,8 y 2). Las principales diferencias estuvieron asociadas a variaciones de los sensores 1, 5, 6, 7 y 8, sin embargo el ranking de tratamientos no se mantuvo igual en cada sensor de la “e-nose”. Es decir, cada sensor mide compuestos o “blends” distintos y a su vez, cada combinación cultivo – maleza – herbivoría emite señales químicas diferentes.

Con respecto a la fenología del cultivo, se pudo observar que tanto la composición como la concentración de los distintos compuestos volátiles que emiten las plantas dentro del sistema, presentan variaciones a lo largo del ciclo. Por ejemplo, al

analizar el conjunto de huellas olfativas dentro de un mismo año, se observó que las señales captadas por la “e-nose” variaron dependiendo del momento ontogénico del cultivo. En el caso específico del año 1, si bien se observó un patrón similar en las distintas mediciones, algunos sensores registraron cambios significativos dependiendo del estado del cultivo. El sensor 1 en floración (R1), registró mayor concentración de señales ( $>1,2$ ), mientras que en R4 y R6 registró señales en un orden de magnitud mucho menor (cercano a 1). Lo contrario sucedió con los sensores 5 y 6, que captaron más señales en R4 y R6 (cercano a 2) que en R1 ( $< 1,2$ ) (Figura 5. 8).

Con respecto a la maleza acompañante, dentro del conjunto de “blends” que capta la “e-nose”, en general no se observó ninguna combinación específica de cultivo-maleza que haya mostrado de forma consistente una emisión de señales significativamente mayor al resto. Es decir, en algunos casos los sensores captaron más señales provenientes de los tratamientos con monocultura de soja (SP), en otros casos de los tratamientos soja + *C. album*, y en otros las mezclas con *A. annua* generaron mayor emisión de señales. Las principales variaciones estuvieron relacionadas con la densidad. Por ejemplo, en floración (R1), en el año 1, los sensores 5 y 6 registraron más señales provenientes de los tratamientos con baja densidad (2A y 2C) y en el año 2 las señales fueron ligeramente mayores en los tratamientos con alta densidad (4A y 4C). En ambos años, los sensores 5, 7 y 8 asociados a *C. album* y soja pura, fueron las principales variables exploratorias en la distribución de los insectos (Figura 5. 8)

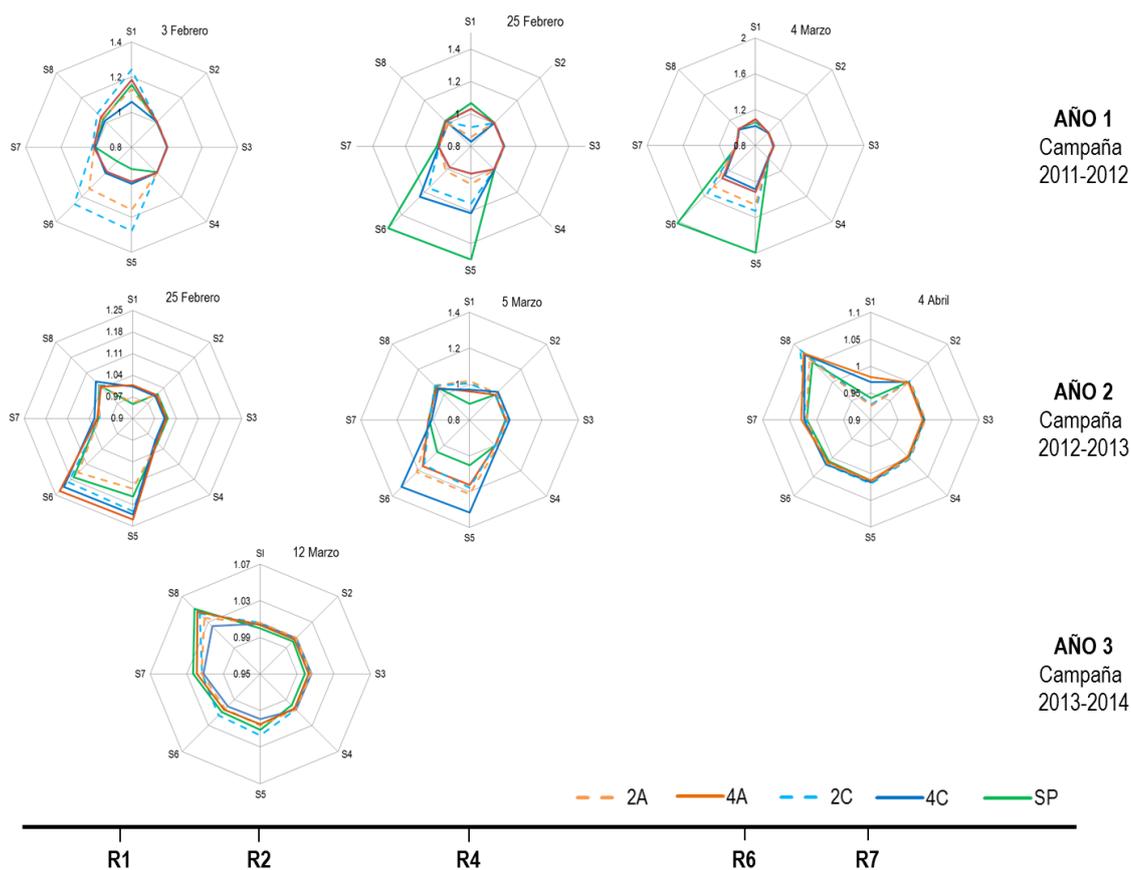


Figura 5. 8. Representación esquemática de la dinámica de las huellas olfativas presentes en el sistema en función del estado ontogénico en que se encontraba el cultivo soja en el momento de la medición durante el año 1, año 2 y año 3.

## 5.4 DISCUSION

En este capítulo se evaluó la emisión de señales químicas liberadas por el cultivo de soja puro o en mezclas con malezas productoras de metabolitos secundarios junto con la herbivoría de *A. gemmatilis*, y su relación con la comunidad de insectos. Los resultados mostraron que las señales varían dependiendo de la combinación cultivo – maleza – herbívoro, y que a su vez estas señales están asociadas a la llegada de insectos al sistema. Estas diferencias pueden estar relacionadas directamente con la presencia de las malezas acompañantes y/o por la herbivoría generada sobre el cultivo.

Con respecto a la presencia de las malezas, los resultados mostraron variaciones relacionadas con la densidad de las especies acompañantes. Se sabe que el aumento en

la diversidad de especies dentro de un sistema resulta en un conjunto de señales más complejo y diverso (Malézieux, 2012). A su vez, las señales o VOC's de una planta vecina pueden alterar el metabolismo de las plantas cercanas e inducir la producción y liberación de compuestos de defensa. Es posible que las diferencias encontradas en las señales captadas por la "e-nose" se deban a la combinación de los compuestos químicos liberados tanto por las especies de malezas acompañantes como por el cultivo. En los resultados, se observó que la generación de las huellas presenta un comportamiento dinámico y que las variaciones dependen de múltiples factores. Es decir, se mostraron diferencias con respecto a los tratamientos y al momento del ciclo, pero no se observó ningún patrón (huella olfativa) específico para cada especie de maleza presente en la mezcla. Esto podría estar relacionado a la coexistencia de diversos compuestos volátiles en el mismo sistema, ya que casi todas las plantas son capaces de liberar volátiles bajo diversas condiciones (Scala et al., 2013), y que a su vez interactúan entre sí, generando un "blend" más complejo y difícil de disociar y cuantificar a escala de campo (Cui et al., 2018).

*C. album* es una especie que produce numerosos metabolitos secundarios a pesar de no ser una típica especie aromática, ya que las aromáticas producen generalmente aceites esenciales (químicamente terpenos), resinoides, concretos, absolutos, extractos crudos o purificados, oleorresinas y exudados naturales (bálsamos y resinas). Estos metabolitos también pueden emitir olores que forman parte del "blend" de la mezcla, ya que en las huellas olfativas se observó que en muchos casos los tratamientos con *C. album* presentaron alta concentración de señales. Esto puede tener que ver con que a pesar de que algunas señales químicas pueden presentar un olor aromático fuerte, como en el caso de los volátiles liberados por la maleza aromática *A. annua*, la mayoría se presentan en concentraciones extremadamente bajas e imperceptibles para el olfato

humano (Cui et al., 2018). En algunos casos, la “e-nose” también captó altas concentraciones de señales volátiles en los tratamientos con *A. annua*, pero en menor medida que los tratamientos con *C. album* (Figura 5. 8).

En cuanto al efecto de la herbivoría, se mostró que en la mayoría de las huellas olfativas la concentración de señales químicas captadas por algunos de los sensores de la “e-nose” aumentó cuando estuvo presente el tratamiento herbivoría (Figura 5. 8). Esto podría estar explicado por la activación del sistema de defensa indirecta del cultivo luego de la herbivoría de *A. gemmatalis*, a través de la liberación de compuestos químicos que atraen insectos benéficos. Se sabe que las plantas responden a la herbivoría produciendo una combinación de volátiles que no solo difieren en la abundancia, sino más importante aún en la composición del “blend” (Mumm y Dicke, 2010). Así como se mostró en cuanto a las defensas directas (capítulo 4), los compuestos químicos suelen actuar en conjunto y no en forma aislada. Por ejemplo, en cuanto a las defensas indirectas, los HIPV, los GLV y los VOC’s, son distintos grupos de compuestos químicos que son liberados por las plantas luego de sufrir un daño por herbivoría (Erb et al., 2015). En la actualidad, se sabe que los volátiles que emiten las plantas en respuesta al daño son liberados por más de 49 plantas pertenecientes a 25 familias (Mumm y Dicke, 2010). Además, se han identificado numerosas familias de insectos asociados a éstos compuestos, hasta ahora se conocen 24 especies (12 familias) de insectos depredadores y 34 especies (10 familias) de avispas parasitas, que son atraídas por los volátiles de plantas dañadas (Aljbory y Chen, 2018).

En cuanto a la comunidad de insectos asociada a los tratamientos, los resultados mostraron una relación entre las señales emitidas por las mezclas de soja con malezas acompañantes, y la llegada de insectos al sistema. Es decir, los insectos percibieron diferencias en las señales del sistema y respondieron de forma diferencial a los volátiles

liberados por cada tratamiento. Las principales diferencias estuvieron asociadas al tipo de maleza presente en la mezcla, específicamente la riqueza de insectos fue significativamente mayor en los tratamientos con *A. annua*. A su vez, los resultados mostraron distintos grupos de insectos asociados a las señales de cada tratamiento. Por ejemplo, en el año 2 las especies *O. insidious* y *Gymnopterus sp.* estuvieron asociadas a las señales emitidas por los tratamientos con *A. annua*; mientras que *Polistes sp.* y *C. mus* se asociaron a los tratamientos con *C. album*.

A diferencia de Luna y Sanchez (1999) y Saunders et al., (1998), que encontraron que la herbivoría de *A. gemmatalis* sobre el cultivo soja atrae una gran cantidad de insectos benéficos, los resultados de este trabajo no mostraron grupos de insectos asociados a los tratamientos con herbivoría. Al parecer las señales emitidas por el cultivo de soja en mezcla con malezas resultó más atractivo. Dentro de las especies relevadas, no se registraron las especies destacadas por Saunders et al., (1998), como los principales enemigos naturales de *A. gemmatalis* a (*Tricholabus serricorne*, *Microcharops anticarseae*, *Microcharops bimaculat*, *Apanteles sp.* y *Telomorpha sp.*)

Existen numerosos trabajos que han reportado el establecimiento de un “sistema tri-trófico” mediado a través de las señales liberadas por plantas dañadas luego de la herbívora y la llegada de enemigos naturales (Dicke, 1999). Mumm y Dicke (2010), reportaron que insectos herbívoros pertenecientes a cinco órdenes (Lepidoptera, Diptera, Thysanoptera, Coleoptera y Hemiptera) y ácaros son conocidos por generar herbivoría e inducir la síntesis de volátiles que resultan atractivos para insectos de cinco órdenes (Hymenoptera, Neuroptera, Diptera, Coleoptera, Heteroptera) y ácaros carnívoros. Los resultados de este trabajo, mostraron que los volátiles de las distintas mezclas fueron atractivos para insectos de seis órdenes (Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, Homoptera) y arañas.

Al analizar los insectos según la estructura funcional (hábito alimenticio), por una parte, se observó que del total de insectos muestreados en este trabajo la mayoría pertenecieron al grupo de los no herbívoros (>70%), es decir, llegaron de forma espontánea al sistema pero en principio no generarían un daño directo sobre el cultivo. Además, se mostró que tanto herbívoros como no herbívoros presentaron un comportamiento distinto con respecto a las señales del sistema. En todos los casos, los insectos asociados a los tratamientos de soja + *A. annua* fueron principalmente no herbívoros, mientras que los herbívoros estuvieron asociados a los tratamientos con *C. album* y soja pura. Este comportamiento podría estar asociado a que los volátiles liberados por la maleza *A. annua* tienen un efecto repelente sobre los herbívoros y atrayente de los no herbívoros (Charleston et al., 2006; Arimura et al., 2010; Lenardis et al., 2011). Mientras que las mezclas de soja + *C. album*, resultan atractivas para los insectos herbívoros ya que ambas especies representan una fuente de alimento. En el caso específico de *C. album*, existe abundante evidencia que reporta un gran número de herbívoros que se alimentan de la maleza (Harder et al., 2007; Sigsgaard et al., 2008), debido a su alto valor energético de la especie (Poonia y Upadhyay, 2015). Mientras que no existe evidencia de herbivoría sobre la especie *A. annua*.

En este trabajo las señales volátiles fueron analizadas a través de la “e-nose”, que es una herramienta que brinda valiosa información sobre el conjunto de señales presentes en un determinado sistema a pesar de no identificar el compuesto específico que capta cada sensor. Recientes estudios han logrado diferenciar plantas sanas de las infectadas solo con el uso de la nariz electrónica (Zhang et al., 2011; Cheng et al., 2017). Por su parte, Xu et al. (2014) lograron estimar el nivel de infestación de *Nilaparvata lugens* en plantaciones de arroz con el uso de la “e-nose”. En el caso específico del “blend” de olores liberado por una planta en respuesta a la herbivoría, son

mezclas complejas que a menudo están compuestas por más de 200 compuestos distintos, muchos de los cuales se presentan solo en ínfimas proporciones (Dudareva et al., 2006; Mumm y Dicke, 2010).

Por ejemplo, la maleza *C. album* es considerada de mucha importancia para el aumento de la biodiversidad (*i.e.* invertebrados y aves), ya que existen más de 26 especies de insectos asociados a la especie y sus semillas son importantes para la alimentación de más de 8 especies de aves. Además, si bien es una especie competitiva, en general 25 pl/m<sup>2</sup> generan bajas pérdida de rendimiento (5%). Por su parte, existe una comunidad de insectos asociada a la maleza aromática *A. annua* (Lenardis et al., 2011). Se sabe que los agroecosistemas diversificados tienen menos plagas generalistas o especializadas y más enemigos naturales (Malézieux, 2012; Gaba et al., 2015).

## 5.5 CONCLUSIONES

Los resultados del presente capítulo permiten extraer las siguientes conclusiones:

- i.* La generación de huellas olfativas es dinámica y varía dependiendo de la maleza que acompañe al cultivo y de su densidad, de la presencia de herbívoros y del momento del ciclo ontogénico.
- ii.* Los volátiles liberados por el cultivo de soja en respuesta a la herbivoría de *A. gemmatalis* generaron distintas huellas olfativas.
- iii.* Existe una relación entre las señales volátiles liberadas por las distintas combinaciones de cultivo - maleza – herbívoro, y la comunidad de insectos que llega al sistema.

- iv. La riqueza de insectos aumentó cuando el cultivo estuvo en mezclas con malezas acompañantes, este aumento fue significativamente mayor en mezclas con la maleza *A. annua*.

Por lo expuesto, se acepta la hipótesis 4a que plantea que “*La presencia de malezas productoras de diferentes metabolitos secundarios dentro del cultivo de soja, altera las huellas olfativas particulares cuando el cultivo crece puro y en mezclas con distintas densidades de las malezas. Las huellas olfativas son distintas dependiendo de la combinación cultivo – maleza - herbivoría y la densidad de las malezas en la mezcla con el cultivo*”, y además, se acepta parcialmente la hipótesis 4b que plantea que “*Las mezclas del cultivo de soja con malezas productoras de terpenos volátiles (soja - A. annua), al liberar señales químicas al sistema atrae a los insectos en general y los no herbívoros en particular. La riqueza de insectos en general y de no herbívoros en particular será mayor en la mezcla soja - A. annua, con respecto a la mezcla soja - C. album o a las monoculturas de soja.*”, ya que el aumento en la riqueza de insectos es independiente del tipo de maleza involucrada en la mezcla.



## **CAPÍTULO 6**

### Síntesis y discusión general

---



## 6.1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo, a través de la construcción de un esquema general del trabajo realizado, se sintetiza el marco teórico de la tesis, los objetivos pautados y los principales resultados obtenidos. Luego se discute en qué medida los resultados obtenidos permiten aceptar o rechazar las hipótesis planteadas, y se destacan los principales hallazgos en relación con el estado actual de los conocimientos, su significado agronómico y científico-tecnológico. Por último, se plantean nuevos interrogantes y líneas de investigación futuras que surgen de la tesis.

## 6.2 ESQUEMA GENERAL Y CONTRASTE DE HIPÓTESIS

Hasta el presente hay numerosos trabajos en condiciones controladas acerca de las interacciones cultivo-maleza, cultivo-herbívoro, maleza-herbívoro y cultivo-herbívoro-enemigos naturales. Sin embargo, las evidencias concretas de interacciones cultivo-maleza-herbívoro-enemigos naturales a escala de campo son aún escasas. En ese contexto, el objetivo general de esta tesis fue “*evaluar el crecimiento, la producción de compuestos de defensa y la emisión de señales del cultivo de soja puro o en mezclas con *Artemisia annua* y *Chenopodium album* y su relación con la herbivoría y supervivencia del lepidóptero *Anticarsia gemmatalis* y la comunidad de insectos asociada*”.

El cultivo de soja creciendo sólo o en mezclas con malezas productoras de metabolitos secundarios, puede sufrir distintos niveles de **daño por herbivoría**. Ante el daño, el cultivo responde a través de la activación de diferentes estrategias de defensa. Por una parte, promueve el **crecimiento compensatorio** para tolerar el daño y compensar la pérdida de tejido. Por otra parte, el cultivo cuenta con una batería de compuestos químicos que le confieren la capacidad de defenderse **directamente**, afectando el comportamiento y/o la **supervivencia** del herbívoro, o **indirectamente** a través de la emisión de **señales volátiles** que **atraen insectos benéficos** al sistema (Figura 6. 1).

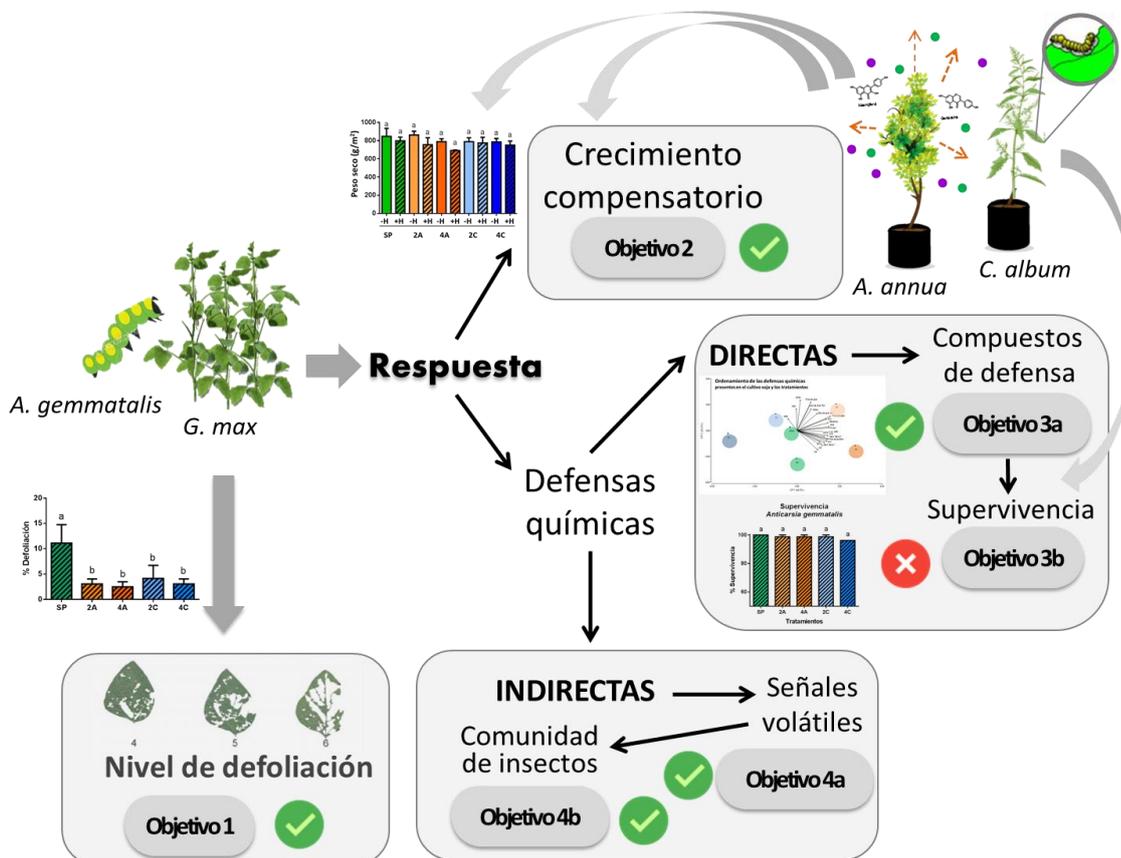


Figura 6. 1. Diagrama esquemático de los mecanismos de respuesta del cultivo soja frente a la herbivoría abarcado en la tesis, junto con los objetivos propuestos.

### **6.2.1 Objetivo 1: Evaluar la herbivoría de *A. gemmatalis* en el cultivo de soja puro o en mezclas con distintas densidades de malezas productoras de diversos metabolitos secundarios**

La herbivoría sobre el cultivo de soja, expresada como porcentaje de área foliar removida (Boito et al., 2013), fue significativamente mayor en las monoculturas de soja que en las mezclas con distintas densidades de malezas. La disminución de la herbivoría sobre el cultivo asociada directamente a la presencia de las malezas acompañantes, puede explicarse a través del efecto de dilución o por ser refugio o fuente alternativa de alimento para el insecto. Esta diferencia se observó tanto cuando la herbivoría fue generada por la introducción de la oruga defoliadora *A. gemmatalis* al sistema (Figura 2. 4), como cuando fue generada por herbivoría natural y espontánea (Figura 2. 5). En todos los casos, la presencia de malezas generó un efecto positivo, es decir, las diferencias observadas fueron independientes de la densidad de la maleza. Esto podría deberse a que las densidades exploradas no fueron lo suficientemente contrastantes. Sin embargo, las densidades utilizadas se basaron en trabajos previos donde se estudió la competencia y la alelopatía entre *A. annua* y soja de (Morvillo et al., 2011) y entre *C. album* y soja (Guglielmini, 2010) y, a pesar de ser densidades relativamente bajas (2 y 4 pl.m<sup>2</sup>), en todos los casos las plantas de las malezas superaron a las de soja.

Por lo expuesto, ya que hubo diferencias en la herbivoría entre la monocultura de soja y las mezclas con malezas pero no hubo diferencias entre las densidades de malezas utilizadas, se acepta parcialmente la **hipótesis 1** que plantea que “*La presencia de malezas productoras de distintos metabolitos secundarios dentro del cultivo, al generar un efecto de dilución denso-dependiente en el sistema, afectan la herbivoría sobre el cultivo soja. La herbivoría sobre el cultivo soja será mayor en monoculturas de*

*soja, con respecto a las mezclas con altas densidades de malezas productoras de diferentes metabolitos secundarios” (Figura 6. 1).*

### **6.2.2 Objetivo 2a: Determinar el efecto de la herbivoría de *A. gemmatalis* sobre el crecimiento en un cultivo de soja acompañado de malezas productoras de distintos metabolitos secundarios**

El cultivo de soja respondió a la herbivoría a través de distintos mecanismos vinculados al crecimiento. Por una parte, se observó una respuesta compensatoria ya que no hubo diferencias significativas en cuanto a biomasa, rendimiento, peso y número de granos y altura y número de ramas por planta, a pesar de las diferencias en la defoliación por efecto de la herbivoría en ninguno de los casos (Figura 3. 7, Figura 3. 8, Figura 3. 9 y Figura 3. 10, respectivamente). Además, la respuesta compensatoria se confirmó a través del análisis del cambio relativo en la producción de biomasa total (RCT), donde los valores cercanos a 0 indicaron la compensación del cultivo soja (Figura 3. 6 y Figura 6. 1).

La respuesta compensatoria del cultivo de soja frente a la herbivoría generada por *A. gemmatalis* es independiente del tipo de maleza acompañante y de su densidad. Por lo tanto, se acepta parcialmente la **hipótesis 2a** que plantea que “*El crecimiento compensatorio en respuesta a la herbivoría es estimulado en presencia de plantas que emiten señales volátiles. El crecimiento compensatorio del cultivo de soja en respuesta a la herbivoría de A. gemmatalis será mayor en mezcla con A. annua, con respecto a la monocultura de soja o a las mezclas con C. album” (Figura 6. 1).*

### **6.2.3 Objetivo 2b: Evaluar la relación competitiva entre el cultivo de soja y las malezas acompañantes en respuesta a la herbivoría de *A. gemmatalis*.**

Los resultados obtenidos a partir del análisis bivariado mostraron la existencia de complementariedad en el uso de los recursos entre el cultivo soja y *A. annua*, indicando que la mezcla con la maleza fue más productiva que la monocultura. El cultivo y la maleza *A. annua* no compitieron por recursos del suelo porque el agua fue suplementada y las malezas estaban en macetas, pero además a pesar del gran porte de las plantas no compitieron plenamente por la radiación (Figura 3. 11).

Por lo tanto, se acepta la **hipótesis 2b** que plantea que “*La relación competitiva del cultivo de soja - malezas acompañantes en respuesta a la herbivoría de A. gemmatalis es amortiguada en presencia de especies poco competitivas. La relación competitiva del cultivo de soja en mezcla con A. annua en respuesta a la herbivoría de A. gemmatalis será incompleta o de tipo complementaria*” (Figura 6. 1).

### **6.2.4 Objetivo 3a: Determinar el efecto de la herbivoría de *A. gemmatalis* sobre la producción de compuestos de defensa del cultivo de soja acompañado de malezas productoras de distintos metabolitos secundarios**

Con respecto a las defensas químicas, se observó que el cultivo de soja respondió al daño a través de la inducción de compuestos de defensa. Los resultados mostraron una relación positiva entre un “blend” de compuestos de defensa y la presencia de la maleza *A. annua*, y una relación negativa o neutra con la presencia de *C. album* y la monocultura de soja (Figura 4. 5 y Figura 4. 6). Los diferentes compuestos que componen los “blends”, mostraron una tendencia a aumentar en presencia de la maleza *A. annua* (tratamientos 4A y 2A), estas correlaciones podrían estar relacionadas

con el efecto de los volátiles liberados por la maleza sobre el sistema de defensa del cultivo soja.

Las variaciones en las defensas del cultivo estuvieron asociadas a los cambios en el ambiente y no al daño generado por *A. gemmatalis*, ya que las variables evaluadas mostraron que las diferencias estuvieron asociadas a la presencia de las malezas dentro del sistema y/o a su densidad, y no con el tratamiento de herbivoría. Estas diferencias no se observaron al analizar separadamente el contenido de fenoles totales (Figura 4. 10), y la capacidad antioxidante (Figura 4. 11). Los resultados mencionados refuerzan la idea de que los compuestos químicos de plantas en general, y los de defensa en particular, suelen actuar en forma conjunta. Asimismo, la interacción de estos compuestos químicos con el resto de los componentes del sistema (*i.e.* plantas vecinas, insectos, aves) también suele presentarse como un “blend” de compuestos (Ćavar et al., 2012).

Por lo tanto, se acepta la **hipótesis 3a** que plantea que “*La producción de compuestos de defensa en respuesta a la herbivoría es estimulada en presencia de plantas productoras de terpenos que emiten señales volátiles. La producción de compuestos de defensa en soja como respuesta a la herbivoría de A. gemmatalis será mayor en mezclas con A. annua, con respecto a la monocultura de soja o a las mezclas con C. album*” (Figura 6. 1).

### **6.2.5 Objetivo 3b: Evaluar la supervivencia de *A. gemmatalis* en el cultivo de soja puro o en mezclas soja - *A. annua* y soja - *C. album***

La relación positiva entre los compuestos de defensa del cultivo soja y la presencia de la maleza *A. annua* (Figura 4. 5 y Figura 4. 6), pueden explicar las diferencias en el nivel de defoliación encontradas (Capítulo 2). Sin embargo, el aumento

del “blend” de compuestos de defensas asociado a los tratamientos con *A. annua* (2A y 4A) no conllevó a disminuciones en la tasa de supervivencia del herbívoro (Figura 4. 12). Los resultados encontrados en la supervivencia de *A. gemmatalis* pueden estar relacionados con el tiempo de muestreo, a pesar de que 24hrs es tiempo suficiente para desencadenar la respuesta y la síntesis de compuestos de defensa (Woldemariam et al., 2011), quizá no fue suficiente para evidenciar su efecto sobre la supervivencia del insecto. Asimismo, también puede deberse a que estos compuestos de defensa relacionados con la maleza *A. annua* tienen efecto sobre el comportamiento del insecto (consumo, crecimiento, movilidad) como se desprende de la mayor defoliación observada en el cultivo puro y no directamente sobre la supervivencia.

Por lo tanto, se rechaza la **hipótesis 3b** que dice que “*La supervivencia de A. gemmatalis está condicionada por la acción de las defensas producidas por el cultivo, que a su vez son estimuladas por las señales volátiles emitidas por plantas productoras de terpenos. La supervivencia de A. gemmatalis será menor cuando el cultivo esté en mezclas con A. annua, con respecto a la monocultura de soja o a las mezclas con C. album*” (Figura 6. 1).

#### **6.2.6 Objetivo 4: Evaluar la comunidad de insectos y su relación con las señales químicas emitidas por el cultivo de soja puro o en mezclas con malezas productoras de metabolitos secundarios junto con la herbivoría de *A. gemmatalis*.**

Los resultados mostraron distintas huellas olfativas relacionadas a las diferentes combinaciones cultivo – maleza - herbivoría (Figura 5. 8), lo cual podría asociarse al conjunto de señales volátiles o “blend” generado por cada combinación en el momento de muestreo. Las huellas olfativas presentan un patrón similar, sin embargo, se aprecian variaciones con respecto al estado ontogénico (Fehr et al., 1977), al tipo de

maleza acompañante, a la densidad y al tratamiento de herbivoría. Estos resultados coinciden con lo propuesto por Maffei (2010), que señala que los compuestos orgánicos volátiles (VOC, en inglés) varían en su concentración y composición según el tipo de planta, su estado sanitario (*i.e.* enfermedad, defoliación) y por los demás componentes del sistema presentes (*i.e.* insectos, aves, patógenos). Además, Heil y Kost (2006) y (Heil, 2010a) muestran que las huellas olfativas generadas por un cultivo en un determinado agroecosistema puede verse afectado cuando las plantas que acompañan al cultivo emiten distintos compuestos volátiles.

Por lo tanto, se acepta la **hipótesis 4a** que plantea que “*La presencia de malezas productoras de diferentes metabolitos secundarios dentro del cultivo de soja, altera las huellas olfativas particulares cuando el cultivo crece puro y en mezclas con distintas densidades de las malezas. Las huellas olfativas son distintas dependiendo de la combinación cultivo – maleza - herbivoría y la densidad de las malezas en la mezcla con el cultivo*” (Figura 6. 1).

A su vez, estas diferencias en las huellas olfativas generaron distintas comunidades y riquezas de insectos. Se observó mayor riqueza de insectos cuando el cultivo de soja estuvo en mezclas con malezas acompañantes, siendo a su vez mayor la riqueza de no herbívoros que la de herbívoros (Cuadro 5. 1 y Cuadro 5. 2). Además, de acuerdo a la estructura funcional de los insectos, el análisis multivariado mostró una relación positiva entre la riqueza de insectos no herbívoros y la presencia de la maleza *A. annua*, y entre la riqueza de herbívoros y la presencia *C. album* y la monocultura de soja y (Figura 5. 3 y Figura 5. 4). La llegada de insectos a un determinado sistema responde a estímulos químicos volátiles que brindan información sobre el lugar, en cuanto a alimento, huésped o refugio. Este estímulo puede ser generado de forma constitutiva por una especie (*i.e.* planta aromática) o bien puede ser inducido como

respuesta a un daño por herbivoría a través de una defensa indirecta de la planta dañada (Moraes et al., 2005; Heil y Kost, 2006; Turlings y Ton, 2006; Baldwin, 2010). Woldemariam et al. (2011) señalan que los volátiles liberados por las plantas en respuesta a la herbivoría (*i.e.* HIPV, GLV) representan una respuesta temprana dentro del plan de ataque al herbívoro, ya que se generan de forma inmediata. Sin embargo, los resultados no mostraron comunidades de insectos asociados al tratamiento de herbivoría, al parecer las señales emitidas por el cultivo de soja en mezcla con malezas resultó más atractivo. Esto puede estar relacionado con el efecto dilución generado por las malezas sobre la concentración del cultivo en el sistema (Bernays y Chapman, 1994; Norris y Kogan, 2000, 2005), ya que a su vez no hubo diferencias significativas en cuanto a la riqueza de insectos entre especies de malezas.

Por lo tanto, se acepta parcialmente la **hipótesis 4b** que plantea que “*Las mezclas del cultivo de soja con malezas productoras de terpenos volátiles (soja - A. annua), al liberar señales químicas al sistema atrae a los insectos en general y los no herbívoros en particular. La riqueza de insectos en general y de no herbívoros en particular será mayor en la mezcla soja - A. annua, con respecto a la mezcla soja - C. album o a las monoculturas de soja*”, ya que el aumento en la riqueza de insectos es independiente del tipo de maleza involucrada en la mezcla.

## 6.3 CONTRIBUCIÓN AL AVANCE DEL CONOCIMIENTO

### 6.3.1 Interacción cultivo - malezas – herbívoro

- *Mezclas con malezas como una interacción “complementaria” en lugar de “competitiva”, aun cuando la herbivoría esté presente.* Los resultados mostraron que el cultivo de soja en mezcla con la maleza *A. annua*, lejos de establecer una relación

puramente competitiva que impacta negativamente en el rendimiento del cultivo, tuvo complementariedad en el uso de los recursos, específicamente de la radiación (Figura 3. 11). El efecto positivo de la mezcla fue mayor cuando el tratamiento de herbivoría estuvo presente (Figura 2. 6 y Figura 2. 7).

- *Análisis de interacciones entre niveles tróficos de tipo “Bottom-up” y “Top-Down”, no solo en términos ecológicos sino también agronómicos en condiciones de campo.* Existen pocos trabajos que reporten el efecto de distintas combinaciones tróficas (cultivo-maleza-herbívoro) sobre otros componentes del sistema a través de los procesos herbivoría, competencia y alelopatía. Por una parte, los resultados mostraron distintas comunidades de insectos asociadas a las diferentes combinaciones cultivo-maleza-herbívoro (Cuadro 5. 1 y Cuadro 5. 2), destacando que la utilización de diferentes especies dentro de un sistema puede impactar positivamente en las comunidades de insectos benéficos (bottom up) y, favorecer la biodiversidad del sistema. A su vez, los resultados sugieren que la llegada de estos insectos podría estar relacionada con la disminución de la herbivoría cuando el cultivo estuvo en mezcla (Figura 2. 4 y Figura 2. 5), reduciendo la pérdida de rendimiento del cultivo de soja (Figura 2. 7).
- *Rol positivo de las malezas, en aspectos tanto ecológicos como productivos.* La presencia de las malezas en un cultivo está frecuentemente asociada a su efecto negativo (competencia con el *cultivo*, pérdida de rendimiento, disminución de la calidad del producto cosechado, huéspedes de patógenos). En esta tesis se ha demostrado que las densidades exploradas de las malezas *A. annua* y *C. album* no generan disminuciones significativas en el rendimiento del cultivo de soja, que su

presencia aumenta la biodiversidad del sistema productivo, y que esto a su vez impactaría sobre los servicios del agroecosistema (Malézieux et al., 2009; Malézieux, 2012; Gaba et al., 2015). En un sistema donde la maleza interactúe con el cultivo y a su vez represente una alternativa productiva (policultivo), se obtendrían además beneficios tanto ecológicos como productivos.

Estos resultados son muy importantes en el marco de la ciencia y del manejo sustentable de adversidades, dado que la mayoría de los trabajos (Radosevich et al., 2007; Zimdahl, 2007; Booth et al., 2013) y de las creencias de los asesores y productores (Scursoni et al., 2019), consideran que la sola presencia de malezas es negativa para el cultivo, ya que es inherente a la definición de maleza (Zimdahl, 2007). Sin embargo, este trabajo, destaca que la presencia de algunas malezas no afecta el rendimiento y es positiva para reducir la defoliación en condiciones de campo. Este resultado es muy importante desde el punto de vista de aumentar la tolerancia de malezas dentro del cultivo como parte del manejo de adversidades.

### **6.3.2 Respuestas del cultivo soja**

*Evidencias que refuerzan la teoría de la capacidad compensatoria del cultivo.*

Hasta el momento la mayoría de los trabajos se refiere a la capacidad compensatoria del cultivo de soja en respuesta a la herbivoría. En esta tesis se evaluó el efecto en conjunto de la herbivoría y la competencia con malezas acompañantes y los resultados mostraron que, frente al “dilema de las plantas de crecer o defenderse”, el cultivo de soja fue capaz de sostener su capacidad de compensar el crecimiento frente al daño por herbivoría a pesar de estar en presencia de malezas acompañantes (Figura 3. 6). Estos resultados coinciden con (Fehr et al., 1977; Saito et al., 1983; Haile et al., 1998) en cuanto al

mecanismo de crecimiento compensatorio del cultivo de soja frente a la herbivoría, pero aportan evidencias nuevas acerca de que el efecto no está sólo asociado a la herbivoría sino también a la presencia de malezas productoras de terpenos volátiles como *A. annua* y de otras especies que producen otros metabolitos como *C. album* que pueden ser señales igualmente eficaces.

*Evidencia de la producción diferencial de compuestos de defensa en presencia de malezas.* Al igual que en el apartado anterior, la evidencia existente hasta el momento da muestra del comportamiento de las defensas químicas del cultivo de soja en respuesta al daño por herbivoría. Sin embargo, los resultados de esta tesis muestran que las defensas químicas del cultivo de soja también pueden ser inducidos por la presencia de especies acompañantes dentro del sistema (Figura 4. 5 y Figura 4. 6). A su vez, la mayoría de los trabajos que evalúan las defensas químicas, son estudios realizados en condiciones controladas donde por lo general, los compuestos son analizados de forma aislada. En esta tesis se ha avanzado en la obtención de evidencia que reafirma la importancia de la realización de ensayos a campo, ya que la información obtenida en laboratorio no siempre puede ser extrapolada a escala de agroecosistema. Además, los resultados de esta tesis han demostrado que algunos compuestos químicos responden, o se inducen en conjunto (“blend”) y no de forma aislada. Estos resultados son relevantes para la ciencia en general y para el manejo del cultivo de soja en particular, ya que si bien la composición química de los compuestos analizados fue similar al comparar distintas mezclas cultivo – maleza, la producción relativa de determinados grupos de compuestos de defensa estuvo muy ligada a las características y densidades de las plantas acompañantes.

### **6.3.3 Relación entre las señales volátiles y la comunidad de insectos**

La liberación de compuestos volátiles en respuesta a algún daño para atraer enemigos naturales (defensas indirectas), ha sido ampliamente estudiada y documentada, sin embargo, hay menos evidencias acerca de la atracción de insectos benéficos al sistema por efecto de los volátiles liberados por una especie de forma constitutiva. Además, la evidencia existente señala que la combinación del cultivo de soja y el herbívoro *A. gemmatilis* atrae una gran cantidad de insectos benéficos (Luna y Sanchez, 1999). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la combinación de los volátiles liberados por el cultivo junto a las malezas estudiadas, tienen un efecto mayor en la atracción de insectos benéficos aun en ausencia de herbívoros. Si bien otros trabajos relacionaron en condiciones controladas la producción de señales y su relación con los herbívoros y enemigos naturales (Turlings et al., 1990; Zavala y Baldwin, 2004; Kessler et al., 2006; Glinwood et al., 2011; Erb et al., 2015), es la primera vez que se miden las huellas olfativas del cultivo de soja en presencia de herbívoros y malezas a campo y se encuentran relaciones con la comunidad de insectos. Esto es muy relevante para la ciencia en general y para el manejo del cultivo de soja en la Argentina en particular, ya que es el cultivo más importante del país por la superficie que abarca y la cantidad de insumos que utiliza (Anón, 2015; Secretaría de Agricultura, Ganadería, 2016), y de este modo se abre una ventana de posibilidades para realizar un manejo más sustentable potenciando los servicios ecosistémicos que brinda este cultivo y sus malezas.

## **6.4 APLICACIÓN**

### **6.4.1 Inter-cultivos**

- Como se describió en el punto 6.3.1, algunos de los aspectos positivos de la maleza *A. annua* asociados a la implementación de un sistema productivo donde se tolere la presencia de esta maleza o se la produzca como cultivo industrial para la obtención de insumos destinados a la industria farmacéutica y de aceites esenciales. Por lo tanto, se puede pensar en la búsqueda de un sistema productivo que combine algún cultivo tradicional primavero-estival como la soja, el girasol o el maíz con la maleza *A. annua*. Por ejemplo, se podría incluso diseñar un manejo extensivo que contemple el establecimiento de franjas de la maleza, ya sea de forma alternada junto con el cultivo o en las borduras del campo.
- También se podría contemplar la posibilidad de tolerar a *C. album* como malezas en el cultivo o explorar policultivos con una especie emparentada de alto valor agronómico como *C. quinoa*.

#### **6.4.2 Utilización de compuestos químicos de la maleza *A. annua***

- Existe abundante información sobre las características químicas de la especie *A. annua*, y su utilización tanto en la industria farmacéutica para el control de enfermedades como la malaria (Ferreira et al., 2013), como en la industria para la obtención de aceites esenciales (Perazzo et al., 2003; Bilia et al., 2014). Sin embargo, los resultados de esta tesis plantean la posibilidad de utilizar los compuestos químicos de esta maleza dentro del plano agrícola. Por ejemplo, se podría pensar en formular nuevos productos químicos que puedan ser utilizados en el manejo de herbívoros para limitar la defoliación o para la atracción de insectos benéficos y de ese modo potenciar los mecanismos de regulación natural de plagas en los sistemas productivos. Al ser de origen natural, estos productos podrían ser utilizados dentro de plantaciones orgánicas o agroecológicas.

### 6.4.3 Umbrales de daño

- Las nuevas relaciones descritas en esta tesis, y su modulación por parte de la presencia de las malezas acompañantes, podrían ser incorporadas en la reformulación de los umbrales de daño utilizados actualmente por los productores, en función de la abundancia de malezas. En primera instancia deberían ser verificados dependiendo de la comunidad de malezas presente en cada lote donde se realice el monitoreo, y luego deberían ser vinculadas al posible efecto positivo de algunas malezas sobre la comunidad de insectos benéficos, y así permitir la coexistencia del cultivo con algunas malezas, reducir la aplicación de insecticidas y aumentar la biodiversidad del sistema

## 6.5 NUEVOS INTERROGANTES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

- Aislar e identificar los compuestos químicos presentes en la maleza *A. annua* que están vinculados en la inducción de defensas del cultivo de soja y en la atracción de insectos benéficos.
- Evaluar si la presencia de malezas acompañantes además de inducir de compuestos de defensa en respuesta a la herbivoría, tiene un efecto pre-inductor (priming) en la respuesta defensiva de la planta. Sería factible determinar si la presencia de la maleza tiene un efecto en la pre-inducción de estos compuestos de defensa, aun en hojas y/o plantas que no han sido dañadas por el herbívoro
- Profundizar en los aspectos fisiológicos del cultivo asociados a la respuesta compensatoria frente a distintos niveles de herbivoría, por ejemplo, la tasa fotosintética o la senescencia.

## **6.6 CONCLUSIONES**

La expansión del cultivo de soja a lo largo del agroecosistema pampeano estuvo asociado al empobrecimiento de la diversidad en un sentido amplio: pérdida en la diversidad de cultivos y disminución de la biodiversidad especies silvestres. Por lo tanto, resulta importante desarrollar estrategias de manejo que se enfoquen en la diversificación del sistema productivo, mediante la incorporación de especies acompañantes que favorezcan algún servicio del ecosistema. Para ello es necesario conocer las características de las especies candidatas que permitan desarrollar este tipo de estrategias.

En esta tesis, se identificaron aspectos del comportamiento del cultivo de soja vinculados a la presencia de malezas productoras de metabolitos secundarios, que podría favorecer la implementación de estrategias de manejo que permitan la coexistencia del cultivo con dichas especies. Las mezclas del cultivo de soja con malezas acompañantes, reveló el importante rol de las especies evaluadas sobre algunos servicios del agroecosistema. Por ejemplo, la herbivoría de *A. gemmatalis* fue significativamente menor cuando el cultivo estuvo en mezclas. A su vez, estas mezclas no ocasionaron pérdidas en el rendimiento del cultivo, ya que a pesar del efecto conjunto de la competencia y la herbivoría, el cultivo sostuvo su capacidad compensatoria. En cuanto a las defensas químicas la presencia de la maleza aromática *A. annua* dentro de la mezcla promovió la síntesis de dos “blends” de compuestos de defensa del cultivo de soja. Por otra parte, se demostró una relación entre las señales químicas emitidas por el sistema y la comunidad de insectos. Las mezclas aumentaron significativamente la riqueza de insectos, en su mayoría no herbívoros.

Los resultados de esta tesis brindan nuevos aportes al conocimiento de las interacciones tróficas dentro de un agroecosistema que tiene al cultivo de soja como un protagonista importante y aportan elementos para el manejo sustentable del cultivo potenciando los servicios ecológicos. Aún quedan preguntas pendientes, especialmente orientadas a profundizar en los aspectos de manejo agronómico que permitan optimizar la combinación del cultivo y los insectos con especies acompañantes, ya sea en borduras, franjas o policultivos.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Acciaresi, H.A., Asenjo, C.A. 2003. Efecto alelopático de *Sorghum halepense* (L.) Pers. sobre el crecimiento de la plántula y la biomasa aérea y radical de *Triticum aestivum* (L.). *Ecologia Austral* 13: 49-61.
- Agrawal, A.A. 2011. Current trends in the evolutionary ecology of plant defence. *Functional Ecology* 25: 420-432.
- Ahuja, I., Kissen, R., Bones, A.M. 2012. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science* 17: 73-90.
- Aizen, M.A., Garibaldi, L.A., Dondo, M. 2009. Expansión de la soja y diversidad de la agricultura argentina. *Ecologia Austral* 19: 45-54.
- Alborn, H.T. 1997. An Elicitor of Plant Volatiles from Beet Armyworm Oral Secretion. *Science* 276: 945-949.
- Aljbory, Z., Chen, M.S. 2018. Indirect plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Science* 25: 2-23.
- Altieri, M.A. 1999a. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74: 19-31.
- Altieri, M.A. 1999b. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74: 19-31.
- Anón. 2015. Ministerio de Agroindustria.  
<https://datos.agroindustria.gob.ar/dataset/estimac>.
- Appel, H.M. 1993. Phenolics in ecological interactions: The importance of oxidation. *Journal of Chemical Ecology* 19: 1521-1552.
- Aragón, J., Molinari, A., Lorenzatti, S. 1998. Manejo integrado de plagas de soja. En *El cultivo de soja en la Argentina INTA*, pp. 247-288.
- Aragón, J.R. 2002. Insectos Perjudiciales de la Soja. *INTA Marcos Juárez. IDIA XXI* 3:

75-82.

- Aragón, J.R., Suelos, A., Nov, V. 2002. Insectos perjudiciales de la soja y su manejo integrado en la Región Pampeana Central Introducción.
- Arimura, G.I., Shiojiri, K., Karban, R. 2010. Acquired immunity to herbivory and allelopathy caused by airborne plant emissions. *Phytochemistry* 71: 1642-1649.
- Armstrong, S. 1997. New Host Records for *Cosmobaris americana* Casey (Coleoptera : Curculionidae) and Its Parasite *Neocatolaccus tylodermae* Ashmead (Hymenoptera : Pteromalidae). *Journal of kansas entomological society* 70: 258-260.
- Arroyo Varela, M., Viñuela Sandoval, E. 1991. *Introducción a la Entomología*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Ayres, M.P., Clausen, T.P., MacLean, S.F., Redman, A.M., Relchardt, P.B. 1997. Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. *Ecology* 78: 1696-1712.
- Baldi, G., Paruelo, J.M. 2008. Land-use and land cover dynamics in South American Temperate grasslands. *Ecology and Society* 13: 6.
- Baldwin, I.T. 2001. An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. *Plant Physiology* 127: 1449-1458.
- Baldwin, I.T. 1998. Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 8113-8118.
- Baldwin, I.T. 2010. Plant volatiles. *Current Biology* 20: 392-397.
- Bálint, J., Zytynska, S.E., Salamon, R.V., Mehrparvar, M., Weisser, W.W., Schmitz, O.J., Benedek, K., Balog, A. 2016. Intraspecific differences in plant chemotype determine the structure of arthropod food webs. *Oecologia* 180: 797-807.

- Ballaré, C.L., Mazza, C.A., Austin, A.T., Pierik, R. 2012. Canopy light and plant health. *Plant Physiology* 160: 145-155.
- Ballaré, C.L., Scopel, A.L., Ghersa, C.M., Sanchez, R.A. 1987. The demography of *Datura ferox* (L.) in soybean crops. *Weed Research* 27: 91-102.
- Balmford, A., Green, R., Phalan, B. 2012. What conservationists need to know about farming. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279: 2714-2724.
- Barbosa, P., Hines, J., Kaplan, I., Martinson, H., Szczepaniec, A., Szendrei, Z. 2009. Associational Resistance and Associational Susceptibility: Having Right or Wrong Neighbors. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40: 1-20.
- Batchelor W. D., Jones J.W., Boote K. J. Pinnschmidt H. O. 1993. Extending the use of crop models to study pest damage. *American Society of Agricultural Engineers* 36 (2): 551-558.
- Baucom, R.S. 2019. Evolutionary and ecological insights from herbicide-resistant weeds: what have we learned about plant adaptation, and what is left to uncover? *New Phytologist* 223: 68-82.
- Bernays, E.A., Chapman R. F. 1994. Host-Plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall, New York (1994)
- Bezemer, T.M., Wagenaar, R., van Dam, N.M., Wackers, F.L. 2003. Interactions between above- and belowground insect herbivores as mediated by the plant defense system. *Oikos* 101: 555-562.
- Bhakuni, R., Jain, D., Sharma, R., Kumar, S. 2001. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Current science* 80: 35-48.
- Bilia, A.R., Santomauro, F., Sacco, C., Bergonzi, M.C., Donato, R. 2014. Essential oil of *artemisia annua* L.: An extraordinary component with numerous antimicrobial properties. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2014: .

- Board, J. 2000. Light interception efficiency and light quality affect yield compensation of soybean at low plant populations. *Crop Science* 40: 1285-1294.
- Boito, G., Crenna, A.C., Giuggia, J.A., Giovanini, D., Oddino, C., Gerardo, U. 2013. Desarrollo y validación de una escala para evaluación de daño por orugas defoliadoras en soja (*Glycine max* L.), para el sur de la provincia de Córdoba. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias* 45: 91-104.
- Booth, B.D., Murphy, S.D., Swanton, C.J. 2013. Invasive ecology of weeds in agricultural systems. In: *Weed ecology and management*. Inderjit (ed). Pp 29-45
- Booth, B.D., Swanton, C.J. 2002. Assembly theory applied to weed communities 50th Anniversary — Invited Article Assembly theory applied to weed communities. *Weed Science* 50: 2-13.
- Borthwick H. A., Parker M.W. 1938. Influence of photoperiods upon the differentiation of meristems and the blossoming of Biloxi soy beans. *Botanical Gazette* 99: 825-839.
- Botella, M.A., Xu, Y., Prabha, T.N., Zhao, Y., Narasimhan, M.L., Wilson, K.A., Nielsen, S.S. et al. 1996. Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate. *Plant Physiology* 112: 1201-1210.
- ter Braak, C.J.F. 1987a. Ordination. En Jongman, R. H. G., Braak, C. J. F. ter, Tongeren, O. F. R. van (eds.), *Data analysis in community and landscape ecology*, pp. 91-173. Pudoc, Wageningen, The Netherlands.
- ter Braak, C.J.F. 1987b. The analysis of vegetation-environment relationships by canonical correspondence analysis. *Vegetatio* 69: 69-77.
- Brown, J.S., Mitchell, W.A. 1989. Diet selection on depletable resources. *Oikos* 54: 33-43.

- Burkholder, P.R. 1952. Cooperation and conflict among primitive organisms. *American Science* 40: 601-631.
- Busi, R., Vila-Aiub, M.M., Beckie, H.J., Gaines, T.A., Goggin, D.E., Kaundun, S.S., Lacoste, M. et al. 2013. Herbicide-resistant weeds: From research and knowledge to future needs. *Evolutionary Applications* 6: 1218-1221.
- Callaway, R.M., Pennings, S.C., Richards, C.L. 2003. Phenotypic plasticity and interactions among plants. *Ecology* 84: 1115-1128.
- Carmona, D., Fornoni, J. 2013. Herbivores can select for mixed defensive strategies in plants. *New Phytologist* 197: 576-585.
- Carpenter, A.C., Board, J.E. 1997a. Branch yield components controlling soybean yield stability across plant populations. *Crop Science* 37: 885-891.
- Carpenter, A.C., Board, J.E. 1997b. Growth dynamic factors controlling soybean yield stability across plant populations. *Crop Science* 37: 1520-1526.
- Castro, P.R.C., Rodrigues, J.D., Moraes, M.A., Carvalho, V.L.M. 1983. Efeitos alelopáticos de alguns extratos vegetais na germinação do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Santa Cruz). *Planta Daninha* 6: 79-85.
- Ćavar, S., Maksimović, M., Vidic, D., Parić, A. 2012. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Industrial Crops and Products* 37: 479-485.
- Chansang, U., Zahiri, N.S., Bansiddhi, J., Boonruad, T., Thongsrirak, P., Mingmuang, J., Benjapong, N., Mulla, M.S. 2005. Mosquito larvicidal activity of aqueous extracts of long pepper (*Piper retrofractum* vahl) from Thailand. *Journal of Vector Ecology* 30: 195-200.
- Charleston, D.S., Gols, R., Hordijk, K.A., Kfir, R., Vet, L.E.M., Dicke, M. 2006. Impact of botanical pesticides derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica*

- plants on the emission of volatiles that attract parasitoids of the diamondback moth to cabbage plants. *Journal of Chemical Ecology* 32: 325-349.
- Chen, P.K., Leather, G.R. 1990. Plant growth regulatory activities of artemisinin and its related compounds. *Journal of Chemical Ecology* 16: 1867-1876.
- Cheng, S.-M., Wang, J., Wang, Y.-W., Wei, Z.-B. 2017. Discrimination of different types damage of tomato seedling by electronic nose. *ITM Web Conf* 11: 1-8.
- Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K.M., Lattanzio, V., Martens, S. 2013. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry* 72: 1-20.
- Chludil, H.D., Vilariño, M.D.P., Franco, M.L., Leicach, S.R. 2009. Changes in *Lupinus albus* and *Lupinus angustifolius* alkaloid profiles in response to mechanical damage. *Journal of agricultural and food chemistry* 57: 6107-6113.
- Cipollini, D. 2004. Stretching the Limits of Plasticity: Can a Plant Defend Against Both Competitors and Herbivores? *Ecology* 85: 28-37.
- Colomo de Correa, M.V., Roig-Alsina, A. 2009. Pompilidae. En Claps, E. (ed.), *Biodiversidad de artrópodos argentinos*, pp. 435-460.
- Cui, S., Ling, P., Zhu, H., Keener, H.M. 2018. Plant pest detection using an artificial nose system: A review. *Sensors (Switzerland)* 18: 1-18.
- Derraik, J.G.B., Closs, G.P., Dickinson, K.J.M., Sirvid, P., Barratt, B.I.P., Patrick, B.H. 2002. Arthropod morphospecies versus taxonomic species: a case study with Araneae, Coleoptera, and Lepidoptera. 16: 1015-1023.
- Dicke, M. 1999. Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 91: 131-142.
- Dicke, M. 1994. Local and systemic production of volatile herbivore-induced

terpenoids: Their role in plant-carnivore mutualism. *Journal of Plant Physiology* 143: 465-472.

Dicke, M., Bruin, J. 2001. Chemical information transfer between plants: *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 981-994.

Dillon, F.M. 2017. Efecto de la radiación solar UV-B y del daño de orugas (*Anticarsia gemmatalis*) trips (*Caliothrips phaseoli*) chinches (*Nezara viridula* y *Piezodorus guildinii*) sobre el perfil de compuestos fenólicos y la actividad de inhibidores de proteasas: rol del etile. Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Buenos Aires.

Dillon, F.M., Chludil, H.D., Zavala, J.A. 2017. Solar UV-B radiation modulates chemical defenses against *Anticarsia gemmatalis* larvae in leaves of field-grown soybean. *Phytochemistry* 141: 27-36.

Dillon, F.M., Tejedor, M.D., Ilina, N., Chludil, H.D., Mithöfer, A., Pagano, E.A., Zavala, J.A. 2018. Solar UV-B radiation and ethylene play a key role in modulating effective defenses against *Anticarsia gemmatalis* larvae in field-grown soybean. *Plant Cell and Environment* 41: 383-394.

Duarte Gómez, W., Zenner de Polanía, I. 2009. Efecto de la temperatura de *Eriopis connexa connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae). *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient* 12: 135-145.

Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D.A., Orlova, I. 2006. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25: 417-440.

Dudareva, N., Pichersky, E. 2008. Metabolic engineering of plant volatiles. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 181-189.

Duffey, S.S., Stout, M.J. 1996. Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 32: 3-37.

- Einhelling, F. 1999. An integrated view of allelochemicals and multiple stresses. En *Principles and practices in Plant Ecology, Allelochemical interactions*, pp. 479-494.
- Engelberth, J., Alborn, H.T., Schmelz, E. a, Tumlinson, J.H. 2004. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 1781-1785.
- Erb, M., Veyrat, N., Robert, C.A.M., Xu, H., Frey, M., Ton, J., Turlings, T.C.J. 2015. Indole is an essential herbivore-induced volatile priming signal in maize. *Nature Communications* 6: 1-10.
- Fehr, W.R., Caviness, C.E. 1977. Stages of soybean development. *Special Report* 80.
- Fehr, W.R., Caviness, C.E., Vorst, J.J. 1977. Response of indeterminate and determinate soybean cultivars to defoliation and half-plant cut-off. *Crop Science* 17: 913.
- Felton, G.W., Summers, C.B., Mueller, A.J. 1994. Oxidative responses in soybean foliage to herbivory by bean leaf beetle and three-cornered alfalfa hopper. *Journal of Chemical Ecology* 20: 639-650.
- Ferraro, D., Oesterheld, M. 2002. Effect of defoliation on grass growth. A quantitative review. *Oikos* 98: 125-133.
- Ferreira, J.F.S., Janick, J. 2004. Allelopathic plants. XVI. Artemisia species. *Allelopathy Journal* 14: 167-176.
- Ferreira, J.F.S., Janick, J. 1996. Distribution of artemisinin in *Artemisia annua*. En *Progress in new crops.*, pp. 579-584.
- Ferreira, J.F.S., Zheljazkov, V.D., Gonzalez, J.M. 2013. Artemisinin concentration and antioxidant capacity of *Artemisia annua* distillation byproduct. *Industrial Crops and Products* 41: 294-298.
- Ferreira, M.F., Carolina, T., Bracamonte, E., Leonardo, G. 2017. Effects of the

herbicide glyphosate on non-target plant native species from Chaco forest (Argentina). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 144: 360-368.

Foley, J.A., DeFries, R., Asner, G.P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S.R., Chapin, F.S. et al. 2005. Global consequences of land use. *Science* 309: 570-574.

Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., Bak, S. 2013. *Plant defense against insect herbivores*.

Gaba, S., Lescourret, F., Boudsocq, S., Enjalbert, J., Hinsinger, P., Journet, E.P., Navas, M.L. et al. 2015. Multiple cropping systems as drivers for providing multiple ecosystem services: from concepts to design. *Agronomy for Sustainable Development* 35: 607-623.

Garibaldi, L.A., Gemmill-Herren, B., D'Annolfo, R., Graeub, B.E., Cunningham, S.A., Breeze, T.D. 2017. Farming Approaches for Greater Biodiversity, Livelihoods, and Food Security. *Trends in Ecology and Evolution* 32: 68-80.

Garibaldi, L.A., Steffan-dewenter, I., Winfree, R., Aizen, M.A., Bommarco, R., Cunningham, S.A., Kremen, C., Carvalheiro, L.G. 2014. Honey Bee Abundance. *Science* 339: 1608-1611.

Gastal, M.F., Casela, C.R. 1986. Allelopathic influence of *Cyperus rotundus* L. on *Glycine max* (L.) Merrill. *Weed Abstracts* 35: 39.

Gershenzon, J., Dudareva, N. 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology* 3: 408-414.

Gil, A., De la Fuente, E.B., Lenardis, A.E., López Pereira, M., Suárez, S.A., Bandoni, A., Van Baren, C. et al. 2002. Coriander essential oil composition from two genotypes grown in different environmental conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2870-2877.

Glinwood, R., Ninkovic, V., Pettersson, J. 2011. Chemical interaction between

undamaged plants - Effects on herbivores and natural enemies. *Phytochemistry* 72: 1683-1689.

- Gols, R., Veenemans, C., Potting, R.P.J., Smid, H.M., Dicke, M., Harvey, J.A., Bukovinszky, T. 2012. Variation in the specificity of plant volatiles and their use by a specialist and a generalist parasitoid. *Animal Behaviour* 83: 1231-1242.
- Gouinguéné, S.P., Turlings, T.C.J. 2002. The Effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiol.* 129: 1296-1307.
- Gramajo, M.C., Mulieri, P.R. 2011. Redescrición de *Archytas cirphis* (Diptera: Tachinidae) y primer registro del hospedero para la región Neotropical. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 70: .
- Green-Tracewicz, E., Page, E.R., Swanton, C.J. 2012a. Light quality and the critical period for weed control in soybean. *Weed Science* 60: 86-91.
- Green-Tracewicz, E., Page, E.R., Swanton, C.J. 2012b. Light quality and the critical period for weed control in soybean. *Weed Science* 60: 86-91.
- Gifford, R. M., Thorne J. H., Hitz W. D., Giaquinta R. T. 1984. Crop productivity and photoassimilate partitioning. *Science* 255:801- 808.
- Guglielmini, A. 2010. Cambios poblacionales en las comunidades de malezas asociadas a la secuencia de cultivos de verano. El rol de la competencia. Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Buenos Aires.
- Haile, F.J., Higley, L.G., Specht, J.E. 1998. Soybean cultivar and insect defoliation: yield loss and economic injury levels. *Agron. J.* 90: 344-352.
- Hammerschmidt, R. 1999. Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology* 37:285-306.
- Harder, D.B., Sprague, C.L., Difonzo, C.D., Renner, K.A., Ott, E.J., Johnson, W.G.

2007. Influence of Stem-boring Insects on Common Lambsquarters (*Chenopodium album*) Control in Soybean with Glyphosate. *Weed Technology* 21: 241-248.
- Hare, J.D. 2011. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. *Annual Review of Entomology* 56: 161-180.
- Heap, I., Duke, S.O. 2018. Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. *Pest Management Science* 74: 1040-1049.
- Heckel, D.G., Gahan, L.J., Baxter, S.W., Zhao, J.Z., Shelton, A.M., Gould, F., Tabashnik, B.E. 2007. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology* 95: 192-197.
- Heil, M. 2010a. Plastic defence expression in plants. *Evolutionary Ecology* 24: 555-569.
- Heil, M., Karban, R. 2010. Explaining evolution of plant communication by airborne signals. *Trends in Ecology and Evolution* 25: 137-144.
- Heil, M., Kost, C. 2006. Priming of indirect defences. *Ecology Letters* 9: 813-817.
- Herms, D.A., Mattson, J.T. 1992. The Dilemma of Plants : To Grow or Defend. *The Quarterly Review of Biology* 67: 283-335.
- Higley, L.G. 1992. New understandings of soybean defoliation and their implication for pest management. *Pest management in soybean* 56-65.
- Hillebrand, H., Bennett, D., Cadotte, M. 2008. Consequences of dominance: a review of evenness effects on local and regional ecosystem processes. *Ecology Society of America* 89: 1510-1520.
- Hoffmann-Campo, C.B., Harborne, J.B., McCaffery, A.R. 2001. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 98: 181-194.
- Hoffmann-Campo, C.B., Neto, J.A.R., De Oliveira, M.C.N., Oliveira, L.J. 2006.

- Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatalis*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 41: 1453-1459.
- Holt, A.R., Alix, A., Thompson, A., Maltby, L. 2016. Food production, ecosystem services and biodiversity: We can't have it all everywhere. *Science of the Total Environment* 573: 1422-1429.
- Holt, R. 1977. Predation, apparent competition and the Structure of Prey Communities. *Theoretical population biology* 12: 197-229.
- Holt, R., Lawton, J. 1992. Apparent Competition and Enemy-Free Space in Insect Host-Parasitoid Communities. *Chicago Journals. American Society of Naturalists* 142: 623-645.
- Hunter, M.D., Price, P. 1992. Playing chutes and ladders : heterogeneity and the relative roles of bottom-up and top- down forces in natural communities. *Ecology* 73: 724-732.
- Inderjit, Callaway, R.M. 2003. Experimental designs for the study of allelopathy. (Special Issue: Allelopathy). *Plant and Soil* 256: 1-11.
- Ivanescu, B., Miron, A., Corciova, A. 2015. Sesquiterpene Lactones from Artemisia Genus: Biological Activities and Methods of Analysis. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2015: .
- Jassbi, A.R., Zamanizadehnajari, S., Baldwin, I.T. 2010. Phytotoxic Volatiles in the Roots and Shoots of *Artemisia tridentata* as Detected by Headspace Solid-phase Microextraction and Gas Chromatographic-mass Spectrometry Analysis. *Journal of Chemical Ecology* 36: 1398-1407.
- Jeandet, P., Clément, C., Courot, E., Cordelier, S. 2013. Modulation of phytoalexin biosynthesis in engineered plants for disease resistance. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 14136-14170.

- Jessing, K.K., Duke, S.O., Cedergreen, N. 2014. Potential ecological roles of Artemisinin produced by *Artemisia annua* L. *Journal of Chemical Ecology* 40: 100-117.
- Jiang Hongfei, Egli, D.B. 1995. Soybean seed number and crop growth rate during flowering. *Agronomy Journal* 87: 264-267.
- Jones, C.G., Lawton, J.H., Shachak, M. 1994. Organisms as Ecosystem Engineers. *Oikos* 69: 373.
- Jongman, R.H.G., Ter Braak, C.J.F., Van Tongeren, O.F.R. 1995. *Data Analysis in Community and Landscape Ecology*.
- Jongsma, M.A., Bakker, P.L., Peters, J., Bosch, D., Stiekema, W.J. 1995. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 8041-8045.
- Kalske, A., Shiojiri, K., Uesugi, A., Sakata, Y., Morrell, K., Kessler, A. 2019. Insect herbivory selects for volatile-mediated plant-plant communication. *Current Biology* 29: 3128-3133.e3.
- Karban, R., Yang, L.H., Edwards, K.F. 2014. Volatile communication between plants that affects herbivory: A meta-analysis. *Ecology Letters* 17: 44-52.
- Kessler, A., Baldwin, I.T. 2002a. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 299-328.
- Kessler, A., Halitschke, R., Diezel, C., Baldwin, I.T. 2006. Priming of plant defense responses in nature by airborne signaling between *Artemisia tridentata* and *Nicotiana attenuata*. *Oecologia* 148: 280-292.
- Khan, Z.R., Pickett, J.A., Van den Berg, J., Wadhams, L.J., Woodcock, C.M. 2000. Exploiting chemical ecology and species diversity: stem borer and striga control

- formaize and sorghum in Africa. *Pest Management Science* 56: 957-962.
- de la Fuente, E.B., Perelman, S., Ghera, C.M. 2010. Weed and arthropod communities in soyabean as related to crop productivity and land use in the Rolling Pampa, Argentina. *Weed Research* 50: 561-571.
- de la Fuente, E.B., Suárez, S.A., Ghera, C.M. 2006. Soybean weed community composition and richness between 1995 and 2003 in the Rolling Pampas (Argentina). *Agriculture, Ecosystems and Environment* 115: 229-236.
- de la Fuente, E.B., Suárez, S.A., Ghera, C.M., Leon, R.J.C. 1999. Soybean weed communities: relationships with cultural history and crop yield. *Agronomy Journal* 91: 234-241.
- Landis, D.A. 2017. Designing agricultural landscapes for biodiversity-based ecosystem services. *Basic and Applied Ecology* 18: 1-12.
- Landis, D.A., Wratten, S.D., Gurr, G.M. 2000. Habitat management to conserve natural enemies of arthropods pests in agriculture. *Annual review of entomology* 45: 175-201.
- Lee, S.E. 2000. Mosquito larvicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 16: 245-247.
- Lee, S.E., Park, B.S., Kim, M.K., Choi, W.S., Kim, H.T., Cho, K.Y., Lee, S.G., Lee, H.S. 2001. Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 20: 523-528.
- Leguizamón, A. 2014. Modifying Argentina: GM soy and socio-environmental change. *Geoforum* 53: 149-160.
- Leicach, S.R., Della Penna, A., Sztarker, N., Olloquiegui, M. 2006. Efectos alelopáticos

de residuos de *Chenopodium album* sobre soja sembrada bajo la modalidad siembra directa. En Juan F. Gallardo Lancho (ed.), *Medioambiente en Iberoamérica. Visión desde la física y la química en los albores del siglo XXI*.

Leitner, M., Boland, W., Mithöfer, A. 2005. Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 167: 597-606.

Lenardis, A.E., van Baren, C., Di Leo Lira, P., Ghera, C.M. 2007. Plant-soil interactions in wheat and coriander crops driving arthropod assemblies through volatile compounds. *European Journal of Agronomy* 26: 410-417.

Lenardis, A.E., Morvillo, C.M., Gil, A., de la Fuente, E.B. 2011. Arthropod communities related to different mixtures of oil (*Glycine max* L. Merr.) and essential oil (*Artemisia annua* L.) crops. *Industrial Crops and Products* 34: 1340-1347.

Liu, J.G., Mahoney, K.J., Sikkema, P.H., Swanton, C.J. 2009. The importance of light quality in crop-weed competition. *Weed Research* 49: 217-224.

Luna, M.G., Sanchez, N.E. 1999. Parasitoid assemblages of soybean defoliator Lepidoptera in north-western Buenos Aires province, Argentina. *Agricultural and Forest Entomology* 1: 255-260.

Mabry, T., Markham, K., Thomas, M. 1940. *The systematic identification of flavonoids*.

Mace, G.M., Cramer, W., Díaz, S., Faith, D.P., Larigauderie, A., Le Prestre, P., Palmer, M. et al. 2010. Biodiversity targets after 2010. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 2: 3-8.

Maffei, M.E. 2010. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany* 76: 612-631.

Magurran, A.E. 1988. A variety of diversities. En *Ecological diversity and its*

- measurement*, pp. 81-99. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ.
- Malézieux, E. 2012. Designing cropping systems from nature. *Agronomy for Sustainable Development* 32: 15-29.
- Malézieux, E., Crozat, Y., Dupraz, C., Laurans, M., Makowski, D., Ozier-Lafontaine, H., Rapidel, B. et al. 2009. Review article Mixing plant species in cropping systems : concepts , tools and models . A review. *Agronomy for Sustainable Development* 29: 43-62.
- McCune, B., Mefford, M.J. 1995. PC-ORD. Multivariate analyses of ecological data. Version 2.0. MJM Software design.
- McPherson, R.M., Buss, G.R. 2007. Evaluating Lepidopteran Defoliation Resistance in Soybean Breeding Lines Containing the Stink Bug (Hemiptera: Pentatomidae) Resistance IAC-100 Cultivar in Their Pedigrees. *Journal of Economic Entomology* 100: 962-968.
- Michereff, M.F.F., Laumann, R.A., Borges, M., Michereff-Filho, M., Diniz, I.R., Neto, A.L.F., Moraes, M.C.B. 2011. Volatiles Mediating a Plant-Herbivore-Natural Enemy Interaction in Resistant and Susceptible Soybean Cultivars. *Journal of Chemical Ecology* 37: 273-285.
- Mielke, P.W. 1984. Meteorological applications of permutation techniques based on distance functions. En Krishnaiah, P. R., Sen, P. K. (eds.), *Handbook of statistics*, pp. 813-830. North-Holland, Amsterdam.
- Moraes, M., Laumann, R., Pareja, M., Sereno, F., Michereff, M., Birkett, M., Pickett, J., Borges, M. 2009. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with cis-jasmone. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 131: 178-188.
- Moraes, M., Laumann, R., Sujii, E., Pires, C., Borges, M. 2005. Induced volatiles in

soybean and pigeon pea plants artificially infested with the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115: 227-237.

Morrill, W.L., Pen-Elec, N., Almazon, L.P. 1990. Effects of weeds on fecundity and survival of *Leptocorisa oratorius* (Hemiptera: Alydidae). *Environmental Entomology* 19: 1469-1472.

Morris, R.J., Lewis, O.T., Godfray, H.C.J. 2005. Apparent competition and insect community structure: towards a spatial perspective. *Ann. Zool. Fennici* 42: 449-462.

Morvillo, C.M., de la Fuente, E.B., Gil, A., Martínez-Ghersa, M.A., González Andújar, J.L. 2011. Competitive and allelopathic interference between soybean crop and annual wormwood (*Artemisia annua* L.) under field conditions. *European Journal of Agronomy* 34: 211-221.

Mumm, R., Dicke, M. 2010. Variation in natural plant products and the attraction of bodyguards involved in indirect plant defense. *Canadian Journal of Zoology* 88: 628-667.

Mumm, R., Posthumus, M.A., Dicke, M. 2008. Significance of terpenoids in induced indirect plant defence against herbivorous arthropods. *Plant, Cell and Environment* 31: 575-585.

Murakami, S., Nakata, R., Aboshi, T., Yoshinaga, N., Teraishi, M., Okumoto, Y., Ishihara, A. et al. 2014. Insect-Induced Daidzein, Formononetin and Their Conjugates in Soybean Leaves. *Metabolites* 4: 532-546.

Norris, R.E. 2005. Ecological bases of interactions between weeds and organisms in other pest categories. *Weed Science* 53: 909-913.

Norris, R.F., Kogan, M. 2005. Ecology of interactions between weeds and arthropods.

*Annual Review of Entomology* 50: 479-503.

Norris, R.F., Kogan, M. 2000. Interactions between weeds, arthropod pests, and their natural enemies in managed ecosystems. *Weed Science* 48: 94-158.

O'Neill, B.F., Zangerl, A.R., Dermody, O., Bilgin, D.D., Casteel, C.L., Zavala, J.A., DeLucia, E.H., Berenbaum, M.R. 2010. Impact of elevated levels of atmospheric CO<sub>2</sub> and herbivory on flavonoids of soybean (*Glycine max* Linnaeus). *Journal of Chemical Ecology* 36: 35-45.

Osada-Velasquez, H., Mora-Aguilera, G. 1997. DOSLOG Version 1.0. Un sistema logaritmico computarizado para la elaboración de escalas y diagramas de intensidad de enfermedad. Manual de usuario. Colegio de postgraduados. Instituto de fitosanidad.

Pare, P.W., Tumlinson, J.H. 1999. Update on plant-insect interactions plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology* 121: 325-331.

Paruelo, J.M., Guerschman, J.P., Verón, S.R. 2005. Expansión agrícola y cambios en el uso del suelo. *Ciencia Hoy* 15: 14-23.

Pedigo, L. 1986. Economic Injury Levels in Theory and Practice. *Annual Review of Entomology* 31: 341-368.

Perazzo, F.F., Carvalho, J.C.T., Carvalho, J.E., Rehder, V.L.G. 2003. Central properties of the essential oil and the crude ethanol extract from aerial parts of *Artemisia annua* L. *Pharmacological Research* 48: 497-502.

Perotti, E., Gamundi, J.C. 2007. Evaluación del daño provocado por lepidópteros defoliadores en cultivares de soja determinados e indeterminados (GM III , IV , V) con diferentes espaciamientos entre líneas de siembra. *Para Mejorar la Producción* 36 - INTA EEA Oliveros 119-125.

Pierik, R., Ballaré, C.L., Dicke, M. 2014. Ecology of plant volatiles: Taking a plant

community perspective. *Plant, Cell and Environment* 37: 1845-1853.

Piubelli, G.C., Hoffmann-Campo, C.B., De Arruda, I.C., Franchini, J.C., Lara, F.M.

2003. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effect on insect-feeding preference. *Journal of Chemical Ecology* 29: 1223-1233.

Piubelli, G.C., Hoffmann-Campo, C.B., Moscardi, F., Miyakubo, S.H., Neves De

Oliveira, M.C. 2005. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*? *Journal of Chemical Ecology* 31: 1509-1525.

Piubelli, G.C., Moscardi, F., Hoffmann-Campo, C.B. 2009. Interactions among insect-

resistant soybean genotypes extracts with populations of *Anticarsia gemmatalis*

Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) susceptible and resistant to its

nucleopolyhedrovirus. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 81: 861-871.

Poggio, S.L. 2005. Structure of weed communities occurring in monoculture and

intercropping of field pea and barley. *Agriculture, Ecosystems and Environment*

109: 48-58.

Poonia, A., Upadhayay, A. 2015. *Chenopodium album* Linn: review of nutritive value

and biological properties. *Journal of Food Science and Technology* 52: 3977-3985.

Pourcel, L., Routaboul, J.M., Cheynier, V., Lepiniec, L., Debeaujon, I. 2007. Flavonoid

oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends*

*in Plant Science* 12: 29-36.

Power, M.E. 1992. Top-down and bottom-up forces in food webs: do plants have

primacy? *Ecology* 73: 733-746.

Radosevich, S.R., Holt, J.S., Ghersa, C.M. 2007. Ecology of weeds and invasive plants:

Relationship to agriculture and natural resource management: 3. ed.

Reboratti, C. 2010. Un mar de soja: La nueva agricultura en Argentina y sus

consecuencias. *Revista de Geografia Norte Grande* 76: 63-76.

- Reinhardt, C.F., Meissner, R., van Wyk, L.J. 1997. Allelopathic effects of *Chenopodium album* L. and *Chenopodium polyspermum* L. on another weed and two crop species. *South African Journal of Plant and Soil* 14: 165-168.
- Rice, E.L. 1984. *Allelopathy*. Academic Press, Orlando.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. 2017. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Root, R. 1973. Organization of a plant-arthropod association in simple and diverse habitats: the fauna of collards (*Brassica oleracea*). *Ecological monographs* 43: 95-124.
- Russin, J.S. 1989. Severity of Soybean Stem Canker Disease Affected by Insect-Induced Defoliation. *Plant Disease* 73: 144.
- Russin, J.S., Layton, M.B., Boethel, D.J. 1989. Severity of soybean stem canker disease affected by Insect-Induced defoliation. *Plant Disease* 73: 144-147.
- Sadras V.O., Wilson L.J. 1997. Growth analysis of cotton crops infested with spider mites: partitioning of dry matter. *Crop Science* 37:492-497.
- Saito, T., Kawamoto, H., Kiritani, K. 1983. Effect of artificial defoliation on growth and yield of soybean: development of dynamic economic injury level and control threshold. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 27: .
- Satorre, E.H. 2005. Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Ciencia hoy* 15: 6.
- Saunders, J., Coto, D., King, A. 1998. *Plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios de america central*.
- Scala, A., Allmann, S., Mirabella, R., Haring, M.A., Schuurink, R.C. 2013. Green leaf volatiles: A plant's multifunctional weapon against herbivores and pathogens.

*International Journal of Molecular Sciences* 14: 17781-17811.

Schuman, M.C., Baldwin, I.T. 2016. The layers of plant responses to insect herbivores.

*Annual Review of Entomology* 61: 373-394.

Scursoni, J.A., Vera, A.C.D., Oreja, F.H., Kruk, B.C., De La Fuente, E.B. 2019. Weed

management practices in Argentina crops. *Weed Technology* 33: 459-463.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, P. y A. 2016. SAGPYA.

[http://www.siia.gob.ar/sst\\_pcias/estima/estima.php](http://www.siia.gob.ar/sst_pcias/estima/estima.php).

Seigler, D.S. 1996. Chemistry and mechanisms of allelopathic interactions. *Agronomy*

*Journal* 88: 876-885.

Shikano, I. 2017. Evolutionary Ecology of Multitrophic Interactions between Plants,

Insect Herbivores and Entomopathogens. *Journal of Chemical Ecology* 43: 586-

598.

Shirley, B.W. 1998. Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic

importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Science Research* 8: 415-422.

Sigsgaard, L., Jacobsen, S.E., Christiansen, J.L. 2008. Quinoa, *Chenopodium quinoa*,

provides a new host for native herbivores in northern europe: case studies of the

moth, *Scrobipalpa atriplicella*, and the tortoise beetle, *Cassida nebulosa*. *Journal*

*of insect science (Online)* 8: 1-4.

Simmonds, M.S.J. 2003. Flavonoid-insect interactions: Recent advances in our

knowledge. *Phytochemistry* 64: 21-30.

Singer, J.W. 2001. Soybean light interception and yield response to row spacing and

biomass removal. *Crop Science* 41: 424-429.

Singleton V. L., Rossi J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-

phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*

16:144-158.

- Slansky, F. 1989. Early season weedy legumes: potential larval food plants for the migratory velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 82: 819-824.
- Slansky, F., Wheeler, G.S. 1992. Caterpillars' compensatory feeding response to diluted nutrients leads to toxic allelochemical dose. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 65: 171-186.
- Snaydon, R.W., Satorre, E.H. 1989. Bivariate diagrams for plant competition data modifications and interpretation. *Journal of Applied Ecology* 26: 1043-1057.
- Sobrero, M., Acciaresi, H. 2015. Interferencia cultivo - maleza: la alelopatía y su potencialidad en el manejo de malezas. En *Malezas e Invasoras de la Argentina: su identificación, biología y manejo*, pp. 24.
- Soriano, A., R., L., Sala, Avado, V., D., A., Cauhépé, M., A., Scaglia, O. et al. 1991. Rio de la Plata Grasslands. En *Coupland RT (Ed) Temperate Subhumid Grasslands Ecosystems of the World*, pp. 367-406.
- Steppuhum, A., Baldwin, I.T. 2008. Induced defenses and the Cost-Benefit Paradigm. En *Induced Plant Resistance to Herbivory*, pp. 1-462.
- Štolcová, J. 2009a. Insect damage to and mortality of seedlings of *Chenopodium album* L. and *Fallopia convolvulus* (L.) Á. Löve. *Plant Protection Science* 45: 59-65.
- Štolcová, J. 2009b. Insect Damage to and Mortality of Seedlings of *Chenopodium album* L. and *Fallopia convolvulus* (L.) Á. Löve. 45: 59-65.
- Swift, M., Anderson, J. 1993. Biodiversity and ecosystem function in agricultural systems. En *Biodiversity and Ecosystem Function*, pp. 15-66.
- Szpeiner, A., Martínez-Ghersa, M.A., Ghersa, C.M. 2009. Wheat volatile emissions modified by top-soil chemical characteristics and herbivory alter the performance of neighbouring wheat plants. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 134: 99-

107.

- Tabashnik, B.E., Carrière, Y. 2017. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. *Nature Biotechnology* 35: 926-935.
- Terra, W.R., Ferreira, C., Bioquímica, D. De, Química, I. De, Paulo, U.D.S. 1994. Pergam on Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109B: 1-62.
- Tiffin, P. 2000. Mechanisms of tolerance to herbivore damage: What do we know? *Evolutionary Ecology* 14: 523-536.
- Turlings, T.C.J., Ton, J. 2006. Exploiting scents of distress: the prospect of manipulating herbivore-induced plant odours to enhance the control of agricultural pests. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 421-427.
- Turlings, T.C.J., Tumlinson, J.H., Lewis, W.J. 1990. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015* 1: 1251-1253.
- Underwood, N., Rausher, M., Cook, W. 2002. Bioassay versus chemical assay: Measuring the impact of induced and constitutive resistance on herbivores in the field. *Oecologia* 131: 211-219.
- Urretabizkaya, N., Vasicek, A., Saini, E. 2010. *Insectos perjudiciales de importancia agropecuaria: 1. Lepidópteros*. INTA, E. (ed.),.
- USDA. 1999. *Keys of Soil Taxonomy*. 8th ed. Pocahontas Press.
- Vandermeer, J.H. 1989. *The ecology of intercropping*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Viglizzo, E.F., Lértora, F., Pordomingo, A.J., Bernardos, J.N., Roberto, Z.E., Del Valle, H. 2001. Ecological lessons and applications from one century of low external-input farming in the pampas of Argentina. *Agriculture, Ecosystems and*

*Environment* 83: 65-81.

- Vila-Aiub, M.M., Yu, Q., Powles, S.B. 2019. Do plants pay a fitness cost to be resistant to glyphosate? *New Phytologist* 223: 532-547.
- Vilariño, M. del P., Ravetta, D.A. 2008. Tolerance to herbivory in lupin genotypes with different alkaloid concentration: Interspecific differences between *Lupinus albus* L. and *L. angustifolius* L. *Environmental and Experimental Botany* 63: 130-136.
- Wang, H., Yan, H., Du, H., Chao, M., Gao, Z., Yu, D. 2015. Mapping quantitative trait loci associated with soybean resistance to common cutworm and soybean compensatory growth after defoliation using SNP marker-based genome-wide association analysis. *Molecular Breeding* 35: 1-15.
- War, A.R., Paulraj, M.G., Ahmad, T., Buhroo, A.A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., Sharma, H.C. 2012a. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior* 7: 1306-1320.
- War, A.R., Paulraj, M.G., Ahmad, T., Buhroo, A.A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., Sharma, H.C. 2012b. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling and Behavior* 7: .
- Whittaker, R.H. 1975. *Communities and Ecosystems*. Mac-Millan, New York, USA.
- Wisler, G.C., Norris, R.F. 2005. Interactions between weeds and cultivated plants as related to management of plant pathogens. *Weed Science* 53: 914-917.
- de Wit. 1960. On Competition. *Versl. Landbouwk. Onderz* 66: 1-82.
- Woldemariam, M.G., Baldwin, I.T., Galis, I. 2011. Transcriptional regulation of plant inducible defenses against herbivores: A mini-review. *Journal of Plant Interactions* 6: 113-119.
- Xiao, Y., Wu, K. 2019. Recent progress on the interaction between insects and *Bacillus thuringiensis* crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological*

*Sciences* 374: .

Xu, S., Zhou, Z., Lu, H., Luo, X., Lan, Y., Zhang, Y., Li, Y. 2014. Estimation of the age and amount of brown rice plant hoppers based on bionic electronic nose use.

*Sensors (Switzerland)* 14: 18114-18130.

Zavala, J.A., Baldwin, I.T. 2004. Fitness benefits of trypsin proteinase inhibitor expression in *Nicotiana attenuata* are greater than their costs when plants are attacked. *BMC Ecology* 4: 1-15.

Zavala, J.A., Giri, A.P., Jongsma, M.A., Baldwin, I.T. 2008. Digestive duet: Midgut digestive proteinases of *Manduca sexta* ingesting *Nicotiana attenuata* with manipulated trypsin proteinase inhibitor expression. *PLoS ONE* 3: 29-31.

Zavala, J.A., Nability, P.D., DeLucia, E.H. 2013. An Emerging Understanding of Mechanisms Governing Insect Herbivory Under Elevated CO<sub>2</sub>. *Annual Review of Entomology* 58: 79-97.

Zavala, J.A., Scopel, A.L., Ballaré, C.L. 2001. Effects of ambient UV-B radiation on soybean crops: Impact on leaf herbivory by *Anticarsia gemmatalis*. *Plant Ecology* 156: 121-130.

Zhang, F., Iliescu, D., Hines, E., Leeson, M. 2011. Tomato Plant Health Monitoring: An Electronic Nose Approach. En *Intelligent Systems for Machine Olfaction: Tools and Methodologies*, IGI Global.

Zhao, Y., Botella, M.A., Subramanian, L., Niu, X., Nielsen, S.S., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. 1996. Two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog. *Plant Physiology* 111: 1299-1306.

Zimdahl, R.L. 2007. Fundamentals of weed science. Academic Press, San Diego, USA.

