

Tesis de Grado

Defensas químicas inducidas en hojas de soja frente al ataque de *Caliothrips phaseoli* (Thysanoptera) y de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera)

Romero, Berenice

2017

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the digital collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in bibliotecadigital.exactas.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Romero, Berenice. (2017). Defensas químicas inducidas en hojas de soja frente al ataque de *Caliothrips phaseoli* (Thysanoptera) y de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

https://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO001614_Romero

Cita tipo Chicago:

Romero, Berenice. "Defensas químicas inducidas en hojas de soja frente al ataque de *Caliothrips phaseoli* (Thysanoptera) y de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017.

https://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO001614_Romero

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

Defensas químicas inducidas en hojas de soja frente al ataque de
Caliothrips phaseoli (Thysanoptera) y de larvas de *Spodoptera frugiperda*
(Lepidoptera).

Autora: Berenice Romero

Director: Dr. MSc. Ing. Agr. Jorge Alberto Zavala

Consejero: Dr. Ing. Agr. Francisco M. Dillon

Lugar de trabajo: Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

Fecha de presentación: Octubre 2017

Tesis de Licenciatura

Agradecimientos

A mi mamá, mis abuelos y mi madrina, por lograr que no encuentre las palabras para explicar todo lo que significan para mí, todo lo que me enseñaron en estos años y me enseñan a diario, y cuán grandes ejemplos de personas son.

A Jorge Alberto Zavala, por haberme recibido en su laboratorio con una gran calidez desde el primer día. Lo que comenzó por una simple pregunta acerca de su especialidad se terminó convirtiendo en un tema de gran interés para mí y objeto de mi tesis. Gracias por haber estado siempre más que disponible para mí, haberme enseñado a ver las historias ocultas detrás de los gráficos y haberme permitido crecer intelectual y personalmente.

A Francisco M. Dillon, por haberme enseñado las técnicas con las cuales pude realizar los experimentos de mi tesis y haber respondido todas las inquietudes y preguntas que surgieron sobre la marcha.

A Vanesa Jacobi, por haber sido mi compañera de charlas y mates tanto fuera como dentro del laboratorio, por haberme contenido en días en los cuales perdí ensayos y por siempre haberme prestado cinco minutos de su tiempo para ayudarme y escucharme.

A los integrantes de los laboratorios de Bioquímica y Biomoléculas, por haber estado más que dispuestos a ayudarme a encontrar compuestos o materiales, perdidos quizás en el fondo de algún cajón o la heladera, y haber sido tan pacientes y buena onda.

A Wendy López Barrios, Ignacio Carol Lugones, Mariano Ariel Lenna, Emiliano Burne, Franco Norval, Ernesto Matej, María Emilia Cabrera, Micaela Bongianino, Josefina Quezada, Elías Cerdeira Prucnal, Leonardo Bloise, Oda Sofie Pettersen y Melina Dommarco, por haberme dado esos “empujoncitos”, “apapachos”, contención y todo el cariño que solo ustedes saben dar; por haber compartido días lindos y días no tan lindos, por siempre saber cómo sacarme una sonrisa y haber sido partícipes de más de una historia que luego se convirtió en una gran anécdota.

A mis docentes de la facultad, por haberme brindado una excelente formación y tener un trato tan ameno, especialmente Juan Carlos Calvo, Daniel Medesani, Adriana Pérez y Pablo Schilman.

Índice

Agradecimientos	2
Resumen	4
Introducción	5
Objetivos e hipótesis	12
Materiales y métodos	13
Análisis estadístico	17
Resultados	19
➤ Sección A	19
➤ Sección B	23
➤ Sección C	30
Discusión	38
Conclusiones	45
Bibliografía	46
Anexo	50

Resumen

Los cultivares comerciales de soja DM 4210 y 5.8i presentan una respuesta diferencial al ataque de los insectos. Desde la emergencia hasta la cosecha, la soja puede ser atacada por diferentes plagas como larvas de lepidópteros y tisanópteros que se alimentan de sus hojas y reducen el rendimiento. Las plantas presentan distintas líneas de defensa contra el ataque de herbívoros, como la síntesis de metabolitos secundarios (dentro de los cuales se destacan los inhibidores de proteasas digestivas y los flavonoides), regulada por distintas fitohormonas como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (cuyo precursor es el ACC o 1-aminociclopropano-1-carboxilato).

Se sembraron a campo ambos cultivares de soja. Con el objetivo de evaluar la susceptibilidad/resistencia de los mismos al ataque de lepidópteros y tisanópteros, se realizaron experimentos de supervivencia y ganancia de peso de larvas de *Spodoptera frugiperda* y experimentos de colonización, preferencia entre genotipos y tiempo de desarrollo de tisanópteros *Caliothrips phaseoli*. Se determinó que *C. phaseoli* prefiere y puede desarrollarse mejor en el genotipo 4210, mientras que *S. frugiperda* puede alimentarse de ambos sin que ello afecte su supervivencia o su ganancia de peso diferencialmente. Flavonoides como los derivados de quercetina se encuentran solo en el genotipo 4210, mientras que los derivados de kaempferol se encuentran en mayor concentración en el 5.8i.

Se realizaron aplicaciones exógenas de fitohormonas (SA, JA y ACC) 72 hs previas al comienzo de los experimentos con el fin de evaluar el efecto sobre la preferencia y el tiempo de desarrollo de los trips. Se indujeron cascadas de señalización que provocaron una disminución del número total de individuos de distintos estadios en el genotipo 4210, observándose un mayor efecto con el JA. El JA también indujo los niveles de inhibidores de proteasas de tripsina en el genotipo 4210. No se pudo evaluar el efecto de las fitohormonas en el genotipo 5.8i debido a que no se encontraron individuos vivos en ninguno de los tratamientos. Estos resultados sugieren que *C. phaseoli* es muy sensible a la composición química de trifolios del genotipo 5.8i y a los metabolitos secundarios inducidos por JA en el genotipo 4210. La aplicación exógena de JA sería recomendable como primera medida para controlar las poblaciones de trips en cultivares comerciales susceptibles. Deberían realizarse estudios in vitro con los diglicósidos de kaempferol del cultivar 5.8i para determinar si una mayor concentración de los mismos por sí sola es capaz de disminuir el ataque de trips.

Introducción

La soja (*Glycine max*) es el cultivo oleaginoso de mayor importancia mundial y también el más sembrado en nuestro país. La mayor parte de la producción se utiliza en la obtención de aceite y harina de extracción, enormemente consumidos por parte de los países europeos debido a su alto contenido proteico.

Fue introducida a comienzos del 1900 y con el paso de los años se pudo observar una rápida expansión de la superficie destinada al cultivo e inclusive una adopción del mismo en regiones donde tradicionalmente se cultivaban maíz o girasol. Ello se vio favorecido por la estabilidad del mercado, las innovaciones técnicas que ofrecen una gran capacidad de adaptación de la soja a variedad de ambientes, la facilidad y manejo de la cosecha, y una alta seguridad en cuanto al rendimiento de la misma.

Desde la emergencia hasta la cosecha, el cultivo de soja puede ser atacado por diferentes plagas que se alimentan de sus hojas y reducen el rendimiento. Entre las plagas que atacan este cultivo se encuentran los tisanópteros (Thysanoptera), que incrementan sus densidades poblacionales con las altas temperaturas y el clima seco. Se caracterizan por poseer piezas bucales asimétricas debido a la pérdida de la mandíbula derecha durante el desarrollo, pretarsos con un arolio reversible ("protrusible bladder"), adultos con alas lineales con largas setas marginales (cuando se encuentran presentes) y dos o tres estadios pupales. Las especies fitófagas de este orden presentan un aparato bucal sucto-raspador con el cual pueden explotar el citoplasma de las células de las plantas como fuente de alimento. El daño a los tejidos vegetales se produce debido a que raspan la hoja y succionan el contenido celular, y en casos severos pueden provocar defoliación.

Sumado al daño provocado por el tipo de alimentación de este insecto, algunas especies pertenecientes a la familia Thripidae pueden transmitir tospovirus (género *Tospovirus*, familia *Bunyaviridae*), los cuales tienen un impacto económico importante debido a que afectan cultivos de consumo masivo (Riley *et al.* 2011).

Otras de las típicas plagas de la soja son las larvas de lepidópteros, como *Spodoptera sp.*, que pueden disminuir el rendimiento del cultivo (INTA. 2011). *Spodoptera frugiperda* es un lepidóptero ampliamente distribuido en América, con 3 a 4 generaciones por año. A diferencia de otras especies de insectos de regiones templadas, no posee mecanismos de

diapausa. Tiene un hábito alimentario polífago, pudiendo afectar no sólo al cultivo de la soja sino también al maíz (*Zea mays*), algodón (*Gossypium hirsutum*) y poroto (*Phaseolus vulgaris*), entre otros. La larva de esta especie recibe el nombre común de “gusano cogollero” u “oruga militar tardía” debido a que cuando el alimento es escaso y hay una densidad elevada de larvas, las mismas se desplazan hacia otros cultivos en masa, como si fueran un “regimiento” (Casmuz *et al.* 2010).

Ante el ataque de un herbívoro o patógeno, las plantas presentan diversas líneas de defensa, que pueden ser de naturaleza *constitutiva* o *inducida*, según si están presentes en la planta independientemente de la presencia de herbívoros o no. Componentes estructurales que actúan como una barrera física (como por ejemplo, tricomas, espinas), repelentes y toxinas son ejemplos de defensas constitutivas; mientras que compuestos como los metabolitos secundarios (inhibidores de proteasas digestivas, flavonoides, fenoles, volátiles entre otros) que aumentan su contenido como respuesta al daño producido por los herbívoros son defensas inducidas. Las barreras físicas debidas a procesos de lignificación o producción de resinas también forman parte de estas líneas defensivas (Schoonhoven. 2005; Howe & Jander. 2008).

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos restringidos a ciertos grupos o taxones, a los cuales se les atribuyen funciones relacionadas con la defensa de la planta frente al ataque de insectos y otros organismos, si bien algunos autores consideran que los mismos intervienen también en la respuesta frente a factores ambientales como la deficiencia nutricional, la sequía y la radiación ultravioleta. Estos compuestos son mayoritariamente producidos a partir de precursores universales como diversos aminoácidos, el ácido shikímico y el acetil-coenzima A (Figura 1 & Schoonhoven. 2005).

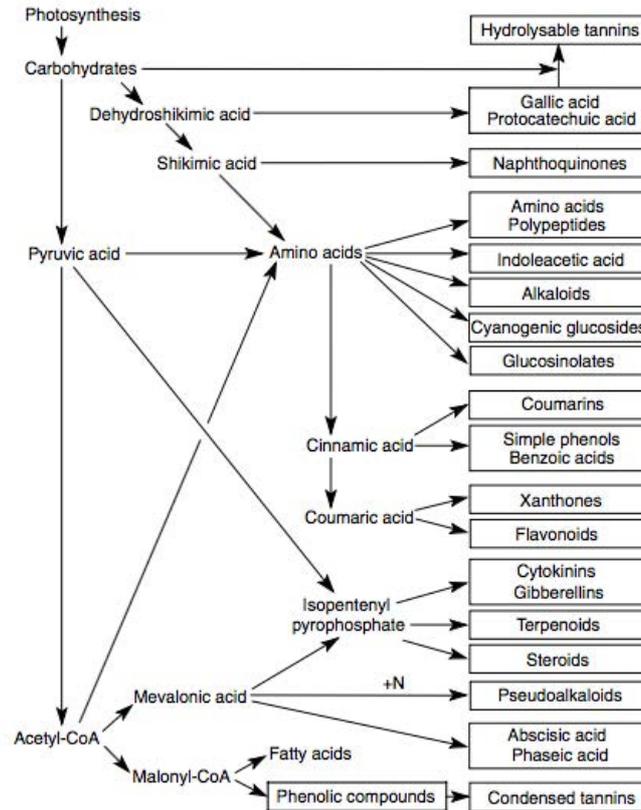


Figura 1: vías de síntesis de los principales grupos de metabolitos secundarios en plantas (Schoonhoven. 2005).

La síntesis de los metabolitos secundarios está regulada por distintas fitohormonas, como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (cuyo precursor es el ACC o 1-aminociclopropano-1-carboxilato), que pueden ser combinadas de manera diferencial para obtener una respuesta específica frente a cada estímulo.

El JA y sus compuestos derivados (*Figura 2*), conocidos como jasmonatos, son indicadores del daño tisular y provocan la activación de respuestas de defensa contra una gran variedad de insectos herbívoros. Estas respuestas incluyen la síntesis del ácido metil-jasmónico (MeJA, volátil), la formación de jasmonoil-isoleucina (JA-Ile) así como de otros conjugados (JACs) y enzimas. La hormona puede actuar sinérgicamente con el etileno, aumentando los niveles de respuesta de las plantas frente al ataque de insectos. De acuerdo con el trabajo de Howe & Jander (2008), las plantas mutantes del gen CO11, que interviene en la ruta de señalización del ácido jasmónico, resultaron ser muy susceptibles al ataque de distintos artrópodos, permitiendo concluir que los jasmonatos tienen un papel central en la regulación de las respuestas de defensa contra la herbivoría. La tercera hormona que participa en las

respuestas inmunológicas de las plantas es el SA, que en general regula la inducción de defensas relacionadas con el ataque de patógenos y de algunos insectos picadores, como los áfidos. Es interesante destacar que el SA actúa en forma antagonica con el JA, la inducción del SA disminuye la acumulación de JA. La importancia de estas hormonas se pone en evidencia en el trabajo de Selig et al. (2016), quienes evaluaron el desarrollo de poblaciones de los trips en plantas de soja tratadas con las fitohormonas SA y MeJA (precursor disponible comercialmente del JA). Este trabajo demuestra que la aplicación de MeJA provoca una disminución del 47% del tamaño poblacional de los trips, el efecto antagonista del SA con el JA al aplicarlos conjuntamente, y no descartan que el etileno también podría estar involucrado en las respuestas comportamentales registradas.

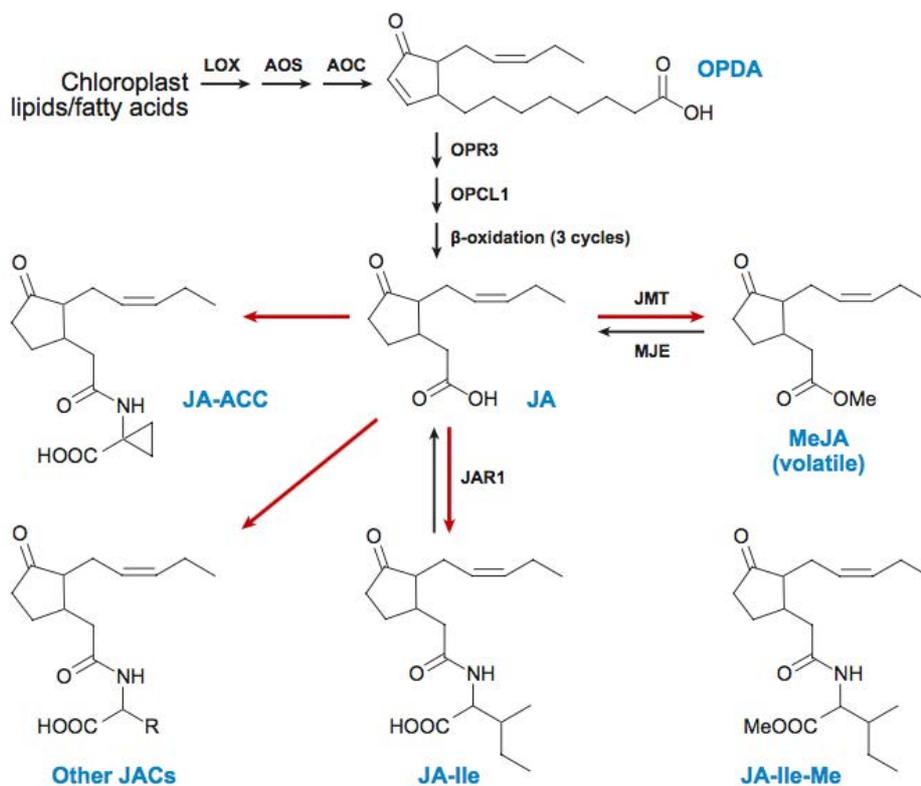


Figura 2: ruta de los octodecanoides para la síntesis del ácido jasmónico (JA) y sus derivados bioactivos. En el cloroplasto, el ácido linoleico es convertido en ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), por acción de las enzimas LOX, AOS y AOC. Una vez en el peroxisoma, intervienen las enzimas OPR3, OPCL1 y beta-oxidasa, para obtener JA. El JA es luego metabolizado a distintos derivados biológicamente activos (indicados con flechas rojas), como por ejemplo, el ácido metil-jasmónico (MeJA), un conjugado con el precursor del etileno (JA-ACC), el jasmonoil-isoleucina (JA-Ile) y otros compuestos conjugados (JACs). JA-Ile-Me hace referencia al compuesto JA-Ile metilado. (Howe & Jander. 2008).

Una de las defensas más importantes de la soja contra el ataque de insectos y reguladas por el JA/ET son los inhibidores de proteasas (PI). Estos metabolitos secundarios de naturaleza proteica se unen a proteasas digestivas presentes en el intestino de los organismos que se alimentan del tejido vegetal, formando así complejos que disminuyen parcial o totalmente la actividad proteolítica, e interfieren de esta manera en el crecimiento y desarrollo de los insectos herbívoros (Ryan. 1990). Outchkourov *et al.* (2004) observaron una disminución del 50% en la fecundidad de los trips cuando se alimentaron de una dieta artificial con PIs, así como también una reducción en el tamaño poblacional de los trips que se alimentaron sobre cultivos de papa transgénica que sobre expresaba PIs. Además, estas proteínas expresadas en tabaco resultaron ser defensas eficientes contra larvas de lepidópteros (Zavala *et al.* 2004).

Los PIs se encuentran generalmente en altas concentraciones en células parenquimáticas, pero también son detectables en hojas frente al ataque de insectos o patógenos (Ryan. 1990). Los PIs en el intestino de los insectos impiden el acceso al sustrato, reducen la disponibilidad de aminoácidos de la dieta ingerida y en algunos casos pueden ocasionar la muerte del herbívoro (Ryan. 1990; Franco *et al.* 2004).

Otras de las defensas importantes de la soja contra el ataque de insectos son los flavonoides, que en su mayoría se encuentran en forma de glucósidos, pudiendo ser almacenados en las vacuolas de la células vegetal (Schoonhoven. 2005). Pueden clasificarse a su vez en 2-fenilcromanos (flavonoides) y 3-fenilcromanos (isoflavonoides) (Figura 3). Estos compuestos fenólicos intervienen en funciones relacionadas con la atracción de organismos polinizadores y simbioses, así como también en la protección de las plantas contra el daño producido por la radiación ultravioleta, y pueden actuar como aleloquímicos o factores contra la herbivoría (Dixon & Pasinetti. 2010).

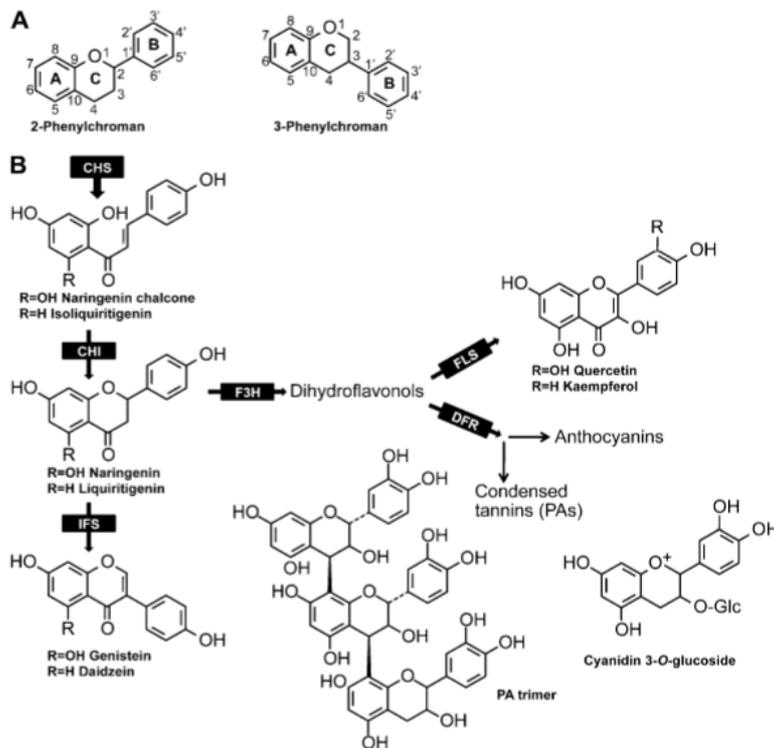


Figura 3: clases de flavonoides y breve esquema de su biosíntesis. A. Esqueletos de 2- y 3-fenilcromanos. B. Esquema de síntesis; CHS, F3H, FLS, DFR e IFS hacen referencia a las enzimas que intervienen en dicha síntesis. Todas las clases de (iso) flavonoides pueden ser además modificados por reacciones de sustitución (Dixon & Pasinetti. 2010).

Los cultivares comerciales de soja DM 4210 y DM 5.8i presentan una respuesta diferencial al ataque de los insectos, siendo el primero susceptible y el segundo, resistente. Analizando el perfil químico de los mismos, se puede observar que el cultivar 4210 tiene un menor nivel de inhibidores de proteasas, así como diversos flavonoides de los cuales carece el cv. 5.8i (triglicósidos y diglicósidos de quercetina y diglicósidos de kaempferol). En experimentos observacionales y ensayos a campo se advierte una preferencia de los trips por el cultivar 4210 y una preferencia por trifolios control respecto de trifolios que fueron tratados con ACC o JA, según el genotipo (no publicado).

Actualmente se desconocen los mecanismos moleculares de la respuestas defensivas de la soja frente a la herbivoría de los trips, si bien hay estudios que sugieren que el JA tiene un rol importante (Selig *et al.* 2016). También se han utilizado pesticidas que suprimen la vía del JA e inducen rutas de señalización en las cuales está involucrado el SA, logrando reducir la abundancia de trips en los cultivos (Reisig *et al.* 2012), con lo cual no es claro cuál de estas hormonas están involucradas en la respuesta, o si las mismas actúan conjuntamente.

Por otro lado, en general el ataque de los trips a la soja ocurre en conjunto con otras especies como larvas de lepidópteros, por lo que determinar el efecto de las defensas inducidas por los trips sobre las larvas y viceversa es importante para el control de estos insectos plaga. Poder dilucidar dichos mecanismos así como identificar compuestos presentes en los cultivos que disminuyan la palatabilidad, oviposición o afecten negativamente el desarrollo de trips y larvas lepidópteros, como la de *Spodoptera sp.* es de vital importancia para poder proponer nuevos métodos de mejoramiento de cultivos, pudiendo evitar el uso de insecticidas tradicionales u otros compuestos sintéticos.

Objetivos

- Analizar y caracterizar la respuesta de dos cultivares comerciales de soja (DM 4210 y DM 5.8i) con distintos niveles de defensa frente al ataque de trips *Caliothrips phaseoli* y larvas de *Spodoptera frugiperda*, cuantificando los isoflavonoides e inhibidores de proteasas presentes en las hojas.
- Evaluar el comportamiento, el crecimiento y el desarrollo de las larvas de *Spodoptera frugiperda* y la preferencia de los trips *Caliothrips phaseoli* luego del ataque de estos insectos y frente a la aplicación de fitohormonas como el SA, JA y ACC en los cultivares.

Hipótesis

1. Hay una mayor concentración de compuestos químicos defensivos como inhibidores de proteasas e isoflavonoides en el cultivar resistente (5.8i) respecto del susceptible (4210).
2. El cultivar 5.8i es menos preferido por los trips que el cultivar 4210 y la supervivencia y fecundidad de trips es menor en el cv. 5.8i que en el 4210.
3. Al aplicar fitohormonas, hay cambios en la supervivencia, en la fecundidad y en la preferencia por la alimentación de los trips y larvas de *Spodoptera frugiperda*.
4. Las diferencias en la resistencia a los trips observadas en los cultivares afectarán de la misma manera la supervivencia de las larvas de *Spodoptera frugiperda*.

Materiales y métodos

1. *Material botánico y condiciones de cultivo*

Se sembraron en el campo experimental de la Facultad de Agronomía (UBA) dos cultivares comerciales de soja (Genotipo 4210 y 5.8i, Semillera Don Mario) a fines de Diciembre/comienzos de Enero. Las cuatro parcelas (3,6 x 1,6 m) sembradas se dividieron de manera que en las mismas se fueran alternando 3 hileras de plantas de cada genotipo, con un espacio de aproximadamente 15 centímetros entre una hilera y otra.

Las plantas fueron regadas para mantener un abastecimiento óptimo de agua y el lote se mantuvo desmalezado manualmente. Desde el momento de emergencia hasta que las plantas desarrollaron la primer hoja verdadera se protegió a las plántulas del ataque de palomas usando una mediasombra.

2. *Spodoptera frugiperda*

Se utilizaron huevos de cría del IFEVA/FAUBA, y una vez eclosionados se utilizaron los neonatos, a modo de indicador general de la resistencia de los cultivares.

2.1. *Curva de supervivencia*

Se utilizaron plantas de soja de los genotipos 4210 y 5.8i. Se colocaron 12 neonatos de *Spodoptera frugiperda* por trifolios, dentro de una bolsa de tul que evitara que los mismos se escaparan (sellándola con cinta de papel) y se contabilizó el número de individuos vivos durante 7 días, en ambos genotipos. Se realizaron 6 réplicas por tratamiento.

2.2. *Ganancia de peso de larvas*

Se pesaron las larvas provenientes del experimento de supervivencia el mismo día en que concluyó dicho ensayo. Se trabajó con 10 larvas que se habían alimentado con trifolios del genotipo 4210, y 12 con el genotipo 5.8i.

2.3. *Inhibidores de proteasas (tripsina)*

Las muestras provenientes de los experimentos de supervivencia y del peso de las larvas fueron cosechadas, colocando los trifolios en pequeños sobres de papel aluminio, debidamente rotulados, y conservándolos en nitrógeno líquido hasta su posterior reserva en un freezer a -80°C. También se cosecharon trifolios de ambos genotipos que fueron cubiertos por bolsas de

tul vacías (controles). Se cosecharon en total 6 trifolios dañados y 6 trifolios control, por cada genotipo.

Para extraer los inhibidores de tripsina se mortearon en N₂ líquido 150mg de material fresco (hojas), y se vortexeó en 0,525 ml de buffer de extracción durante 5 minutos. Luego se centrifugó a 11.000g durante 15 minutos a 4°C y se levantó el sobrenadante (extracto de inhibidores). Luego se colocó en la lectora de microplacas: 115ml buffer de corrida (Tris-Cl 0,1 M; pH 7,8; Cl₂Ca 20mM), 10ml de 0,08mg Tripsina Bovina/ml buffer corrida, 15ml de extracto de inhibidores y se incubaron durante 10 min a 37°C. Luego se agregaron 50ml del sustrato *a*-N-Benzoil-L-arginina-*p*-nitroanilidina (Bapna; 1mg/1ml de buffer de corrida). La corrida se hizo a 37°C y se ajustó al lector en la longitud de onda de 410 nm (Van Dam et al., Fortunato et al., 2007). La preparación del buffer se realizó agregándole a un litro de buffer Tris-Cl 0,1M: 50g polivinil polipirrolidona (PVPP), 2g Fenioltiourea, 5g Dietydithocemnet, 18,6 g Na₂EDTA.

El valor de inhibición de la actividad de tripsina se relativizó a la concentración de proteína del extracto, la cual fue medida usando Bio-Rad's Protein Assay y albúmina bovina como estándar.

2.4. Determinación de isoflavonoides

Las hojas provenientes de los experimentos de supervivencia y del peso de las larvas fueron cosechadas, y los trifolios fueron colocados en pequeños sobres de papel aluminio, debidamente rotulados, y conservados en nitrógeno líquido hasta su posterior reserva en un freezer a -80°C. También se cosecharon trifolios de ambos genotipos que fueron cubiertos por bolsas de tul vacías (controles).

Para la determinación de isoflavonoides en hojas, se mortearon 0,1g de material verde (peso fresco) en N₂ líquido, se adicionaron 0,9 ml de metanol 80% y se vortexeó durante 2 minutos. Luego se sonicó durante 1 minuto y se coloraron las muestras en hielo durante 2 horas. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 11.000 g. Se adicionaron 0,4 ml de cloroformo y 0,2 ml de agua destilada y se realizó una segunda centrifugación por 4 minutos. Se sustrajeron las fases acuosas y se dispusieron en viales. Las muestras fueron analizadas por un HPLC con una columna analítica Eclipse XDB-C18 4,6 x 150 mm, 5mm utilizando un gradiente entre acetonitrilo (ACN) y agua acidulados con ácido acético (1%) durante 30

minutos a un flujo de 1ml/min (0min-15ACN% y 30min-36%ACN). El detector UV-Vis fue seteado a 360 nm.

Se realizaron 3-4 réplicas por tratamiento.

3. Trips

Se colectaron adultos de *Caliothrips phaseoli* utilizando un frasco con cierre hermético con dos salidas, que permitían succionar de una salida y hacer vacío en el recipiente de manera de colectar trips desde la otra boca, excepto en el experimento de colonización natural.

3.1. Colonización natural

Se tomaron trifolios del tercio superior al azar y se contabilizó el número de trips adultos por trifolio (n=20 o 21), en ambos genotipos.

3.2. Crecimiento y desarrollo de los trips

Se colocaron 12 trips por bolsa, y dentro de la misma se dispuso un trifolio de uno u otro genotipo. Se contabilizó el número de huevos, larvas y adultos por trifolio, en cada caso luego de 14 días. Se realizaron 6 réplicas por tratamiento.

3.3. Preferencia entre genotipos 4210 y 5.8i

Se colocaron 15 trips adultos por bolsa de tul, la cual envolvía un trifolio del genotipo 4210 y uno del 5.8. Se contabilizó el número de individuos presentes en cada trifolio, durante 4 días (96 hs desde el momento en el cual se colocaron inicialmente los insectos). Se realizaron 6 réplicas por tratamiento.

3.4. Determinación de los inhibidores de proteasas (tripsina)

Se siguió el protocolo descrito para las muestras de hojas dañadas por las larvas de *Spodoptera frugiperda*. Se utilizaron las muestras cosechadas del experimento de preferencia entre genotipos 4210 y 5.8i del año 2016, y muestras a las cuales se les había aplicado una determinada fitohormona 72 hs previas al momento de cosecharlas (ver 3.6 *Preferencia en ambos genotipos con fitohormonas*). Se realizaron 3-4 réplicas por tratamiento.

3.5. Determinación de flavonoides

Se siguió el protocolo descrito para las muestras de hojas de los experimentos con *Spodoptera frugiperda*. Se utilizaron las muestras cosechadas del experimento de preferencia entre genotipos 4210 y 5.8i. También se cuantificaron los flavonoides presentes en hojas a las

cuales se les había aplicado una determinada fitohormona 72 hs previas al momento de cosecharlas (ver 3.6 *Preferencia en ambos genotipos con fitohormonas*). Se realizaron 3-4 réplicas por tratamiento.

3.6. *Preferencia en ambos genotipos con fitohormonas (ACC, JA y SA)*

En el caso del JA, se aplicó una concentración de 1 mM a las hojas de soja. Para ello, se tomaron 68 microlitros de metil jasmónico y 140 microlitros de etanol, y se llevaron a un volumen final de 300 cm³ con agua destilada, en un pulverizador.

Se aplicó también una solución de ACC 1 mM. La misma fue preparada pesando 0,005 g de ACC y diluyendo el mismo en 50 ml de agua destilada. Posteriormente se lo colocó en un pulverizador.

En el caso del SA, se aplicó una concentración de 1,5 mM. Se pesaron 0,069 g de SA y se llevaron a un volumen final de 300 cm³ con agua destilada, en un pulverizador.

Las hormonas fueron pulverizadas entre 72 hs previas al momento en el cual se colocaron los insectos y se comenzaron a realizar las observaciones. Luego de pulverizar una sola vez por cada lado del trifolio, se colocó el mismo dentro de una bolsa de tela individual, sellando sus bordes con cinta de papel. Para los trifolios controles, se realizó algo similar, pero con agua destilada.

Luego de las 72 hs, se quitaron las bolsas individuales y se dispusieron de un trifolio pulverizado con hormona y un trifolio control dentro de una misma bolsa de tela. En dicha bolsa se habían colocado (12 ± 3) thrips. Luego se contabilizó el número de individuos adultos por trifolio, cada día, durante 96 hs.

3.7. *Crecimiento y desarrollo de los trips con aplicación de fitohormonas*

Se evaluó el efecto de la aplicación de las fitohormonas previamente mencionadas (JA, SA y ACC) sobre el crecimiento y desarrollo de los trips, en ambos genotipos. Se utilizaron concentraciones de 1 mM de JA, 1 mM de ACC y 1,5 mM de SA. Dichas hormonas fueron pulverizadas en cada caso sobre ambas caras del trifolio tratado, 72 hs antes del comienzo del experimento.

Se colocaron (15 ± 2) trips por bolsa de tul, y dentro de la misma se dispuso un trifolios de uno u otro genotipo, y los trifolios tratados con hormonas o sin tratar (control). Se contabilizó el número de huevos, larvas y adultos por trifolios, en cada caso, luego de 14 días.

3.8. Interacción *Spodoptera frugiperda*- trips

Se colocaron 12 neonatos de *Spodoptera frugiperda* por trifolios, se los cubrió con una bolsa de tul (30 cm x 30 cm) y se permitió que se alimenten durante 72 hs. Luego de dicho lapso de tiempo, se realizó un experimento de preferencia de trips entre trifolios control y trifolios que hubieran sido sometidos a daño por *S. frugiperda*. Para ello, se colocaron (15 ± 3) trips adultos por bolsa de tul, la cual envolvía un trifolios control y uno dañado, y se contabilizó el número de individuos presente en cada trifolios, durante 4 días (96 hs desde el momento en el cual se colocaron inicialmente los trips).

Este experimento no se pudo llevar a cabo debido a una falta de huevos/neonatos de *Spodoptera frugiperda*.

Análisis estadístico

Las curvas de supervivencia para larvas de *Spodoptera frugiperda* fueron analizadas utilizando un test de chi-cuadrado y uno de Gehan-Breslow-Wilcoxon.

Los datos obtenidos en el experimento “Ganancia de peso de larvas de *Spodoptera frugiperda*” fueron analizados con un ANOVA de 1 factor, habiéndose previamente corroborado el cumplimiento de los supuestos de homocedasticidad y normalidad.

Para el análisis de datos provenientes de los ensayos de “Inhibidores de proteasas de tripsina”, se plantearon modelos lineales generales (GLS) en los cuales se modeló la varianza con las funciones identidad, exponencial y potencia, considerando el genotipo y el nivel de daño como variables explicatorias de efecto fijo e incorporando la interacción entre los mismos en el modelo. Se seleccionó aquel modelo con menor valor del criterio de información Bayesiano (BIC), considerándose una diferencia igual o mayor a 2 unidades como significativa. Se corroboró además el cumplimiento del supuesto de normalidad con un test de Shapiro-Wilks y una distribución azarosa de los residuos gráficamente.

En el caso de la “Determinación de isoflavonoides”, se realizó un análisis con un ANOVA de 1 factor o con un modelo lineal general con modelado de la varianza (función identidad) cuando el compuesto identificado estuviera presente en un solo genotipo. Si el compuesto se hallaba en ambos genotipos, se plantearon distintos modelos lineales generales (GLS) y se seleccionó aquel con menor BIC, de acuerdo con el criterio mencionado anteriormente. Se corroboraron además el cumplimiento del supuesto de normalidad con un test de Shapiro-Wilks y una distribución azarosa de los residuos gráficamente.

Se utilizó un modelo lineal generalizado (GLM) (distribución Poisson, considerando el “genotipo” como variable explicatoria de efecto fijo) para analizar el efecto del genotipo sobre la colonización natural de trips en soja. Se corroboró además que no hubiera sobre o subdispersión en los datos.

Se realizó una prueba de correspondencia en el caso del ensayo de “Performance de trips” con las frecuencias observadas el día 14 del experimento.

Por último, los datos obtenidos en los experimentos de “Preferencia de trips entre genotipos” fueron expresados en proporciones y analizados con una prueba chi-cuadrado, para determinar si las mismas diferían respecto de aquellas esperadas por el azar y aplicándose la corrección de Bonferroni secuencial en el caso que fuera necesario, debido a que las observaciones no eran independientes entre sí. También se analizaron los datos con modelos lineales generales considerando el factor “tiempo” como variable explicatoria de efecto fijo y la “unidad experimental” como una variable explicatoria de efecto aleatorio, con el fin de determinar si había un efecto del tiempo en las proporciones observadas de insectos en un dado trifolio. Se seleccionó aquel modelo con menor BIC y que cumpliera con los supuestos de homocedasticidad y normalidad. En la “Preferencia con fitohormonas”, se incorporó además el factor “hormona” como variable explicatoria de efecto fijo.

Resultados

Sección A. Desarrollo de *Spodoptera frugiperda* y *Caliothrips phaseoli* sobre cultivares comerciales de soja

Con el objetivo de evaluar el crecimiento y desarrollo de las larvas de *Spodoptera frugiperda* en dos cultivares comerciales de soja con diferentes perfiles químicos (DM 4210 y DM 5.8i), se permitió la alimentación de neonatos sobre las plantas de ambos cultivares durante 7 días y se contabilizó el número de neonatos vivos cada día, expresándolo en porcentaje (Figura 4).

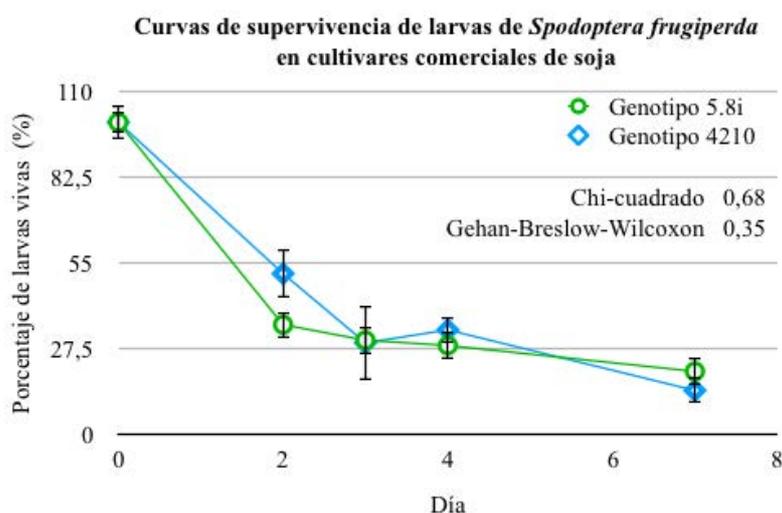


Figura 4: curvas de supervivencia de larvas de *Spodoptera frugiperda* en los genotipos 4210 y 5.8i. Las barras de error representan el error muestral ($n=5$ ó 6). Se muestran los valores P para un test chi-cuadrado y un test Gehan-Breslow-Wilcoxon. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas ($p\text{-valor}<0,05$).

Los tests de chi-cuadrado y Gehan-Breslow-Wilcoxon no revelaron que existieran diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de ambos genotipos. La supervivencia media de las larvas que se alimentaron del genotipo 4210 fue de 3 individuos, mientras que en el genotipo 5.8i fue de 2 individuos.

También se evaluó la ganancia de peso en cada caso, una vez finalizado el experimento de supervivencia (Figura 5). El peso promedio a los 7 días de vida de las larvas de *Spodoptera frugiperda* fue de $5,28 \pm 0,73$ mg para los individuos que habían sido alimentados con el

genotipo 5.8i, mientras que aquellos alimentados con el genotipo 4210 tuvieron un peso promedio de $4,12 \pm 0,67$ mg.

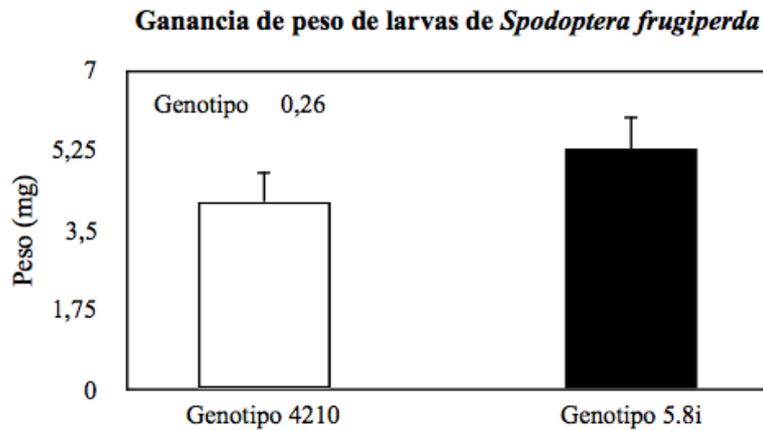


Figura 5: peso promedio de larvas de *Spodoptera frugiperda* de 7 días de vida, luego de haber sido alimentadas con cultivares comerciales de soja. Las barras de error representan el error muestral ($n_{4210}= 10$, $n_{5.8i}=12$). Se muestra el valor P para un ANVA de un factor. Los asteriscos (*) indican que las medias difieren significativamente entre sí (valor $P < 0,05$).

No se detectaron diferencias significativas en el peso promedio de larvas de 5 días de vida alimentadas de ambos genotipos ($p=0,26$).

Con el fin de caracterizar la preferencia de alimentación natural de los individuos de *Caliothrips phaseoli* entre ambos cultivares, se cuantificó la colonización natural a campo (Figura 6), y posteriormente se realizó un experimento de preferencia entre genotipos (Figura 7).

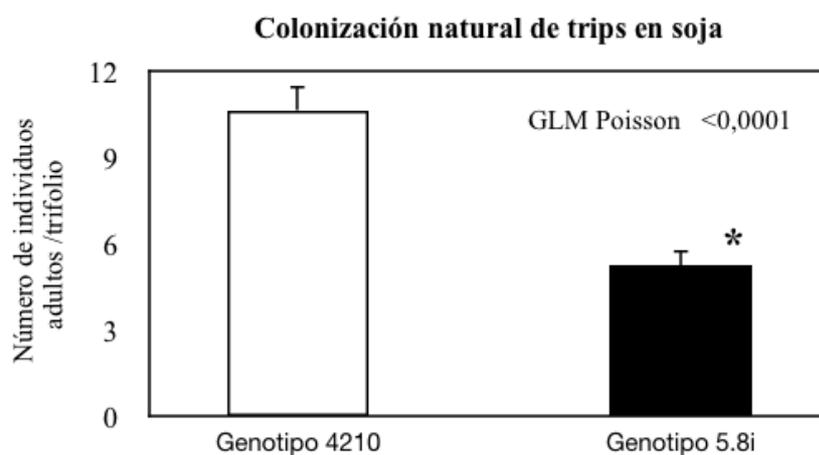


Figura 6: número de trips adultos por trifolio. Los trifolios fueron elegidos al azar y pertenecieron al tercio superior de follaje del cultivo. Se muestra el valor P para un GLM con distribución de Poisson. Las barras de error representan el error muestral ($n=20$ o 21). Los asteriscos (*) indican que las medias difieren significativamente entre sí ($P < 0,05$).

Se detectaron diferencias significativas en el número de insectos observados por trifolio en las hojas pertenecientes a las plantas de distinto genotipo, se encontró un mayor número de trips en los trifolios del genotipo 4210 ($p < 0,0001$). El número promedio de individuos en los trifolios del cultivar 4210 fue de $10,65 \pm 0,87$, mientras que en el 5.8i fue de $5,24 \pm 0,55$.

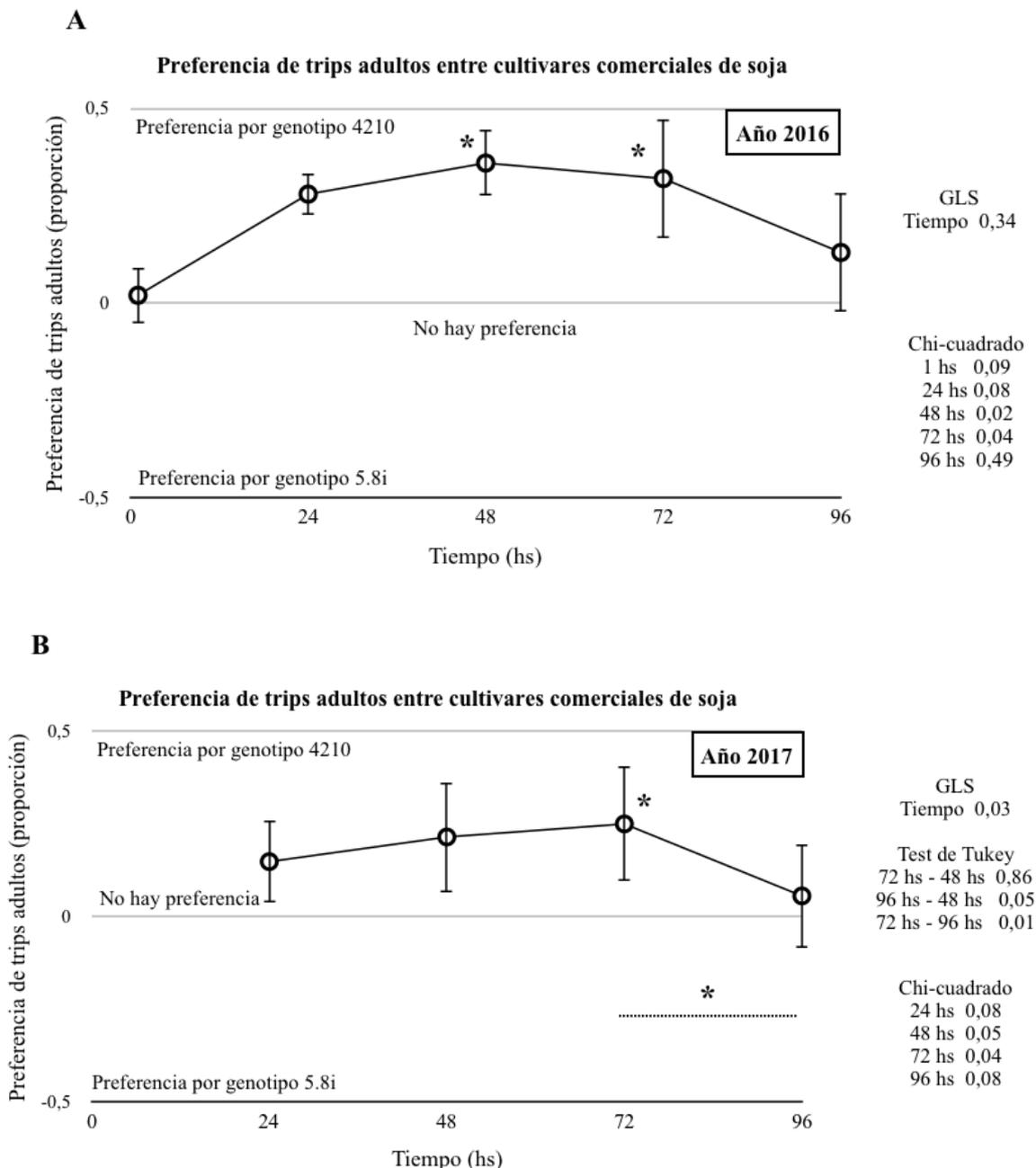


Figura 7: preferencia de trips adultos por un trifolio del genotipo 4210 o un trifolio del genotipo 5.8i en función del tiempo en dos ensayos independientes. Los datos fueron expresados como proporción de adultos, considerando el número de individuos presentes sobre un dado trifolio respecto del número total, y de modo que una proporción de 0,5 fuera equivalente al 0 del eje de ordenadas (no hay preferencia). Las barras de error representan el error muestral ($n=6$). Se muestran los valores P para un GLM con tiempo inicial como

covariable y modelado de la matriz de covarianza, para contrastes *a posteriori* (Tukey) y para tests Chi-cuadrado. Se realizaron correcciones secuenciales de Bonferroni a los valores P de los tests chi-cuadrado. Los asteriscos (*) indican que las medias difieren significativamente entre sí o que la proporción difiere significativamente de 0,5 ($P < 0,05$). A) Año 2016. B) Año 2017.

En ambos años se observó una tendencia a una mayor preferencia de los trips a alimentarse de los trifolios del genotipo 4210, que luego fue disminuyendo a medida que transcurrieron los días. El tiempo no tuvo un efecto significativo en el año 2016 (*Figura 7A*), pero sí en 2017, encontrándose que las proporciones medias entre las 72 y las 96 hs difirieron significativamente entre sí (*Figura 7B*).

Al analizar si las proporciones de trips adultos observadas en el experimento de preferencia entre genotipos eran distintas de una distribución esperada por azar mediante el test de Chi-cuadrado y corrigiendo con Bonferroni debido a la realización de múltiples tests sobre las mismas unidades experimentales, se pudo determinar que a las 48 y 72 hs de iniciado el experimento realizado en 2016, y a las 72 hs de iniciado el experimento llevado a cabo en 2017, las proporciones de estos insectos difirieron significativamente respecto de las esperadas por azar (*Figuras 7A y 7B*). El tiempo de desarrollo de los trips difirió entre los cultivares de soja. Luego de 14 días, hubo una reducción considerable del número de adultos respecto del tiempo inicial y un mayor número total de individuos en trifolios del genotipo 4210 (*Figura 8*). El genotipo es independiente del estadio del insecto (Prueba de correspondencia, $p=0,004$), habiendo una asociación positiva entre huevos, larvas y el genotipo 4210, y entre trips adultos y el genotipo 5.8i. Mis resultados sugieren que la alimentación sobre los diferentes cultivares comerciales de soja podría afectar el ciclo de vida de tisanópteros de manera diferencial.

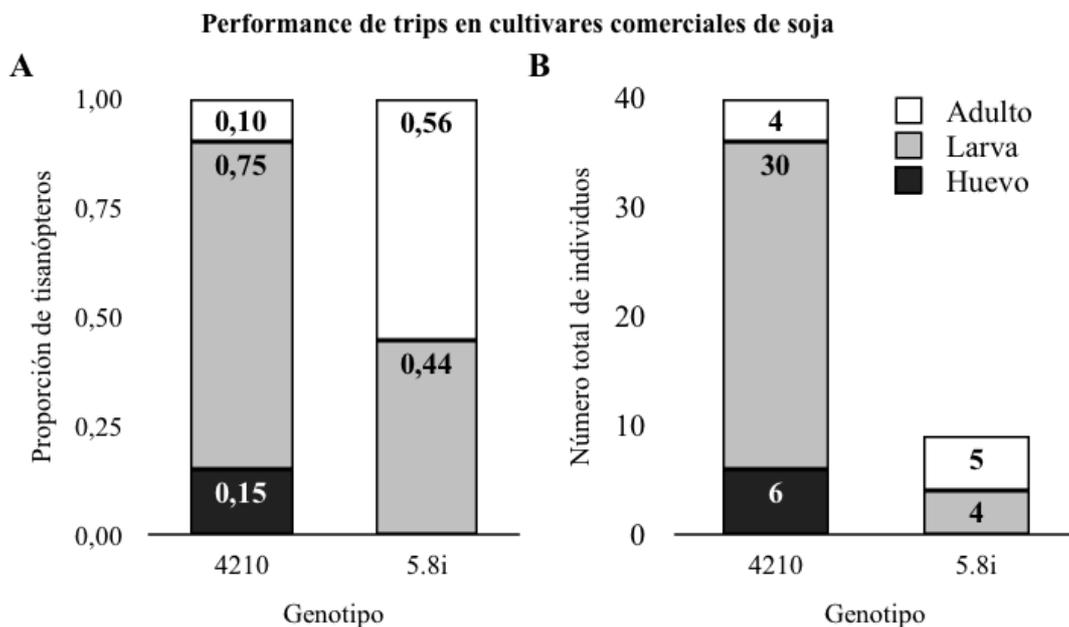


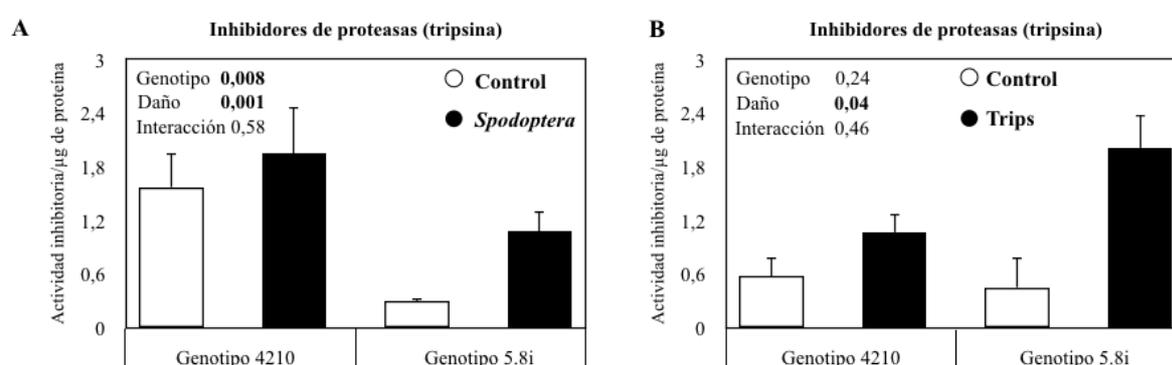
Figura 8: desarrollo de tisanópteros en trifolios de cultivares 4210 y 5.8i luego de 14 días. Inicialmente se coloraron 12 trips adultos por réplica. Se realizaron 6 réplicas por tratamiento. A) Proporción de individuos de distintos estadios (adulto, larva y huevo) según el tratamiento. B) Número total de individuos de cada estadio (adulto, larva y huevo) según el tratamiento.

Sección B. Defensas constitutivas e inducidas: inhibidores de proteasas y compuestos fenólicos presentes en el tejido foliar de cultivares comerciales de soja.

Debido a que *Spodoptera frugiperda* presenta un aparato bucal de tipo masticador y *Caliothrips phaseoli* posee un aparato bucal de tipo raedor, se determinó la respuesta de la soja frente al daño diferencial de estos dos tipos de herbívoro. Con el objetivo de caracterizar los niveles de compuestos químicos que intervienen en la defensa de las plantas frente al ataque de herbívoros y determinar si son además de naturaleza constitutiva o si pueden ser inducidos por herbivoría, se cuantificaron los niveles de actividad de los inhibidores de proteasas de tripsina (Figuras 9A y 9B), así como los compuestos fenólicos presentes en trifolios de ambos cultivares, con y sin daño de los insectos (Figura 10).

Al determinar los niveles actividad de inhibidores de proteasas, se observó un efecto del cultivar independiente del efecto del nivel de daño de las hojas, en el caso de muestras provenientes de los experimentos con *Spodoptera frugiperda* (interacción no significativa, $p=0,58$). Hubo un efecto del genotipo en el nivel de actividad inhibitoria relativizada a la cantidad de proteína ($p=0,008$), encontrándose mayores niveles en el genotipo 4210 respecto del 5.8i. También hubo un efecto del nivel de daño, indicando que la herbivoría sería capaz de inducir mayores niveles de estos compuestos químicos ($p=0,001$) (Figura 9A).

En muestras provenientes de experimentos con trips adultos (*Caliothrips phaseoli*) (Figura 9B), el efecto del genotipo del cultivar también fue independiente del efecto del nivel de daño de la muestra vegetal (interacción no significativa, $p=0,46$). Sin embargo, no hubo un efecto del genotipo del cultivar ($p=0,24$), a diferencia de lo observado con el nivel de daño ($p=0,04$). Los niveles de actividad de los inhibidores de proteasas fueron mayores en muestras dañadas que en muestras control, independientemente del genotipo. En este caso, los niveles basales de actividad de inhibidores de proteasas no difirieron entre los genotipos, en contraposición con los resultados provenientes de los experimentos con *Spodoptera*



frugiperda.

Figura 9: actividad inhibitoria relativizada a la cantidad de proteína presente en trifolios de los genotipos 4210 y 5.8i, con y sin daño por herbivoría. Las barras de error representan el error muestral ($n=3$ o 4). Se muestran los valores P para un GLS con modelado de la varianza (función potencia en el caso de *Spodoptera* y función exponencial en el caso de trips). A) *Spodoptera frugiperda*. B) Trips.

Al cuantificar distintos compuestos fenólicos presentes en el tejido foliar, se pudo observar que mientras algunos fueron de naturaleza constitutiva, otros fueron inducidos por herbivoría y que además la inducción fue específica en algunos casos.

Uno de los compuestos identificados en este estudio fue un derivado benzoico, que fue inducido por herbivoría de *Spodoptera frugiperda* en el genotipo 4210 (Figura 10A), contrario a lo ocurrido con el daño producido por los trips en ambos genotipos (Figura 10B, $p=0,06$) (Figura 10B). En muestras no dañadas no se encontró producción de este compuesto y es posible que el bajo nivel detectado en muestras del genotipo 5.8i en el caso de *Spodoptera frugiperda* se debiera a daños previos realizados por otros herbívoros presentes en el campo experimental.

El triglicósido de quercetina fue ubicuo del genotipo 4210, de naturaleza constitutiva. La herbivoría tuvo un efecto diferencial sobre los niveles de quercetina que vario con la especie de insecto que produjo el ataque, evidenciándose una tendencia hacia una mayor producción del compuesto cuando el daño fue realizado por trips (*Figura 10D*) y una disminución significativa de los niveles del compuesto cuando el daño lo produjeron larvas de *Spodoptera frugiperda* ($p=0,024$) (*Figura 10C*).

La daidzina fue inducida por herbivoría, pero varió de acuerdo a la especie de insecto que produjo el daño (*Figuras 10E y 10F*). El aumento de este compuesto no fue significativo en ambos casos ($p=0,18$, *Spodoptera*; $p=0,36$, trips). Se detectó daidzina en muestras no dañadas del genotipo 5.8i, pudiendo deberse nuevamente a daño previo provocado por herbívoros no controlados.

El triglicósido de kaempferol es producido constitutivamente y se encontró en ambos genotipos. El efecto producido por el daño por herbivoría es similar al observado para el triglicósido de quercetina: hay una disminución significativa del nivel del triglicósido cuando el daño es provocado por *Spodoptera frugiperda* ($p=0,04$) (*Figura 10G*). En el caso del ataque de trips, los niveles de este compuesto fenólico fueron similares entre muestras control y muestras dañadas ($p=0,83$) (*Figura 10H*).

Los diglicósidos de quercetina están sólo presentes en el genotipo 4210, de manera constitutiva (*Figuras 10I-L*). La herbivoría de *Spodoptera frugiperda*, disminuyó la concentración de uno de los isómeros (B) en el tejido foliar ($p=0,019$). La concentración del isómero A, en cambio, no se ve alterada por el daño por herbivoría.

La genistina se encuentra presente en ambos genotipos, en cantidades similares. El daño por trips no produce alteraciones en el nivel de este compuesto ($p=0,23$) (*Figura 10N*), a diferencia de *Spodoptera frugiperda*, cuyo daño aumenta la cantidad de la genistina ($p=0,0001$) (*Figura 10M*). (Unir)

El triglicósido de isorhamnetina es constitutivo, ubicuo de ambos genotipos (*Figuras 10Ñ y 10O*). La alimentación de trips y *Spodoptera frugiperda* no alteraron los niveles de este compuesto fenólico ($p=0,11$ y $p=0,16$, respectivamente).

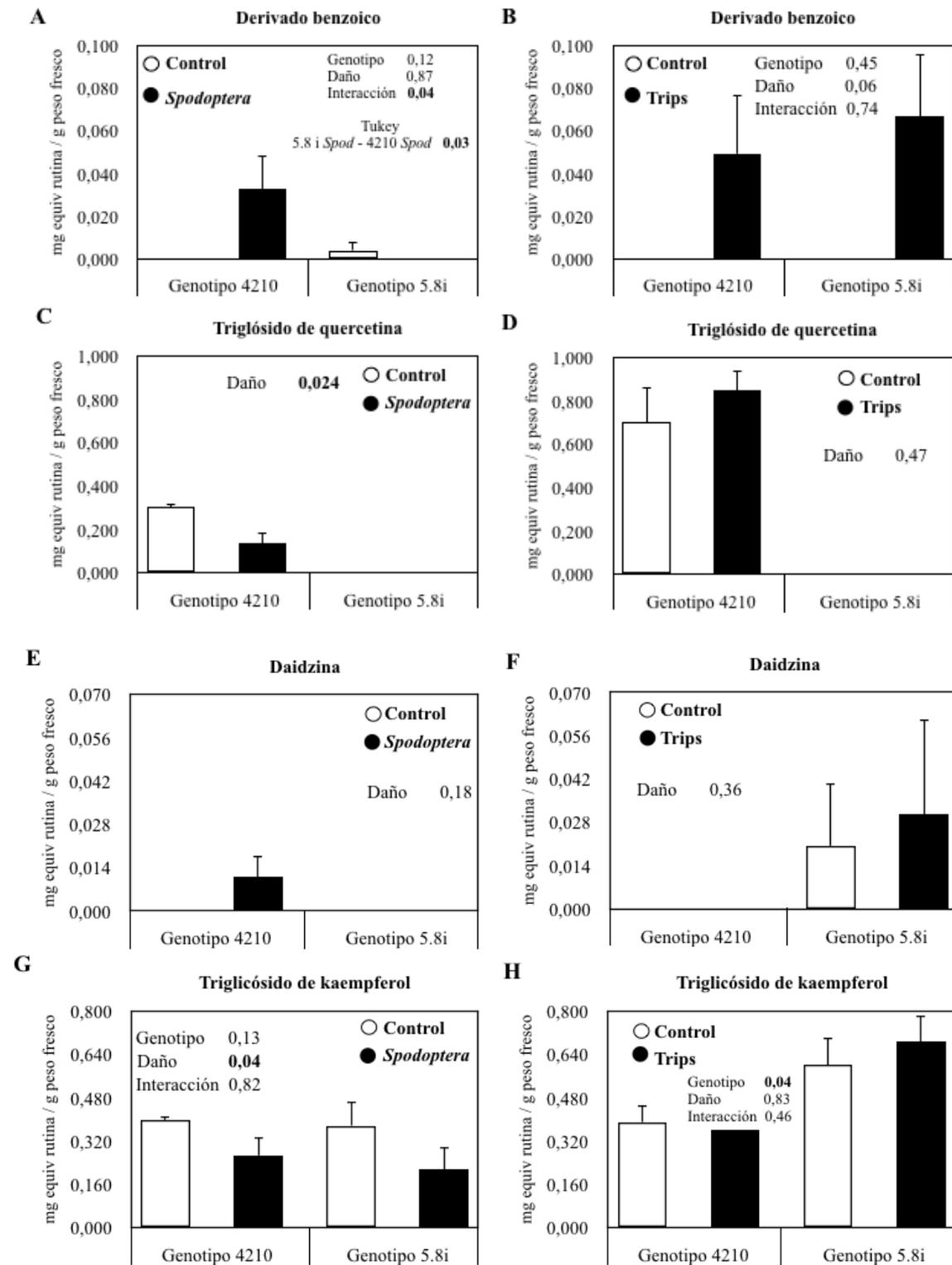
Se encontraron además distintos diglicósidos de kaempferol, algunos presentes en ambos genotipos y otros solo en el 4210. El diglicósido A se encuentra en ambos genotipos y frente al daño con *Spodoptera frugiperda*, habría una tendencia por la cual disminuirían los niveles del mismo ($p=0,085$) (*Figura 10P*). En el caso de los trips, la herbivoría no afecta la concentración del diglicósido A ($p=0,22$) y habría una mayor cantidad en el genotipo 5.8i ($p<0,01$) (*Figura 10Q*).

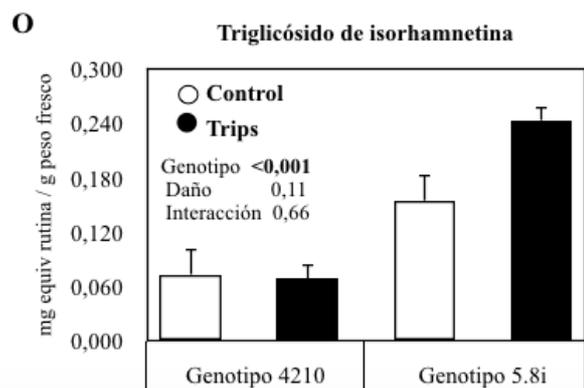
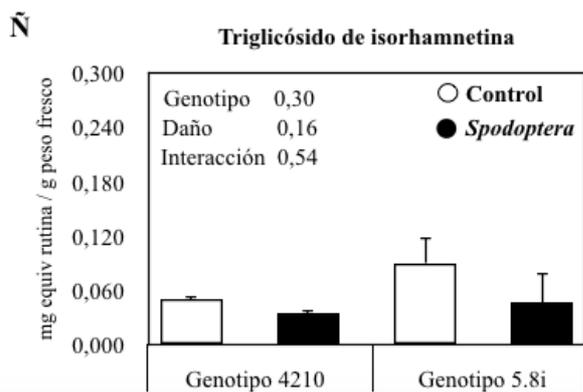
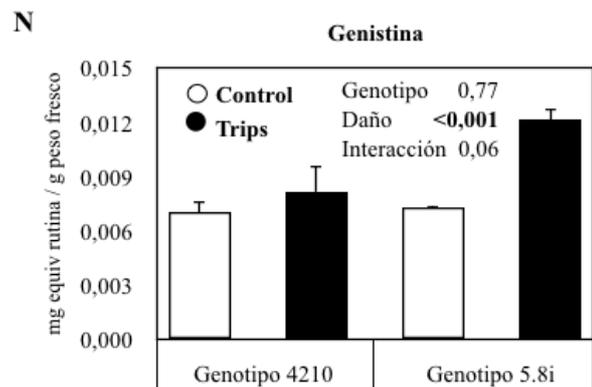
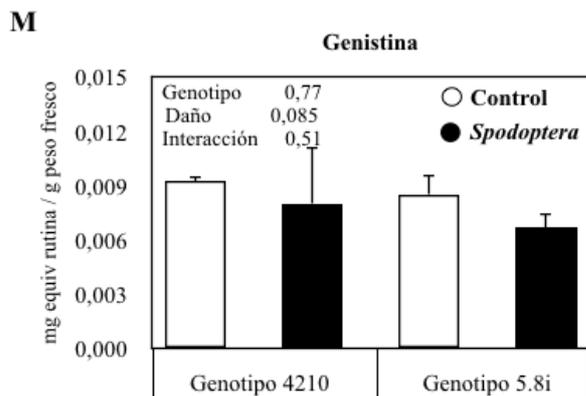
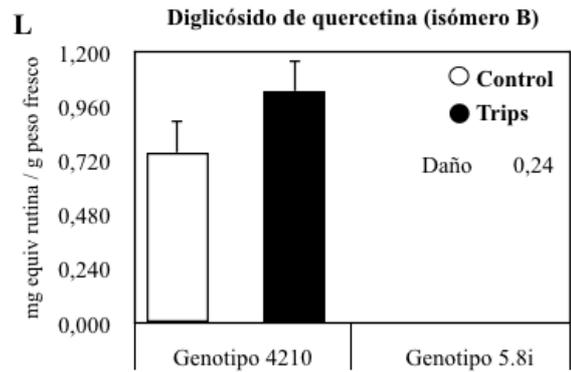
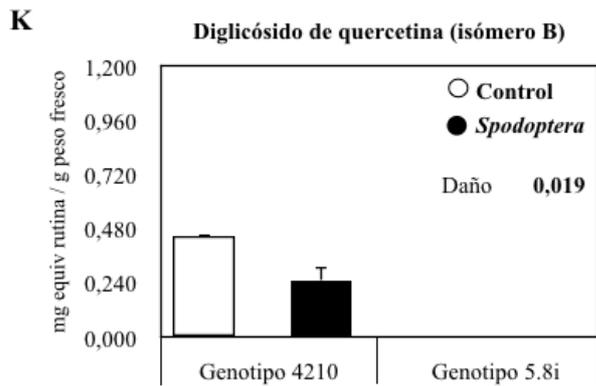
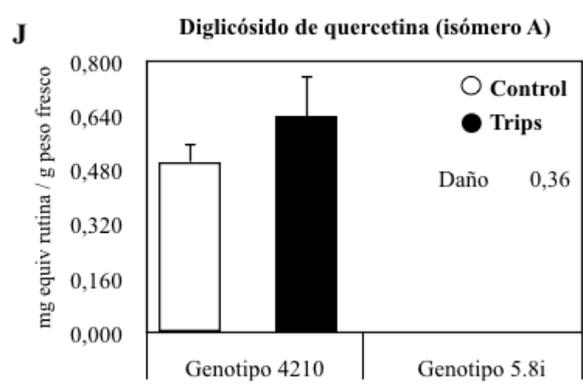
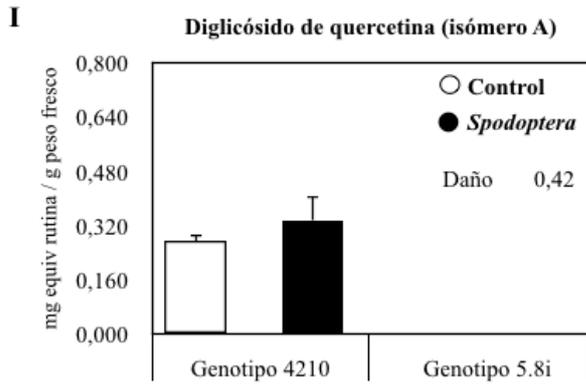
Los diglicósidos B y C son constitutivos y ubicuos del genotipo 4210 (*Figuras 10R-U*). La herbivoría de *Spodoptera frugiperda* aumenta la cantidad de estos compuestos ($p=0,04$ y $p=0,033$, respectivamente). En cambio, el daño por trips no altera los niveles de estos diglicósidos de manera significativa ($p=0,59$ y $0,38$, respectivamente).

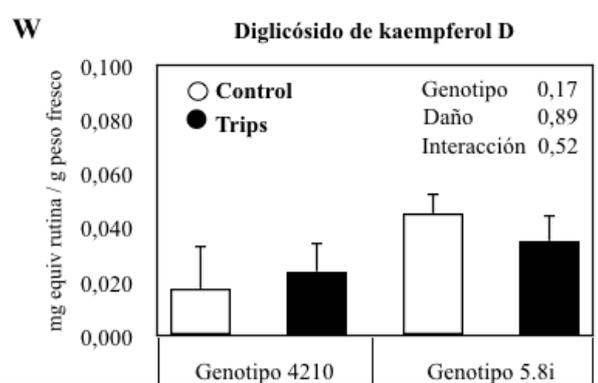
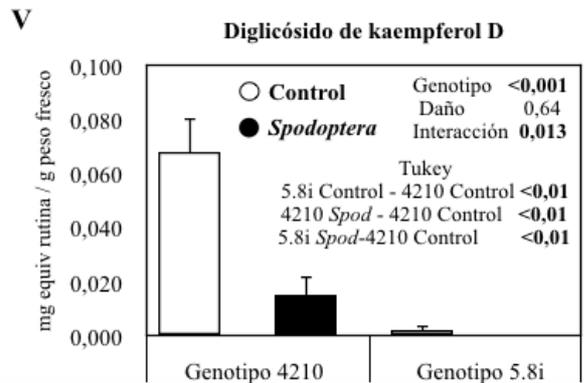
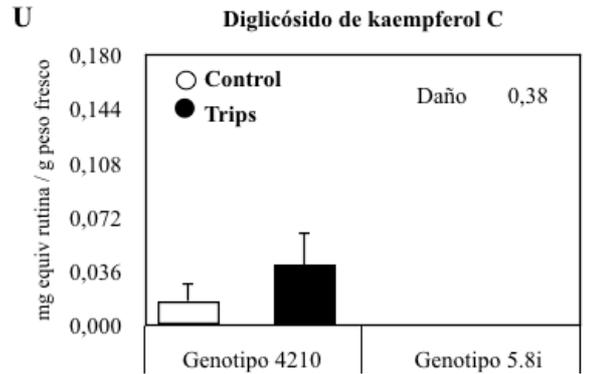
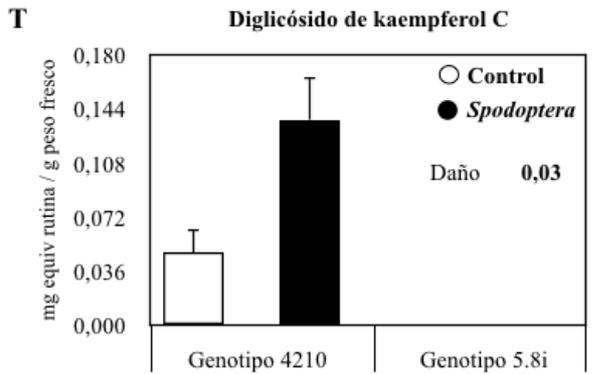
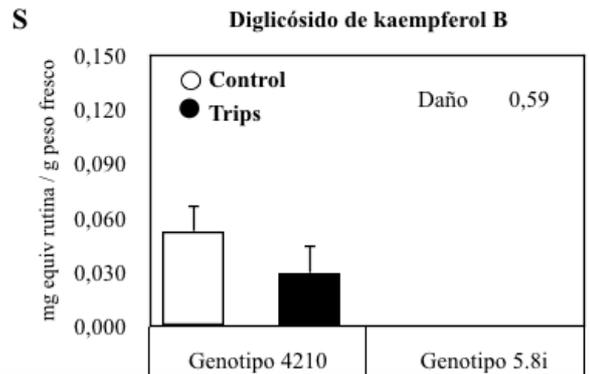
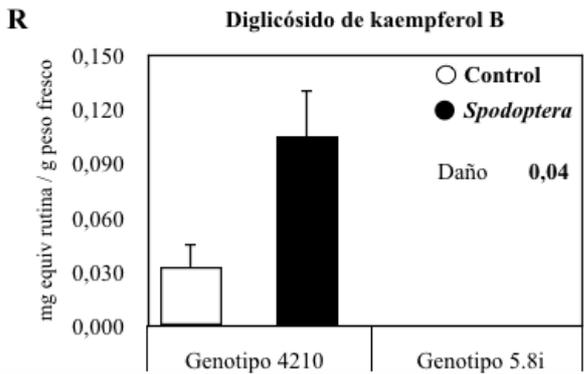
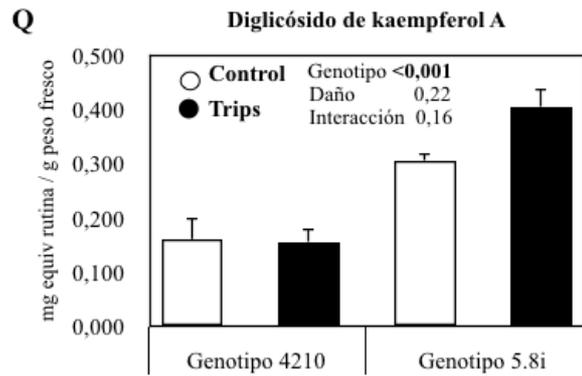
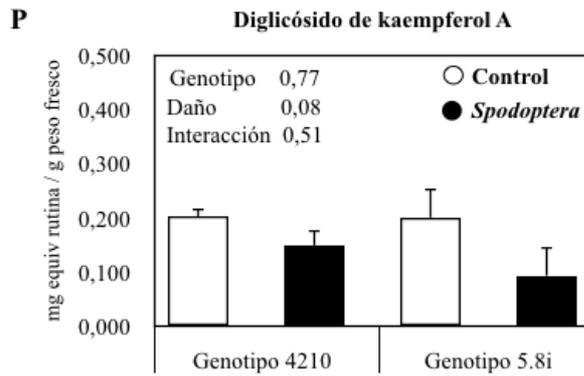
El diglicósido de kaempferol D puede encontrarse tanto en el genotipo 4210 como en el 5.8i, de manera constitutiva (*Figuras 10V y 10W*). No habría un efecto del genotipo ni del daño por herbivoría en las muestras provenientes de los experimentos con trips ($p=0,17$ y $p=0,89$, respectivamente). Sin embargo, en el caso de *Spodoptera frugiperda*, el efecto del daño no fue independiente del genotipo ($p=0,013$). Hubo una mayor cantidad del diglicósido en el genotipo 4210 ($p<0,01$, comparación con muestras control del genotipo 5.8i) y una disminución significativa de dicha cantidad debido al daño por larvas de *Spodoptera* ($p=0,004$). Los bajos niveles en el genotipo 5.8i podrían deberse al efecto conjunto previo de distintos herbívoros presentes en el campo experimental.

Otro compuesto fenólico presente en ambos genotipos fue la manolil-genistina. La misma es constitutiva, con niveles similares en ambos genotipos (*Figuras 10X y 10Y*). Sin embargo, en el caso de *Spodoptera* se puede evidenciar una inducción diferencial por la

herbivoría, siendo significativamente mayor en el genotipo 5.8i ($p=0,02$, interacción entre genotipo y daño).







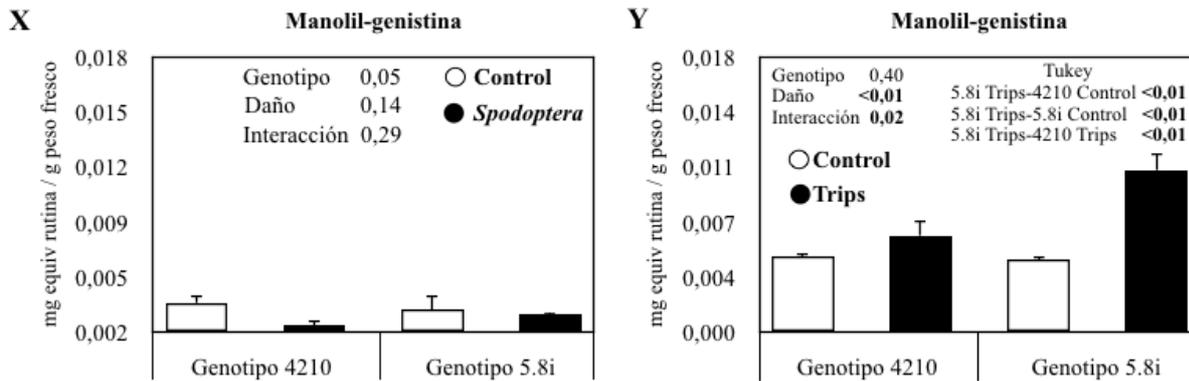


Figura 10: compuestos fenólicos presentes en muestras control y en muestras dañadas por *Spodoptera frugiperda* o trips. Las barras de error representan el error muestral (n=3 o 4). Se muestran los valores P para un GLS (con modelado de la varianza donde fue necesario) y para comparaciones *a posteriori* (Tukey).

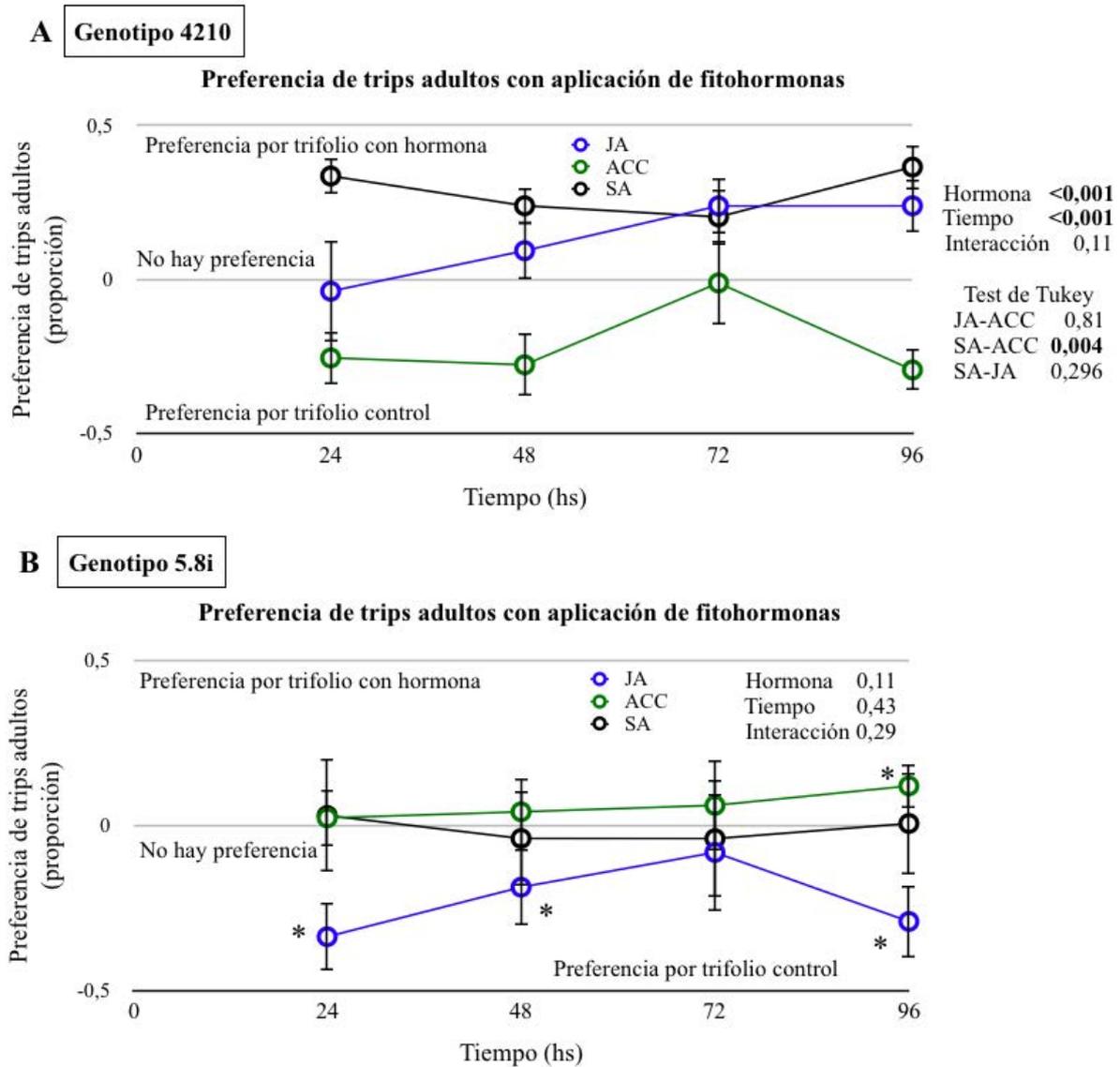
Sección C. Regulación de compuestos defensivos por fitohormonas (ácido jasmónico, ácido salicílico y etileno).

La síntesis de los metabolitos secundarios está regulada por distintas fitohormonas, como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (cuyo precursor es el ACC o 1-aminociclopropano-1-carboxilato), que pueden ser combinadas de manera diferencial para obtener una respuesta específica frente a cada estímulo. Los compuestos fenólicos como los flavonoides son un ejemplo de metabolito secundario que interviene en la defensa de las plantas frente al ataque de herbívoros, al igual que los inhibidores de proteasas. Es posible que alguna de estas fitohormonas induzca la síntesis o aumente la concentración de flavonoides y/o inhibidores de proteasas y que ello tenga un efecto sobre la fisiología de los trips. Para poner a prueba esta hipótesis, se evaluaron la preferencia y el tiempo de desarrollo de estos insectos y se cuantificaron los compuestos fenólicos e inhibidores de proteasas inducidos por la aplicación de las fitohormonas.

En los experimentos de preferencia en los que se ofrecieron un trifolios sin aplicación de hormonas (control) y un trifolios pulverizado con una fitohormona (ácido salicílico, ácido jasmónico o precursor del etileno) a un grupo de trips adultos, se observó el efecto de la hormona sobre la proporción de individuos en trifolios del genotipo 4210 (*Figura 11A*). Hubo mayor preferencia por los trifolios tratados con ácido salicílico respecto de aquellos tratados

con el precursor del etileno (ACC), en los cuales se encontró un mayor número de trips adultos en trifolios control ($p=0,004$; Figura 11A).

Las proporciones de trips adultos no difirieron entre tratamientos con fitohormonas en trifolios del genotipo 5.8i en 2017 (Figura 11B). En cambio, en 2016 sí difirieron, pero al contar con pocas observaciones, las comparaciones *a posteriori* no tienen la potencia necesaria para determinar qué tratamientos difieren entre sí (Figura 11C).



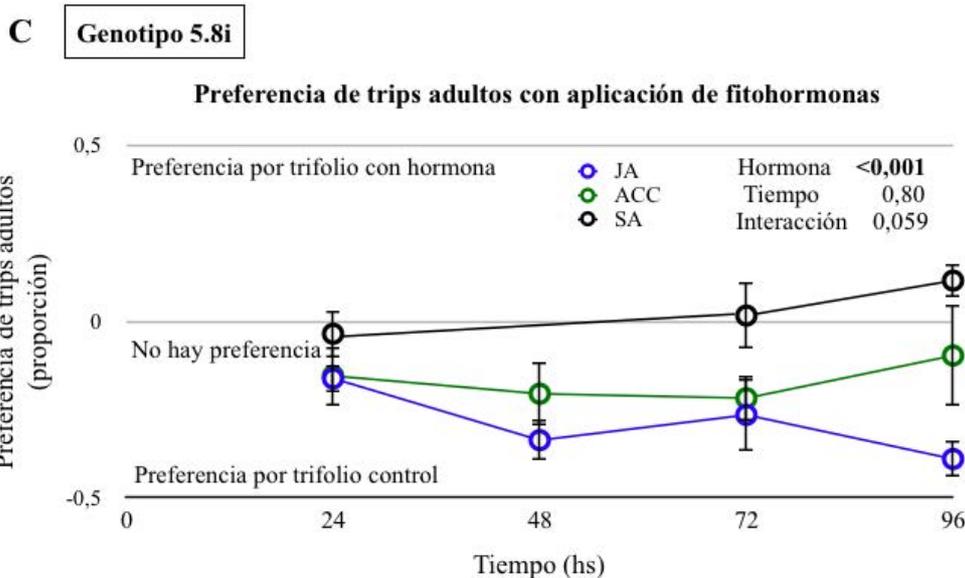


Figura 11: preferencia de trips adultos por un trifolío control o un trifolío al cual se le había aplicado una fitohormona en solución acuosa (ACC, JA o SA), en ambos genotipos (4210 y 5.8i). Los datos fueron expresados como proporción de adultos, considerando el número de individuos presentes sobre un dado trifolío respecto del número total, y de modo que una proporción de 0,5 fuera equivalente al 0 del eje de ordenadas (no hay preferencia). Las barras de error representan el error muestral ($n=6$). Se muestran los valores P para un GLM con tiempo inicial como covariable y modelado de la matriz de covarianza, para contrastes *a posteriori* (Tukey). Los asteriscos (*) indican que la proporción difiere significativamente de 0,5 (Chi-cuadrado, $P < 0,05$). A) Genotipo 4210. B) Genotipo 5.8i, año 2017. C) Genotipo 5.8i, año 2016.

El tiempo de desarrollo de trips se vió afectado por la aplicación de fitohormonas en el caso del genotipo 4210. Luego de 14 días, hubo una reducción del número total de adultos respecto del tiempo inicial y un mayor número total de individuos en plantas control (Figura 12). El tratamiento recibido resultó ser independiente del estadio del insecto (Prueba de correspondencia, $p < 0,001$), encontrándose evidencias a favor de una asociación positiva entre el etileno (aplicación de ACC) y el estadio larval por un lado; y adultos, huevos, ácido jasmónico, ácido salicílico y plantas control, por el otro. Estas fitohormonas intervendrían en cascadas de señalización por las cuales se sintetizarían compuestos que afectarían la fisiología de los trips.

En el caso del genotipo 5.8i, no se encontraron individuos de ningún estadio luego de los 14 días en ninguna de las plantas tratadas, indicando que las mismas no constituyen un buen alimento para los trips. Esto reforzaría los resultados de los ensayos de colonización natural y preferencia entre genotipos (Figuras 6 y 7).

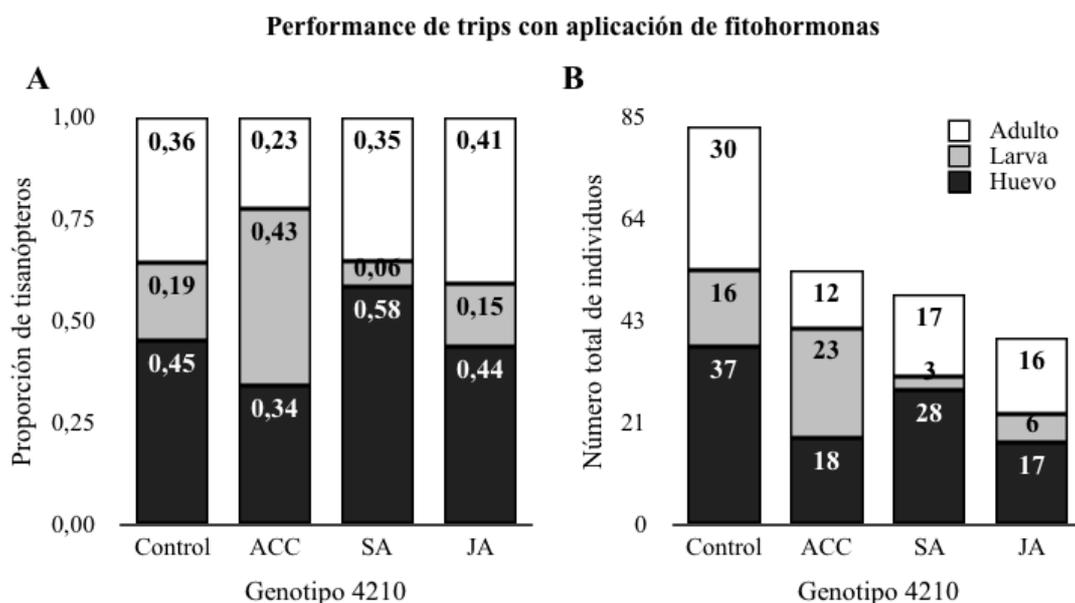
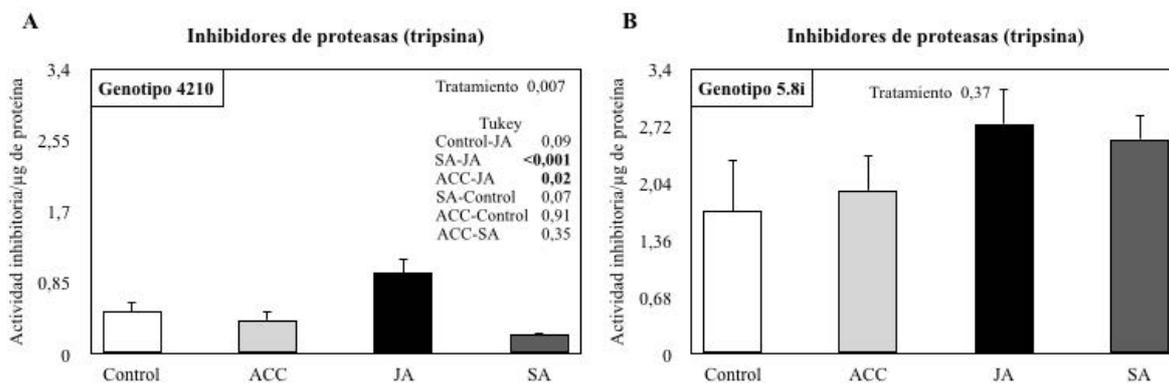


Figura 12: desarrollo de tisanópteros en trifolios del cultivar 4210 luego de 14 días de alimentación con una dieta control o habiéndose aplicado una fitohormona (ACC, SA o JA). Inicialmente se coloraron 12 trips adultos por réplica. Se realizaron 6 réplicas por tratamiento. A) Proporción de individuos de distintos estadios (adulto, larva y huevo) según el tratamiento. B) Número total de individuos de cada estadio (adulto, larva y huevo) según el tratamiento.

Al determinar los niveles de inhibidores de proteasas tripsina del genotipo 4210 tratadas con fitohormonas, se observó un efecto del tratamiento ($p=0,007$) (*Figura 13A*). La actividad de los inhibidores de proteasas no difirió entre el control y plantas tratadas con ácido salicílico o etileno (ACC, precursor) ($p>0,05$). Sin embargo, se encontró mayor actividad de inhibidores de proteasas en plantas tratadas con ácido jasmónico que en aquellas tratadas con ácido salicílico o etileno (ACC, precursor) ($p<0,001$ y $p=0,02$, respectivamente). La actividad de los inhibidores de proteasas tripsina en el genotipo 5.8i no difirió entre muestras control y muestras tratadas con fitohormonas (SA, JA y etileno –ACC, precursor-) ($p=0,37$), si bien parecería haber una tendencia por la cual habría aumento del nivel de actividad de los inhibidores de proteasas producido por el ácido jasmónico (*Figura 13B*).

Figura 13: actividad de inhibidores de tripsina de muestras control y muestras tratadas con fitohormonas (ACC, JA o SA) en ambos genotipos (4210 y 5.8i). Las barras de error



representan el error muestral (n=3 o 4). Se muestran los valores *P* para un GLS (con modelado de la varianza donde fue necesario) y para comparaciones *a posteriori* (Tukey). A) Genotipo 4210. B) Genotipo 5.8i.

Aunque la aplicación del ácido jasmónico aumentó los niveles de actividad de los inhibidores de proteasas tripsina del genotipo 4210, no se encontraron diferencias en el 5.8i. Debido a que también es posible que se induzcan o modifiquen las síntesis de compuestos, como los flavonoides, se analizaron muestras vegetales tratadas con ácido salicílico, ácido jasmónico o el precursor del etileno (ACC) en solución acuosa y muestras control.

La daidzina, compuesto inducido por el daño producido por la alimentación de un herbívoro (*Figuras 10E y 10F*), no fue inducido por la aplicación de fitohormonas, a diferencia del resto de los compuestos fenólicos analizados en la *Sección B*.

A diferencia de los experimentos previos (*Figuras 10A y 10B*), se encontró un nivel basal de derivado benzoico en muestras vegetales control de ambos genotipos (*Figura 14A*). El contenido de este compuesto fenólico fue mayor en el genotipo 4210 que en el 5.8i (p=0,047). No se observó un efecto del tratamiento de fitohormonas (p=0,69).

El triglicósido de quercetina sólo fue identificado en el genotipo 4210 (*Figura 14B*) y la concentración del mismo no varió por acción de las fitohormonas (p=0,087).

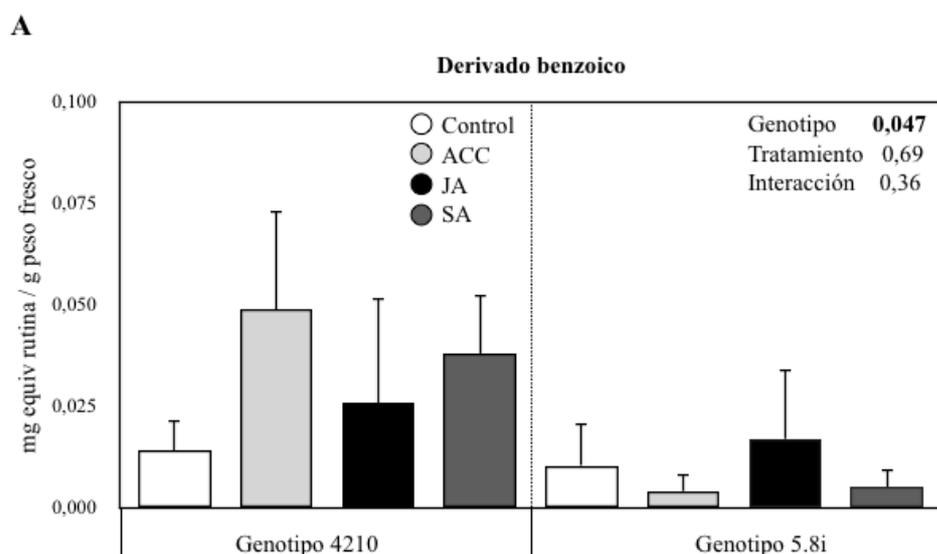
El triglicósido de kaempferol fue identificado en ambos genotipos y se indujo por la aplicación de las distintas fitohormonas bajo estudio (*Figura 14C*). Se determinó una mayor concentración de este compuesto en el genotipo 5.8i que en el genotipo 4210 (p<0,001). La adición de ácido jasmónico disminuyó el nivel de triglicósido de kaempferol en las hojas y también al aplicar tanto el ácido salicílico como el precursor del etileno ACC. Las plantas tratadas con ácido salicílico presentaron una menor concentración del compuesto respecto del control, pero las diferencias no fueron significativas (p=0,08).

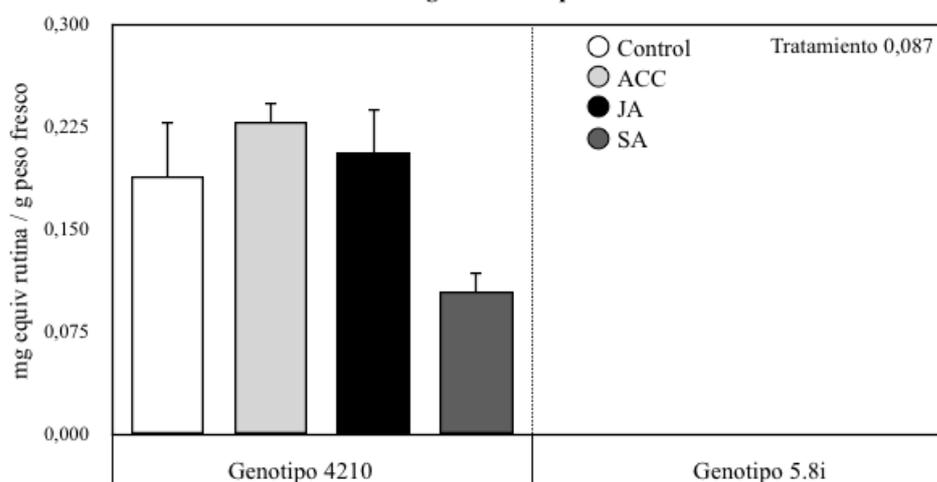
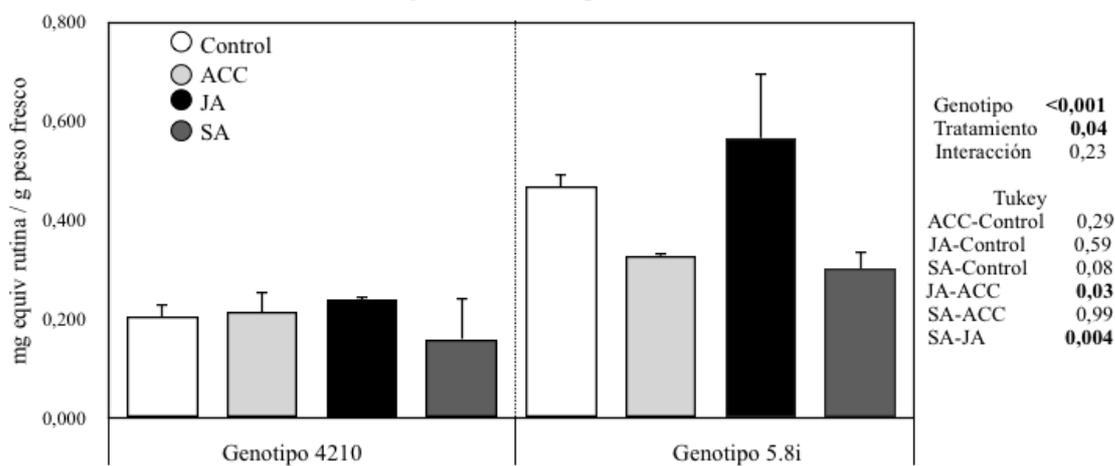
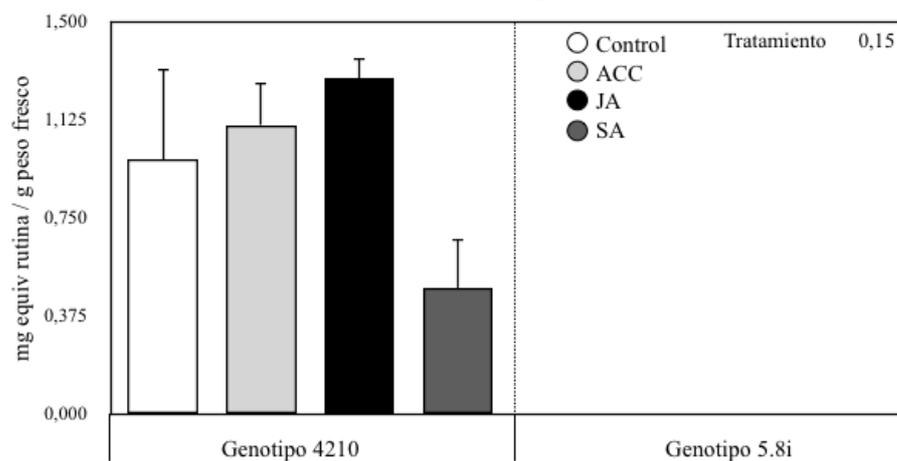
Los diglicósidos de quercetina fueron identificados sólo en el genotipo 4210 y la concentración de los mismos no se vió afectada por la aplicación de fitohormonas ($p=0,15$) (Figura 14D).

El triglicósido de isorhamnetina fue identificado en ambos genotipos, en mayor concentración en el 5.8i ($p<0,001$) (Figura 14E). Al tratar las plantas del genotipo 5.8i con ácido salicílico, los niveles de este compuesto disminuyeron significativamente respecto del control y de las plantas tratadas con ácido jasmónico ($p=0,005$ y $p=0,002$, respectivamente).

Los diglicósidos de kaempferol fueron identificados en ambos genotipos, hallándose en una mayor concentración en el genotipo 4210 ($p<0,01$). Las cascadas de señalización en las cuales intervienen las distintas fitohormonas no afectaron la concentración de estos flavonoides ($p=0,12$).

Por último, las fitohormonas sí tuvieron un efecto diferencial en la concentración de manolil-genistina según el genotipo considerado ($p=0,02$, interacción). La concentración de manolil-genistina fue mayor en las plantas tratadas con el precursor del etileno, respecto del resto de los tratamientos, en el genotipo 4210. En cambio, en el genotipo 5.8i, los tratamientos no difirieron significativamente entre sí.



B**Triglicósido de quercetina****C****Triglicósido de kaempferol****D****Diglicósidos de quercetina**

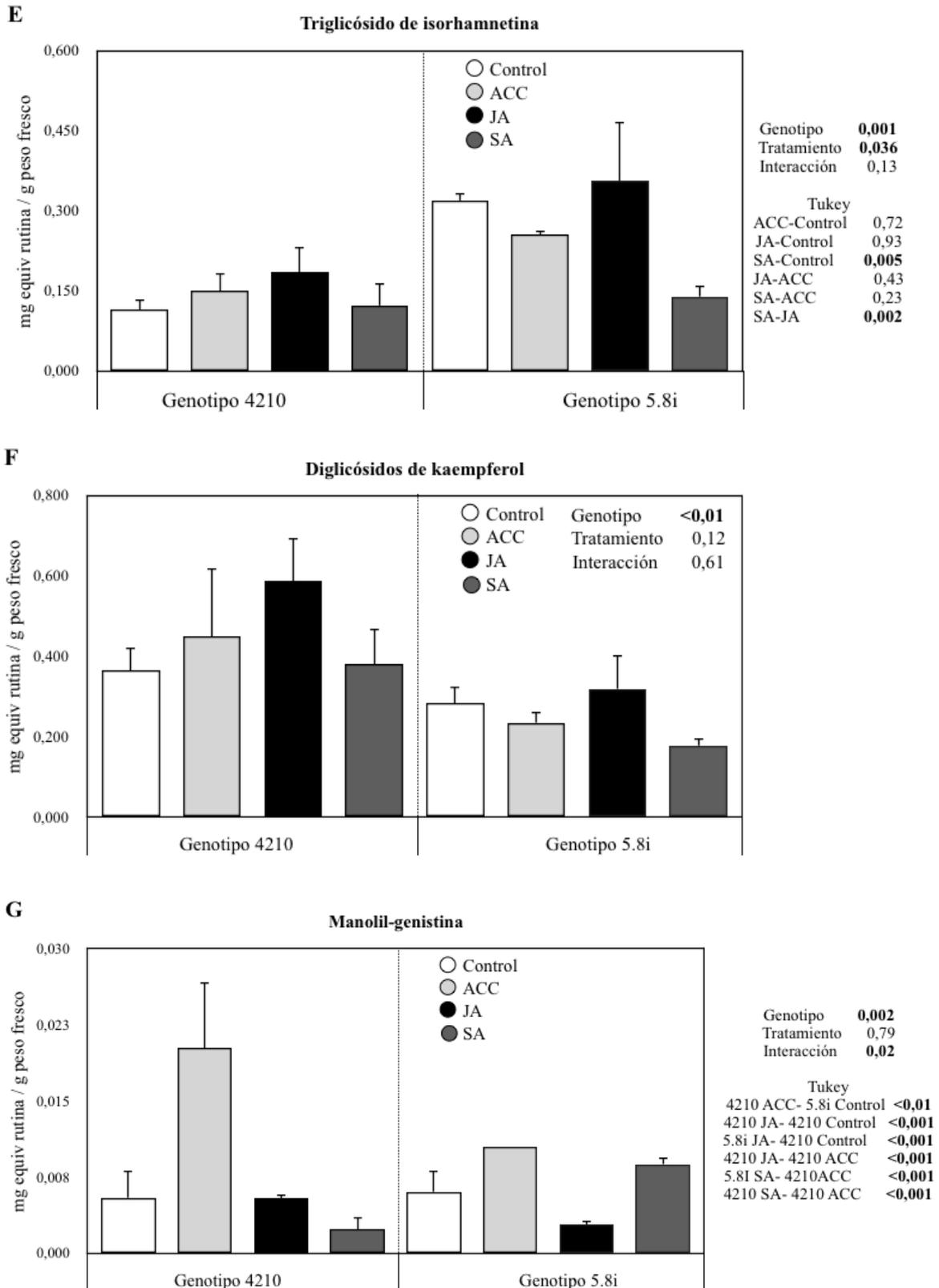


Figura 14: compuestos fenólicos regulados por fitohormonas (ACC, JA y SA). Las barras de error representan el error muestral (n=3 o 4). Se muestran los valores P para un GLS (con modelado de la varianza donde fue necesario) y para comparaciones *a posteriori* (Tukey). E)

Sólo se presentan los valores P para comparaciones *a posteriori* que fueron significativos ($p < 0,05$).

Los trips tuvieron preferencia de alimentación por el genotipo 4210, tanto a campo como en condiciones controladas. Esta preferencia pudo ser además alterada mediante la aplicación de fitohormonas. Se determinó una mayor proporción de trips en los trifolios pulverizados con ácido salicílico que en aquellos pulverizados con ACC, sugiriendo que las cascadas de señalización en las cuales intervienen estas fitohormonas son capaces de inducir la síntesis de metabolitos que alteran la fisiología de los trips. Al evaluar el tiempo de desarrollo de los trips, se observó un menor número total de individuos en los trifolios tratados con cualquiera de las 3 fitohormonas (SA, JA y etileno –ACC, precursor-) que en aquellos trifolios no tratados (control). En base a los resultados del experimento de preferencia con fitohormonas, se podría esperar un menor tiempo de desarrollo de los trips en los trifolios tratados con ácido salicílico que en los tratados con ACC. Se encontró una asociación positiva entre el ácido salicílico y los estadios de huevo y adulto, mientras que el ACC estuvo asociado positivamente con el estadio larval.

Debido a que en el genotipo 5.8i se obtuvieron diferentes resultados según el año, no quedó claro si la aplicación de las fitohormonas es capaz de provocar un cambio sobre la preferencia de los trips. Tampoco se pudieron evaluar cambios en el tiempo de desarrollo, ya que no se encontraron individuos vivos en el momento de finalización del experimento.

Discusión

Las larvas de lepidópteros y los tisanópteros constituyen importantes plagas del cultivo de soja, motivo por el cual es importante identificar metabolitos secundarios que puedan disminuir la palatabilidad de las hojas de soja y afectar la tasa de oviposición o el desarrollo de estos insectos, pudiendo así evitar el uso de insecticidas u otros compuestos sintéticos. *Spodoptera frugiperda* y *Caliothrips phaseoli* fueron afectados de distinta manera por la ingesta de los cultivares comerciales de soja DM 4210 y DM 5.8i. En observaciones a campo y experimentos de preferencia, se determinó que *C. phaseoli* prefiere y puede desarrollarse mejor en el genotipo 4210, mientras que *S. frugiperda* puede alimentarse de ambos genotipos sin que ello afecte su supervivencia o su ganancia de peso diferencialmente.

La producción de metabolitos secundarios como los flavonoides constituyen una de las líneas de defensa de las plantas contra el ataque de herbívoros (Schoonhoven. 2005). Estos compuestos son sintetizados a partir de fenilalanina y manolil-CoA, que pueden actuar como aleloquímicos o factores contra la herbivoría. De acuerdo con el esqueleto y la vía metabólica, se puede establecer la siguiente clasificación: flavonoides e isoflavonoides (Dixon & Pasinetti. 2010). A diferencia de los flavonoides, los isoflavonoides y sus derivados son defensas que se encuentran exclusivamente en la familia de las leguminosas. Algunos ejemplos de flavonoides que pueden mencionarse son la quercetina y el kaempferol, y de isoflavonoides, la genistina y la daidzina. El triglicósido de kaempferol, el triglicósido de isorhamnetina y el diglicósido de kaempferol A estuvieron presentes en mayores concentraciones en el genotipo 5.8i, mientras que el triglicósido de quercetina, los diglicósidos de quercetina y diglicósidos de kaempferol B y C estuvieron solo presentes en el 4210. Estas diferencias en el contenido de flavonoides entre los genotipos estudiados podrían explicar las diferencias en la herbivoría de los insectos.

Leiss et al. (2009) trabajaron con híbridos de Senecio (F2 de *Senecio jacobaea* x *S. aquativus*) y tisanópteros *Frankliniella occidentalis*, encontrando una asociación positiva entre líneas resistentes al ataque de este insecto y glicósidos de kaempferol. Este tipo de compuestos así como glicósidos de quercetina fueron identificados por *Wu et al.* (2007) en *Solidago altissima*, una variedad vegetal que no puede ser atacada por trips y que se encuentra ampliamente distribuida en Japón.

Hasta el momento no hay estudios en los cuales se manipule la concentración de estos compuestos y se evalúe el efecto sobre la preferencia o el tiempo de desarrollo de tisanópteros, sino que los experimentos realizados hasta la fecha establecen asociaciones entre la resistencia/susceptibilidad y la presencia de determinados compuestos fenólicos, de manera que no es posible establecer una relación causal entre alguno de los flavonoides previamente mencionados y la preferencia por el genotipo 4210 y un menor tiempo de desarrollo en el mismo. Sin embargo, los resultados de Leiss *et al.* (2008) y Wu *et al.* (2007) son concordantes con los obtenidos en este estudio, sugiriendo fuertemente que los glicósidos de kaempferol y de quercetina podrían conferirle una mayor resistencia a la soja, teniendo un impacto negativo sobre el desarrollo de los trips, mientras que los derivados de quercetina presentes en trifolios del genotipo 4210 podrían actuar como antioxidantes, permitiendo que el ciclo de vida de trips se acelerara. En este estudio los niveles de flavonoides estuvieron modulados por el daño por herbivoría de *S. frugiperda* o de los trips, observándose tanto aumentos como disminuciones en la síntesis de los mismos, y siendo este efecto dependiente del insecto en algunos casos.

Los inhibidores de proteasas digestivas (PIs) constituyen otra línea defensiva contra al ataque de herbívoros o patógenos (Schoonhoven, 2005). De acuerdo con el aminoácido o ión involucrado en la hidrólisis de los enlaces peptídicos, las proteasas presentes en el tracto digestivo de los insectos pueden clasificarse en cuatro grandes grupos: serina-, cisteína-, aspártico- y metalo-proteasas. La presencia de PIs puede resultar en la inhibición de las proteasas, que se traduce en una menor tasa de crecimiento, oviposición y/o incremento en la mortalidad, debido a la disminución de la ingesta de aminoácidos presentes en la dieta. Annadana *et al.* (2002) caracterizaron e identificaron las proteasas presentes en el intestino de tisanópteros, encontrando una predominancia de la clase de las serina proteasas. Al suplementar las dietas de estos insectos con PIs de cisteína (cistatina de papa y equistatina) durante un período de 5 días, los autores observaron disminuciones de entre 30-50% en las tasas de oviposición de los tisanópteros, respecto del grupo control. Resultados similares fueron obtenidos por Outchkourov *et al.* (2004), observándose una disminución del 50% en la fecundidad de los trips cuando se les ofreció una dieta artificial con PIs. También, se observó una reducción en el tamaño poblacional de los trips que se alimentaron sobre cultivos de papa transgénica que sobreexpresaban PIs. Thomas *et al.* (1994) registraron el tiempo transcurrido hasta que se observó la colonización por parte de los trips en distintas líneas de alfalfa y observaron que las plantas que expresaran un PI presente en el contenido intestinal de *Manduca sexta* fueron colonizadas mucho más tardíamente que las plantas control.

Al analizar las muestras provenientes de los experimentos con larvas de *S. frugiperda* se evidenció un mayor nivel basal de inhibidores de proteasas digestivas en el genotipo 4210 que en el 5.8i. Sin embargo, a pesar del daño producido por el *Caliothrips phaseoli* a las hojas de soja, no se encontraron diferencias en los niveles basales entre ambos genotipos. Debido a la susceptibilidad del genotipo 4210 al ataque de los trips, es probable que los resultados obtenidos se debieran a una inducción por insectos no controlados previo al momento de realizar el experimento y que por lo tanto, no se vieran reflejados los niveles basales reales de la especie vegetal. El daño producido por los trips indujo los niveles de inhibidores de proteasas, siendo mayor en el genotipo resistente. Sin embargo, estos compuestos no parecerían explicar completamente la preferencia diferencial y cambios en el tiempo de desarrollo de los tisanópteros.

El crecimiento y el desarrollo de los tisanópteros (*Frankliniella occidentalis*) pueden verse afectados por la dieta, de acuerdo con estudios realizados sobre dos variedades de algodón (Pima-S-5, resistente, y Acala SJ-2, susceptible), y donde se observó un mayor tiempo de desarrollo y una menor tasa de fecundidad de los trips que se alimentaron a partir de plantas resistentes (Trichilo & Leigh. 1988). Estos autores evaluaron además el efecto de distintos alimentos suplementarios como polen y huevos de ácaros, y observaron que cuando la variedad vegetal presentaba niveles considerables de defensas químicas contra la herbivoría, es decir, que la variedad de algodón era resistente, la suplementación de la dieta resultó más importante y vital para el desarrollo del estadio larval de los trips. Este trabajo sería consistente con los resultados obtenidos en mi estudio con *Caliothrips phaseoli* y las dos variedades comerciales de soja (4210 y 5.8i).

En un estudio similar llevado a cabo por Macel *et al.* (2005) con plantas del género *Senecio* se modificaron las concentraciones de un grupo de metabolitos secundarios conocido como alcaloides pirrolizidínicos (PAs) en dietas provistas a tisanópteros (*Frankliniella occidentalis*), presentando cantidades del alcaloide que iban desde un décimo, hasta una concentración diez veces mayor respecto de las que se suelen encontrar naturalmente en estas especies vegetales. Compuestos como la senkirquina, la senecionina, la senecifilina, la monocrotalina y la retosina provocaron una disminución en la supervivencia de los trips cuando se encontraron en concentraciones elevadas (10x). Este trabajo reforzaría la idea de la susceptibilidad de los trips a las concentraciones de los metabolitos secundarios presentes en

las variedades vegetales de las cuales se alimentan, como los inhibidores de proteasas digestivas y/o los flavonoides.

En mi estudio no se encontraron efectos de las defensas químicas sobre las larvas de *Spodoptera frugiperda*, un resultado similar fue encontrado en cultivos transgénicos BT de maíz en Argentina. Casmuz et al. (2010) señalan la introducción de cultivos Bt como una posible herramienta para el control de insectos plaga. Estos cultivos transgénicos expresan proteínas producidas por la bacteria *Bacillus thuringiensis* (normalmente, Cry y Vip), que al ser consumidas alteran el equilibrio osmótico del intestino de los insectos, impidiendo que puedan asimilar nutrientes y produciendo su muerte en pocos días. Sin embargo, se han descrito numerosos casos en los cuales surgen insectos resistentes a este tipo de toxinas, como ocurre con *Spodoptera frugiperda* y la proteína Cry1Fa en cultivos de maíz Bt (Farias et al. 2014; Santos-Amaya et al. 2017). Si bien los cultivares 4210 y 5.8i no expresan proteínas Bt, sí contienen compuestos de defensa contra la herbivoría que podrían afectar la supervivencia y el desarrollo de las larvas de *S. frugiperda* de manera diferencial, como por ejemplo, inhibidores de proteasas digestivas. Debido a que estos cultivares fueron introducidos en el mercado hace casi una década, se podría especular que algo similar al ejemplo con la proteína Cry1Fa podría haber ocurrido con las defensas químicas de los cultivares de soja estudiados. Por un proceso de selección pudieron haber surgido individuos resistentes a los compuestos defensivos, generando que no se observaran diferencias en la supervivencia ni ganancia de peso de las larvas, a pesar de que uno de los genotipos contuviera una mayor concentración de inhibidores de proteasas digestivas respecto del otro.

Regulación de la producción de defensas por las fitohormonas.

La síntesis de los metabolitos secundarios está regulada por distintas fitohormonas, como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (cuyo precursor es el ACC o 1-aminociclopropano-1-carboxilato). El JA provoca la activación de respuestas de defensas contra una variedad de insectos herbívoros, pudiendo actuar sinérgicamente con el etileno y de manera antagónica con el SA (Lorenzo & Solano. 2005).

De acuerdo con el trabajo de Li *et al.* (2004) en el modelo de *Arabidopsis* sp., el factor de transcripción específico de plantas WRKY70 podría explicar el antagonismo entre las rutas de señalización de defensa mediadas por el SA y el JA a nivel molecular. La expresión de dicho

gen es activada por el SA y reprimida por el JA. Una expresión constitutiva de este factor de transcripción genera una expresión de genes PR, también inducidos por el SA, y aumenta la resistencia frente a patógenos. En cambio, la supresión con un RNA antisentido activa genes de respuesta a JA. Petersen *et al.* (2000) analizaron la expresión constitutiva de genes PR y cuantificaron los niveles de SA en plantas de *Arabidopsis* sp. mutantes para la proteína MAP quinasa MPK4. A diferencia de lo ocurrido con el FT WRKY70, en estas líneas se observaron un aumento significativo en los niveles de SA, una resistencia frente al ataque de patógenos virulentos y la supresión de la expresión de genes de defensa dependientes de JA (PDF1.2 y THI2.1). El tratamiento con metil-jasmónico (MeJA) no logró inducir la expresión de PDF1.2 y THI2.1, indicando que la proteína MPK4 es necesaria para la expresión de los mismos. A su vez, este efecto es independiente de los niveles de SA.

Al evaluar el efecto de las fitohormonas sobre la preferencia de los trips, se observó que la aplicación de JA sobre trifolios disminuyó la preferencia por los mismos en el genotipo 5.8i, mientras que en el genotipo 4210 sucedió algo similar con el ACC. La adición de SA también fue capaz de modificar el comportamiento de los trips, habiendo una preferencia por trifolios pulverizados con esta fitohormona en el genotipo 4210 y sugiriendo que el SA inhibió la producción de JA y sus defensas relacionadas. En un estudio previo se aplicó JA en cultivos de tomate y se observó una disminución de la ocurrencia natural de trips, sin que se vieran comprometidas la biomasa ni la producción de frutos (Thaler *et al.* 2001). Sin embargo, el control de este insecto plaga fue menor que cuando se utilizó una mayor concentración de JA (0,5 mM vs. 1,5 mM), sugiriendo un rango óptimo para la regulación de las defensas.

La aplicación de las fitohormonas también tuvo un efecto sobre el tiempo de desarrollo de los trips en el genotipo 4210, observándose una disminución del número total de individuos de todos los estadios respecto del control en todos los casos. La adición de JA provocó una mayor disminución del número de individuos respecto del ACC y el SA, pudiendo explicarse en parte por un aumento en la concentración de PIs de tripsina, que no alteraría la preferencia, pero sí la fisiología del insecto, como fue reportado por Annadana *et al.* (2002) y Outchkourov *et al.* (2004).

Si bien previamente fue mencionada una interacción antagónica entre el JA y el SA, ambas fitohormonas estarían asociadas positivamente con los mismos estadios de trips en el genotipo 4210. La aplicación de JA y SA tendrían un efecto negativo sobre el desarrollo de las

larvas, mientras que la de ACC afectaría el desarrollo de adultos y huevos. Estas asociaciones entre estadios y la aplicación de una dada fitohormona, así como el efecto sobre el trébol preferido, podrían explicarse por flavonoides que estuvieran regulados de manera antagónica por el SA y el ACC, como ocurre con la manolil-genistina y también ocurriría con los diglicósidos y triglicósidos de quercetina. También podrían estar involucrados otros metabolitos secundarios, como los PIs.

En un estudio llevado a cabo por Abe *et al.* (2009) con ejemplares de *Arabidopsis* WT y *coil-1* (insensibles al JA), se observó un mayor número de huevos de trips en plantas *coil-1*, así como un mayor número de adultos y larvas. También realizaron experimentos de preferencia y registraron que un 70% de los tisanópteros prefirió plantas *coil-1*. Obtuvieron resultados similares aplicando JA a ejemplares *B. rapa*. Los autores atribuyen la preferencia por las mutantes a una menor concentración de compuestos tóxicos y volátiles inducidos por herbivoría.

Conclusiones

Las larvas de *S. frugiperda* pueden alimentarse de los cultivares 4210 y 5.8i sin que ello afecte su supervivencia o ganancia de peso de manera diferencial, mientras que los trips prefieren y se desarrollan mejor en el genotipo 4210.

Los flavonoides, como los glicósidos de kaempferol y el triglicósido de isorhamnetina, que se encuentran en mayor concentración en el genotipo 5.8i, podrían conferir una mayor resistencia frente al ataque de trips y explicar las diferencias observadas con estos insectos en cuanto a su menor preferencia y desarrollo dificultado en este genotipo. A su vez, los niveles de flavonoides fueron modulados por el daño por herbivoría de *S. frugiperda* y *C. phaseoli*, observándose tanto aumentos como disminuciones en la síntesis de los mismos, y una dependencia del insecto involucrado en algunos casos.

Los inhibidores de proteasas también podrían estar involucrados en las diferencias en la preferencia y tiempo de desarrollo de trips. Las concentraciones de los PIs de tripsina fueron similares entre los genotipos, pero se evidenció una mayor inducción por el daño por herbivoría de trips en trifolios del cultivar 5.8i.

La aplicación de JA indujo la síntesis de inhibidores de proteasas de tripsina en el genotipo 4210. En el genotipo 5.8i, en cambio, los niveles de estos compuestos no se vieron modificados por la aplicación de fitohormonas. Los efectos sobre la síntesis de flavonoides difirieron según el genotipo y la fitohormona involucrada.

La preferencia y el tiempo de desarrollo de *C. phaseoli* se vieron afectados por acción de las fitohormonas. La aplicación de JA sobre trifolios disminuyó la preferencia por los mismos en el genotipo 5.8i, mientras que en el genotipo 4210 sucedió algo similar con el ACC. La adición de SA también fue capaz de modificar el comportamiento de los trips, habiendo una preferencia por trifolios pulverizados con esta fitohormona en el genotipo 4210.

Bibliografía

Abe, H.; Shimoda, T.; Ohnishi, J.; Kugimiya, S.; Narusaka, M.; Seo, S.; Narusaka, Y.; Tsuda, S. & Kobayashi, M. *Jasmonate-dependent plant defense restricts thrips performance and preference*. 2009.

Annadana, S.; Peters, J.; Gruden, K.; Schipper, A.; Outchkourov, N. S.; Beekwilder, M. J.; Udayamukar, M. & Jongsma, M. A. *Effects of cysteine protease inhibitors on oviposition rate of the western flower thrips, Frankliniella occidentalis*. 2002. *Journal of Insect Physiology* 48 (2002) 701–706.

Casmuz, A.; Juárez, M. L.; Socías, G.; Murúa, M. G.; Prieto, S.; Medina, S.; Willink, E. & Gastaminza, G. *Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae)*. 2010. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 69 (3-4): 209-231.

Dixon, R. A. & Pasinetti, G. M. *Flavonoids and Isoflavonoids: From Plant Biology to Agriculture and Neuroscience*. 2010. *Plant Physiology*, October 2010, Vol. 154, pp. 453–457.

Farias, J. R.; Andow, D.; Horikoshi, R. J.; Sorgatto, R. J.; Fresia, P.; dos Santos, A. C. & Omoto, C. *Field-evolved resistance to CryIF maize by Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil*. 2014. *Crop Prot* 64, 150–158.

Franco, O. L.; Dias, S. C.; Magalhaes, C. P.; Monteiro, A. C.; Bloch, Jr. C.; Melo, F. R.; Oliveira-Neto, O. B.; Monnerat, R. G.; Grossi-de-Sá, M. F. *Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (Anthonomus grandis)*. 2004. *Phytochemistry* 65: 81-89.

Howe, G. A. & Jander G. *Plant Immunity to Insect Herbivores*. 2008. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008. 59:41–66

INTA (EEA Marcos Juárez). *Insectos perjudiciales de la soja y su manejo integrado en la Región Pampeana Central*. 2011.

Leiss, K. A.; Choi, Y. H., Abdel-Farid, I. B., Verpoorte, R. & Klinkhamer, P. G. L. 2008. *NMR Metabolomics of Thrips (Frankliniella occidentalis) Resistance in Senecio Hybrids*.

Li, J.; Brader, G. & Palva, T. *The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense*. 2004. *The Plant Cell*. Vol. 16, 319-331.

Lorenzo, O. y R. Solano. *Señalización de ácido jasmónico e interacciones con otras hormonas*. 2005.

Macel, M.; Bruinsma, M.; Dijkstra, S.; Ooijendijk, T. & Niemeyer, H. M. *Differences in effects of pyrrolizidine alkaloids on five generalist herbivore species*. 2005. *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 31, No. 7, July 2005.

Outchkourov, N. S.; de Kogel, W. J.; Schuurman-de Bruin, A., Abrahamson, M. & Jongsma, M. A. *Specific cysteine protease inhibitors act as deterrents of western flower thrips, Frankliniella occidentalis (Pergande), in transgenic potato*. 2004. *Plant Biotechnology Journal*. 439-448.

Outchkourov, N. S.; de Kogel, W. J.; Wieggers, G. L., Abrahamson, M. & Jongsma, M. A. *Engineered multidomain cysteine protease inhibitors yield resistance against western flower thrips (Frankliniella occidentalis) in greenhouse trials*. 2004. *Plant Biotechnology Journal*. 449-458.

Petersen, M. Brodersen, P. Naested, H. Andreasson, E. Lindhart, U. Johansen, B. Nielsen, H.B. Lacy, M. Austin, M.J. Parker, J.E. Sharma, S.B. Klessig, D.F. y R. Martienssen. (2000). *Arabidopsis Map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance*. *Cell*. 103: 1111-1120.

Reisig, D. D.; Herbert, D. A. & Malone, S. *Impact of neonicotinoid seed treatment on thrips (Thysanoptera:Thripidae) and soybean yield in Virginia and North Carolina*. 2012. *J. Econ Entomol* 105:884-889.

Riley G. D., Shimat V. J. Rajagopalbau S. y Diffie S. *Thrips vectors of tospoviruses*. 2011. Journal of integrated Pest Management.

Ryan, C. A. *Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens*. 1990. Annual Review of Phytopathology 28. 425-449.

Santos-Amaya, O. F.; Tavares, C. S.; Rorigues, J. V. C.; Campos, S. O.; Guedes, R. N. C.; Alves, A. P. & Pereira, E. J. G. *Fitness costs and stability of Cry1Fa resistance in Brazilian populations of Spodoptera frugiperda*. 2017. Pest Manag Sci. 2017 Jan; 73(1):35-43

Schoonhoven, L. M.; van Loon, J. J. A. & Dicke, M. *Insect-plant biology*. 2° edition. 2005.

Selig, P.; Keough, S.; Nalam, V. J. & Nachappa, P. *Jasmonate-dependent plant defenses mediate soybean thrips and soybean aphid performance on soybean*. 2016.

Thaler, J. S.; Stout, M. J.; Karban, R. & Duffey, S. S. *Jasmonate-mediated induced plant resistance affects a community of herbivores*. 2001. Ecological Entomology (2001) PT, 312-324.

Thomas, J.C.; Wasman, C.C.; Echt, C.; Dunn, R.L.; Bohnert, H.J. & McCoy, T.J. *Introduction and expression of an insect proteinase inhibitor in alfalfa (Medicago sativa L.)*. 1994. Plant Cell Reports. 14, 31–36.

Trichilo, P. J. & Leigh, T. F. *Influence of resource quality on the reproductive fitness of flower thrips (Thysanoptera:Thripidae)*. 1988. Annals of the Entomological Society of America, 81(1): 64-70

Zavala, J. A. *Respuestas inmunológicas de las plantas frente al ataque de insectos*. 2010. Ciencia Hoy, Vol. 20, No. 117: 52-59.

Zavala, J. A.; Patankar, A. G.; Gase, K.; Hui, D. & Baldwin, I. T. *Manipulation of Endogenous Trypsin Proteinase Inhibitor Production in Nicotiana attenuata Demonstrates Their Function as Antiherbivore Defenses*. 2004. Plant Physiology 134: 1181-1190.

Wu, B.; Takahashi, T.; Kashiwagi, T.; Tebayashi, S. & Kim, C. *New Flavonoid Glycosides from the Leaves of Solidago altissima*. 2007. Chem. Pharm. Bull. 55(5) 815—816.

Anexo

Tiempo	ACC	JA	SA
24 hs	0,22	0,49	0,14
48 hs	0,27	0,64	0,47
72 hs	0,66	0,44	0,49
96 hs	0,37	0,38	0,27

Tabla 2: valores P para test de chi-cuadrado. Preferencia de trips adultos entre un trifolio control y otro tratado con fitohormona (ACC, JA o SA). Genotipo 4210. Se aplicaron correcciones secuenciales de Bonferroni por test múltiples.

Tiempo	ACC	JA	SA
24 hs	0,03	0,03	0,13
48 hs	0,05	0,04	0,14
72 hs	0,05	0,11	0,04
96 hs	0,01	0,04	0,09

Tabla 3: P valores para test de chi-cuadrado. Preferencia de trips adultos entre un trifolio control y otro tratado con fitohormona (ACC, JA o SA). Genotipo 5.8i, año 2017. Se aplicaron correcciones secuenciales de Bonferroni por test múltiples.

Tiempo	ACC	JA	SA
24 hs	0,63	0,60	0,77
48 hs	0,39	0,16	-
72 hs	0,70	0,39	0,55
96 hs	0,69	0,18	0,96

Tabla 4: P valores para test de chi-cuadrado. Preferencia de trips adultos entre un trifolio control y otro tratado con fitohormona (ACC, JA o SA). Genotipo 5.8i, año 2016. Se aplicaron correcciones secuenciales de Bonferroni por test múltiples.