



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

## **Metabolitos de defensa en plantas de sauce y su interacción con el herbívoro especialista *Nematus oligospilus***

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos  
Aires, área Ciencias Biológicas

Lic. Camila Dávila

Directora de Tesis: Dra. Patricia Carina Fernández

Director adjunto: Dr. Jorge Alberto Zavala

Consejera de Estudios: Dra. Viviana Andrea Confalonieri

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales  
y la Cátedra de Biomoléculas, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

Fecha de defensa: 12 de julio de 2023, FCEN, Buenos Aires.

Jurados: Dr. Gabriel Manrique, Dr. Carlos Mazza, y Dra. Paola A. González Audino

## Agradecimientos

A mis directores Jorge y Pato, por confiar en mi y acompañarme durante el doctorado, por los debates y por la ayuda. Gracias Pato por tus empujes de optimismo, tu apoyo y dedicación.

A mis Mapadres, por apoyarme, por empujarme siempre a hacer lo que me gusta. A mi Sis, por bancar mi intensidad, por acompañarme. A Damián, por su amor y apoyo. Lxs quiero.

A Cintu y Anita, por su cariño, su escucha y seguirme eligiendo tantos años de amistad.

A Dai, Lu y Mile, por su amistad, la contención, las charlas, los mates, las cenas, las catarsis y todos los lindos y no tan lindos momentos. Las quiero.

A Juan, mi incondicional compañero de estadística, por su ayuda, sus conocimientos y su amistad. Siempre estás y estarás.

A Martín (un actor no descubierto), Fran y Vir por el aguante, por la escucha, por estar para responder mis preguntontas de química.

A Juampi, por su enorme cariño, por su alegría y su amistad. Siempre estás y estarás.

A Marina Ciancia por recibirme y permitirme ser parte de la Cátedra y sumarme como docente

A Alberto, Lili, Lore y Luis por estar, por ayudarme, por bancarme mientras paseaba los sauces de acá para allá por toda la cátedra.

A Sole, por su compañerismo y la ayuda en el laboratorio.

A Hugo por sus consejos fitoquímicos.

A todo el equipo de y Cátedra de Bioquímica. A Dani, Vero, Vir, Jesi, Bruno, Andrés, Gera y todxs, por siempre recibirme tan bien y ayudarme en lo que necesitara. Especialmente a Vane, mi compañera de volátiles, por su ayuda y sus consejos.

A Pau Z, por ser una gran compañera en el aula y hacerse siempre un ratito para escucharme y darme una mano.

A Pau G, por las horas de manualidades con las cajitas y la ayuda con los sauces y los bichos escapistas.

Al equipo de INTA Castelar. A Guille y Silvi por ayudarme cuando necesitaba una mano.

A Celi por enseñarme sobre el mundo de la avispa y los sauces.

A Lau por la buena onda y ayudarme con las larvitas escapistas.

A Teresa Cerrillo, Victoria Coll, Gabi Valladares y Leo Gallo por darnos las estacas de sauces con tan buena predisposición. Gracias a Teresa y Leo por sus conocimientos sobre sauces y por su colaboración.

A Natalia y Sandra por salvarme con la colecta de avispa y a Antonio por salvarme con el liofi en medio de la pandemia.

A Gladys y Ele, por la escucha y contención infinita.

A Jonathan Gershenzon, Michael Reichelt y a Richard Lindroth por las colaboraciones y abrirnos las puertas de sus laboratorios.

Al CONICET, la UBA y a la educación pública y gratuita.

## Publicaciones derivadas de esta tesis

Parte del **Capítulos 3** dio lugar a la siguiente publicación:

Fernández, P. C., Braccini, C. L., Dávila, C., Barrozo, R. B., Aráoz, M. V. C., Cerrillo, T., Gershenzon J., Reichelt M. & Zavala, J. A. (2019). The use of leaf surface contact cues during oviposition explains field preferences in the willow sawfly *Nematus Oligospilus*. *Scientific reports*, 9(1), 4946. Doi:10.1038/s41598-019-41318-7.

Parte del **Capítulo 4** dio lugar a la siguiente publicación:

Dávila, C., Fiorenza, J. E., Gershenzon, J., Reichelt, M., Zavala, J. A., & Fernández, P. C. (2023). Sawfly egg deposition extends the insect life cycle and alters hormone and volatile emission profiles. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11. Doi: 10.3389/fevo.2023.1084063.

# ÍNDICE

|                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Agradecimientos .....                                                         | i   |
| Publicaciones derivadas de esta tesis .....                                   | ii  |
| Resumen.....                                                                  | vii |
| Abstract .....                                                                | ix  |
| Capítulo 1: Introducción general .....                                        | 1   |
| 1.1. Estrategias defensivas en las plantas .....                              | 2   |
| 1.2. Tipos de daño causados por insectos herbívoros .....                     | 3   |
| 1.2.1. Oviposición.....                                                       | 3   |
| 1.2.2. Herbivoría.....                                                        | 5   |
| 1.3. Respuestas fisiológicas de las plantas frente al daño del herbívoro..... | 5   |
| 1.3.1. Percepción del daño y señalización de la respuesta defensiva.....      | 5   |
| 1.3.2. Características defensivas.....                                        | 8   |
| 1.3.2.1. Compuestos fenólicos.....                                            | 9   |
| 1.3.2.2. Compuestos orgánicos volátiles .....                                 | 9   |
| 1.4. Reconocimiento de la planta hospedera .....                              | 13  |
| 1.5. Sistema de estudio: El sauce y la avispa sierra.....                     | 15  |
| 1.5.1. El género <i>Salix</i> .....                                           | 15  |
| 1.5.1.1. Importancia en la Argentina.....                                     | 17  |
| 1.5.2. Defensas en salicáceas.....                                            | 18  |
| 1.5.2.1. Salicinoides .....                                                   | 19  |
| 1.5.2.2. Taninos condensados .....                                            | 22  |
| 1.5.2.3. Compuestos orgánicos volátiles .....                                 | 24  |
| 1.5.3. La avispa sierra .....                                                 | 25  |
| 1.5.4. La interacción entre <i>N. oligospilus</i> y <i>Salix</i> spp .....    | 27  |
| 1.6. Objetivos.....                                                           | 29  |



|                                                                                                                                                        |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Capítulo 2: Metodología general .....</b>                                                                                                           | <b>30</b> |
| <b>2.1. Material biológico.....</b>                                                                                                                    | <b>31</b> |
| 2.1.1. Sauces .....                                                                                                                                    | 31        |
| 2.1.2. Avispa sierra del sauce: <i>Nematus oligospilus</i> .....                                                                                       | 32        |
| <b>2.2. Colecta de compuestos orgánicos volátiles y análisis químico .....</b>                                                                         | <b>33</b> |
| <b>2.3. Análisis de fitohormonas.....</b>                                                                                                              | <b>37</b> |
| <b>2.4. Análisis de salicinoides y taninos condensados.....</b>                                                                                        | <b>38</b> |
| 2.4.1. Análisis de salicinoides del Capítulo 3 y 4:.....                                                                                               | 38        |
| 2.4.2. Análisis de salicinoides del Capítulo 5: .....                                                                                                  | 39        |
| 2.4.3. Análisis de taninos condensados.....                                                                                                            | 41        |
| <b>2.5. Análisis estadístico.....</b>                                                                                                                  | <b>42</b> |
| <b>Capítulo 3: Preferencia de oviposición de <i>N. oligospilus</i> y el contenido de salicinoides en distintos genotipos de <i>Salix</i> spp .....</b> | <b>44</b> |
| <b>3.1. Introducción .....</b>                                                                                                                         | <b>45</b> |
| <b>3.2. Materiales y métodos.....</b>                                                                                                                  | <b>48</b> |
| 3.2.1. Plantas y colecta de hojas .....                                                                                                                | 48        |
| 3.2.2. Análisis del contenido de salicinoides .....                                                                                                    | 49        |
| 3.2.2.1. Lavado de la superficie de las hojas mediante inmersión en sauces comerciales.....                                                            | 49        |
| 3.2.2.2. Remoción de la superficie epicuticular de las hojas de <i>S. nigra</i> con goma arábica .....                                                 | 49        |
| 3.2.3. Análisis estadístico .....                                                                                                                      | 51        |
| 3.2.3.1. Matriz de preferencia de oviposición .....                                                                                                    | 51        |
| 3.2.3.2. Concentración de salicinoides .....                                                                                                           | 52        |
| 3.2.3.3. Análisis de correlación .....                                                                                                                 | 52        |
| <b>3.3. Resultados.....</b>                                                                                                                            | <b>53</b> |
| 3.1. Relación entre el contenido de salicinoides en sauces comerciales y la preferencia de oviposición.....                                            | 53        |

|                                                                                                                                                                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2. Contenido de salicinoides en la superficie epicuticular de <i>S. nigra</i> .....                                                                                                                                                              | 55        |
| <b>3.4. Discusión.....</b>                                                                                                                                                                                                                         | <b>56</b> |
| <b>Capítulo 4: Efectos de la oviposición del herbívoro especialista <i>N. oligospilus</i> sobre <i>Salix babylonica</i> var <i>sacramenta</i> .....</b>                                                                                            | <b>62</b> |
| <b>4.1. Introducción .....</b>                                                                                                                                                                                                                     | <b>63</b> |
| <b>4.2. Materiales y métodos.....</b>                                                                                                                                                                                                              | <b>65</b> |
| 4.2.1. Plantas e insectos.....                                                                                                                                                                                                                     | 65        |
| 4.2.2. Diseño experimental y muestreo de plantas .....                                                                                                                                                                                             | 66        |
| 4.2.3. Análisis de fitohormonas y salicinoides.....                                                                                                                                                                                                | 69        |
| 4.2.4. Desempeño de <i>N. oligospilus</i> .....                                                                                                                                                                                                    | 70        |
| 4.2.5. Colecta de volátiles y análisis químico.....                                                                                                                                                                                                | 71        |
| 4.2.6. Análisis estadístico .....                                                                                                                                                                                                                  | 72        |
| <b>4.3. Resultados.....</b>                                                                                                                                                                                                                        | <b>73</b> |
| 4.3.1. Efecto de la oviposición sobre las fitohormonas y los salicinoides del sauce americano.....                                                                                                                                                 | 73        |
| 4.3.2. Efecto de la oviposición en el desempeño de la avispa sierra .....                                                                                                                                                                          | 75        |
| 4.3.3. Efecto de la oviposición y del daño por alimentación sobre la emisión de volátiles .....                                                                                                                                                    | 77        |
| <b>4.4. Discusión.....</b>                                                                                                                                                                                                                         | <b>80</b> |
| <b>Capítulo 5 : Respuestas químicas frente al daño de <i>N. oligospilus</i> en el sauce comercial <i>S. babylonica</i> var <i>sacramenta</i> y el sauce nativo <i>S. humboldtiana</i> y su efecto sobre el desempeño de la avispa sierra .....</b> | <b>86</b> |
| <b>5.1. Introducción .....</b>                                                                                                                                                                                                                     | <b>87</b> |
| <b>5.2. Materiales y métodos.....</b>                                                                                                                                                                                                              | <b>90</b> |
| 5.2.1. Material biológico.....                                                                                                                                                                                                                     | 90        |
| 5.2.1.1. Sauces .....                                                                                                                                                                                                                              | 90        |
| 5.2.1.2. <i>Nematus oligospilus</i> .....                                                                                                                                                                                                          | 90        |
| 5.2.1.3. <i>Spodoptera frugiperda</i> .....                                                                                                                                                                                                        | 90        |

|                                                                                                                                                                   |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.2.2. Preferencia de oviposición de <i>N. oligospilus</i> sobre <i>S. babylonica</i> var <i>sacramenta</i> y <i>S. humboldtiana</i> .....                        | 91         |
| 5.2.3. Desempeño de <i>N. oligospilus</i> sobre <i>S. humboldtiana</i> y <i>S. babylonica</i> y la respuesta química de los sauces.....                           | 92         |
| 5.2.3.1. Diseño experimental y muestreo de plantas .....                                                                                                          | 92         |
| 5.2.3.2. Variables de desempeño medidas en <i>N. oligospilus</i> .....                                                                                            | 94         |
| 5.2.3.3. Análisis de salicinoides y taninos condensados .....                                                                                                     | 96         |
| 5.2.3.4. Colecta de volátiles y análisis químico .....                                                                                                            | 96         |
| 5.2.4. Crecimiento vegetativo de <i>S. humboldtiana</i> y <i>S. babylonica</i> var. <i>sacramenta</i> .....                                                       | 97         |
| 5.2.5. Desempeño de un insecto modelo generalista, <i>Spodoptera frugiperda</i> , sobre <i>S. babylonica</i> var <i>sacramenta</i> y <i>S. humboldtiana</i> ..... | 99         |
| 5.2.6. Análisis estadístico .....                                                                                                                                 | 100        |
| <b>5.3. Resultados.....</b>                                                                                                                                       | <b>101</b> |
| 5.3.1. Preferencia de oviposición de <i>N. oligospilus</i> .....                                                                                                  | 101        |
| 5.3.2. Desempeño de <i>N. oligospilus</i> sobre <i>S. humboldtiana</i> y <i>S. babylonica</i> var <i>sacramenta</i> .....                                         | 102        |
| 5.3.3. Análisis de salicinoides y taninos condensados.....                                                                                                        | 104        |
| 5.3.4. Análisis de compuestos orgánicos volátiles .....                                                                                                           | 108        |
| 5.3.5. Crecimiento inicial de <i>S. babylonica</i> y <i>S. humboldtiana</i> .....                                                                                 | 113        |
| 5.3.6. Desempeño de <i>Spodoptera frugiperda</i> , un insecto modelo generalista, sobre <i>S. babylonica</i> var <i>sacramenta</i> y <i>S. humboldtiana</i> ..... | 114        |
| <b>5.4. Discusión.....</b>                                                                                                                                        | <b>115</b> |
| <b>Capítulo 6: Discusión general .....</b>                                                                                                                        | <b>121</b> |
| 6.1. Contribuciones al estado de conocimiento y contraste de hipótesis.....                                                                                       | 122        |
| 6.2. Perspectivas .....                                                                                                                                           | 125        |
| 6.3. Consideraciones finales.....                                                                                                                                 | 127        |
| <b>Bibliografía .....</b>                                                                                                                                         | <b>128</b> |
| <b>Anexo.....</b>                                                                                                                                                 | <b>147</b> |

## Resumen

Las plantas de sauce pertenecen al género *Salix* que comprende varias especies leñosas de las cuales muchas han sido mejoradas con fines comerciales. Los diferentes genotipos de sauce muestran diversos grados de susceptibilidad al ataque de insectos herbívoros. Esto se debe, al menos en parte, a que el contenido de metabolitos especializados asociados con las defensas está determinado principalmente por la genética de la planta. Siendo la avispa sierra del sauce *Nematus oligospilus*, un insecto especialista que representa una de las principales amenazas para las plantaciones de sauces en la zona del Delta del Paraná, es importante estudiar su comportamiento frente a las defensas químicas de *Salix* spp. Esta interacción se abordó desde una perspectiva que abarque tanto los rasgos intrínsecos de la planta como las características comportamentales del insecto. El objetivo general de esta tesis fue evaluar el perfil fitoquímico de *Salix* spp y su rol en la interacción con la avispa sierra durante las tres etapas del proceso de selección de la planta hospedera: Evaluación por contacto, oviposición y herbivoría. Por lo tanto, se analizó el perfil constitutivo e inducido por el daño de *N. oligospilus* de los metabolitos especializados asociados típicamente a las defensas en salicáceas: compuestos fenólicos (salicinoides y taninos condensados) y orgánicos volátiles (COVs). Esto fue realizado en distintos genotipos comerciales exóticos y en *S. humboldtiana*, la única especie nativa de Sudamérica, amenazada por la invasión de sauces exóticos. Los resultados muestran que la susceptibilidad de los sauces comerciales a *N. oligospilus* correlaciona fuertemente con la concentración de salicinoides presentes en la superficie foliar y sugieren que podrían ser las claves de contacto que desencadenan el comportamiento de oviposición de la avispa sierra. Luego, se demostró que el sauce comercial *S. babylonica* var *sacramento* respondió frente a la oviposición *per se* mediante la activación de la señalización de defensas a través de la vía del ácido jasmónico. A su vez, se alteró el perfil de emisión de COVs y se afectó negativamente el desempeño del insecto, a través de un incremento en la proporción de individuos que retrasan su transición a pupa. Por último, se compararon las respuestas de defensa constitutivas e inducidas por el daño de *N. oligospilus* en el sauce comercial *S. babylonica* var *sacramento* y en el sauce nativo *S. humboldtiana*, y sus efectos sobre este insecto plaga. El análisis de salicinoides, taninos condensados y COVs tanto en forma constitutiva como inducida por el daño, mostró un perfil propio para cada especie de sauce. En *S. humboldtiana*, se observó un nivel de salicinoides mayor que en *S. babylonica*, aunque este último mostró una inducción significativa frente al daño. Pese a la mayor proporción de salicinoides, *S. humboldtiana* resultó ser un hospedero más susceptible a la avispa sierra, ya que favoreció su desempeño y preferencia de oviposición. El efecto opuesto se observó en *Spodoptera frugiperda* un insecto generalista modelo, cuyo desarrollo y supervivencia disminuyó al alimentarse de *S. humboldtiana*. Esto sugiere que los salicinoides en altas concentraciones afectan negativamente a los insectos

generalistas, pero no tendrían un rol defensivo contra la avispa sierra que, al ser especialista posee tolerancia a estos compuestos. Esta tesis aporta más evidencia sobre el rol de los metabolitos especializados en plantas leñosas, un modelo muy poco explorado en relación con las plantas herbáceas. Se demostró la importancia de estudiar varios genotipos para determinar la susceptibilidad a los insectos herbívoros a través de la caracterización de los metabolitos especializados y del comportamiento de los insectos plaga. Esto sugiere una posible explotación de los rasgos defensivos de las plantas contra los insectos herbívoros en los programas de mejoramiento e incluso en programas de rescate de especies de árboles amenazadas como *S. humboldtiana*.

Palabras clave: interacción planta-insecto, oviposición, herbivoría, compuestos orgánicos volátiles, salicinoides, *Nematus oligospilus*, *Salix spp.*, avispa sierra del sauce.

## Abstract

### **Defensive metabolites in willow plants and their interaction with the specialist herbivore *Nematus oligospilus***

Willow plants belong to the genus *Salix*, which comprises several woody species, many of which have been improved for commercial purposes. The different genotypes of willow show varying degrees of susceptibility to herbivorous insect attacks. This is partly due to the fact that the content of specialized metabolites associated with defenses is primarily determined by the plant's genetics. Considering that the willow sawfly *Nematus oligospilus*, a specialist insect, represents one of the main threats to willow plantations in the Paraná Delta region, it is important to study its behavior in response to the chemical defenses of *Salix spp.* This interaction was approached from a perspective that encompasses both intrinsic plant traits and behavioral characteristics of the insect. The general objective of this thesis was to evaluate the phytochemical profile of *Salix spp.* and its role in the interaction with the sawfly during the three stages of the host plant selection process: contact evaluation, oviposition, and herbivory. Therefore, the constitutive and damage-induced profile of *N. oligospilus*-associated specialized metabolites typically involved in defenses in willows was analyzed. These include phenolic compounds (salicinoids and condensed tannins) and volatile organic compounds (VOCs). The analysis was conducted on different commercial genotypes and *S. humboldtiana*, the only native species in South America threatened by the invasion of exotic willows. The results show that the susceptibility of commercial willows to *N. oligospilus* strongly correlates with the concentration of salicinoids present on the leaf surface, suggesting that these compounds may serve as contact cues triggering the oviposition behavior of the sawfly. Furthermore, it was demonstrated that the commercial willow *S. babylonica* var *sacramenta* perceives oviposition itself and activates defense signaling through the jasmonic acid pathway. This alters the emission profile of VOCs and negatively affects the insect's performance by increasing the proportion of individuals delaying their transition to the pupal stage. Finally, the constitutive and induced defense responses by *N. oligospilus* damaged were compared between the commercial willow *S. babylonica* var *sacramenta* and the native willow *S. humboldtiana*, along with their effects on this pest insect. The analysis of salicinoids, condensed tannins, and VOCs, both constitutively and induced, revealed a distinct profile for each willow species. *S. humboldtiana* exhibited a higher level of salicinoids than *S. babylonica*, although the commercial willow significant induction in response to damage. Despite the higher proportion of salicinoids, *S. humboldtiana* was more susceptible host for the sawfly, as it favored its performance and oviposition preference. The opposite effect was observed in *Spodoptera frugiperda*, a generalist insect model, whose development and survival decreased when feeding on *S. humboldtiana*. This suggests that high

concentrations of salicinoids strongly affect generalist insects but do not have a defensive role against the sawfly, which, as a specialist, possesses tolerance to these compounds. This thesis provides further evidence of the role of specialized metabolites in woody plants, a model that has been relatively unexplored compared to herbaceous plants. It demonstrates the importance of studying multiple genotypes to determine susceptibility to herbivorous insects through the characterization of specialized metabolites and the behavior of pest insects. This suggests a potential exploitation of plant defensive traits against herbivorous insects in breeding programs and even in rescue programs for threatened tree species such as *S. humboldtiana*.

Key words: insect-plant interaction, oviposition, volatile organic compounds, salicinoids, *Nematus oligospilus*, *Salix spp*, willow sawfly.

# **Capítulo 1:**

## **Introducción general**



## 1.1. Estrategias defensivas en las plantas

Como principales productores primarios en los ecosistemas terrestres, las plantas son atacadas con frecuencia por diversas comunidades de artrópodos herbívoros. Se supone que varios rasgos de las plantas han evolucionado como defensas en respuesta a la presión de selección de los herbívoros y así asegurar su supervivencia (Fürstenberg-Hägg et al., 2013). Desde la perspectiva de las plantas, las **defensas** son respuestas fenotípicas que pueden generar repelencia y/o una reducción del desempeño del herbívoro, y tienen un efecto positivo sobre su aptitud (es decir, la producción de descendencia fértil, denominada *fitness en inglés*) (Karban y Baldwin 1997). Desde el punto de vista del herbívoro, las defensas pueden clasificarse en directas o indirectas, según si afectan negativamente en forma directa o indirecta el crecimiento, reproducción y/o fecundidad del atacante. Las **defensas directas** hacen referencia a características estructurales de las plantas que resultan en una barrera física (p.ej., tricomas, espinas y cutículas cerosas) para la alimentación u oviposición del herbívoro, y a la producción de compuestos bioactivos especializados (conocidos como metabolitos secundarios o especializados que tienen efectos repelentes, tóxicos y/o antinutritivos sobre los mismos (Wu y Baldwin, 2010; Mitchell et al., 2016). En esta tesis se utilizará la denominación “metabolitos especializados”. Esto se debe a que el término “secundario” puede sonar trivial para la amplia gama de roles ecológicos de vital importancia para las plantas y su interacción con el medio biótico y abiótico (p.ej. inducir la floración, mantener el crecimiento perenne, ser compuestos defensivos contra insectos; Tissier et al., 2015).

Por otro lado, las **defensas indirectas** hacen referencia a compuestos químicos y/o estructuras físicas que atraen, alimentan o albergan organismos del tercer nivel trófico y actúan reduciendo la presión de los herbívoros sobre la planta (Fürstenberg-Hägg et al., 2013). Esto se lleva a cabo mediante la producción de volátiles que atraen a los predadores y/o parasitoides de los herbívoros, o de sustancias (p.ej., néctar extrafloral) que actúan a modo de recompensa nutriendo al artrópodo carnívoro o como refugio o sitio de oviposición (Wu y Baldwin, 2010).

Las defensas contra los insectos fitófagos, tanto directas como indirectas, también se definen temporalmente según el momento en que se expresan y pueden clasificarse en constitutivas o inducidas (Gatehouse, 2002). Las **defensas constitutivas** son rasgos físicos y/o químicos que las plantas tienen independientemente de la presencia o nivel de daño ocasionado por los herbívoros. Por el contrario, las **defensas inducidas** se expresan sólo después de que las plantas hayan sido atacadas (Wu y Baldwin, 2010). Esta inducción involucra cambios en el metabolismo y en el fenotipo de la planta cuando es dañada, como

la producción de compuestos químicos o estructuras físicas que repelen y/o disminuyen el desempeño del herbívoro repercutiendo positivamente en el *fitness* de la misma (Kessler et al., 2012). Estos cambios pueden aumentar la resistencia de la planta a nuevos ataques de herbívoros al disminuir la preferencia y/o afectar el desempeño natural de los insectos sobre la planta dañada, o aumentar la tolerancia compensando dicho daño (Karban y Myers, 1989). La resistencia es una de las estrategias defensivas adaptativas de las plantas contra sus atacantes, que implican diferentes características y antecedentes genéticos de las mismas, y que pueden producir efectos diferentes sobre el *fitness* tanto de la planta como del herbívoro (Núñez-Farfán et al., 2007). Se conoce como **resistencia** a la respuesta constitutiva o inducida de la planta frente al estrés generado por el herbívoro que evita y/o reduce la magnitud del daño (Karban y Myers, 1989). Esta respuesta se manifiesta afectando negativamente el comportamiento del herbívoro (conocido como antixenosis; p.ej., selección de la planta hospedera, oviposición, comportamiento de alimentación) o disminuyendo su desempeño (conocido como antibiosis; p.ej., la tasa de crecimiento, tiempo de desarrollo, el éxito reproductivo) (Núñez-Farfán et al., 2007; Schaller, 2008).

## 1.2. Tipos de daño causados por insectos herbívoros

El ataque de las plantas por parte de los insectos herbívoros puede dividirse en tres fases que pueden actuar en secuencia o incluso pueden afectarse mutuamente y, por lo tanto, actuar de forma concertada: evaluación por contacto, oviposición y alimentación o herbivoría (Hilker y Meiners, 2010). En esta tesis se va a prestar particular atención a la oviposición y a la herbivoría.

### 1.2.1. Oviposición

El proceso de oviposición puede variar entre los insectos, presentando puestas de huevos gregarias o solitarias, donde, en la mayoría de los casos, están pegados o cubiertos por secreciones derivadas de las glándulas accesorias o del oviducto (Reymond, 2013). Estas secreciones que adhieren a los huevos a la superficie de la planta son cruciales para inducir las defensas de la planta contra la presencia de huevos (Hilker y Meiners, 2006). Si no se produce ningún daño en la planta durante la oviposición, pueden existir compuestos

*inductores*<sup>1</sup> (conocidos como *elicitors* en inglés) liberados con la secreción que adhiere los huevos, que atraviesan la cutícula cerosa y entran en la célula vegetal. Sin embargo, la puesta de los huevos suele estar asociada al daño del tejido vegetal. Se conocen varios tipos de daño que ocurren conjuntamente con la deposición de huevos: (1) heridas por la actividad de alimentación de la hembra en la misma hoja sobre la que se depositan los huevos (p. ej. la chinche *Nezara viridula*: Colazza et al., 2004); (2) heridas por la eliminación de la epidermis de la hoja con las piezas bucales en el lugar donde se depositan los huevos, presumiblemente para mejorar la adhesión de los huevos a la superficie de la hoja (p. ej. el escarabajo del olmo *Xanthogaleruca luteola*: Meiners y Hilker, 2000); (3) disección del tejido de la hoja con las valvas del ovipositor utilizadas en la inserción de los huevos, presumiblemente para proporcionar protección contra la desecación (p.ej. la avispa sierra *Diprion pini*: Hilker et al., 2002; y *Nematus oligospilus*: Braccini et al., 2013).

La respuesta de la planta ante la oviposición involucra la inducción de defensas que actúan directa y/o indirectamente sobre los huevos o sobre las larvas que nacen de ellos. Como defensas directas contra los huevos se conocen la síntesis de compuestos ovicidas que aumentan la mortalidad (p.ej. benzoato de bencilo: Yang et al., 2013), formación de neoplasmas que conducen al desprendimiento de los huevos o incluso su aplastamiento (Hilker y Fatouros, 2015) y la formación de tejido necrótico (Hilker y Fatouros, 2015). Por otro lado, las defensas indirectas dirigidas a los huevos involucran al tercer nivel trófico mediante la atracción o el arresto de predadores y/o parasitoides de huevos a través del aumento y/o la síntesis de *novos* de compuestos orgánicos volátiles (COVs; explicado con más detalle en la sección **1.5.2.3. Compuestos orgánicos volátiles**).

Las plantas también pueden responder ante la oviposición mediante la inducción de defensas directas y/o indirectas contra la futura herbivoría dirigidas a estados juveniles posteriores a los huevos. Las defensas que perjudican directamente a larvas o pupas están relacionadas con la disminución de la calidad nutricional de la planta que afecta negativamente el desempeño o la supervivencia del herbívoro. Esta respuesta puede activarse antes o durante la alimentación de las larvas o ninfas desencadenando la liberación de COVs y/o activando la transcripción de genes asociados a las defensas directas contra la herbivoría (Hilker y Fatouros, 2016 y sus referencias). Sean las defensas directas o indirectas, la presencia de huevos actuaría como una señal de herbivoría inminente que “prepara” a la planta para una defensa más eficaz contra los herbívoros que se alimentan de ella (conocido en inglés como *priming*; Hilker y Fatouros, 2015).

---

<sup>1</sup> *Inductores*: compuestos químicos o bioquímicos de origen biótico o abiótico que desencadenan una respuesta defensiva en la planta (Eder y Cosio, 1994).

### **1.2.2. Herbivoría**

Las plantas tienen la capacidad de distinguir el tipo de daño físico infligido al tejido. Este puede ser provocado por la alimentación y/o oviposición del insecto, pero también por otros daños mecánicos. Esta capacidad evitaría un gasto innecesario de recursos costosos de defensa, considerando que la producción de las mismas sólo beneficiaría a las plantas atacadas por los herbívoros (Fürstenberg -Hägg et al., 2013). La herbivoría no se da en la misma medida en todos los grupos de insectos y se ha sugerido que, dependiendo del modo de alimentación y/o el grado de especialización alimentaria se inducirán distintas respuestas de la planta, resultando en la activación de diferentes mecanismos de defensa (Ali y Agrawal, 2012). Los insectos utilizan principalmente uno de dos modos de alimentación: o muerden y mastican su alimento (masticadores o mandibulados), o bien lo absorben líquido (picador-suctores o chupadores). A su vez, se han clasificado tradicionalmente en generalistas (polífagos) que se alimentan de varios hospederos de más de una familia de plantas, o especialistas (monófagos y oligófagos), que se alimentan de uno o unos pocos taxones de plantas estrechamente emparentadas de la misma familia o incluso de un único género (Ali y Agrawal, 2012; Fürstenberg -Hägg et al., 2013). En esta tesis se han adoptado los términos especialista y generalista para centrarnos en los extremos, que suelen significar especies que consumen desde unas pocas especies relacionadas hasta especies de varias familias de plantas, respectivamente.

## **1.3. Respuestas fisiológicas de las plantas frente al daño del herbívoro**

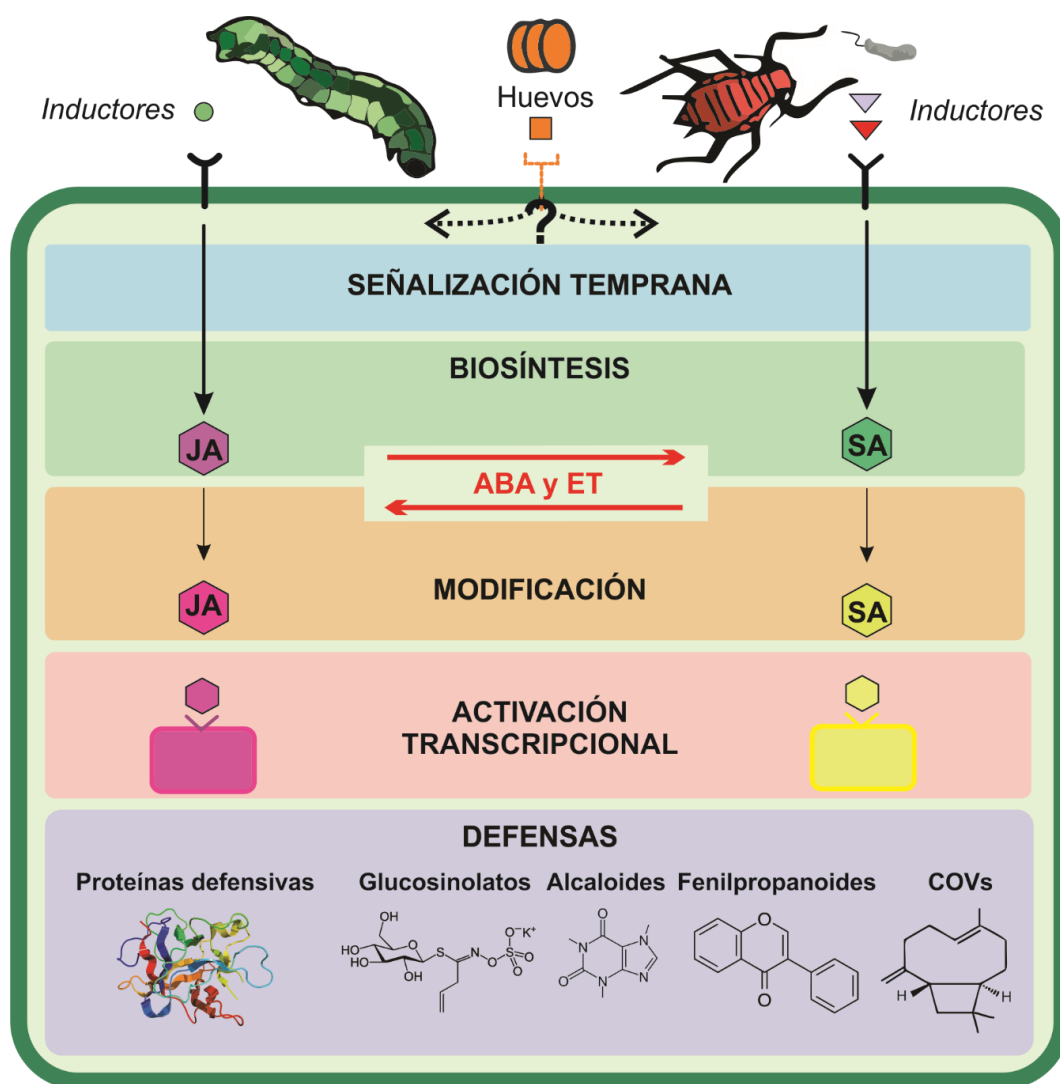
### **1.3.1. Percepción del daño y señalización de la respuesta defensiva**

Una respuesta defensiva requiere el reconocimiento específico del herbívoro y su transducción en la señalización de la defensa. Las plantas perciben la herbivoría a través del reconocimiento de *inductores*, moléculas provenientes de los insectos (p.ej. en secreciones orales) y/o moléculas endógenas citosólicas o apoplásticas de la planta liberadas al producirse una lesión tisular (Erb y Reymond, 2019). Varias fitohormonas, como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA), el etileno (ET) y el ácido abscísico (ABA), regulan la respuesta defensiva frente a factores bióticos estresantes, entre otras funciones (Santner et al., 2009). Las fitohormonas comprenden un grupo de moléculas derivadas de varias vías metabólicas, y funcionan como mensajeros químicos endógenos que conectan la percepción de la herbivoría con la expresión de las defensas (Santner y Estelle, 2009). En general, estos compuestos están presentes en concentraciones basales

y actúan a nivel local en el lugar de síntesis o a nivel sistémico en tejidos cercanos o distantes.

La vía del JA se activa especialmente en respuesta al daño ocasionado por herbívoros masticadores mientras que la vía del SA se activa si la planta es atacada por insectos sucto-picadores y patógenos biotróficos (Fig. 1.1) (Glazebrook, 2005; Kawazu et al., 2012). Las redes de defensa reguladas por SA y JA interactúan a través de una compleja red en la que ambas vías suelen ser antagónicas (Peña-Cortés et al., 1993; Diezel et al., 2009), pero también pueden ser sinérgicas (Schenk et al., 2000; Devadas et al., 2002). Dentro de esta red de interacción cruzada entre diferentes fitohormonas, la vía regulada por el JA puede ser co-regulada por ABA y/o ET (Kazan y Manners, 2008).

Aunque las redes de defensa SA y JA responden a diferentes tipos de daños bióticos, ambas redes siguen un conjunto similar de "etapas" durante la inducción de la defensa (Fig.1.1). La primer etapa se conoce como señalización temprana que comienza con la percepción de los *inductores* asociados con la herbivoría que desencadena una cascada de respuestas bioquímicas (Erb y Raymond, 2019) (Fig. 1.1) que conlleva a la activación de la biosíntesis hormonal (Fig. 1.1). Esta última involucra una larga vía dando lugar a la producción de SA o JA que luego se convierten en su formas metabólicamente activas en la etapa de modificación (Fig. 1.1). Las formas bioactivas se unen a sus respectivos receptores involucrados en la liberación de la represión de los genes de defensa (activación transcripcional; Fig. 1.1). Finalmente se inicia la producción de distintas clases de compuestos involucrados en la respuesta defensiva directa y/o indirecta contra el insecto herbívoro (Wasternack y Hause, 2013; Erb y Reymond, 2019; Fig. 1.1).



**Figura 1.1.** Representación esquemática de las etapas de la vía de señalización de la respuesta defensiva del ácido jasmónico (JA) (izquierda) y salicílico (SA) (derecha). Las vías del JA y SA comparten 5 etapas marcadas con recuadros de distintos colores. La etapa de señalización temprana (recuadro celeste) comienza con la percepción de moléculas *inductoras* asociadas al daño de insectos herbívoros masticadores (círculo verde), succionadores (triángulo rojo), de patógenos (triángulo gris), o de huevos (cuadrado naranja). La regulación de la respuesta defensiva ante la puesta de huevos no se conoce con exactitud (signo de pregunta y flechas punteadas). Luego de la percepción, se desencadena la biosíntesis (recuadro verde) en la que se producen JA y SA (hexágonos violeta y verde) y que en la etapa de modificación (recuadro naranja) se convertirán a sus formas bioactivas (hexágonos fucsia y amarillo). Ambas fitohormonas se unen a sus respectivos receptores (cuadrado fucsia y amarillo) logrando como resultado la activación transcripcional (recuadro rosado) de los genes involucrados en la síntesis de compuestos de defensa (recuadro violeta). Las flechas rojas dobles indican la interacción entre JA y SA en la que pueden verse involucradas otras fitohormonas como ácido abscísico (ABA) y etileno (ET). Modificado de Erb y Reymond (2019) y de Stroud et al. (2022).

Se sabe que la señalización por fitohormonas tiene un rol en la mediación de las respuestas de las plantas frente a los huevos de los insectos, sin embargo, el conocimiento es escaso (Fig.1.1). Parecería que el SA es la fitohormona que protagoniza la regulación

de las defensas frente a la oviposición. Varias especies de plantas forman tejido necrótico en respuesta a los huevos (Reymond, 2013; Fatouros et al., 2014), imitando así la llamada respuesta hipersensible que se produce ante la infección por patógenos (Mur et al., 2008). Esta reacción va acompañada de mayores niveles de SA y de la expresión de genes asociados a la infección por patógenos relacionados con el SA (Little et al., 2007; Bruessow et al., 2010; Hilfiker et al., 2014; Lortzing et al., 2019). Sin embargo, los estudios en solanáceas han proporcionado indicios sobre la importancia del JA en la activación de la resistencia de las plantas contra las larvas conespecíficas que eclosionan de los huevos. Estos antecedentes sugieren que la oviposición desencadena reacciones de defensa que pueden actuar de forma específica para cada planta y su insecto asociado.

### 1.3.2. Características defensivas

Las barreras físicas, los metabolitos especializados y las proteínas antidigestivas determinan directamente la resistencia de las plantas contra los herbívoros. En esta tesis se hará foco principalmente en los metabolitos especializados asociados a las defensas químicas de las plantas. A diferencia de los metabolitos primarios, no se encuentran en todas las especies, sino que suelen estar asociados a distintos grupos taxonómicos. Algunos de ellos pueden estar ampliamente distribuidos, es decir, presentes en muchos taxones diferentes, mientras que otros pueden encontrarse en una sola especie. Debido a su rol ecológico, los metabolitos especializados pueden funcionar como aleloquímicos<sup>2</sup> y desempeñar un papel vital en la defensa directa e indirecta contra los herbívoros.

Los metabolitos especializados pueden encontrarse de manera constitutiva almacenados como formas activas o inactivas, o ser inducidos en respuesta al ataque de insectos aumentando su concentración o sintetizándose de *novo* (War et al., 2012). La clase más importante debido a la cantidad de compuestos registrados, la conforman los terpenoides, con más de 25.000 compuestos identificados. La segunda clase en importancia es la de los alcaloides, y la tercera es la de los compuestos fenólicos (Taiz et al., 2015). En esta tesis se dará particular importancia a los compuestos fenólicos y a los compuestos orgánicos volátiles (donde algunos también pueden ser compuestos fenólicos) como los grupos de metabolitos predominantes asociados a las defensas químicas de salicáceas.

---

<sup>2</sup> Aleloquímico: sustancia química no nutritiva producida por un individuo de una especie que afecta al crecimiento, la salud, el comportamiento o la biología de la población de otra especie (Kost, 2008).

### 1.3.2.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos más comunes y extendidos de moléculas defensivas, que desempeñan un papel importante en la resistencia constitutiva e inducida contra los insectos (War et al., 2012). Poseen un anillo aromático con uno o varios grupos hidroxilo, junto con otros componentes. El nombre de este grupo se debe a que comparten una molécula aromática (i.e. fenol) pero la mayoría contienen más de un fenol (polifenoles). Se clasifican convenientemente según el número de átomos de carbono en el esqueleto básico. Metabólicamente, pertenecen al grupo de los fenilpropanoides, del cual derivan miles de compuestos, entre los que se encuentran los fenoles y los flavonoides (Philippe y Bohlmann, 2007). También forman parte de este grupo los salicinoides y los taninos, explicados en la sección **1.5.2. Defensas en salicáceas**. Los factores de transcripción regulados por JA tienen funciones clave en la regulación de la síntesis de compuestos derivados de los fenilpropanoides (Gaquerel et al., 2014; Liu et al., 2015). Además, se han demostrado los efectos perjudiciales de los compuestos fenólicos producidos a partir de la vía fenilpropanoide sobre el desempeño de los herbívoros en numerosas interacciones planta-insecto (Dixon et al., 2002; Kaur et al., 2010; Salminen et al., 2011; War et al., 2012). Algunos incluso pueden ser disuasivos de la alimentación (por ejemplo, la catequina y la faseolina) o tóxicos para insectos (p.ej, el insecticida natural rotenona). Por otro lado, varios flavonoides y salicinoides son utilizados por especies de insectos monófagos u oligófagos para reconocer sus plantas hospederas y estimular su alimentación (Kolehmainen et al., 1995; Roininen et al., 1999; Schoonhoven et al., 2005).

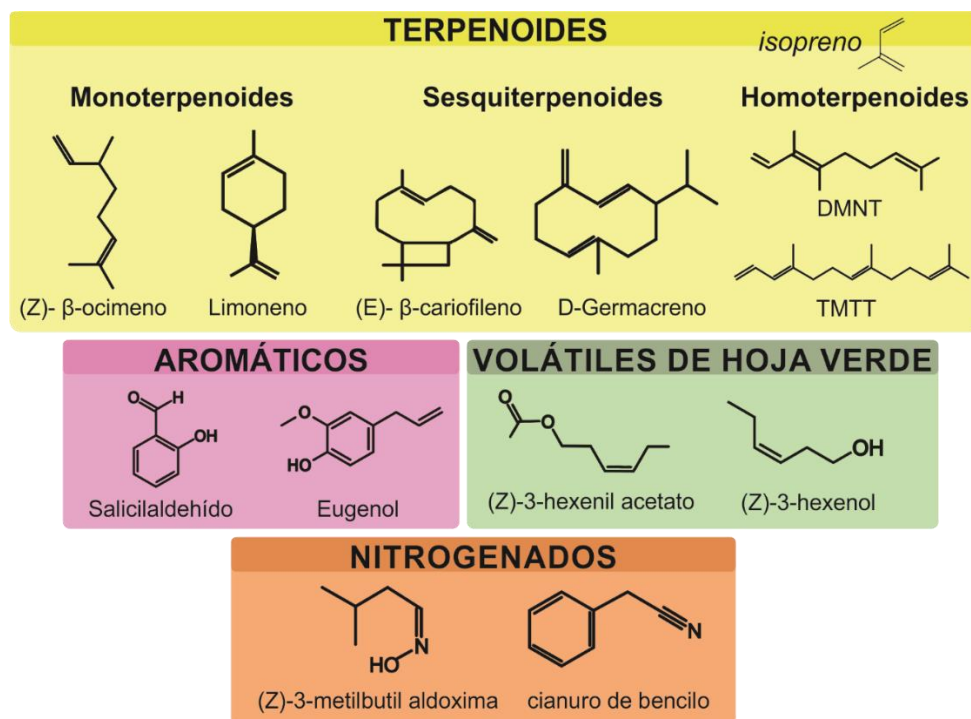
### 1.3.2.2. Compuestos orgánicos volátiles

Un grupo relativamente grande de metabolitos especializados ampliamente distribuido en plantas está formado por compuestos orgánicos volátiles (COVs), que son moléculas de bajo peso molecular y alta presión de vapor a temperatura ambiente (Knudsen et al., 2006). La biosíntesis de la amplia variedad de COVs se ramifica a partir de unas pocas rutas metabólicas primarias. Basándose en su origen biosintético, todos los COVs se dividen en varias clases, incluyendo terpenoides (i.e. isoprenoides), compuestos aromáticos (i.e. benzenoides), derivados de ácidos grasos y de aminoácidos, además de algunos compuestos específicos de especies o géneros no representados en esas clases principales (Dudareva et al., 2013; Fig. 1.2). Mientras que algunos volátiles son probablemente comunes a casi todas las plantas, como los derivados de ácidos grasos que incluyen aldehídos, alcoholes y ésteres de 6 átomos de carbono (conocidos como



volátiles de hoja verde), otros, como los terpenoides sólo se emiten en grandes cantidades en algunos taxones vegetales (Schnitzler et al., 2010).

Los **terpenoides** constituyen la clase más amplia y diversa de metabolitos secundarios (Fig. 1.2). Pertenecen a la gran familia de los compuestos isoprenoides, formados por un número variable de unidades de isopreno de cinco carbonos (i.e. metil-1,3-butadieno; Fig. 1.2). El número de unidades de isopreno define a qué subclase pertenece un determinado terpenoide. Ambos términos, terpenos y terpenoides, se consideran generalmente equivalentes, aunque el uso de terpenos se reserva a veces para los compuestos olefínicos (es decir, que sólo contienen carbono e hidrógeno) y el de terpenoides para los terpenos oxidados (Tissier et al., 2015). Derivan de dos vías independientes y separadas por compartimentos celulares donde una da lugar a sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), mientras que la otra proporciona precursores de monoterpenos (C<sub>10</sub>), entre otros (Fig. 1.2). A su vez, dentro de los terpenoides, se encuentran los **homoterpenos**, que son compuestos acíclicos irregulares que derivan de la degradación de terpenos de 15 y 20 átomos de carbono: 4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT) y 4,8,12-trimetil tridecano-1,3,7,11-tetraeno (TMTT) respectivamente (Fig. 1.2). Los **monoterpenoides** están formados por dos unidades de isopreno y se encuentran con frecuencia en los aceites esenciales de hierbas aromáticas y especias. Compuestos como el limoneno, el pineno y el (Z)- $\beta$ -ocimeno pertenecen a esta clase (Fig. 1.2). Los **sesquiterpenoides** constan de tres unidades de isopreno y también se encuentran con frecuencia en los aceites esenciales (Fig. 1.2).



**Figura 1.2.** Ejemplos de los principales grupos de compuestos orgánicos volátiles. El grupo más grande y diverso está representado por los terpenoides clasificado según la cantidad de unidades de isopreno que los conforman: monoterpenoides ((Z)-β-ocimeno, Limoneno), sesquiterpenoides ((E)-β-cariofileno, D-Germacreno) y homoterpenoides ((4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT) y 4,8,12-trimetil tridecano-1,3,7,11-tetraeno (TMTT)). Otros grandes grupos están representados por los volátiles aromáticos que presentan en su estructura un anillo aromático (Salicilaldehído, Eugenol), los volátiles de hoja verde que son aldehídos, alcoholes y ésteres de seis carbonos ((Z)-hexenil acetato, (Z)-3-hexenol) y los nitrogenados que derivan de los aminoácidos y contienen nitrógeno ((Z)-3-metilbutil aldoxima, cianuro de bencilo).

La segunda clase más importante de COVs comprende los **compuestos aromáticos** conocidos también como fenilpropanoides o bencenoides (Knudsen et al., 2006; Fig. 1.2), que se originan a partir del aminoácido aromático fenilalanina y tienen en común en su estructura un anillo aromático. Ejemplos de estos compuestos son el eugenol, el benzaldehído y el salicilaldehído, entre otros (Fig. 1.2). Otra clase de COVs son los llamados **volátiles de hoja verde**. Son derivados de ácidos grasos como el 3-hexanol y el cis-3-hexenil acetato que proceden de los ácidos grasos insaturados (C18) linoleico o linolénico (Dudareva et al., 2013; Fig. 1.2). Consisten en aldehídos, alcoholes y ésteres de seis carbonos (Dudareva et al., 2006; Fig. 1.2). Generalmente se producen, sobre todo en cantidades apreciables, por oxidación de los lípidos de las hojas (Schoonhoven et al., 2005). Otros compuestos, son los **volátiles nitrogenados** que derivan de aminoácidos o intermediarios en su biosíntesis, conteniendo nitrógeno en su estructura (Knudsen et al., 2006). Dentro de los volátiles nitrogenados se encuentra el cianuro de bencilo y las aldoximas y sus derivados, y pueden ser alifáticos o aromáticos. Ejemplos de estos compuestos son el cianuro de bencilo, 2-metilbutanonitrilo y 3-metilbutanonitrilo, el 2-

fenilnitroetano, y las aldoximas 2-metil-butilaldoxima, 3-metilbutialdoxima (Irmisch et al., 2013; Fig. 1.2).

Muchos COVs se volatilizan fácilmente cuando se exponen al aire y, de hecho, se liberan cuando se dañan los tejidos vegetales. Las plantas intactas también emiten estos compuestos volátiles, que se liberan a través de los estomas abiertos, las cutículas de las hojas y las paredes de las glándulas, pero la tasa de liberación es mucho menor.

Los COVs cumplen variadas funciones ecológicas. Son importantes en la comunicación planta-planta (Baldwin et al., 2006; Arimura et al., 2009), la comunicación planta-polinizador (Schiestl y Johnson, 2013), planta-insecto (Blande, 2017; Moreira et al., 2018a) y proporcionan defensas directas como la disuasión de los insectos herbívoros (Bruinsma y Dicke, 2008). También los COVs pueden actuar como claves de reconocimiento de la planta hospedera para los herbívoros. Estos los perciben a través del reconocimiento de componentes específicos o de composiciones cualitativas y cuantitativas específicas de COVs (Galizia y Menzel, 2000; Hansson, 2002; Riffell et al., 2009). Incluso pueden ser aprovechados por insectos de otros niveles tróficos como los depredadores y parasitoides durante la búsqueda y reconocimiento de su insecto hospedero, actuando como defensas indirectas (Dicke, 1999).

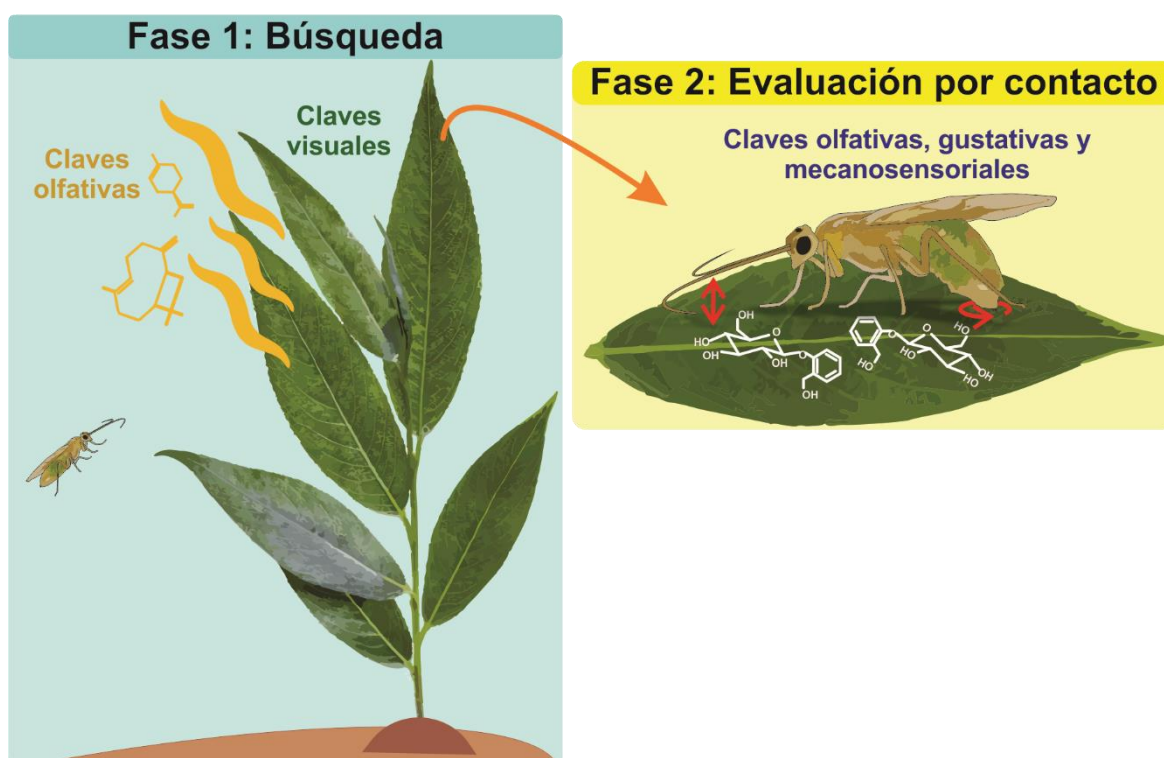
La formación y emisión de volátiles a menudo es inducida por herbívoros masticadores o sucto-picadores y las mezclas volátiles resultantes suelen contener sustancias de diversas clases de compuestos. Las mezclas volátiles de plantas inducidas por herbívoros suelen estar dominadas por terpenoides y volátiles de hoja verde, pero también incluyen compuestos aromáticos, alcoholes y compuestos nitrogenados (Dudareva et al., 2013). Los volátiles liberados tras el ataque de herbívoros suelen ser producto de una biosíntesis de *novo* y/o de un aumento de compuestos constitutivos almacenados (Paré y Tumlinson, 1997; Kollner et al., 2004). Los COVs inducidos por herbivoría son defensas químicas desencadenadas por el daño de los herbívoros, que tienen efectos directos e indirectos sobre los herbívoros que los causan (Clavijo McCormick et al., 2012). La biosíntesis y la liberación de COVs inducidos por herbivoría están reguladas por JA y SA, según el modo de alimentación del insecto, que inician cascadas de señalización controlando la expresión de múltiples genes de defensa, incluidos los responsables de la producción de volátiles (Arimura et al., 2009). Los compuestos inducidos se emiten principalmente a nivel local desde los tejidos vegetales dañados, pero también pueden liberarse sistémicamente desde partes de la planta no dañadas, tanto por encima como por debajo del suelo (Turlings y Tumlinson, 1992).

## 1.4. Reconocimiento de la planta hospedera

Para localizar y evaluar la calidad de posibles plantas hospederas, los insectos herbívoros suelen basarse en señales producidas por las plantas que proporcionan información sobre su idoneidad (Bruce et al., 2005). Estas señales pueden ser visuales (p.ej. rasgos físicos de la planta como color, tamaño y forma), físicas (p.ej. tricomas, la microestructura que forman las ceras epicuticulares, grosor y dureza de la hoja) y químicas (olfativas o gustativas; p.ej., metabolitos primarios o especializados) (Schoonhoven et al., 2005). Aunque las señales varían en importancia relativa durante la selección de la planta hospedera, los insectos que buscan alimento o sitios de oviposición utilizan a menudo estas señales de forma combinada (Schoonhoven et al., 2005). Sin embargo, las señales químicas son fundamentales en la ejecución de comportamientos que son cruciales para la supervivencia y la reproducción de los insectos fitófagos (Visser, 1986; Bernays y Chapman, 1994).

Los insectos herbívoros presentan una serie de sistemas sensoriales que les permiten percibir e interpretar la información de su entorno codificada como señales visuales, físicas y químicas. Particularmente, responden a las señales químicas percibiéndolas mediante la quimiorrecepción, es decir a través del uso de los sentidos del olfato (olfacción, órganos de detección de estímulos químicos volátiles) y del gusto (gustación, o quimiorrecepción de contacto). Estos compuestos químicos pueden encontrarse en solución líquida siendo percibidos por sensilias gustativas, o en el aire y son percibidos por sensilias olfativas (Zacharuk, 1980). Las sensilias son órganos sensoriales que se encuentran presentes predominantemente en las antenas y piezas bucales, pero también pueden encontrarse en los tarsos y en el ovipositor y presentan uno (i.e. gustativas) o múltiples poros (i.e. olfativas) por los que responden al estímulo químico.

La elección de planta hospedera por parte de los insectos herbívoros puede considerarse como un comportamiento de selección. Este proceso de selección normalmente consiste en una cadena de acontecimientos secuenciales estereotipados que involucra varios estímulos de la planta y genera diversas respuestas en el insecto. En este proceso pueden distinguirse dos fases principales consecutivas delimitadas por la decisión intermitente de permanecer en contacto con la planta: (1) de búsqueda y (2) de evaluación por contacto (Schoonhoven et al., 2005; Fig. 1.3). La primera fase puede terminar con el encuentro del hospedero; la segunda, con la aceptación o el rechazo. La aceptación es una decisión de comportamiento crucial, ya que da lugar a la alimentación o a la puesta de huevos, con posibles consecuencias negativas para su *fitness*.



**Figura 1.3.** Esquema del proceso de selección de la planta hospedera por el insecto herbívoro. Primero se inicia una fase de búsqueda comandada por claves visuales (rasgos físicos, como el tamaño, la forma y el color de la planta) y por claves olfativas (compuestos orgánicos volátiles). Una vez encontrado al hospedero se inicia la segunda fase de evaluación por contacto donde el insecto manifiesta un comportamiento estereotipado contactando de forma repetitiva la superficie con los apéndices (i.e. antenas, patas, cercos del ovipositor) (flechas rojas). Las claves gustativas incluyen nutrientes como azúcares y aminoácidos, así como metabolitos defensivos y las mecanosensoriales, o claves físicas, tricomas, esclerotización y dureza de las hojas, entre otras.

Los pasos conductuales que se producen secuencialmente durante la búsqueda (i.e. primera fase de selección del hospedero) pueden ser aleatorios o conformar patrones de movimiento dirigidos hacia el hospedero. La orientación de los insectos durante la búsqueda se da en respuesta al estímulo de señales que pueden ser visuales o químicas olfativas, o a su combinación. Muchas especies de insectos dependen de señales visuales para localizar plantas, especialmente si son capaces de dispersarse a larga distancia (Turlure et al., 2016). Por otro lado, las olfativas químicas aportan mayor precisión sobre la localización de la planta hospedera (Bruce et al., 2005) tanto a corta (Egonyu, et al., 2013) como a larga distancia (Ballhorn et al., 2013).

Una vez encontrado el hospedero, el insecto herbívoro que contacta la planta entra en la segunda fase que se conoce como "fase de evaluación por contacto" (Fig. 1.3) en la que obtiene información adicional sobre su calidad a través de estímulos táctiles

(mecanosensoriales o físicos) y de contacto (olfativos y predominantemente gustativos) (Fig. 1.3). Esta fase consiste en una serie de comportamientos que sirven para evaluar rasgos físicos y químicos de la planta que no podrían percibirse a mayor distancia. Tras el contacto inicial con la planta, la locomoción suele detenerse de forma repentina donde el insecto tiende a restringir sus movimientos a un área reducida. Durante el movimiento se realiza una evaluación intermitente, que se manifiesta como un contacto repetitivo de la superficie de la planta con el extremo de las patas, las antenas, las piezas bucales y/o el ovipositor. Rascar y golpear con los tarsos, antenar, palpar y arrastrar el ovipositor son tipos de comportamientos comúnmente observados. Estos movimientos son una respuesta directa a las señales físicas y químicas de contacto que ofrece la planta (Schoonhoven et al., 2005).

Las señales químicas son cruciales durante la evaluación por contacto, particularmente para insectos especialistas. Estos son capaces de reconocer metabolitos especializados exclusivos de una misma familia o género de plantas que no están presentes en otros taxones. Por ejemplo, los glucosinolatos son compuestos químicos presentes sólo en algunas familias de plantas emparentadas (Harborne, 1995) y que se han reportado como claves de reconocimiento de las brasicáceas para la oviposición del lepidóptero especialista *Plutella xylostella*. (Badenes-Pérez et al., 2011). A su vez, los metabolitos específicos de cada taxón o de mayor distribución entre las plantas, también pueden encontrarse en la superficie de la hoja (Müller y Riederer, 2005) actuando como principios activos en el reconocimiento del hospedero. Sin embargo, puede haber otros compuestos químicos disponibles sobre la superficie foliar muy frecuentes entre las plantas que también pueden formar parte de las claves de contacto. Estos abarcan varios grupos de compuestos cuticulares no polares, como los alcanos de cadena larga y los ésteres, y polares como los azúcares y los aminoácidos (Müller y Riederer, 2005). Por lo tanto, la composición química de la superficie foliar puede determinar la aceptación de la planta hospedera por el insecto herbívoro.

## **1.5. Sistema de estudio: El sauce y la avispa sierra**

### **1.5.1. El género *Salix***

La familia Salicaceae está compuesta por árboles y arbustos caducifolios que pueden ser hermafroditas o dioicos. Comprende varios géneros entre los que se destacan *Salix* (sauces) y *Populus* (álamos), ya que han resultado de gran utilidad para la sociedad (Dickmann et al., 2014) gracias a su rápido crecimiento juvenil, facilidad de propagación vegetativa, y variados usos de la madera: aserrado, debobinado, celulosa, fibras y/o

partículas para la producción de tableros y biomasa con fines energéticos. Particularmente, la corteza de los sauces fue la fuente original de la salicina, cuya modificación química es la aspirina (ácido acetilsalicílico) y se usa con fines medicinales.

Si bien no existe acuerdo entre taxonomistas con respecto al número exacto de especies de *Populus* y *Salix*, se considera que ambos géneros abarcan unas 400–500 especies (Cortizo et al., 2016). Por el contrario, las especies de plantaciones tanto en reservas, sistemas agroforestales o pequeños grupos de árboles aislados se distribuyen por todo el mundo y se ubican en latitudes templadas de ambos hemisferios (Cortizo et al., 2016).

El género *Salix* comprende más de 300 especies, pero la existencia de numerosos híbridos complica su identificación a nivel específico. La clasificación del género *Salix* es notoriamente difícil e, incluso hoy en día, la identificación a nivel de especie sigue siendo problemática por diversas razones. Muchas especies muestran plasticidad fenotípica y existe una considerable hibridación interespecífica y variación en la ploidía (Karp et al., 2011). Por lo tanto, se han utilizado técnicas moleculares para ayudar a resolver problemas de filogenia del sauce y para caracterizar la diversidad entre especies y clones (Karp et al., 2011).

La radiación en el género *Salix* involucró la divergencia entre arbustos, formas bajas y postradas, y árboles. Además, este género ocupa diversos cursos de agua (orillas de ríos y lagos, aguas temporales y pantanos) y posee una buena adaptación al frío (Price y Roininen, 1993). Son tolerantes a inundaciones periódicas o permanentes y son capaces de sobrevivir en suelos salinos, pero son sensibles a la sequía (Alderete, 2005). Particularmente la herbivoría llega a ser un factor crítico en los dos primeros años de vida (Flinta, 1960).

Los sauces son especies dioicas donde las plantas masculinas y femeninas tienen amentos distintos (inflorescencia de flores unisexuales, sin pétalos ni sépalos). Sus hojas son simples, normalmente alternas, finamente dentadas o aserradas, brevemente pecioladas, yemas agudas, axilares, protegidas por una escama o bráctea (Méndez, 2012). Generalmente se propagan asexualmente por medio de esquejes (también llamadas estacas) que enraízan fácilmente y son de rápido crecimiento.

### 1.5.1.1. Importancia en la Argentina

En Argentina se cultivan, principalmente en el Delta del Paraná y zonas de regadío de la Patagonia y Cuyo, conformando el tercer cultivo forestal en importancia en el país (Cortizo et al., 2016). El desarrollo de estas plantaciones depende en gran medida del suministro de material mejorado que asegure la adaptabilidad, productividad y sostenibilidad del recurso forestal y para ello se lleva a cabo la selección de especies y clones adaptados a las condiciones ecológicas de los distintos territorios en que son introducidos (Cortizo et al., 2016).

En Buenos Aires, el Delta del Paraná es el humedal de mayor extensión e importancia. En este ambiente conviven especies exóticas, con una creciente producción forestal de Salicáceas, de las cuales el 80% corresponde a plantaciones de sauce. Las plantaciones actuales están compuestas mayoritariamente por el cultivar exótico Soveny Americano (*Salix babylonica* var *sacramenta*), nombre con el que fue inscripto al Registro Nacional de Cultivares del INASE (2010). Es una variedad exótica de sexo femenino, introducida y reconocida por su la tolerancia al anegamiento y la alta aptitud para elaboración de papel para diarios y embalaje, ocupando un rol relevante en la industria maderera. Según Golfari (1958), Soveny Americano fue introducido a través de estacas al Delta del Río Paraná en el año 1928, desde Rojas, Provincia de Buenos Aires, por un isleño, el Sr. Harped Soveny. Se estima que provino de Estados Unidos pero su origen sería de Rusia (que es parte del territorio de dispersión natural de la especie *Salix babylonica*) (Ragonese, 1993).

En Argentina, los programas de mejoramiento genético se iniciaron a mediados del siglo XX, buscando árboles con una arquitectura de copa que permita capturar la luz de forma más eficiente, que concentren la producción de fotosintatos en el tallo, que presenten menor cantidad de ramas, mayor largo de entrenudos, mejor aptitud y comportamiento en los procesos de transformación de la madera, mejorando así la calidad y cantidad del producto final, reduciendo los costos de establecimiento, cosecha y/o procesos industriales (Cortizo et al., 2009). La mayor parte de los programas de mejora se basa fundamentalmente en la hibridación interespecífica. En el Programa Nacional de Mejoramiento Genético de Salicáceas (programa de mejoramiento genético del INTA) se han utilizado un total de 14 especies de sauces exóticas (p.ej. *S. viminalis*, *S. nigra*, *S. alba* y *S. matsudana*) de las que se generó una gran variedad de híbridos mediante cruzamientos controlados. También se utilizan clones de especies puras cuando los híbridos interespecíficos no presentan ventajas agronómicas por falta de adaptación y/o de tolerancia a enfermedades (Stanton et al., 2014; López et al., 2016).



El “sauce criollo” (*Salix humboldtiana* Willd.) es la única especie nativa del hemisferio Sur, distribuyéndose desde el norte de México hasta el norte de la Patagonia en la Argentina y Chile. En el límite meridional de la distribución, la especie está representada por individuos aislados o formando pequeños grupos (Dezzotti et al., 2020). Tiene una dispersión amplia en nuestro país, desde la Patagonia hasta Salta, Jujuy y Formosa, en el extremo norte. Entre sus diversos usos, se pueden mencionar el maderero, medicinal, ornamental, forrajera para ganado, melífera y para restauración de zonas ribereñas erosionadas. En su estado natural se reproduce casi exclusivamente por semilla, al contrario de los sauces introducidos que se reproducen por esquejes. Ocasionalmente, se reproduce en forma vegetativa, a partir del enraizamiento de segmentos de ramas.

A escala regional, la invasión biológica, la fácil hibridación con plantas exóticas, el uso no sustentable y la transformación causada por la urbanización, la agricultura, y la actividad hidroeléctrica constituirían factores antropogénicos de degradación y destrucción de la vegetación formada por *S. humboldtiana* (Gallo et al., 2016). En la mayoría de los ríos patagónicos, así como en el Delta del Paraná y las riberas platenses, este sauce ha desaparecido o quedan pocos ejemplares (Adema et al., 2022). Esto se debe a las podas producidas durante la colonización de las tierras patagónicas, por la invasión de sauces exóticos que modificaron su hábitat y por la falta de estabilidad de sus riberas, algo necesario para que las semillas germinen y prosperen las plántulas (Amico et al., 2018). Esta situación justifica su inclusión en el marco que brindan las leyes de protección ambiental de bosques naturales (Dezzotti et al., 2020). Por tal motivo, el INTA junto a otras instituciones trabaja actualmente en el rescate de esta especie a través de un Programa de Rescate Genético Participativo iniciado por la Estación Experimental Agropecuaria INTA Bariloche. Al no conocerse nada sobre la interacción del sauce nativo con los insectos herbívoros asociados, es importante estudiar tanto las características químicas que la identifiquen como la respuesta de los insectos en dicha interacción.

### **1.5.2. Defensas en salicáceas**

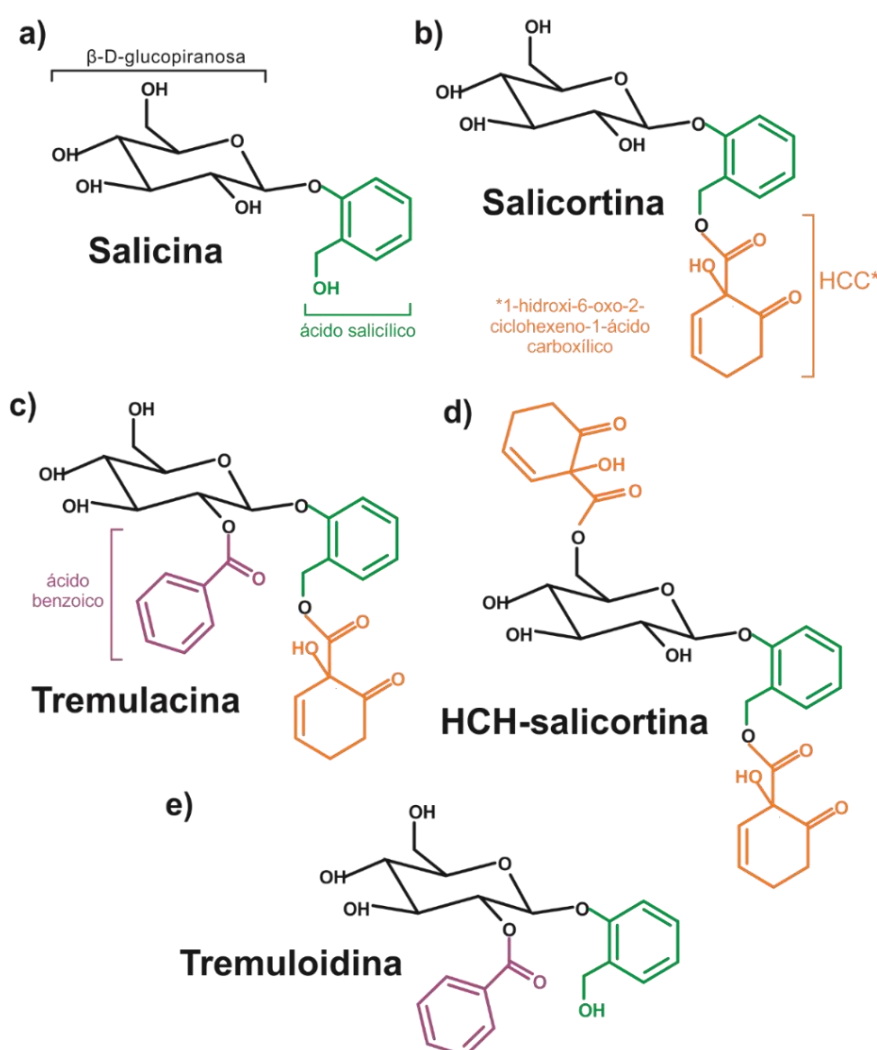
La mayoría de las investigaciones sobre resistencia frente a los insectos herbívoros se han concentrado en especies de plantas herbáceas por sobre las plantas leñosas, en parte debido a las dificultades metodológicas que éstas presentan por su longevidad y gran tamaño (Haukioja, 2006). Se pueden nombrar tres características que los árboles comparten en contraposición con las herbáceas. En primer lugar, son plantas perennes y, a lo largo de su vida, pueden enfrentarse en forma reiterada con las mismas especies de herbívoros. En segundo lugar, pueden ser atacadas constantemente durante la temporada de crecimiento, desde el brote de las hojas (Van Asch y Visser, 2007) hasta la senescencia

(White, 2015). Por último, entre los órganos aéreos, el tallo es el que concentra la mayor cantidad de biomasa y esto puede favorecer a la planta, haciendo que sea menos crítica la pérdida de hojas (Fabisch et al., 2019). Estas características de las plantas leñosas pueden dar lugar a diferentes respuestas y estrategias de defensa específicas o inespecíficas contra los herbívoros. Sin embargo, hay pocos estudios que investiguen la especificidad de las respuestas de defensa de las plantas leñosas por la herbivoría (sauce: Fields y Orians, 2006; abedul: Hartley y Lawton, 1987; y álamo Fabisch et al., 2019).

Para explicar la resistencia de los árboles contra los insectos, el énfasis tradicional en entomología forestal ha estado enfocado en el estudio de la resistencia constitutiva frente a la inducida. Sean inducidas o constitutivas, las defensas directas y/o indirectas de las salicáceas están representadas por defensas químicas mediadas por metabolitos especializados (compuestos fenólicos y compuestos orgánicos volátiles), defensas proteicas (p.ej., inhibidores de proteasas), y defensas físicas en forma de estructuras anatómicas protectoras (p.ej. tricomas, corteza gruesa; Gange, 1995; Philippe y Bohlmann, 2007). Las defensas constitutivas se atribuyen principalmente a la síntesis de compuestos fenólicos, de los cuales los más estudiados en salicáceas involucrados en la interacción con los insectos herbívoros son una clase particular de glicósidos fenólicos (salicinoides) y los taninos condensados. Ambos grupos de compuestos comparten la misma vía de biosíntesis (i.e. vía de los fenilpropanoides).

#### 1.5.2.1. Salicinoides

Los salicinoides son uno de los metabolitos secundarios más abundantes, restringidos a la familia Salicaceae (Philippe y Bohlmann, 2007; Boeckler et al., 2011). Forman un subgrupo de los compuestos fenólicos derivados de la fenilalanina. Históricamente se ha referido a este grupo con el término glicósidos fenólicos para los compuestos formados por una estructura central no glucídica de ácido salicílico y una glucídica de  $\beta$ -D-glucopiranososa unidos por un enlace O-glucosídico con el hidroxilo fenólico (Fig. 1.4 a). El elemento estructural básico es el 2-(hidroximetil) fenil- $\beta$ -d-glucopiranósido (salicina), y al ser el glicósido fenólico más simple del cual derivan compuestos más complejos, se considera más apropiado denominarlos salicinoides (Boeckler et al., 2011). Las modificaciones comunes de la estructura central de salicina son en su mayoría esterificaciones de ácidos orgánicos con uno o más hidroxilos del alcohol salicílico y/o en la posición 2' o 6' de la glucosa (Fig. 1.4 b-e).



**Figura 1.4.** Estructuras de los salicinoides. **a)** La salicina es el salicinoide más simple y el elemento estructura básico formado por una estructura central de ácido salicílico (verde) y  $\beta$ -D-glucopiranososa (negro). **b-e)** Salicinoides más complejos formados por modificaciones de la salicina mediante la esterificación con distintos ácidos orgánicos (en violeta y naranja).

A pesar del extenso conocimiento de las estructuras y distribución de los salicinoides, se sabe poco sobre su biosíntesis y regulación hormonal. Se sugiere que la salicortina y los salicinoides más complejos se sintetizan por una vía distinta de la biosíntesis de la salicina (Babst et al., 2010) y que la síntesis de salicinoides y de otros metabolitos como los taninos condensados está regulada por SA, generándose un equilibrio en la producción de ambos compuestos (Mellway et al., 2009; Boeckler et al., 2014). Sin embargo, el JA también tiene un rol juntamente con al SA observándose en álamo aumentos de SA, JA y ABA o sólo de JA y ABA tras la herbivoría de insectos de distinto grado de especialización alimentaria, pero no se asociaron con la inducción de salicinoides (Koch et al., 2000; Boeckler et al., 2013; Clavijo McCormick et al., 2014; Fabisch et al., 2019) Por lo tanto,

parecería que el SA y el JA están involucrados en la regulación de las defensas en salicáceas y su activación depende en parte del tipo de estrés biótico.

Los salicinoides pueden ser muy abundantes (con valores reportados de hasta un 30% del peso seco de la planta; Donaldson et al., 2006) y estar muy distribuidos entre especies de salicáceas o incluso pueden estar completamente ausentes. Hasta ahora, se han descrito más de 20 salicinoides diferentes en varios álamos (*Populus* spp.), sauces (*Salix* spp.) y algunas otras especies emparentadas (Boeckler et al., 2011). Además, la distribución de estos compuestos muestra una amplia variación con la estación y la ontogenia, pero el factor principal que determina la abundancia de los salicinoides es el genético (Osier y Lindroth, 2004; Boeckler et al., 2011; Barker et al., 2019a). De esta manera, la constitución de perfiles de salicinoides puede ser una herramienta útil de identificación y caracterización taxonómica.

Los salicinoides están presentes de forma constitutiva en las especies de la familia Salicaceae pero también pueden ser inducibles tras el ataque de herbívoros o la defoliación artificial. Sin embargo, los ejemplos de la literatura no presentan un patrón claro de inducción. Aunque la inducción de salicinoides es evidente en algunos estudios (Clausen et al., 1989; Stevens y Lindroth, 2005; Fields y Orians, 2006; Rubert-Nason et al., 2015) no siempre es el caso (Boeckler et al., 2013). Se ha reportado la inducción de salicinoides a nivel sistémico a corto (24-48 h) y a largo plazo (10 días - 8 semanas) en salicina y tremulacina en el álamo *P. tremuloides* (Clausen et al., 1989; Stevens y Lindroth, 2005). Por ejemplo, en *P. nigra*, se observó una inducción significativa sólo de salicina (local y sistémica), por las larvas de los lepidópteros *Lymantria dispar* y *Amata mogadorensis* y el adulto del escarabajo *Phratora vulgatissima* (Fabisch et al., 2019).

El momento, la intensidad y la localización (local frente a sistémica) de la inducción de salicinoides en salicáceas depende de diversos factores, como la identidad de la especie arbórea, el genotipo del árbol (Julkunen-Tiitto et al., 1995; Ruuhola et al., 2001) y el insecto atacante, incluida su fase de desarrollo y su estrategia de alimentación. Sin embargo, se necesitan más experimentos para investigar si los salicinoides se sintetizan realmente de *novo* (como sugieren Ruuhola et al., 2001) o sólo se translocan (como sugieren Clausen et al., 1989), ya que esto afectaría a la asignación de recursos y a los costos energéticos del árbol.

La mayoría de los estudios indican que los salicinoides funcionan como disuasores de la alimentación y reducen el *fitness* de los insectos generalistas (Matsuki y MacLean, 1994; Boeckler et al., 2011) y se han realizado frecuentemente en los álamos *P. tremuloides* y *P. nigra* con dos especies de lepidópteros *Lymantria dispar* o la oruga del bosque *Malacosoma disstria*. Estos mostraron que las larvas de *L. dispar* se ven afectadas

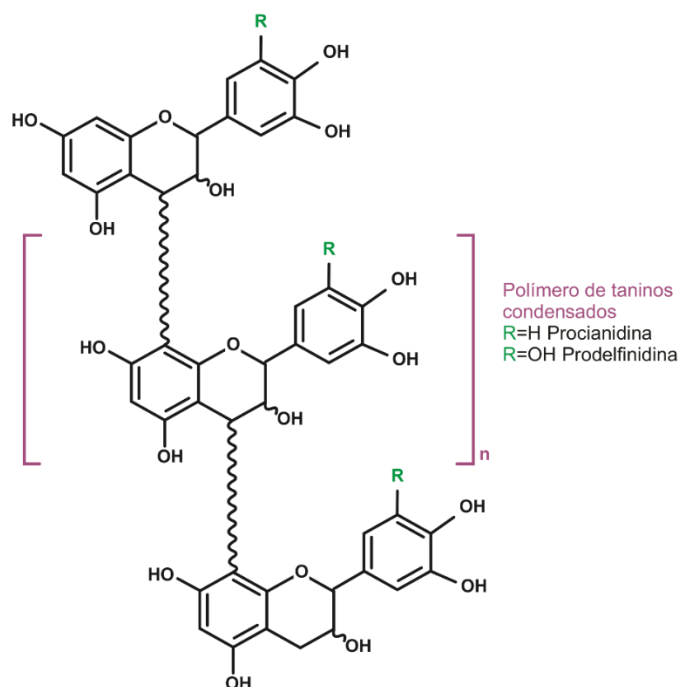
negativamente por los altos niveles de salicinoides cuando se alimentan de *P. tremuloides*. En comparación con *P. tremuloides* y *P. nigra*, menos estudios han analizado los efectos de los salicinoides sobre los insectos herbívoros generalistas y especialistas en otras especies de álamos y en el género *Salix*.

Otra de las funciones biológicas que se le ha atribuido a los salicinoides consiste en estimular la alimentación (Kolehmainen et al., 1995; Orians et al 1997) y la oviposición de herbívoros especialistas (Roininen et al., 1999) y beneficiar o no tener efecto sobre su desempeño larval (Matsuki y Maclean, 1994; Rank et al., 1998). Por ejemplo, en insectos especialistas de salicáceas se observó un mejor desempeño y mayor preferencia de oviposición y alimentación en las plantas que contenían mayor cantidad de salicinoides (Matsuki y Maclean, 1994; Orians et al., 1997; Roininen et al., 1999). Por lo tanto, el rol de los salicinoides frente a la interacción contra un amplio espectro de insectos herbívoros es variable y podría depender, entre otros factores, de la especialización alimentaria, la taxonomía y el modo de alimentación del insecto.

### 1.5.2.2. Taninos condensados

Existen dos clases principales de taninos: los taninos hidrolizables y los taninos condensados, siendo estos últimos los más estudiados en salicáceas asociados a respuestas defensivas contra los insectos herbívoros (Phillippe y Bohlmann, 2007). Los taninos condensados, también conocidos como proantocianidinas (Hagerman y Butler, 1991) presentan varios subtipos que difieren en el patrón de hidroxilación de los grupos flavanoles (i.e. polifenol derivado de los flavonoides) que los constituyen (Fig. 1.5). Los taninos condensados son oligómeros o polímeros de dos o más flavanoles (Fig. 1.5), normalmente catequina y epicatequina, y con frecuencia sus versiones glicosiladas. Los taninos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, donde las plantas leñosas tienden a sintetizar más de estos compuestos que las herbáceas (Porter, 1992; Mole, 1993). La biosíntesis de los taninos condensados a través de la vía de los flavonoides es ahora bien conocida, pero las reacciones de polimerización no se han terminado por dilucidar (Zhao et al., 2010). La regulación de la biosíntesis de los taninos condensados se produce principalmente a nivel transcripcional, especialmente para los genes que codifican las enzimas biosintéticas (Koes et al., 2005; Xu et al., 2015) y se ha sugerido que está regulada por JA, SA y ABA según el tipo de daño (Ullah et al., 2019; Li et al., 2021). La concentración de taninos es un rasgo muy plástico; varía con el genotipo de la planta, la fase de desarrollo del tejido y las condiciones ambientales como la disponibilidad de nutrientes (Barbehenn y

Constabel, 2011). La producción de taninos puede variar tanto entre especies como dentro de una misma especie (Dalzell y Shelton, 2002), y gran parte de esta variación está mediada genéticamente (Klaper et al., 2001; Donaldson y Lindroth, 2007). La herbivoría de los insectos puede inducir una elevada producción de taninos en las hojas a nivel local y sistémico involucrando la activación transcripcional de la vía de los flavonoides que subyace a la acumulación inducida de taninos condensados (Peters y Constabel, 2002).



**Figura 1.5.** Estructura general de los taninos condensados mostrando dos de los compuestos más comunes: procianidina y prodelfinidina. Esquema modificado de Barbehenn y Constabel (2011).

Dentro de las funciones defensivas contra los insectos, los taninos condensados se han propuesto como disuasores de la alimentación y antinutrientes por formar complejos con las proteínas, sin embargo, hay poca evidencia de que provoquen una disminución de la actividad enzimática *in vivo* (Barbehenn y Constabel, 2011 y sus referencias). Aunque es probable que la formación de un complejo tanino-proteína tenga poco impacto en la nutrición de los insectos, es posible que los taninos actúen como compuestos tóxicos ya que forman especies reactivas de oxígeno al ser muy propensos a oxidarse (Barbehenn y Constabel, 2011). Los peróxidos son lo suficientemente estables y permeables a la membrana intestinal como para difundirse en las células epiteliales, participar en la oxidación intracelular y provocar lesiones en el epitelio del intestino medio. Sin embargo, la oxidación de los taninos se ha medido con poca frecuencia en insectos herbívoros (Barbehenn y Constabel, 2011 y sus referencias).

A pesar de que se han reportado asociaciones negativas entre los taninos y el desempeño de los insectos, no se determinó si fue debido a la disuasión de la alimentación, a la disminución de la eficacia de la utilización de proteínas o a la toxicidad (Barbehenn y Constabel, 2011). Los efectos negativos de los taninos sobre los insectos herbívoros dependen, en parte, de una concentración elevada (Aerts et al., 1999) y del contexto nutricional de la planta. Sin embargo, existen pocos estudios dosis-respuesta de taninos foliares sobre insectos herbívoros. Por lo tanto, es imposible generalizar sobre el funcionamiento de los taninos, pero se pueden hacer predicciones, dada la información sobre una variedad de factores fisiológicos y bioquímicos en la interacción planta-herbívoro.

### 1.5.2.3. Compuestos orgánicos volátiles

Al igual que otras plantas, las salicáceas liberan numerosos COVs en forma constitutiva que están involucrados en la localización del hospedero por parte del insecto herbívoro (Peacock et al., 2001; Brilli et al., 2009; Lehrman et al., 2013; Ling et al., 2022). Sin embargo, se ha hecho mayor énfasis en los COVs inducidos tras el ataque de herbívoros como respuestas defensivas directas e indirectas (Staudt y Lhoutellie, 2007; Schnitzler et al., 2010). Los álamos por sobre los sauces son los modelos de planta leñosa más estudiados en lo que respecta a emisión y regulación de COVs. Estudios previos han investigado el efecto de la herbivoría en las emisiones de COVs en álamos (Dannet et al., 2011; Unsicker et al., 2015), y han caracterizado algunos de los genes y enzimas responsables de la biosíntesis de terpenoides inducidos (Danner et al., 2011; Clavijo McCormick et al., 2014; Irmisch et al., 2014) y compuestos nitrogenados (Irmisch et al., 2013). En *P. nigra* se identificaron compuestos importantes que lograron distinguir las mezclas de COVs de hojas dañadas por herbívoros respecto de las sanas. Entre ellos, las aldoximas, los volátiles de hoja verde (p.ej. (Z)-3-hexenol) y los terpenoides (p.ej. (E)- $\beta$ -ocimeno, y DMNT) fueron característicos de las hojas dañadas por herbívoros tanto de árboles jóvenes como maduros. Así, estos compuestos podrían tener un rol como señales indicadoras de la herbivoría en la defensa indirecta, transmitiendo información específica sobre la localización y abundancia de herbívoros a los enemigos naturales (Shiojiri et al., 2010; Sabelis et al., 2011). A su vez, los volátiles podrían actuar como defensas directas, indicándole al herbívoro la presencia de competidores potenciales en la planta y que se ha iniciado la inducción de otros sistemas de defensa, produciendo metabolitos que podrían ser disuasorios evitando la colonización del insecto atacante (Irmisch et al., 2013, 2014). Por lo tanto, los COVs inducidos por herbívoros en salicáceas podrían tener roles

defensivos similares a los reportados para plantas herbáceas, actuando directamente sobre los insectos como repelentes y/o indirectamente como atrayentes de depredadores y parasitoides.

### 1.5.3. La avispa sierra

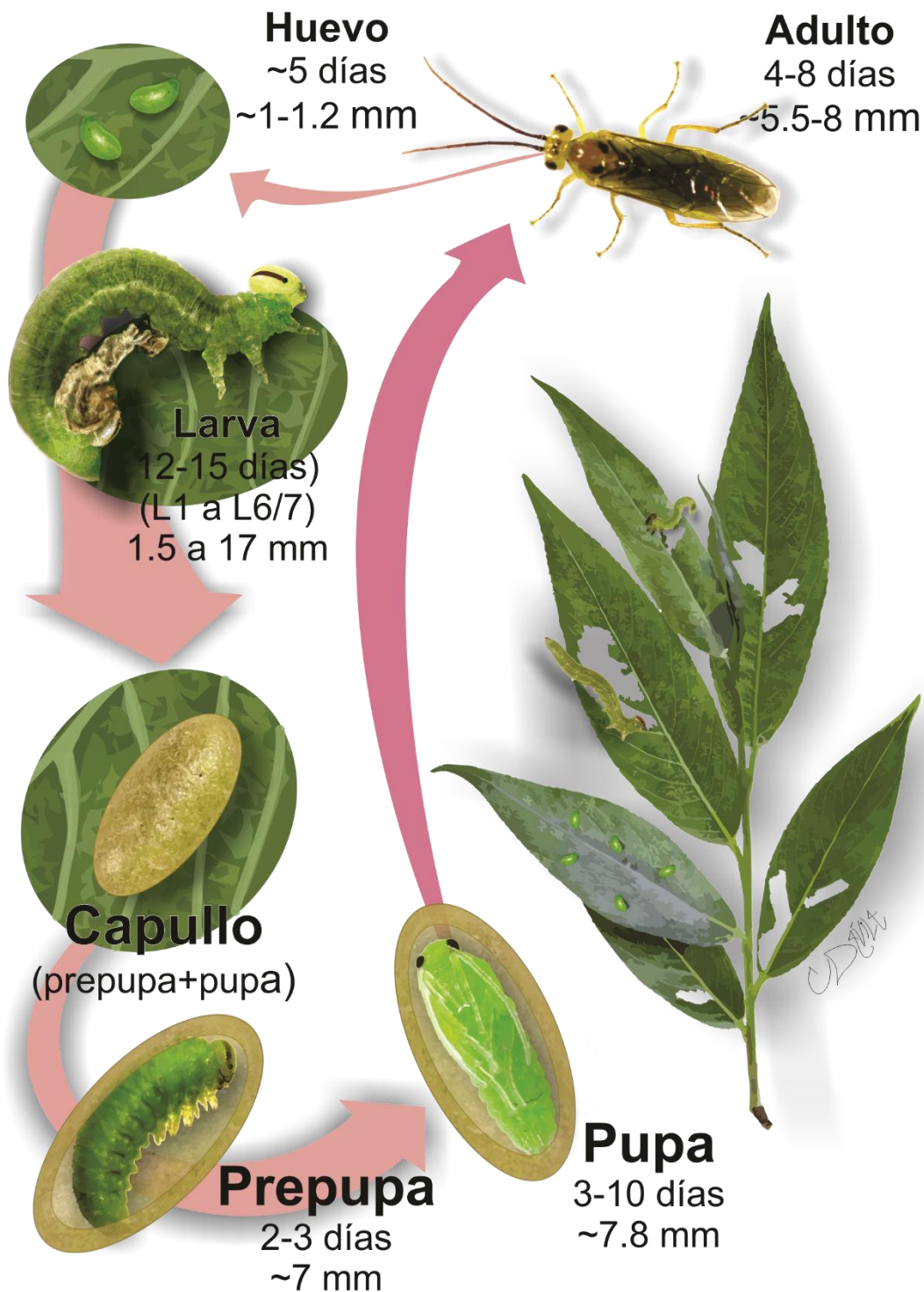
Una de las principales plagas que atacan de manera exclusiva al género *Salix* es la avispa sierra del sauce *Nematus oligospilus* Förster (= *Nematus desantisi* Smith) (Hymenoptera: Tenthredinidae: Nematinae). Pertenece al suborden Symphyta, cuya característica distintiva es la ausencia de la constricción en la base del abdomen a diferencia de la mayoría de los himenópteros. Las hembras de los Symphyta tienen un ovipositor en forma de sierra (de ahí su denominación avispa sierra o *sawfly* en inglés) con el que realizan hendiduras en el tejido vegetal para introducir los huevos (Smith, 1993).

*N. oligospilus* es nativa del hemisferio Norte, con una amplia distribución que abarca América del Norte y Eurasia (desde Irlanda hasta los Himalayas) (Smith, 1979). A partir de la década de 1980, se comenzaron a reportar invasiones en las regiones templadas del hemisferio sur. Las primeras detecciones ocurrieron en Argentina (De Santis, 1981) y Chile (González et al., 1986). En 1993 fue registrada en Sudáfrica (Urban y Eardley, 1995), unos pocos años después en Nueva Zelanda (Berry, 1997), Australia (Bruzzeze y McFadyen, 2006; Caron et al., 2014) y más recientemente en Colombia (Malagón-Aldana et al., 2017). En la República Argentina, el primer registro de *N. oligospilus* ocurrió en la provincia de Chubut, en 1980 (De Santis, 1981) dispersándose al norte del país hasta llegar a Jujuy (Toscani, 1987; Vattuone, 1989; Ovruski y Fidalgo, 1991). La región más afectada económicamente en la Argentina correspondió a la zona productiva del Delta del río Paraná en donde se detectaron altas densidades de *N. oligospilus* durante las temporadas 1987, 1992 y 1994 (Toscani, 1987, 1992, 1994) y 2008-2009 (Bellocq et al., 2019). Provocó una reducción de la producción de madera hasta un 60 % (Cabarcos, 1995) situación que llevó a considerarla una plaga forestal en Argentina (Giménez, 2006; Dapoto et al., 2011). Desde 2019, las densidades permanecen bajas en esta región (Bellocq et al., 2019).

Fuera de su área de distribución endémica, *N. oligospilus* se reproduce sexualmente por partenogénesis (i.e. desarrollo de células sexuales femeninas no fecundadas) meiótica telitóquica en la cual los oocitos se desarrollan por meiosis dando origen a una progenie formada sólo por hembras. De esta manera se constituye una población uniparental femenina (Koch y Smith, 2000). Se trata de un organismo solitario de vida libre y su desarrollo es holometábolo conformado por 5 estados en su ciclo de vida: huevo, larva, prepupa, pupa e imago (adulto) (Fig. 1.6). El ciclo de vida tiene una duración promedio de



27 días, pero la duración de cada estado e incluso la cantidad de estadios larvales, varía según la especie y/o genotipo del sauce en que se desarrolla, así como también influye la fenología de las hojas y la temperatura ambiental (Alderete, 2005; Braccini et al., 2013; Fig. 1.6).



**Figura 1.6.** Ciclo de vida de *N. oligospilus*. Se indica la duración y el tamaño aproximado de cada estado según Ovruski y Smith (1993).

Durante el año se diferencian dos períodos estacionales que caracterizan la dinámica poblacional: uno de actividad en el que transcurren varias generaciones durante primavera-verano y uno de diapausa invernal en otoño-invierno registrándose entre 6 y 7 generaciones superpuestas (i.e. especie multivoltina). Las larvas de la última generación del período de actividad entran en diapausa como prepupas, protegidas en capullos y enterrados en el suelo o adheridos a la corteza de los árboles hospederos (Urban y Eardley, 1995). El período de actividad comienza cuando las hembras adultas emergen de los capullos invernantes a principios de la primavera coincidente con la brotación de los sauces.

Inmediatamente después de la emergencia de los capullos, las hembras adultas comienzan a oviponer (Toscani, 1992). Mediante un comportamiento de oviposición estereotipado, las hembras colocan sus huevos en la epidermis foliar, o entre ésta y la capa subyacente de clorénquima (Braccini et al., 2013; Fernández et al., 2019). Con el ovipositor, la hembra daña y empuja la epidermis foliar generando una pequeña cavidad donde coloca el huevo y, posteriormente, lo cubre con una secreción del oviducto (Braccini et al., 2013). Cada adulto pone en promedio 35 huevos a lo largo de su vida (Urban y Eardley, 1995). Luego de la eclosión del huevo, la larva I (1-2 mm) hace una abertura en la hoja cerca del huevo y comienza a alimentarse (Fig. 1.6). La larva pasa por seis o siete estadios larvales mientras se alimenta de las hojas (Ovruski, 1991; Urban y Eadley, 1995; Carr et al., 1998; Charles y Allan, 2000) y una vez alcanzado el último estadio tejen el capullo en el que ocurre la metamorfosis. Esta larva del ultima estadio, que ya no muda, teje el capullo donde transcurre como prepupa y pupa (Fig. 1.6) (Ovruski, 1991). La prepupa es una larva madura que no se alimenta y disminuye su actividad. Su cuerpo se curva reduciéndose su tamaño y toma un color verde oscuro (Fig. 1.6). Luego de un período de dos a tres días la prepupa se transforma en pupa (Ovruski y Smith, 1993; González, et al., 1986; Urban y Eardley, 1995). La pupa es libre o exarata de color verde. Se reconocen patas protorácicas, mesotorácicas y las pterotecas se encuentran curvadas hacía la superficie ventral del tórax y las patas metatorácicas extendidas al quinto segmento abdominal (Fig. 1.6).

#### **1.5.4. La interacción entre *N. oligospilus* y *Salix* spp**

En base a los estudios previos realizados sobre la interacción entre *N. oligospilus* y los sauces, se sabe que existe una variación en la susceptibilidad y preferencia de oviposición de diferentes genotipos comerciales y exóticos de *Salix*, tanto en condiciones de laboratorio como a campo (Charles et al., 1998; Braccini et al., 2013; Braccini et al., 2015; Fernández

et al., 2019). Por otro lado, se han reportado diferencias en el desempeño de las larvas según el genotipo del sauce, observándose tanto asociaciones positivas entre la preferencia de oviposición y el desarrollo larval (Carr et al., 1998) como asociaciones negativas entre las mismas (Braccini et al., 2013). Se ha propuesto que los salicinoides, podrían actuar como claves de reconocimiento del hospedero y convertirse en un factor de susceptibilidad del sauce ante este insecto (Braccini et al., 2013; Fernández et al., 2019). Esto se desprende de la observación del comportamiento estereotipado durante la oviposición de *N. oligospilus*, en la que las hembras contactan la hoja reiteradas veces, primero con las antenas y luego con el ovipositor, sugiriendo que reconocen a su hospedador utilizando claves de contacto en la superficie foliar (Braccini et al., 2013, Fernández et al., 2019). Por otro lado, un alto contenido de los salicinoides podría tener un impacto ligeramente negativo en el desempeño de *N. oligospilus* (Braccini et al., 2013) como ocurre en otros insectos especialistas de salicáceas (Young et al., 2012; Braccini et al., 2013; Volf et al., 2015).

Dentro de las defensas inducidas, se conoce que los taninos y los volátiles se inducen en respuesta a la herbivoría de los insectos, pero los salicinoides presentan un patrón de inducción muy variable y poco claro. Un antecedente sobre la respuesta inducida en *Salix*, se observó en la interacción entre la avispa sierra y el sauce nativo *S. humboldtiana*, donde la herbivoría conespecífica previa tuvo un impacto negativo en la preferencia de oviposición de las hembras, posiblemente por la emisión diferencial de compuestos orgánicos volátiles (Valladares et al., 2020). El efecto opuesto se observó en el sauce comercial *S. babylonica*, donde la preferencia de oviposición se mantuvo similar entre plantas sanas y dañadas (Valladares et al., 2016). La inducción por herbivoría previa, también afectó drásticamente el desempeño de *N. oligospilus*, disminuyendo la eclosión de los huevos, y el desarrollo y supervivencia de las larvas (Valladares et al., 2020). Sin embargo, se desconocen los metabolitos especializados que podrían haber afectado el desempeño de la avispa sierra, siendo los salicinoides y taninos condensados los candidatos que podrían explicar este efecto. Si bien hay información sobre la regulación hormonal de las respuestas defensivas frente a la herbivoría en salicáceas, no se han reportado los efectos de la oviposición sobre su fitoquímica ni sobre el desempeño del insecto.

Siendo la avispa sierra, una plaga especialista que representa una amenaza para las plantaciones de sauces comerciales y nativos, es importante estudiar su interacción con *Salix* spp desde una perspectiva que abarque tanto los rasgos intrínsecos de la planta como las características comportamentales del insecto. Por lo tanto, en esta tesis se estudió el comportamiento de reconocimiento, la oviposición y la herbivoría en distintos genotipos comerciales introducidos y en *S. humboldtiana*, la única especie nativa,

amenazada por la invasión de sauces exóticos. Se evaluó si los salicinoides están asociados con las claves que llevarían a las hembras de *N. oligospilus* a reconocer al sauce como planta hospedera (Capítulo 3; objetivo específico I), si la oviposición genera un impacto sobre la fitoquímica del sauce comercial *S. babylonica* var *sacramenta* y consecuentemente sobre el desempeño del insecto (Capítulo 4; objetivo específico II) y si existen respuestas fitoquímicas constitutivas e inducidas por el daño de la avispa sierra, diferenciales entre *S. babylonica* var *sacramenta* y *S. humboldtiana* que afecten la interacción con el insecto (Capítulo 5; objetivo específico III).

## 1.6. Objetivos

### Objetivo general

Evaluar el perfil fitoquímico de *Salix* spp y su rol en la interacción con la avispa sierra *N. oligospilus* durante las tres etapas del proceso de selección de la planta hospedera (evaluación por contacto, oviposición y alimentación o herbivoría) que determinan su aceptación.

Las hipótesis asociadas a los siguientes objetivos específicos se encuentran en sus respectivos capítulos.

### Objetivos específicos:

- I) Determinar la composición de salicinoides presentes en la superficie foliar de distintos genotipos comerciales de *Salix* spp y relacionarla con la preferencia de oviposición de *N. oligospilus*.
- II) Evaluar la respuesta química (composición de salicinoides y compuestos orgánicos volátiles) y fitohormonal del sauce comercial *S. babylonica* var *sacramenta* frente al daño ocasionado por la oviposición de *N. oligospilus* y su impacto sobre el desempeño del insecto.
- III) Estudiar la respuesta química inducida y constitutiva (composición de salicinoides, taninos condensados y volátiles) en el sauce nativo *S. humboldtiana* y en el comercial *S. babylonica* var. *sacramenta* en su interacción con *N. oligospilus*.

## **Capítulo 2:**

### **Metodología general**

## 2.1. Material biológico

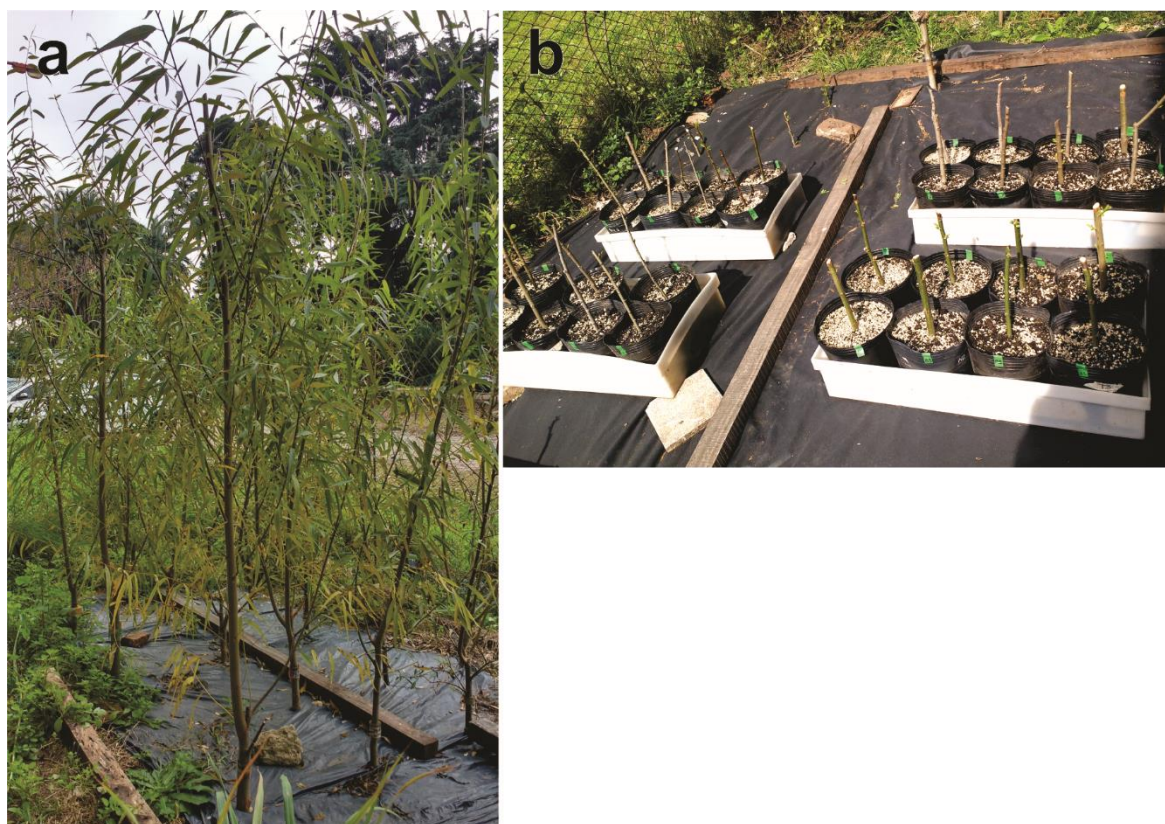
### 2.1.1. Sauces

Para llevar a cabo los experimentos, se seleccionaron 4 genotipos de sauce según su importancia económica y/o experimental para la región del bajo Delta del Río Paraná. El origen de los mismos corresponde a: *S. viminalis* ("Amarillo"), *S. babylonica* var. *sacramenta* "Soveny Americano" y *S. nigra* ("Alonzo nigra IV INTA"). Además, un genotipo adicional de origen *S. alba* × *S. alba* ("genotipo de cría") se empleó para mantener la cría de *N. oligospilus* en el laboratorio. Las estacas de todos estos genotipos fueron provistas por el Programa de Mejoramiento Genético de Salicáceas del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, dirigido por la Ing. Agr. Teresa Cerrillo (EEA Delta-INTA).

A fines de invierno de 2016 se instaló un estaquero con las estacas de sauces en un predio cercado de la Cátedra de Química de Biomoléculas de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (Fig. 2.1 a). El estaquero consistió en 4 filas (una por cada genotipo) y 5 clones por fila. Cada clon corresponde a una estaca (30-35 cm de longitud) distanciada 80 cm entre filas y 50 cm entre estacas de la misma fila. En el año 2019, se removieron los genotipos *S. viminalis* y *S. nigra* y se plantaron estacas de *S. humboldtiana*. Las estacas de esta especie (i.e. 30 estacas) fueron provistas por la Dra. Victoria Coll-Aráoz (PROIMI-CONICET) obtenidas de 2 árboles de sexo masculino ubicado en la rotonda Horco Molle de Yerba Buena (26° 48' 4.363" S, 65° 19' 1.762" O) Tucumán, Argentina. Se pudo verificar el nivel de pureza de *S. humboldtiana* mediante marcadores SSR a través de la colaboración del Dr. Leonardo Gallo (INTA-EEA Bariloche).

El suelo del estaquero fue cubierto con polietileno o tela de polipropileno negra para mantener la humedad y evitar el crecimiento de malezas (Fig. 2.1 a). El riego se realizó de forma manual 1 vez por semana durante otoño-invierno y 3 veces por semana durante primavera-verano. A mediados de cada invierno, se hizo una poda completa para generar las estacas utilizadas luego en los ensayos durante el verano. Las estacas consistieron en ramas de 30-35 cm de longitud y 1-1.5 cm de diámetro. Estas se conservaron envueltas en papel húmedo dentro de bolsas plásticas y almacenadas en heladera a 4°C hasta su uso. Dicho material se usó para generar clones crecidos en maceta. Para ello, a comienzos de primavera, las bases de las estacas fueron sumergidas en agua corriente durante 7 días hasta la aparición de raíces y luego plantadas en macetas plásticas de 5 litros. El sustrato en las macetas consistió en tierra abonada y perlita (3:1) y se regaron por inmersión dentro de bateas plásticas (70 x 40 x 15 cm, largo x ancho x alto; Fig. 2.1 b). Los sauces del

estaquero se protegieron del ataque de hormigas cortadoras con barreras mecánicas y con aplicación de cebos granulados (Mirex Glex, Gleba ambiental, Argentina). Todas las plantas crecieron bajo condiciones ambientales naturales.



**Figura 2.1.** Mantenimiento de plantas experimentales. **a)** Estaquero de sauces en el predio de la Cátedra de Química de Biomoléculas - FAUBA. Se observan las filas de los clones plantados a suelo cubierto con polietileno negro. **b)** Sauces crecidos en macetas para la realización de ensayos. Se encuentran inmersos en bateas plásticas para su riego.

### 2.1.2. Avispa sierra del sauce: *Nematus oligospilus*

Cada primavera, se inició un nuevo periodo de cría en laboratorio para generar una población mantenida hasta el otoño del año siguiente. Para ello se colectaron hojas con huevos, larvas y/o pupas en sauces adultos presentes en el predio de la Facultad de Agronomía (34° 35' 26.981" S, 58° 29' 3.762" O) y en el barrio en los alrededores. Las larvas fueron criadas dentro de contenedores plásticos transparentes (46 × 30 × 32 cm) que contenían ramas frescas de sauce de cría (10 cm de longitud) colocadas dentro de vasos con agua corriente (Fig. 2.2). Una vez alcanzado el estado de pupa, se trasladaron a frascos cilíndricos hasta la emergencia de las hembras adultas. Las hembras se utilizaron para continuar la cría generando varias cohortes cada temporada. Para ello, se liberaron hembras a oviponer en sauces *S. alba* × *S. alba* ("genotipo de cría") crecidos en maceta y



cubiertos con una bolsa de tela tipo *voile* (Fig. 2.2). Luego de 5-7 días de eclosionados los huevos, se trasladaron las larvas a los contenedores plásticos para alimentarlas con ramas frescas del genotipo de cría. La cría se realizó dentro de una cámara bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperiodo ( $25 \pm 2$  °C,  $60 \pm 10\%$  humedad relativa y 18-6 h de luz-oscuridad correspondiente a un fotoperiodo de verano). Dichas condiciones se mantuvieron en todos los experimentos efectuados dentro de la misma.



**Figura 2.2.** Dispositivos para la cría de *N. oligospilus*. Izquierda: contenedor plástico con ramas frescas de sauce en el que eran criadas las larvas. Derecha: sauce encerrado con bolsa *voile* en el que se liberaban las hembras para la puesta de huevos.

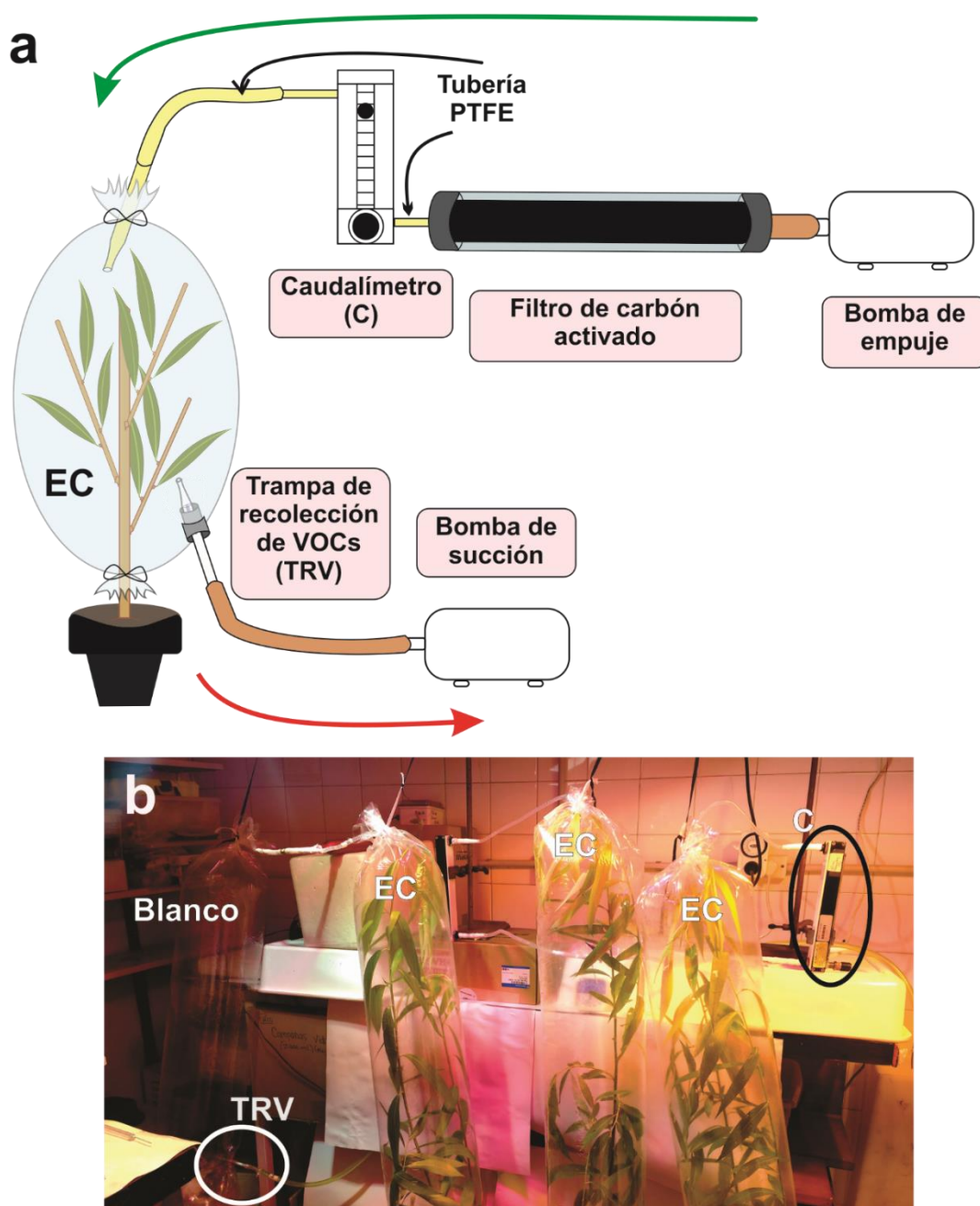
## 2.2. Colecta de compuestos orgánicos volátiles y análisis químico

Para caracterizar el perfil de emisión de compuestos orgánicos volátiles de los sauces, se colectaron los compuestos de la parte aérea de las plantas crecidas en maceta. La metodología de colecta de volátiles consistió, en primera instancia, en encerrar la parte aérea completa de la planta (1m de longitud aproximadamente, Fig. 2.3) con bolsas de tereftalato de polietileno transparentes (PET; bolsas para horno Toppits, Minden, Alemania). Ese aire encerrado es llamado espacio de cabeza (EC, también conocido como *headspace* en inglés; Fig. 2.3). Para colectar los volátiles, se generó un sistema de entrada



y salida de flujo de aire que atraviere el espacio de cabeza de la planta (Fig. 2.3). El aire ingresa al sistema atravesando un filtro de carbón activado, arrastrado por una bomba de empuje hacia el EC de la planta, con un flujo constante regulado por un caudalímetro (0.9 L/min; Fig. 2.3). Las piezas del sistema por donde circula aire limpio (desde la salida del filtro de carbón activado hasta la entrada al EC) estuvieron conectadas con tubería de teflón de politetrafluoroetileno (PTFE) (Fig. 2.3). El aire deja el sistema mediante una bomba de succión, saliendo de la bolsa a través de un cartucho de vidrio actuando a modo de trampa de recolección y retención de volátiles que contiene 30 mg de adsorbente HayeSep Q (Fig. 2.3). La lista de cada componente del sistema se detalla a continuación (Fig. 2.3):

- Bomba de empuje: bomba de acuario modelo AT-703, Atman, China.
- Filtro de carbón activado: tubo de metal (19.5 cm de longitud, 4.5 cm de diámetro interno) con carbón activado granulado (120 g). Su función es purificar el aire que ingresa al dispositivo.
- Caudalímetro (C): modelo 112-02-A, Aalborg Instruments, Orangeburg, Nueva York, Estados Unidos).
- Trampa de recolección de volátiles (TRV): tubo de vidrio Pyrex (7.5 cm longitud, 4 mm diámetro interno) que contiene 30 mg de adsorbente HayeSep Q (adsorbente sólido de polidivinilbenceno poroso de Grace, 60-40 mesh tamaño de partícula, afinidad alta por compuestos lipofílicos a polaridad media, Deerfield, Illinois, Estados Unidos). El adsorbente se retiene con un tapón de lana de vidrio de borosilicato y un tapón de compresión de teflón tipo PTFE. Se ubica en el interior del EC, extrayendo y concentrando los COVs del mismo a medida que la corriente de aire generada por las bombas lo atraviesa.
- Bomba de succión (modelo Standard, Tuff, Bedford, Reino Unido). Aspira el aire del EC, obligándolo a pasar por la trampa de recolección.



**Figura 2.3.** Colecta de compuestos orgánicos volátiles. **a)** Esquema de colecta. La parte aérea de la planta se encierra con una bolsa PET y el aire interior se denomina espacio de cabeza (EC). Los COVs quedan retenidos en la trampa de recolección (TRV) con la ayuda de una bomba de succión que saca aire de la bolsa (flecha roja). El aire ingresa limpio al sistema atravesando un filtro de carbón activado, impulsado por una bomba de empuje. El flujo que ingresa (flecha verde) es regulado con un caudalímetro (C). **b)** Imagen de una colecta de volátiles mostrando algunas partes del sistema.

Para el muestreo de volátiles, se dejaron aclimatando las plantas durante 48 h dentro de la cámara antes de la colecta de volátiles. Ésta se realizó dentro de una cámara con condiciones de temperatura, fotoperiodo y luz controladas ( $25 \pm 2$  °C, L16: O8, intensidad lumínica  $350 \mu\text{mol}/\text{m s}$ ). Las plantas fueron iluminadas desde arriba con una lámpara LED

de luz azul y roja y dos lámparas de haluro metálico de alta presión. Después de un período de muestreo de 6 horas (entre las 10:00 y las 16:00 h), las trampas de recolección de volátiles se envolvieron en papel de aluminio y se almacenaron en el congelador (-20°C) hasta su elución. Además, se usaron bolsas de PET vacías para realizar los blancos del sistema (muestra blanco) para luego restar los componentes colectados a las muestras del EC y excluir contaminantes. Los COVs se eluyeron de las trampas de recolección con 150 µl de diclorometano (grado Plaguicida - Sintorgan) que contenía 5 ng/µl de dodecano (Sigma-Aldrich) como estándar interno.

Las muestras se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (*gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS por sus siglas en inglés): equipo Agilent 7890-A acoplado a detector de masas selectivo Agilent 5977. Se utilizó una columna capilar DB5-MS (0.25 mm de diámetro interno x 0.25 µm de espesor de película). Las muestras (1 µl) se inyectaron a 240 °C en modo *splitless*. Se usó helio como gas portador (carrier) con un flujo de 0.7 ml por minuto (presión de entrada: 20.48 kPa). La temperatura de la columna se mantuvo a 35 °C durante 1 minuto y luego se aumentó a una velocidad de 10°C por minuto hasta alcanzar los 230 °C. Finalmente, la temperatura se mantuvo a 230°C durante 15 min.

Los compuestos se identificaron por comparación de sus espectros de masa con aquellos provistos por NIST Chemistry WebBook (William E. Wallace, director, "Mass Spectra") y por el libro con datos publicados de los espectros (Adams, 2007). Además, se usó para la identificación la comparación de los índices de retención de Kovats calculados para cada compuesto con los tabulados para una columna DB5-MS publicados por NIST (William E. Wallace, director, "Retention Indices") y/o por Adams (2007). El índice de Kovats (IK) de un componente de la muestra es un número, obtenido por interpolación logarítmica que relaciona el tiempo de retención del componente de la muestra con el tiempo de retención de dos estándares eluidos antes y después del pico del componente de la muestra (Ettre, 1993). Para el cálculo de los IK, se utilizó la calculadora de Kovats provista por The Pherobase (El-Sayed AM 2022. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. <https://www.pherobase.com>). Los estándares utilizados para el cálculo de los IK consistieron en una mezcla de 13 alcanos con cantidad de carbonos creciente (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>, Sigma-Aldrich). Adicionalmente, para la identificación se compararon los tiempos de retención de los compuestos con los siguientes estándares auténticos: α-pineno, limoneno, (E)-β-ocimeno, (Z)-β-ocimeno, β-cariofileno, α-humuleno, (E,E)-α-farneseno, eucaliptol, nonanal, undecano, decanal, β-mirceno, heptadecano y decano.

Los datos cromatográficos se analizaron con el software MassHunter Workstation (version B.06.00, Agilent). Las concentraciones de cada compuesto se calcularon sobre la

base de las áreas de los picos del cromatograma de iones totales (TIC), relativizadas al área del estándar interno. Con las áreas relativas, se expresaron los valores de los compuestos como el equivalente en masa del estándar interno (ng/μl). Previamente, los valores de las muestras blanco se restaron de las muestras tomadas de los sauces. Aquellos picos pertenecientes a compuestos identificados, relevantes para el análisis, y que tenían una relación señal-ruido inferior a 1, se consideraron trazas y se les asignó cero como valor al momento de realizar el análisis estadístico.

### 2.3. Análisis de fitohormonas

Las muestras se procesaron en el laboratorio dirigido por el Dr. Jonathan Gershenzon con participación del Dr. Michael Reichelt (Departamento de Bioquímica del Instituto, Instituto Max Planck de Ecología Química, Jena, Alemania) siguiendo protocolos previamente establecidos.

Para estudiar el perfil de fitohormonas, las muestras se liofilizaron y se molieron hasta obtener un polvo fino mediante agitación en un agitador de pintura (Skandex SO-10M, Fluid Management Europe, Países Bajos). Una porción de 10 mg de cada muestra se extrajo con 1 ml de metanol frío que contenía los siguientes estándares internos ácido D6-abscísico (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA; 40 ng/ ml), ácido D4-salicílico (Santa Cruz Biotechnology; 40 ng/ ml) y ácido D6-jasmónico (HPC Standards GmbH, Cunnernsdorf, Germany; 40 ng/ ml). Las muestras se agitaron durante 30 segundos con un agitador de pintura. A continuación, se centrifugaron a 2000 g durante 5 min, y se transfirieron 400 μl del sobrenadante a un nuevo tubo. El resto del sobrenadante se retiró cuidadosamente de la fase sólida con una pipeta. Posteriormente, se añadió 1 ml de metanol fresco (sin estándares) a la fase sólida antes de repetir el procedimiento de extracción (agitador + centrifugado). De nuevo, se tomaron 400 μL del sobrenadante y se combinaron con el sobrenadante de la primera extracción. Los extractos se almacenaron a -20 °C hasta su medición.

Las fitohormonas se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas (i.e. *high performance liquid chromatography–mass spectrometry*, HPLC-MS por sus siglas en inglés): cromatógrafo Agilent 1100 Varian ELSD, Varian, USA y espectrómetro API 5000 LC/MS/MS System, AB Sciex, Framingham, MA, USA. Los compuestos se separaron en una columna C18 (XDB-C18, 50 × 4.6 mm × 1.8 μm, Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.) utilizando un gradiente de ácido fórmico (0.05% en agua) / acetonitrilo (flujo: 1,1ml/min) y se detectaron a través de la monitorización de reacciones múltiples (MRM) en modo de ionización negativa (pulverización de iones a -

4500 eV a 700 °C) como se describe en Vadassery et al., 2012. Los datos se procesaron con Analyst 1.5.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), y las fitohormonas se cuantificaron según el área del pico de su correspondiente estándar. Los resultados del contenido de fitohormonas fueron relativizados al peso seco de la muestra de hojas (ng/g).

## 2.4. Análisis de salicinoides y taninos condensados

El análisis de salicinoides del *Capítulo 3* y *4* y del *Capítulo 5* se realizó con un procedimiento similar pero levemente distinto bajo la colaboración de dos laboratorios internacionales respectivamente: El laboratorio dirigido por el Dr. Jonathan Gershenzon con la participación del Dr. Michael Reichelt (Departamento de Bioquímica del Instituto, Instituto Max Planck de Ecología Química, Jena, Alemania) y del Dr. Richard Lindroth con participación del Dr. Mark R. Zierden (Departamento de Entomología de la Universidad de Wisconsin, Madison, Estados Unidos).

Para estudiar el perfil de salicinoides se cosecharon las hojas, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

### 2.4.1. Análisis de salicinoides del Capítulo 3 y 4:

Las hojas se liofilizaron y se trituraron hasta obtener un polvo fino mediante agitación en un agitador de pintura (Skandex SO-10M, Fluid Management Europe, Países Bajos). Una muestra de 10 mg se extrajo con 1 ml de metanol 100% con 0.8 mg/ml de fenil-β-D-glucopiranosido como estándar interno (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Se incubó en un agitador horizontal durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm. Se transfirieron 300 µl del sobrenadante a un tubo nuevo y se diluyó con 300 µl de agua destilada en un vial de vidrio de 1.5 ml. Los extractos se almacenaron a -20 °C hasta su medición.

Las muestras se analizaron con un cromatógrafo líquido de alta resolución equipado con un detector de arreglo de diodos (*high-Performance Liquid Chromatography- Diode Array Detection*, HPLC-DAD por sus siglas en inglés): cromatógrafo HPLC; Agilent, Serie 1100, Santa Clara, CA, EE. UU., equipado con un detector G1315B. Se usó una columna C18 de fase reversa (EC 250/4.6 Nucleodur Sphinx, RP5 µm, Macherey-Nagel, Düren, Alemania) para la separación de los compuestos usando las condiciones descritas en

Boeckler et al. (2016). Se aplicó un gradiente de elución con ácido fórmico acuoso al 0.05 % (A) y acetonitrilo (B) con un flujo de 0.8 ml/min usando los siguientes parámetros: 5 % B (0–0.5 min), 5–90 % B (0.5– 4.5 min), 90–100 % B (4.5–4.52 min), 100 % B (4.52– 5.0 min), 5 % B (5.1–8.5 min).

Las concentraciones se calcularon sobre la base de las áreas de los picos a 200 nm relativizadas al estándar interno aplicando factores de respuesta determinados experimentalmente. Los factores de respuesta basados en el peso en relación con el estándar interno de fenil-β-glucopiranosido se determinaron utilizando los siguientes patrones: salicina (Alfa Aesar), salicortina, HCH-salicortina y tremulacina (los últimos tres proporcionados amablemente por el Dr. Bernd Schneider (Instituto Max Planck de Ecología Química, Jena, Alemania) originalmente aislado por H. Thieme Halle (Thieme y Benecke, 1971). Los factores de respuesta fueron los siguientes: salicina, 0.45; salicortina, 0.87; HCH-salicortina, 0.65; y tremulacina, 0.44. La caracterización de la salicortina, HCH-salicortina, tremulacina y tremuloidina fue realizada previamente por LC-MS y espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (Lindroth et al., 1987; Feistel et al., 2015). Los resultados del contenido de salicinoides se relativizaron al peso seco de la muestra de hojas (mg/g).

#### 2.4.2. Análisis de salicinoides del Capítulo 5:

Las hojas se liofilizaron y se trituraron hasta obtener un polvo fino mediante agitación con esferas de acero inoxidable en un agitador de pintura. Una porción de 20 ± 5 mg de muestra se extrajo en 1,5 ml de metanol 100% frío (-20°C) enriquecido con 0.01 mg/ml de ácido β-resorcílico (Sigma R-5877) mediante sonicación en baño de hielo durante 15 minutos. Luego se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se tomó una alícuota de 150 µl del sobrenadante, se diluyó con 150 µl de metanol 100% (Fisher A452-4 grado HPLC) y se agregaron 30 µl de 1 mg/ml de ácido salicílico-D6 (Cambridge Isotope Laboratories DLM-3624-0.25) como estándar interno. Luego el extracto diluido se filtró al vacío con una membrana FEP de 0.2 µm. Luego se transfirieron 200 µl del extracto a un tubo plástico de HPLC para su análisis cromatográfico UHPLC-MS.

Se evaluó la composición de salicinoides de las hojas, mediante cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas de cuadrupolo simple de ionización negativa (*Ultra-high performance liquid-chromatography- single quadrupole mass spectrometer*, UHPLC-MS/ISQ por sus siglas en inglés): cromatógrafo UHPLC Waters



Acquity I-Class UPLC, Milford, MA, EE.UU y espectrómetro Waters Acquity 3100 SQ Mass Detector. Se utilizó una columna C18 (Waters Acquity CSH; 1.7  $\mu$ m, 2.1 x 100 mm) a 40 °C con un flujo de 0.5 ml/min, aplicando un gradiente de elución con agua (A) y acetonitrilo (B) ambos conteniendo 0.1 % de ácido fórmico usando los siguientes parámetros: 99% A (0-4min), 85 % (4-12 min), 75 % (12-20 min), 69 % (20-23), 38% (23-24), 1% (24-25 min).

Los parámetros de funcionamiento para la espectrometría de masas de ionización negativa fueron los siguientes: potencial del cono, 30 V; potencial del capilar, 2500 V; potencial del extractor, 3 V; potencial de la lente de RF, 0,1 V; temperatura de la fuente, 120 °C; temperatura de desolvatación, 250 °C; flujo de gas de desolvatación, 500 L/h; flujo de gas del cono, 10 L/h; tasa de infusión, 5 L/min; tiempo de permanencia, 0.025 s.

La identificación y análisis cuantitativo de los compuestos se realizó mediante detección MS por el modo de registro selectivo de iones utilizando relaciones masa/carga correspondientes a los aductos de formiato de los salicinoides. Para más detalle ver la metodología utilizada por Rubert-Nason et al. (2019) desarrollada en el Laboratorio del Dr. Lindroth. La cuantificación se realizó mediante curvas de calibración de estándares externos de 5 salicinoides: salicina (Sigma S-0625), salicortina, HCH-salicortina, tremulacina y tremuloidina. Estos últimos cuatro compuestos se obtuvieron por extracción y purificación de hojas de álamos *Populus* spp realizadas en el laboratorio (Rubert-Nason et al., 2017), ya que no se consiguen de forma comercial. Las soluciones se prepararon en metanol frío (1 mg/ml) y se crearon diluciones agregando metanol y 0.1mg/ml de estándar interno. Para construir las curvas de calibración para salicina y tremuloidina se crearon 4 puntos (dentro del rango 0.015-0.375 mg/ml) y para salicortina, HCH-salicortina y tremulacina, 6 puntos (dentro del rango 0.015-1 mg/ml). Las concentraciones de cada compuesto se calcularon sobre la base de las áreas de los picos relativizadas al área del estándar interno. La relación de sus áreas es el factor de respuesta (Rf). Para cada estándar externo, se creó una curva de calibración a partir de los valores Rf de las diferentes concentraciones conocidas, y se utilizó para convertir el valor Rf de cada muestra en una concentración equivalente. Los valores de los compuestos fueron expresados como porcentaje respecto al peso seco (% PS) según la siguiente fórmula:

$$\% PS_s = \frac{1.5 \times FD \times 1.09 \times Conc_s}{PS_m} \times 100$$

donde

- 1,5 es el volumen de extracción de 1.5 ml;

- FD es el factor de dilución que describe la dilución del sobrenadante con metanol antes de la inyección de la muestra: 1 = sin diluir; 2 = 1:1 (sobrenadante: metanol); 4 = 1:3 (sobrenadante:metanol), etc.
- 1.09 es la eficiencia de extracción del 92% determinada empíricamente;
- $Conc_s$  es la concentración del salicinoide calculada a partir de la curva de calibración
- $PS_m$  es el peso seco de la muestra
- 100 para convertir el valor en porcentaje

### 2.4.3. Análisis de taninos condensados

Las muestras se procesaron en el laboratorio dirigido por el Dr. Richard Lindroth en el Departamento de Entomología de la Universidad de Wisconsin (Madison, Estados Unidos) siguiendo protocolos previamente establecidos.

Para estudiar el perfil de taninos condensados se cosecharon hojas, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Se utilizaron 20-30 mg de hojas secas que se trituraron hasta obtener un polvo fino mediante agitación con esferas de acero inoxidable en un agitador de pintura. Se extrajeron con 1.5 ml de una solución de acetona y agua (70:30) conteniendo 10 mM de ácido ascórbico y se sonicaron en un baño con hielo ( $4-12^{\circ}\text{C}$ ) durante 30 minutos. Se centrifugaron a  $4^{\circ}\text{C}$  a 3000 rpm durante 10 min y se conservaron los sobrenadantes a  $-20^{\circ}\text{C}$  (hasta antes de 4 semanas) hasta su análisis. Los taninos se analizaron por el método del HCl-butanol y se determinaron de forma colorimétrica. Para ello se hizo reaccionar el sobrenadante diluido (con 70% de acetona con ácido ascórbico) del extracto con 2 ml de butanol ácido (N-butanol y HCl concentrado en proporción 95:5) y 100  $\mu\text{l}$  de reactivo de hierro (0.02 g/ml de sulfato de amonio férrico en 2N HCl). Luego se llevaron a un baño en agua hirviendo durante 50 min, se dejó enfriar y se transfirieron 200  $\mu\text{l}$  a una microplaca de 96 pocillos para registrar la absorbancia a 550 nm (lector de placas Molecular Devices Spectramax). Al mismo tiempo, se midió una curva de calibración de un estándar externo purificado de taninos condensados de *Populus spp* obtenido por aislamiento en laboratorio por el método de



Hagerman y Butler (1989). Se preparó una solución estándar de 0.5 mg/ml con acetona al 70% (con 10 mM de ácido ascórbico) para generar las diluciones que van a formar parte de los puntos de la curva (8 puntos dentro del rango de concentración de 0-0.5 mg/ml). Cada muestra y punto de la curva se realizó por triplicado y se registró el valor de absorbancia promedio. La curva se utilizó para convertir el valor de absorbancia de cada muestra en una concentración equivalente mediante el software (SoftMax Pro). Los valores de los compuestos fueron expresados como porcentaje respecto al peso seco (% PS) según la siguiente fórmula:

$$\% PS_t = \frac{1,5 \times FD \times \overline{Conc}_t}{PS_m} \times 100$$

donde

- 1,5 es el volumen de extracción de 1.5 ml;
- FD es el factor de dilución
- $\overline{Conc}$  es la concentración promedio de los taninos, calculada a partir de la curva de calibración
- $PS_m$  es el peso seco de la muestra
- 100 para convertir el valor en porcentaje

## 2.5. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software RStudio 2020.02.3 (R Core Team, 2020). Para los modelos lineales mixtos (*linear mixed model*, LMMs por sus siglas en inglés) se utilizó la función lme el paquete nlme (Pinheiro et al., 2022). Previamente, todos los datos se examinaron para comprobar los supuestos del modelo analizando la distribución normal (Q-Q plot), la normalidad residual con la función shapiro.test (Shapiro-Wilk) y la homocedasticidad (gráficos de dispersión residual). También se evaluaron los residuales y el diagnóstico del modelo de regresión lineal con la función plot\_model del paquete sjPlot (Lüdtke et al., 2022). En caso de heteroscedasticidad, la estructura de la varianza se modeló con la función varIdent (Pinheiro y Bates, 2000) del paquete nlme. Se evaluaron los efectos de cada factor y sus

interacciones (según corresponda) sobre la variable respuesta con el estadístico F a través de la función `anova` (Chambers y Hastie, 1992). Las comparaciones múltiples entre tratamientos se realizaron con la prueba post hoc de Tukey utilizando el paquete `emmeans` (Lenth et al., 2020).

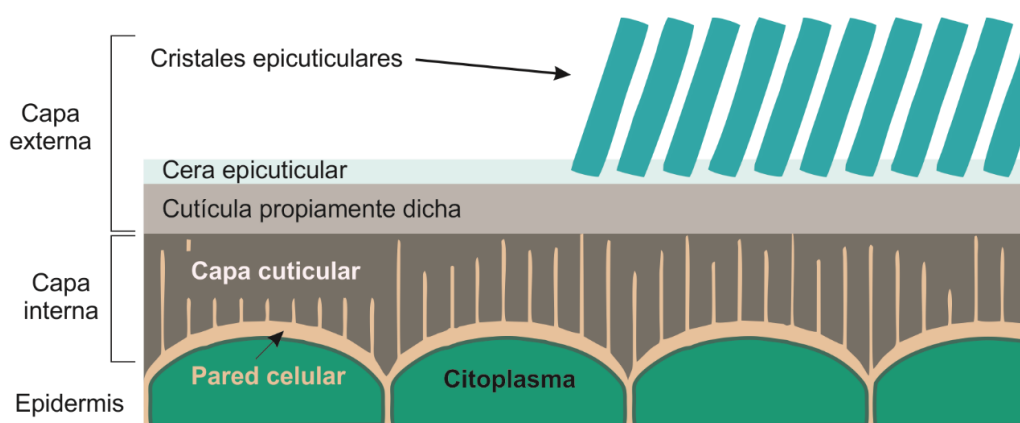
Para los modelos lineales generalizados mixtos (*generalized linear mixed models*, GLMMs por sus siglas en inglés) se utilizó la función `glmmTMB` del paquete `glmmTMB` (Brooks et al., 2017). Se utilizaron 4 distribuciones distintas según las características de la variable: binomial, Poisson, gamma y log normal. En estas últimas 3, se usó como función de enlace el logaritmo y para la distribución binomial, `logit`. Se verificó la ausencia de patrones en los residuos, la ausencia de outliers y la ausencia de sobre o subdispersión. La verificación de estos supuestos se realizó a través de un análisis con la función `simulateResiduals` de la biblioteca “DHARMA” (Hartig, 2021) y a través del cálculo del índice de dispersión. Además, la bondad de ajuste de la distribución gamma se probó previamente con el paquete `goft` (González-Estrada y Villaseñor, 2018). En caso de sobredispersión, se incluyó al modelo a cada observación como factor aleatorio. Se evaluaron los efectos de cada factor y sus interacciones (según corresponda) sobre la variable respuesta utilizando la prueba de Wald con el estadístico chi cuadrado  $X^2$  (Zuur et al., 2009) a través de la función `Anova` del paquete `car` (Fox y Weisberg, 2019). Las comparaciones múltiples entre tratamientos se realizaron con la prueba post hoc HSD de Tukey utilizando la función `lsmeans` del paquete `emmeans`.

## **Capítulo 3:**

**Preferencia de oviposición de *N. oligospilus* y el contenido de salicinoides en distintos genotipos de *Salix* spp**

### 3.1. Introducción

La capacidad de encontrar y reconocer la planta hospedera es crucial para la alimentación y oviposición de los insectos herbívoros. Una vez sobre la planta, los insectos evalúan su superficie mediante pruebas de contacto, en las que realizan una serie de movimientos repetitivos con los apéndices en respuesta a las claves físicas y químicas que ofrece la planta (Schoonhoven et al., 2005). Muchas de estas sustancias químicas suelen estar confinadas en compartimentos intra o extracelulares. Una de las estructuras extracelulares con un rol relevante durante el comportamiento de selección insecto-hospedero es la cutícula vegetal (Schoonhoven et al., 2005). Las cutículas de las plantas son estructuras lipofílicas que se depositan sobre la cara externa de las paredes celulares de la epidermis (Buschhaus y Jetter, 2011). Se pueden distinguir dos componentes principales en función de su solubilidad en solventes orgánicos: a los compuestos lipofílicos que se los denomina *ceras cuticulares*, mientras que a los que no pueden extraerse por su estructura polimérica se los llama *cutina* (Buschhaus y Jetter, 2011). La cutina es un polímero de ácidos grasos de cadena larga unidos por uniones éster creando una red rígida tridimensional. En cambio, la cera cuticular es una mezcla compleja de decenas de compuestos con diversas cadenas hidrocarbonadas o estructuras de anillos (Jetter et al., 2007). El modelo estructural más común de la matriz de la cutícula foliar es el de una membrana en bicapa, donde las dos capas se distinguen por su ontogenia, ultraestructura y composición química (Müller y Riederer, 2005; Fig. 3.1). La porción más externa (denominada cutícula propiamente dicha) está compuesta por cutina y forma una capa continua separada de la pared celular epidérmica externa (Müller y Riederer, 2005; Fig. 3.1). Tiene ceras incrustadas (ceras intracuticulares) y sobre su superficie externa la cubre una película fina de ceras epicuticulares (capa epicuticular; Fig. 3.1). Según la especie, puede haber una cubierta más o menos densa de cristales epicuticulares formados principalmente por el único componente predominante de la cera (Jetter y Riederer, 1994). La capa interna de la cutícula (capa cuticular), surge de la impregnación de la pared celular epidérmica externa por la cutina, y contiene diversos polisacáridos incrustados de la pared celular (Müller y Riederer, 2005; Fig. 3.1).



**Figura 3.1.** Esquema de la estratificación de la cutícula vegetal (Modificado de Müller y Riederer, 2005).

Dependiendo de su polaridad y solubilidad, los metabolitos primarios y especializados distintos de las ceras, pueden liberarse de los tejidos vegetales y acumularse entre las ceras epicuticulares o en la cutina (Müller y Riederer, 2005). Particularmente, los metabolitos especializados que son característicos de determinadas especies o familias de plantas y que estén ubicados en la cutícula foliar, podrían ser utilizados por los insectos especialistas en el reconocimiento de su hospedero (Müller, 2006). Por ejemplo, compuestos con mayor polaridad como los hidratos de carbono hidrofílicos y metabolitos especializados como los glucosinolatos o compuestos fenólicos como los ácidos fenólicos y los flavonoides han sido reportados como kairomonas<sup>3</sup> estimulando la oviposición y/o alimentación de los insectos herbívoros (Lombarkia y Derridj, 2002; Marazzi et al., 2004; Singh et al., 2021).

Entre las especies de salicáceas, gran parte de la variación en susceptibilidad al ataque de insectos se ha atribuido a la presencia o ausencia de salicinoides (Orians et al., 1997). Dentro de sus funciones biológicas, se han reportado como estimulantes de alimentación y oviposición en insectos especialistas de sauces (Orians et al., 1997; Roininen et al., 1999; Cha et al., 2009). Esto sugiere que los salicinoides serían un determinante importante en la selección de la planta hospedera. La distribución de estos compuestos dentro de las distintas especies de la familia Salicaceae muestra una amplia variación con la estación del año, el genotipo y la fase de desarrollo, y probablemente también entre órganos, aunque está menos estudiada (Boeckler et al., 2011). Los salicinoides suelen encontrarse en tejidos de brotes como hojas, pecíolos, entrenudos,

<sup>3</sup> Kairomona: sustancia química involucrada en la comunicación entre distintas especies (i.e. aleloquímico) que aporta información beneficiosa sólo para el organismo receptor (Kost, 2008).

flores y corteza, pero su localización específica no se ha investigado a fondo (Boeckler et al., 2011).

En Argentina, la mayor parte de los programas de mejora de sauces se basan fundamentalmente en la hibridación interespecífica, la cual permite maximizar la varianza genotípica a través de la combinación de las características sobresalientes de las distintas especies para la producción maderera y de papel (Cortizo et al., 2016). Los híbridos y las especies parentales suelen diferir en la resistencia a los herbívoros, y esta variación se debe probablemente a modificaciones en la química, morfología o fenología de las plantas híbridas en comparación con sus progenitoras (Fritz et al., 1999; Cheng et al., 2011). Por lo tanto, es importante evaluar la susceptibilidad a los insectos plaga de estos nuevos genotipos generados en los programas de mejoramiento genético del sauce. Esto podría lograrse evaluando la composición de metabolitos asociados con la selección de la planta hospedera, como los salicinoides.

Estudios previos sobre *N. oligospilus* describieron una preferencia de oviposición diferencial en función de los genotipos de sauce, en los cuales se registraron diferencias contrastantes en la composición de salicinoides (Braccini et al., 2013, 2015; Fernández et al., 2019). El sauce con mayor cantidad de huevos puestos por las hembras (el clon de *S. nigra* “Alonzo nigra IV”) presentó una concentración alta de salicinoides totales, tanto en extractos de hoja completa como en lavados de superficie respecto al menos preferido (un clon de *S. viminalis*), con una cantidad indetectable de los mismos (Braccini et al., 2013; Fernández et al., 2019). Sobre el sauce con mayor contenido de salicinoides, se observó que las hembras contactaban la superficie de la hoja reiteradas veces, primero con las antenas y luego con el ovipositor, indicando un comportamiento estereotipado de evaluación por contacto del hospedero (Braccini et al., 2013, Fernández et al., 2019). Además, la preferencia de *N. oligospilus* por el genotipo preferido para oviponer disminuyó al remover mecánicamente la superficie foliar (Braccini et al., 2013). Estos antecedentes, sugieren un papel fundamental de la química de la superficie foliar durante el reconocimiento y la aceptación de la planta hospedera por parte de *N. oligospilus*. Por lo tanto, podría haber una asociación entre la abundancia de salicinoides y la preferencia de oviposición. Además, la presencia de estos metabolitos no ha sido documentada específicamente en la superficie foliar de *Salix* spp. Esto es importante porque nuestras observaciones sugieren que la avispa sierra no daña la hoja durante su reconocimiento, por lo que esos metabolitos deberían estar presentes en la cutícula.

Objetivo específico I:

Determinar la composición de salicinoides presentes en la superficie foliar de distintos genotipos de *Salix* spp y relacionarla con la preferencia de oviposición de *N. oligospilus*.

Hipótesis I:

Los salicinoides de la superficie foliar de *Salix* forman parte de las claves de reconocimiento del hospedero de *N. oligospilus*.

Predicción I:

Habrà una mayor composición y concentración de salicinoides en aquellos genotipos de *Salix* donde las hembras pongan más huevos.

## 3.2. Materiales y métodos

### 3.2.1. Plantas y colecta de hojas

Se utilizó material del Programa Nacional de Mejoramiento Genético de Salicáceas (área de mejoramiento genético de sauces del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA, Argentina).

Para los lavados de la superficie de las hojas por inmersión y la evaluación de la preferencia de oviposición, se utilizaron sauces que provenían de un vivero de la estación experimental del INTA Delta del Paraná (Buenos Aires, Argentina 34° 5' 6" S, 58° 22' 23" O) formado por 15 estacas de 6 genotipos distintos (30 cm de longitud) durante el invierno del año 2016. Estos genotipos fueron elegidos por su valor comercial en la zona: Lezama (*S. matsudana* × *S. nigra*), Yaguareté (*S. alba* × polinización libre), Los Arroyos (*S. matsudana* × *S. alba*), Agronales (*S. matsudana* × *S. alba*), Soveny Americano (*S. babylonica* var. *sacramenta*) y Géminis (*S. matsudana* × polinización abierta). Se recolectaron hojas maduras de la sección media de estas plantas de 4 a 5 meses de edad ubicadas en 3 sectores distintos del vivero, y se congelaron a -20 °C en bolsas de plástico selladas hasta su uso. La plantación y la colecta de hojas fue realizada por la Dra. Celina L. Braccini (INTA).

Para el estudio de la presencia de salicinoides en la superficie de las hojas, se utilizó un genotipo de sauce altamente preferido por la avispa sierra (*S. nigra*, 'Alonzo nigra 4 INTA') y con alta concentración de salicinoides (Braccini et al., 2013, 2015; Fernández et al., 2019). Los sauces provenían del estaquero de la Facultad de Agronomía, en el que se plantaron 4 estacas de este genotipo durante el invierno del año 2016 (para detalles del armado de este estaquero ver **Metodología general, sección 2.1.2**).

### 3.2.2. Análisis del contenido de salicinoides

#### 3.2.2.1. Lavado de la superficie de las hojas mediante inmersión en sauces comerciales

Se utilizaron aproximadamente 40 g de hojas (3-5 plantas individuales) y se lavaron durante 30 segundos sumergiéndolas en 100 ml de metanol al 100% a temperatura ambiente. El extracto se filtró con papel y el metanol se evaporó hasta sequedad bajo nitrógeno. Las muestras se re diluyeron en 1 ml de metanol 100% con 0.8 mg/ml de fenil- $\beta$ -D-glucopiranosido como estándar interno (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se analizaron y cuantificaron mediante HPLC-DAD. Los resultados del contenido de salicinoides se relativizaron con respecto al peso seco del extracto (mg/m de extracto seco).

Para mayor detalle sobre la extracción, análisis y cuantificación de estos compuestos, ver **Metodología general, sección 2.4.1.**

#### 3.2.2.2. Remoción de la superficie epicuticular de las hojas de *S. nigra* con goma arábica

Esta técnica consistió en la remoción mecánica de las ceras superficiales de las hojas de *S. nigra* mediante el uso de goma arábica. La goma arábica se ha utilizado frecuentemente como adhesivo para aislar las ceras epicuticulares de las plantas para su análisis químico, manteniendo la hoja viva (Jetter et al., 2000; Müller y Riederer, 2005; Koch y Ensikat, 2008; Ringelmann et al., 2009). Esta técnica permite una extracción más selectiva de la cera epicuticular y por lo tanto de los compuestos presentes sólo en la superficie foliar.

Para la remoción con goma arábica se cortaron ramas con 4 hojas (13 cm longitud aprox.) de cada uno de los 4 clones plantados en estaquero (N=4). Cada rama se mantuvo en un recipiente con agua y se pinceló con goma arábica la cara adaxial de las 4 hojas. Como el contenido de salicinoides en salicáceas depende en gran medida de la fenología de la planta (Boeckler et al., 2011), se hicieron mediciones en hojas de distinto grado de maduración (jóvenes y maduras) para evitar resultados sesgados en la concentración de estos compuestos. Se utilizaron como hojas juveniles aquellas que se encontraban en el ápice de las ramas y presentaban un color verde más claro que los otros tipos de hojas.



Las hojas maduras estaban ubicadas en la porción media de la rama y presentaban mayor dureza y un color verde más oscuro que las hojas juveniles (criterio según Alderete, 2005).

La preparación de la goma arábica consistió en una solución acuosa al 50% p/p de goma arábica comercial (Biopack Productos Químicos, Argentina) que se aplicó sobre toda la superficie de la hoja utilizando un pincel como en Badenes-Pérez et al. (2011). Luego de 1 hora, la solución se encontraba seca y se podía retirar suavemente una película fina de polímero en trozos, dejando las hojas físicamente intactas (sin dañar el tejido epidérmico). Las películas de goma arábica de cada una de las hojas se pesaron y posteriormente se mezclaron con el doble de su peso en agua de grado HPLC. El material insoluble precipitó por centrifugación a 2500 g durante 10 minutos, y los sobrenadantes se utilizaron para el análisis de salicinoides.

Debido a las concentraciones muy bajas de salicinoides en los extractos de goma arábica se utilizó un sistema LC-MS/MS muy sensible para la cuantificación (i.e. *Liquid chromatography– tandem mass spectrometry*). Los analitos se separaron en un sistema HPLC Agilent serie 1200 equipado con una columna Agilent XDB-C-18 (4.6 x 50 mm, 1.8  $\mu$ m). Se aplicó una elución en gradiente con ácido fórmico acuoso al 0.05% (A) y acetonitrilo (B) a un flujo de 0,8 ml/min utilizando los siguientes parámetros 5% B (0-0.5 min), 5-90% B (0.5- 4.5 min), 90-100% B (4.5- 4.52 min), 100% B (4.52- 5.0 min), 5% B (5.1- 8.5 min). Los compuestos eluidos se ionizaron mediante *electrospray* (modo negativo) y se detectaron en un espectrómetro de masas API 5000 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE.UU.) utilizando la monitorización de reacciones múltiples (MRM). Los parámetros MRM para cada analito se optimizaron utilizando compuestos estándar. La cuantificación se llevó a cabo mediante curvas de estándar externo para la salicina (Alfa Aesar), la salicortina y la tremulacina. Parámetros MRM: (ion precursor m/z  $\rightarrow$  ion producto m/z; potencial de declusión [V], energía de colisión [V]): salicina (285  $\rightarrow$  123; -50,-18), salicortina (423  $\rightarrow$  123; -75, -30), tremulacina (527  $\rightarrow$  123; -75, -34).

Para expresar la concentración de salicinoides por unidad de superficie (ng/ cm<sup>2</sup> de hoja), se midió el área foliar. Después de eliminar la cera superficial con goma arábica, se cortaron las hojas, se presionaron con un vidrio y se fotografió la superficie adaxial con una cámara digital. El área de la hoja se determinó utilizando el software ImageJ versión 1.45s (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland).

### 3.2.3. Análisis estadístico

#### 3.2.3.1. Matriz de preferencia de oviposición

Para la construcción de esta matriz, se utilizaron los datos de preferencia de oviposición realizados previamente mediante ensayos de elección dual con 6 genotipos de sauce comerciales (Lezama, Yaguareté, Los Arroyos, Agronales, Americano y Géminis) por la Dra. Celina L. Braccini (INTA) bajo la siguiente metodología:

Los ensayos de elección dual se realizaron dentro de la cámara de ambiente controlado mencionada anteriormente. La arena experimental consistió en una caja de plástico transparente (33 × 23 × 14 cm) que contenía 1 par de ramas recién cortadas de cada genotipo e hidratadas en floreros. Cada florero contó con una porción de rama de sauce fresca de 2 hojas sanas maduras (cortada de la porción media de una rama de sauce). En lados opuestos de la diagonal de la arena se colocó un florero de cada genotipo y en el centro de la arena se liberó una hembra (recién emergida o de menos de 10 h de vida) permitiéndole poner huevos hasta su muerte (normalmente hasta 3 días). Se ofrecieron los genotipos de a pares hasta completar todas las combinaciones posibles (i.e. 30 combinaciones pareadas). Se registró el número de huevos puestos por genotipo en cada ensayo.

Con el fin de asignar un valor cualitativo que representara la preferencia de magnitud sobre los otros sauces, la preferencia de oviposición de la avispa sierra sobre diferentes genotipos de sauce se clasificó en base a una matriz de comparación emparejada según Pirk y López De Casenave (2011). La matriz de comparación emparejada fue de 6 × 6, con cada celda  $ij$  representando un par de genotipos de sauce, y su valor, el número de veces que el genotipo  $i$  (fila) fue preferido al genotipo  $j$  (columna) en todos los ensayos (3 repeticiones) que involucraban a  $i$  y  $j$ . Las diferencias en el número de huevos resultantes de la preferencia de oviposición de *N. oligospilus* entre pares de sauces se probaron mediante una prueba de Chi-cuadrado ( $X^2$ ,  $P < 0.05$ ). En caso de diferencias significativas, el valor asignado a una celda  $ij$  fue 1 para el genotipo de sauce preferido y 0 para el no preferido. Para las combinaciones en las que la preferencia de oviposición en un ensayo no fue contrastada ( $X^2$ ,  $P > 0.05$ ), se asignó un valor de 0.5 a ambos genotipos, porque esta situación se consideró un empate. La jerarquía de una matriz construida con la suma de los resultados de cada ensayo de preferencia dual se verificó mediante el índice de linealidad de Landau modificado  $h'$  (Landau, 1951), ya que éste considera los resultados

donde hay interacciones desconocidas. Cuando todos los elementos de un diseño de comparaciones emparejadas pueden ordenarse jerárquicamente, la jerarquía es lineal (Pirk y López de Cassenave, 2011). El índice de Landau va de 0 a 1, donde 1 indica una linealidad completa y 0 indica que todas las especies son igualmente preferidas. La significación del índice de linealidad  $h'$  se determinó mediante una prueba de aleatorización (de Vries, 1995).

Para asignar un valor cuantitativo, se clasificó la preferencia de oviposición para los genotipos de sauce mediante el índice de David normalizado (IDnorm), que es el método de clasificación de dominancia (Gammell et al., 2003). Esta puntuación refleja por igual la fuerza de las especies no preferidas por la especie  $i$  y la debilidad de las especies por las que la especie  $i$  fue derrotada (de Vries, 1998). Varía entre 0 y  $N-1$ , donde  $N$  es el número de especies comparadas, y los valores más altos indican niveles de preferencia más elevados.

El índice de Landau modificado con su significancia y el índice de David normalizado se calcularon con el paquete *compete* (Curley, 2016) en el software RStudio.

### 3.2.3.2. Concentración de salicinoides

Para analizar las diferencias entre las concentraciones de salicinoides en los extractos de goma arábiga de *S. nigra*, se realizó un LMM para cada compuesto. Para detalles del análisis ver **Metodología general, sección 2.5**.

### 3.2.3.3. Análisis de correlación

El coeficiente de correlación mide la fuerza y la dirección de asociación lineal entre dos variables cuantitativas. Para determinar el tipo de coeficiente más apropiado, primero se analizó si ambas variables seguían una distribución normal a través de la prueba de Shapiro y un gráfico de normalidad de residuos (Q-Q plot). Al no cumplirse estos supuestos, se optó por utilizar una prueba no paramétrica a través del coeficiente de Spearman ( $\rho$ ). Los gráficos de la estimación de la recta, junto con el cálculo del coeficiente  $\rho$  y su significancia se realizaron con el paquete *ggpubr* en RStudio (Kassambara, 2020).

### 3.3. Resultados

#### 3.1. Relación entre el contenido de salicinoides en sauces comerciales y la preferencia de oviposición

La preferencia de oviposición en el laboratorio se clasificó para los genotipos de sauce por el índice de David normalizado (IDnorm), basada en una matriz de comparación emparejada de  $6 \times 6$  que reúne la información de todas las réplicas (los seis genotipos de sauce, Tabla 3.1). El índice de linealidad de Landau fue alto (cercano a 1), y significativo ( $h' = 0.97$ ,  $p = 0.02$ , Tabla 3.1), indicando una jerarquía lineal en la preferencia de oviposición. Como se esperaba a partir de observaciones previas (Braccini et al., 2013, 2015) y de estos datos, el híbrido de sauce que contiene como parental al genotipo *S. nigra* (Lezama) fue el más preferido, con el IDnorm, lo que significa que siempre recibió más huevos en las comparaciones duales. Géminis fue el híbrido menos preferido, con un IDnorm de 1.

| Matriz de preferencia |        |           |             |           |           |         |        |
|-----------------------|--------|-----------|-------------|-----------|-----------|---------|--------|
|                       | Lezama | Yaguareté | Los Arroyos | Agronales | Americano | Géminis | IDnorm |
| Lezama                | -      | 3         | 3           | 2.5       | 3         | 3       | 4.3    |
| Yaguareté             | 0      | -         | 2           | 2         | 2.5       | 3       | 3      |
| Los Arroyos           | 0      | 1         | -           | 2         | 3         | 2       | 2.6    |
| Agronales             | 0.5    | 1         | 1           | -         | 1.5       | 3       | 2.4    |
| Americano             | 0      | 0.5       | 0           | 1.5       | -         | 2.5     | 1.8    |
| Géminis               | 0      | 0         | 1           | 0         | 0.5       | -       | 1      |

**Tabla 3.1.** Matriz de preferencia de oviposición de *Nematus oligospilus* sobre 6 genotipos comerciales (90 comparaciones totales) e índice de David normalizado (IDnorm). Se muestra la matriz construida con la suma de los resultados de cada ensayo de preferencia dual. El número de cada celda representan la cantidad de veces que la fila fue preferida sobre la columna. Replicas biológicas: N=3.

En los extractos de lavados superficiales de hoja de los 6 genotipos comerciales, los salicinoides encontrados en todos los sauces fueron salicina, salicortina y HCH-salicortina. Los 3 genotipos con IDnorm más alto presentaron, además, tremulacina (Tabla 3.2). En los 3 genotipos con menor IDnorm no se detectó tremulacina. En el caso de Yaguareté y Los Arroyos, también se detectaron Lasiandrina y un salicinoide desconocido (peso molecular = 666), que no fueron cuantificados por falta de estándares (Tabla 3.2).

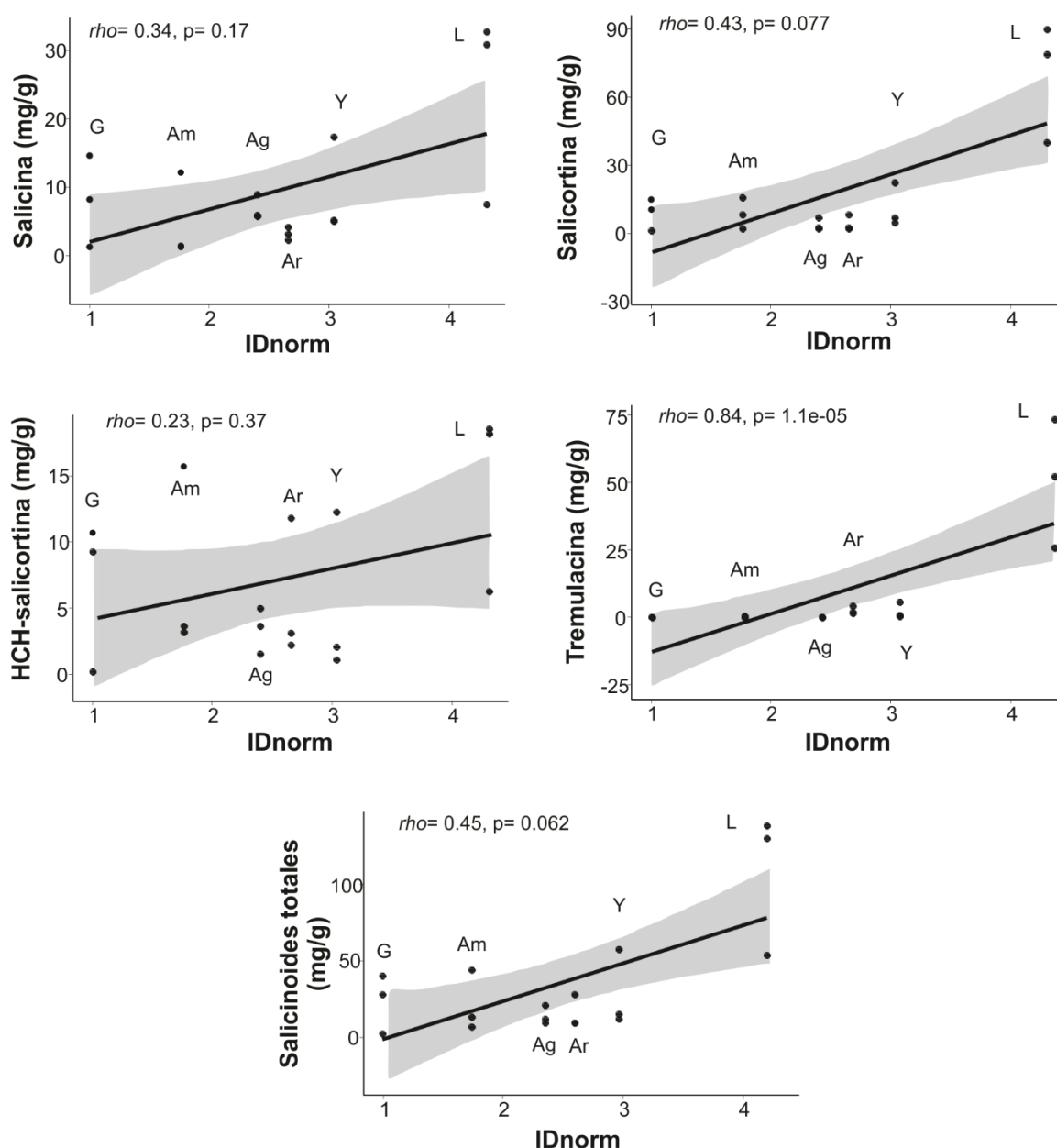
Lezama presentó la mayor concentración media de todos los salicinoides (hasta 5 veces más respecto del resto de los genotipos; Tabla 3.2) y coincidentemente fue el genotipo con el IDnorm más alto (Tabla 3.1). Si bien Géminis fue el genotipo de menor IDnorm, la concentración promedio de salicinoides totales fue cualitativamente similar al resto de los genotipos, con excepción de Lezama cuya concentración total fue al menos 5 veces mayor (Tabla 3.2). La concentración media de tremulacina resultó ser la más contrastante entre genotipos. Pudo ser detectada en la mitad de los sauces, encontrándose hasta al menos 20 veces más en Lezama respecto de Yaguareté y Los Arroyos e indetectable en Agronales, Americano y Géminis (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2.** Contenido de salicinoides (mg/g de extracto seco, media  $\pm$  ES) en seis genotipos

| Genotipo de <i>Salix</i> | <i>matsudana</i> x<br><i>nigra</i> | <i>alba</i> x <i>open</i><br><i>pollination</i> | <i>matsudana</i><br>x <i>alba</i> | <i>matsudana</i><br>x <i>alba</i> | <i>babylonica</i> | <i>matsudana</i><br>x<br>polinización<br>abierto |
|--------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------|
| Salicinoides             | Lezama                             | Yaguareté                                       | Los<br>Arroyos                    | Agronales                         | Americano         | Géminis                                          |
| Salicina                 | 23.7 $\pm$ 6.7                     | 9.2 $\pm$ 3.3                                   | 3.2 $\pm$ 0.5                     | 6.8 $\pm$ 0.8                     | 5.0 $\pm$ 3.0     | 8.0 $\pm$ 3.1                                    |
| Salicortina              | 69.7 $\pm$ 12.4                    | 11.5 $\pm$ 4.5                                  | 4.2 $\pm$ 1.6                     | 4.2 $\pm$ 1.2                     | 8.8 $\pm$ 3.2     | 8.9 $\pm$ 3.4                                    |
| HCH-<br>salicortina      | 14.4 $\pm$ 3.3                     | 5.2 $\pm$ 2.9                                   | 5.7 $\pm$ 2.5                     | 3.4 $\pm$ 0.8                     | 7.5 $\pm$ 3.3     | 6.7 $\pm$ 2.7                                    |
| Tremulacina              | 50.6 $\pm$ 11.3                    | 2.4 $\pm$ 1.4                                   | 2.5 $\pm$ 0.7                     | 0.0                               | 0.2 $\pm$ 0.2     | 0.0 $\pm$ 0.0                                    |
| Lasiandrina              | -                                  | ++                                              | +                                 | -                                 | -                 | -                                                |
| Indentificable<br>PM=666 | -                                  | ++                                              | +                                 | -                                 | -                 | -                                                |
| Totales                  | 158.4 $\pm$ 32.96                  | 28.3 $\pm$ 12.14                                | 15.6 $\pm$ 5.17                   | 14.1 $\pm$ 2.73                   | 21.5 $\pm$ 9.45   | 23.6 $\pm$ 9.7                                   |

comerciales de *Salix* (N=3).

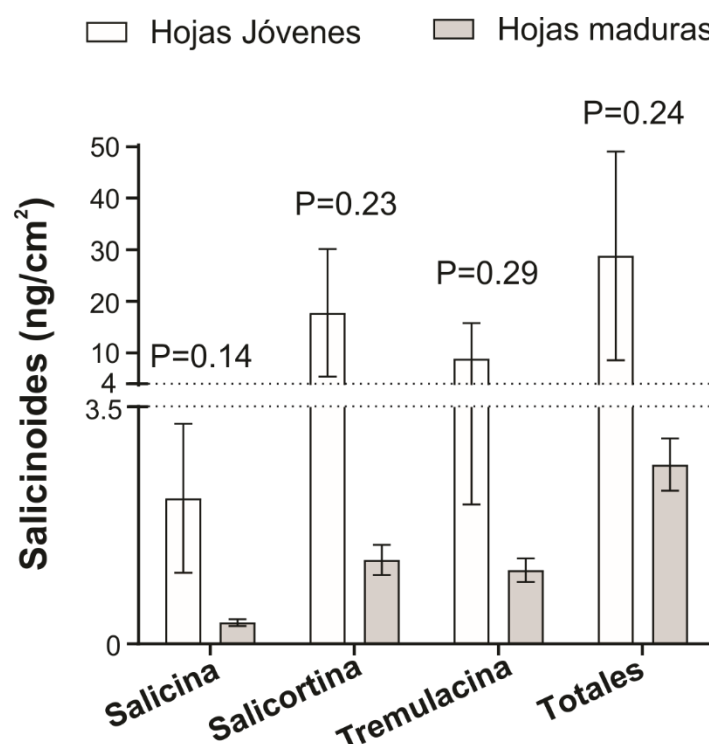
El análisis de correlación mostró que la concentración de la mayoría de los salicinoides tiene una correlación baja ( $\rho = 0.3-0.5$ ) y no significativa con el IDnorm ( $p > 0.05$ ), a excepción de la tremulacina, el compuesto de concentración más contrastante entre genotipos. Para este compuesto se observó una correlación positiva alta ( $\rho > 0$ ;  $\rho = 0.7-0.9$ ) y significativa ( $p < 0.001$ ). A su vez, para la concentración de salicortina y salicinoides totales la correlación fue baja pero marginalmente significativa ( $\rho = 0.43$ ,  $p = 0.07$  y  $\rho = 0.45$ ,  $p = 0.06$  respectivamente; Fig. 3.2).



**Figura 3.2.** Correlación entre el Índice de David normalizado (IDnorm) y la concentración de salicinoides en los 6 genotipos comerciales: Géminis (G), Americano (Am), Agronales (Ag), Los Arroyos (Ar), Yaguareté (Y) y Lezama (L).  $\rho$ : Coeficiente de correlación de Spearman y su significancia p. (Replicas por extracción = 3). Se muestra la línea de tendencia y las bandas de confianza para cada recta.

### 3.2. Contenido de salicinoides en la superficie epicuticular de *S. nigra*

En los extractos de goma arábica para las superficies epicuticulares de este genotipo se pudieron identificar 3 tipos de salicinoides: salicortina, salicina y tremulacina. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los distintos estados fenológicos de las hojas para cada compuesto, ni para el contenido total de salicinoides, se observó una tendencia de concentraciones más altas por unidad de área para las hojas más jóvenes (Fig. 3.3).



**Figura 3.3.** Contenido de salicinoides en extractos de goma arábica de la cara adaxial de hojas jóvenes (barras blancas) y maduras (barras grises) de *S. nigra*. El análisis estadístico de los valores medios se realizó mediante LMM entre tratamientos. Se muestran las medias y errores estándar estimados con los valores de P para cada compuesto. N=4

### 3.4. Discusión

Los resultados de este capítulo muestran que la preferencia de oviposición de *N. oligospilus* y, por lo tanto, la elección de la planta hospedera podría ser explicada, al menos en parte, por la composición de salicinoides en la superficie de las hojas de sauce. La construcción de un ranking de preferencia de oviposición para los distintos genotipos permitió describir un gradiente con distintos niveles de susceptibilidad a la avispa sierra entre aquellos más contrastantes, Lezama y Géminis (Tabla 3.1). La preferencia diferencial entre genotipos pudo ser correlacionada positiva y significativamente con la concentración de tremulacina y marginalmente con salicina y el contenido total de salicinoides (Fig. 3.2). A su vez, estos dos compuestos, junto con la salicortina fueron los que se encontraban en mayor concentración en los genotipos más preferidos para la oviposición de las hembras, Lezama (Tabla 3.1 y 3.2) y un clon de *S. nigra* (i.e. Alonzo nigra IV; Braccini et al., 2013; Fernández et al., 2019). Esto podría indicar que los salicinoides individuales contribuyen a

la preferencia de oviposición, pudiendo ser la tremulacina y/o la salicortina los que desencadenen la puesta de huevos. De manera similar, el crisomélido especialista de salicáceas, *Chrysomela knabi* mostró una preferencia de oviposición por las especies de sauce con mayor concentración de salicinoides (Cha et al., 2009). A su vez, se observó una preferencia por hojas pintadas con diferentes concentraciones de salicortina respecto de hojas control pintadas sólo con solvente (Orians et al., 1997). También se reportó previamente a la tremulacina como estimulante de oviposición para la avispa especialista formadora de agallas *Euura lasiolepis* (Roininen et al., 1999), observándose un aumento en la frecuencia y el tiempo de contacto del ovipositor sobre un papel embebido con dicho compuesto. Un comportamiento similar fue observado en *N. oligospilus* (Fernández et al., 2019) donde las hembras contactaron las hojas de *S. nigra*, (alta en salicinoides, particularmente tremulacina y salicortina), desencadenándose un comportamiento de oviposición estereotipado y de 3 pasos secuenciales. Primero las hembras antenean la hoja mientras caminan, luego frotan el abdomen contra la superficie y finalmente insertan el ovipositor depositando el huevo. A su vez, este comportamiento cambia según el hospedero que se le ofrezca. Por ejemplo, en *S. viminalis*, un genotipo con un contenido indetectable de salicinoides en extractos de metanol y en el que *N. oligospilus* raramente pone huevos, esta secuencia no ocurrió (Fernández et al., 2019). Junto con las observaciones de comportamiento, se encontraron en las antenas y cercos del abdomen de las hembras sensillas quimiorreceptoras (Fernández et al., 2019). Estos resultados sugieren que, en el proceso de reconocimiento del hospedero, las hembras evalúan la composición química de la hoja con las antenas y el abdomen, mediante el contacto de las sensillas con compuestos presentes en la superficie de las hojas, pudiendo ser los salicinoides candidatos de claves gustativas.

Otro grupo de compuestos asociados al reconocimiento de la planta hospedera son las ceras cuticulares y otros metabolitos especializados no polares liposolubles. Se ha demostrado que compuestos cerosos como alcanos de cadena larga, alcoholes, ácidos carboxílicos, así como metabolitos especializados como quinonas y flavonoides localizados en la superficie de la planta están implicados en la estimulación de la alimentación (Adati y Matsuda, 1993; Lin et al., 1998; Coyle et al., 2003). Particularmente, en *Populus spp* se han identificado compuestos no polares como alcoholes de cadena larga y tocoferol como estimulantes de la alimentación del escarabajo especialista de salicáceas *Chrysomela scripta* (Lin et al., 1998; Coyle et al., 2003). A su vez, en varias especies de insectos, los compuestos de la cera epicuticular actúan en sinergia con metabolitos especializados como estimulantes de la oviposición (Müller, 2006 y sus referencias). Previamente se ha asociado la aceptación de la planta hospedera para la oviposición de *N. oligospilus* con la presencia



de un perfil de ceras cuticulares más diverso en el genotipo preferido *S. nigra*, que incluía alcoholes, ácidos y ésteres (Braccini et al., 2015). Considerando estas características lipídicas y la concentración alta de salicinoides presente en este genotipo (Fernández et al., 2019), no se puede descartar que ambos grupos de compuestos (i.e. ceras cuticulares y salicinoides) podrían actuar en conjunto como las claves de reconocimiento que determinan la oviposición en la avispa sierra.

Durante el comportamiento de oviposición hay especies de hembras que se alimentan o prueban el tejido antes de la puesta de los huevos (Colazza et al., 2004; Conti et al., 2012), y otras generan heridas más superficiales en las hojas con los apéndices (Meiners y Hilker, 2000; Calatayud et al., 2006). La ruptura del tejido les permitiría acceder a los compuestos confinados en compartimentos intra y extracelulares localizados por debajo de la cutícula y así percibir claves químicas internas de la hoja (Schoonhoven et al., 2005). Por otro lado, en aquellos insectos que no producen lesiones en el tejido vegetal ni se alimentan previamente a la oviposición, como ocurre en *N. oligospilus*, son las sustancias químicas presentes en la superficie de la hoja las que determinarían el comportamiento de reconocimiento del hospedero. Sin embargo, ha sido difícil establecer procedimientos metodológicos para determinar inequívocamente qué compuestos se encuentran en la superficie del tejido foliar y cuáles sólo en capas subyacentes de la cutícula. Particularmente, sobre la ubicación tisular de los salicinoides en salicáceas, se encontraron salicortina y HCH-salicortina en la superficie foliar en los álamos *Populus deltoides* y *P. grandidentata* mediante espectrometría de masas en tándem por ionización de pulverización *in vivo* de las hojas (Snyder et al., 2015). De esta forma, los salicinoides podrían formar parte de las claves de reconocimiento de la planta hospedera que utiliza la avispa sierra tras la oviposición, pero se desconoce el mecanismo de transporte hacia la superficie de la hoja. Para el álamo *Populus canescens* se ha reportado el transporte de compuestos polares como los hidratos de carbono a través de poros que movilizan moléculas a través de la cutícula foliar (Popp et al., 2005; Schönherr, 2006). Una posibilidad alternativa de transporte sugerida por Badenes-Pérez et al. (2011) es el movimiento a través de las estomas de unos compuestos polares cuticulares (i.e. glucosinolatos) que actúan como estimulantes de oviposición del lepidóptero especialista *Plutella xylostella*, pero su mecanismo es desconocido. En el caso de los salicinoides (compuestos polares), nuestro trabajo muestra que pueden aparecer en pequeñas cantidades en la superficie de la hoja por encima de la capa de cera y tener significado biológico para los insectos. Asimismo, para determinar el rol de estos compuestos, habría que realizar ensayos de electrofisiología y evaluar si existe una respuesta de las sensillas de las antenas y de los cercos ante el estímulo de los salicinoides.

Además del control genético, las concentraciones de salicinoides en hojas completas en la familia Salicaceae también dependen en gran medida de la ontogenia de la planta. La literatura sobre el contenido de salicinoides en estas plantas documenta consistentemente los niveles más altos en tejidos juveniles, con una disminución constante a medida que las plantas maduran (Boeckler et al., 2011). En los resultados de este capítulo, se ha observado que el contenido de salicinoides en la superficie de hojas de *S. nigra* mostró una tendencia a presentar mayores concentraciones en hojas jóvenes respecto de las maduras (Fig. 3.3), similarmente a lo reportado para el contenido de hojas enteras en otras especies de *Populus* y *Salix* (Boeckler et al., 2011 y sus referencias; Massad et al., 2014). Es sabido que la variación ontogénica podría influir en el comportamiento de los insectos. La preferencia de oviposición en adultos y de alimentación en larvas por las hojas jóvenes respecto de las maduras, es una tendencia común en muchos insectos herbívoros, particularmente en los especialistas (Raupp y Denno 1983; Gutbrodt et al., 2012; Badenes-Pérez et al., 2014). Por lo general, las hojas jóvenes son más nutritivas, pero también suelen contener niveles más altos de metabolitos especializados tóxicos que las maduras. Esto se debe a que las plantas maximizarían el crecimiento y la defensa concentrando estos compuestos en tejidos que son decisivos para la supervivencia (McKey, 1974; Herms y Mattson, 1992). Sin embargo, en esta tesis no se ha evaluado si las diferencias ontogénicas modifican el comportamiento de la avispa sierra. En *N. oligospilus* se reportó una preferencia de oviposición de las hembras por hojas maduras respecto de hojas seniles (i.e. de mayor dureza), favoreciéndose así el desempeño de sus larvas (Alderete, 2005). Una variación en la concentración de salicinoides según el grado de maduración de los tejidos, podría ser otro factor que determina la preferencia de oviposición de *N. oligospilus*, pero la asociación entre preferencia por el hospedero y el desempeño de las larvas no tiene un patrón preciso en este sistema.

La hipótesis de preferencia de oviposición-desempeño de la descendencia afirma que las hembras tienen un comportamiento de selección del hospedero tal que maximizan su *fitness* a través de la maximización del desempeño de su progenie (Thompson, 1988; Mayhew, 1997). Sin embargo, la correlación entre preferencia y desempeño ocurre sólo en algunos casos estudiados (Gripenberg et al., 2010 y sus referencias). Muchos estudios han revelado una marcada correlación positiva entre la preferencia de oviposición de la madre y el desempeño de su descendencia (Craig et al., 1989; Craig y Ohgushi, 2002; Wennström et al., 2010), mientras que otros han mostrado poca o ninguna (Denno et al., 1990; Ferrier y Price, 2004). Evidencia de esta asociación positiva fue reportada en otras especies de tentredínidos (Craig et al., 1989), incluyendo a *N. oligospilus* sobre *Salix lasiolepis* (Carr et

al., 1998). Por el contrario, se mostró una asociación negativa entre *N. oligospilus* sobre *S. nigra*, el genotipo con mayor concentración de salicinoides y más preferido por las hembras para oviponer, pero con peor desempeño de sus larvas (Braccini et al., 2013). En aquellos casos donde los insectos prefieren colocar sus huevos en plantas nutricionalmente subóptimas, se han propuesto explicaciones alternativas. Un ejemplo es el de la avispa del pino *Neodiprion sertifer*, cuyas hembras oviponen en árboles de menor valor nutricional pero que en condiciones naturales le confieren a la descendencia mayor protección contra enemigos naturales (Björkman et al., 1997). Si bien no se conoce la ventaja que llevaría a las hembras de *N. oligospilus* a elegir hospederos que afectan negativamente el desempeño de sus larvas, se conocen otras especies del género *Nematus* que aprovechan los metabolitos de las plantas como parte de la estrategia defensiva de sus larvas. Varias especies de avispa sierra, secuestran en la hemolinfa compuestos de la planta hospedera con efectos disuasorios sobre los depredadores como las aves y hormigas (Schaffner et al., 1994; Müller et al., 2001; Boevé y Schaffner, 2003). Estos se liberan de a gotas a través de glándulas ventrales en el abdomen ante el ataque de un depredador, defensa conocida como “sangrado fácil” (Boevé y Schaffner, 2003). Dado que la química del insecto suele estar estrechamente vinculada a la de la planta hospedera, la preferencia de las hembras de *N. oligospilus* por plantas con concentraciones altas de salicinoides, podría estar asociada a una estrategia defensiva en la que las larvas secuestran estos compuestos con una función protectora frente a los depredadores. Sin embargo, la estrategia defensiva de “sangrado fácil” no fue verificada en esta especie.

A pesar de que los efectos de la hibridación sobre la química foliar de las salicáceas son muy variables (p.ej. un perfil intermedio, menor o mayor en la composición de salicinoides entre sauces híbridos y sus parentales; Orians et al., 1997; Hallgren et al., 2003; Torp et al., 2013), en algunos casos la hibridación puede ser una ventaja contra los insectos generando plantas más resistentes que sus progenitoras. Los álamos híbridos generados con *Populus maximowiczii* como álamo parental han demostrado una mayor resistencia contra los adultos y las larvas del coleóptero barrenador del álamo y el sauce *Cryptorhynchus lapathi*, atribuible a una alta concentración de taninos condensados (Broberg et al., 2010). La preferencia de los crisomélidos *Calligrapha multipunctata* y *Plagiodera versicolora* por los híbridos de sauce con bajas concentraciones de salicinoides podría indicar que estos compuestos presentan un efecto disuasorio sobre estos insectos (Orians et al., 1997). Con el fin de explotar eficazmente la variación en la resistencia de los sauces contra *N. oligospilus*, es esencial una mejor comprensión de la genética de la susceptibilidad y cómo se hereda en la progenie híbrida. En los resultados de este capítulo se mostró al sauce híbrido Lezama (*S. matsudana* x *S. nigra*) como el genotipo más

preferido para la oviposición de las hembras y por lo tanto el más susceptible a ese insecto. Tanto el perfil de salicinoides en alta concentración como la gran susceptibilidad a la avispa sierra, fueron rasgos compartidos entre este sauce híbrido y su parental *S. nigra* (Fernández et al., 2019). Esto sugiere que los salicinoides actuarían como un factor de susceptibilidad al formar parte de las claves de reconocimiento de *N. oligospilus*. Los salicinoides podrían ser un rasgo por considerar e identificar en los programas de mejoramiento genético de salicáceas utilizando los genotipos menos susceptibles (i.e. con menor concentración de salicinoides) como parentales a la hora de producir progenie híbrida y verificar si el producto de dichos cruzamientos contribuye a mantener controlada a la avispa sierra en las plantaciones de sauces.

## **Capítulo 4:**

**Efectos de la oviposición del herbívoro  
especialista *N. oligospilus* sobre *Salix babylonica*  
*var sacramenta***

## 4.1. Introducción

Las plantas suelen responder al daño causado por los insectos herbívoros, desarrollando a menudo respuestas específicas según el tipo de daño que reciben. La respuesta de la planta ante la percepción de la oviposición involucra la inducción de defensas que actúan directa y/o indirectamente sobre los huevos o sobre las larvas que nacen de ellos. Como fue detallado en el Capítulo 1, las defensas directas actúan expulsando o matando los huevos de los insectos (Doss et al., 2000; Desurmont y Weston, 2011; Fatouros et al., 2012; Yang et al., 2013), mientras que las defensas indirectas se basan en la atracción de parasitoides de huevos y/o larvas, a través de la emisión de COVs inducidos por oviposición (Meiners y Hilker, 2000; Bruce et al., 2010). La oviposición de los insectos también puede afectar la calidad de la planta como fuente de alimento e influir en el desempeño de las larvas neonatas. Esto se ha observado principalmente en plantas anuales (diversas brasicáceas, Geiselhardt et al., 2013; Pashalidou, 2015a; solanáceas, Kim et al., 2012; Bandoly et al., 2015, y fabáceas Rondoni et al., 2018) y con menos frecuencia en plantas leñosas perennes (como el olmo, Austel et al., 2016; Schott et al., 2021, y el pino, Beyaert et al., 2010). Además, para varias especies de plantas se ha demostrado que los huevos actúan como una señal de alarma previa que las prepara para responder de forma más fuerte y rápida a la herbivoría futura de las larvas (conocido como *priming*; Frost et al., 2008).

Una de las estrategias defensivas más comunes de las plantas frente a la oviposición de los insectos es la modificación cuali y/ cuantitativa en la emisión de volátiles (Hilker y Meiners, 2011). Esto puede ocurrir incluso antes de que las larvas comiencen a dañar el tejido vegetal. En varias especies de plantas, los cambios en la emisión COVs inducidos por oviposición consisten principalmente en el aumento de terpenoides y/o en la reducción de determinados volátiles de hoja verde que atraen específicamente a parasitoides de huevos y/o larvas (Hilker y Fatouros, 2015). A su vez, la composición de volátiles puede variar de forma específica según el estado de desarrollo del insecto que ataca a la planta (Clavijo McCormick et al., 2012), donde la mezcla de COVs emitidos en respuesta a la puesta de huevos difiere de la mezcla emitida frente al daño ocasionado por la alimentación de las larvas (Hilker y Meiners, 2011; Pashalidou et al., 2015b). Aunque estudios previos han investigado los volátiles inducidos por la alimentación de insectos herbívoros en plantas de salicáceas (Yoneya y Takabayashi, 2013; Clavijo McCormick et al., 2019; Valladares et al., 2020), se conoce poco sobre la especificidad de la emisión de volátiles según la etapa de desarrollo del herbívoro. Además, no hay información sobre las

respuestas de los metabolitos asociados a las defensas características de las salicáceas a la oviposición (i.e. salicinoides) ni de su regulación fitohormonal.

Las respuestas defensivas de las plantas frente a los herbívoros suelen estar reguladas principalmente por fitohormonas como el ácido jasmónico (JA), el ácido salicílico (SA) y el ácido abscísico (ABA) (Erb y Reymond, 2019). Se ha reportado que el JA y el SA median la respuesta de plantas que han experimentado una oviposición previa y que luego fueron dañadas por larvas conespecíficas (Meiners y Hilker, 2000; Mumm et al., 2003; Little et al., 2007; Bruessow et al., 2010). La activación de las vías de señalización de las fitohormonas frente a la herbivoría de las larvas e inducida por la oviposición del insecto son conocidas en brasicáceas (p.ej. *Arabidopsis thaliana* y *Brassica nigra*: Bonnet et al., 2017; Valsamakis et al., 2020) solanáceas (p.ej. *Nicotiana attenuata*, y *Solanum lycopersicum*: Bandoly et al., 2015; Kim et al., 2012, y en dos especies de plantas leñosas (pino: *Pinus sylvestris*, Bittner et al., 2019; y olmo: *Ulmus minor*, Büchel et al., 2012). Particularmente en *Populus spp.* Se observó que la alimentación de los insectos sobre las hojas induce un aumento local de los niveles de ABA y JA, acompañado de cambios en la emisión de COVs, en la expresión de genes que codifican para inhibidores de proteasas y de un aumento en los niveles de taninos condensados (Boeckler et al., 2013; Clavijo McCormick et al., 2019; Eberl et al., 2021). La regulación de estas respuestas defensivas se encuentra aún en estudio y no se han reportado los efectos de la oviposición en la respuesta defensiva de salicáceas.

La oviposición de *N. oligospilus*, a diferencia de otros insectos (p.ej. lepidópteros, Berteaux et al., 2020), causa daños en el tejido de las hojas. Las hembras colocan sus huevos en la epidermis foliar, o entre ésta y la capa subyacente de clorénquima (Braccini et al., 2013). Con el ovipositor, la hembra daña y empuja la epidermis foliar generando una pequeña cavidad donde coloca el huevo y, posteriormente, lo cubre con una secreción del oviducto (Braccini et al., 2013). Los huevos eclosionan a los ~ 5 días de la oviposición y cada larva nacida realiza un orificio de alimentación, que se realiza siempre a una distancia de ~3 mm del corion del huevo (observación personal). Este comportamiento de la larva fue observado tanto en el laboratorio, como en condiciones de campo y en diferentes genotipos de sauces (observación personal), sugiriendo que podrían estar evitando una defensa inducida alrededor del huevo. Dado que el proceso de deposición de los huevos de *N. oligospilus* produce una lesión, el daño por oviposición podría ser percibido en las hojas de *Salix spp* e inducirse una respuesta química que afecte el desempeño de las larvas de avispa sierra. Para probar esta presunción se eligió como sauce modelo a la variedad Soveny Americano (*Salix babylonica* var *sacramenta*), uno de los clones con

mayor superficie cultivada en el Delta del Paraná (Borodowski y Suárez, 2004; Signorelli y Gaute, 2012).

Objetivo específico II:

El objetivo de este capítulo fue evaluar la respuesta de *S. babylonica* var *sacramento* frente al daño ocasionado por la oviposición de *N. oligospilus* y su efecto sobre el desempeño del insecto. Específicamente se evaluó:

II a) El impacto de la oviposición previa de *N. oligospilus* sobre el crecimiento y desarrollo del insecto.

II b) Los efectos de la oviposición de *N. oligospilus* sobre la acumulación de fitohormonas, salicinoides y de compuestos orgánicos volátiles.

Hipótesis II:

II a) La oviposición sobre las hojas desencadena una respuesta defensiva inducida en *S. babylonica* que afecta posteriormente el desempeño de la avispa sierra.

II b) La oviposición sobre las hojas actúa como un estímulo de *priming*, preparando a la planta para la inminente herbivoría de las larvas a través de la emisión de compuestos volátiles.

Predicción II:

II a) La oviposición en las plantas aumentará el nivel de fitohormonas, salicinoides y la composición y concentración de compuestos orgánicos volátiles y se afectará negativamente el crecimiento y desarrollo de la avispa sierra sobre *S. babylonica*.

II b) La concentración de los compuestos orgánicos volátiles será mayor luego de la herbivoría de las larvas si las plantas recibieron oviposición previa, respecto a plantas que no fueron sometidas a la oviposición de las hembras.

## 4.2. Materiales y métodos

### 4.2.1. Plantas e insectos

Se utilizaron estacas del sauce *Salix babylonica* var *sacramento* (Soveny Americano) que se obtuvieron de sauces del estaquero de FAUBA. Las estacas se plantaron



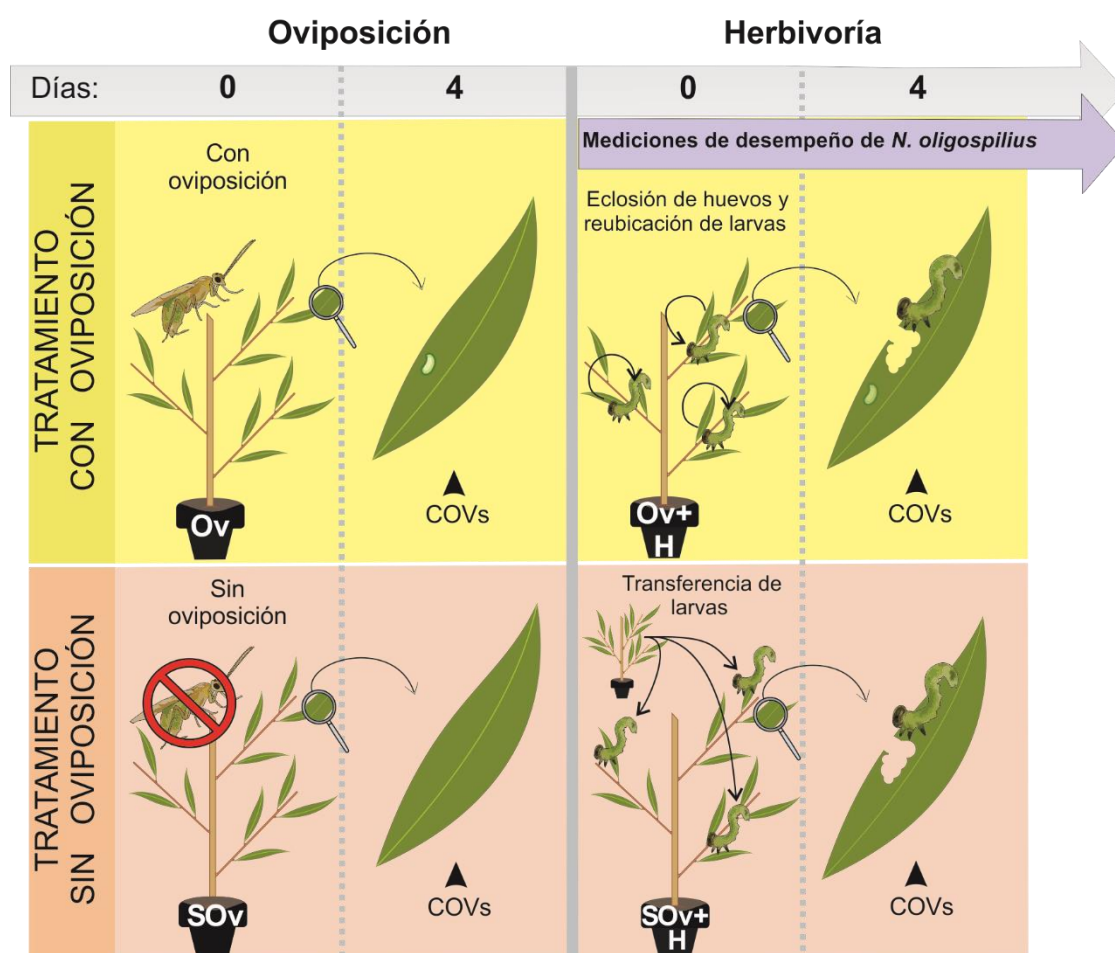
individualmente en macetas durante el final del invierno de 2017 y 2018 y se mantuvieron al aire libre en condiciones naturales (para más detalle ver **Metodología general, sección 2.1.1**). Tras 4 meses de crecimiento, las plantas en maceta fueron sometidas a bioensayos. Todas las plantas analizadas medían aproximadamente 1,5 m de altura y tenían aproximadamente 100-150 hojas. Las plantas en maceta se trasladaron 24 h antes de los tratamientos, desde el exterior hacia una cámara de ambiente controlado (25 °C, L16: D8, intensidad de luz 350  $\mu\text{mol/ m s}$ ), y se mantuvieron en esas condiciones hasta la finalización de los experimentos. Se comprobó que las hojas no presentaran daños causados por los insectos antes de colocarlas en las cámaras.

En todos los bioensayos se utilizaron hembras adultas y larvas de *N. oligospilus* procedentes de una población de laboratorio en una cámara de ambiente controlado a 25 °C y fotoperiodo L16:D8 h. En estas condiciones, el desarrollo de los huevos dura 5 días. Para detalles sobre la cría de la avispa sierra ver **Metodología general, sección 2.1.2**.

## 4.2.2. Diseño experimental y muestreo de plantas

### Diseño experimental I

Este ensayo se diseñó para estudiar los efectos de la oviposición previa sobre el desempeño de *N. oligospilus* y sobre la emisión de COVs luego de la herbivoría posterior de las larvas. Para ambos experimentos se utilizaron los mismos grupos de plantas, sometidos al mismo esquema experimental con dos tratamientos secuenciales: 1) Oviposición y 2) Herbivoría (Fig. 4.1). Los tratamientos se llevaron a cabo en pares de sauces (p.ej. tratamiento con oviposición vs. tratamiento sin oviposición) de forma simultánea. Cada par de sauces fue tratado en semanas diferentes y consecutivas a lo largo de la temporada de verano (es decir, cada semana se consideró como un factor aleatorio de bloqueo del diseño experimental). Los tratamientos fueron categorizados de la siguiente manera: SOv= sin oviposición, Ov= con oviposición de *N. oligospilus*, Ov+H= oviposición seguida de herbivoría y SOv+H= sin oviposición, pero con herbivoría de larvas de *N. oligospilus*.



**Figura 4.1.** Esquema del diseño experimental I para evaluar el desempeño de *N. oligospilus* y la emisión de volátiles de *S. babylonica* var *sacramenta*. Las plantas fueron sometidas a dos tratamientos secuenciales: oviposición (4 días de desarrollo de los huevos) y herbivoría (4 días de alimentación de las larvas). Un primer grupo de sauces fue sometido la oviposición de las hembras (Ov). Un segundo grupo se dejó sin oviposición (SOv). Las plantas Ov y SOv fueron sometidas a la herbivoría de larvas neonatas desde el día de su eclosión (Día 0 del tratamiento Herbivoría). Las plantas Ov+H fueron dañadas con larvas neonatas nacidas de huevos depositados *in situ*. Las plantas SOv+H llevaban neonatos transferidos de otros sauces adicionales no experimentales que presentaban huevos. Las flechas de COVs indican el momento en que se midió la emisión de compuestos orgánicos volátiles. A partir del Día 0 de Herbivoría se comenzó con el seguimiento para la evaluación del desempeño de la avispa sierra.

Para obtener plantas con oviposición (Ov, Fig. 4.1), cada sauce intacto en maceta se encerró en una bolsa de *voile* y se liberaron 15-20 hembras para que ovipongan libremente durante 1 a 5 horas (el 80% de las hojas presentaron al menos un huevo). Cada planta con oviposición tuvo un total de 200-250 huevos (unos  $3.6 \pm 0.2$  huevos por hoja). Este procedimiento permitió obtener una carga de huevos comparable entre las réplicas de plantas y también garantizó una eclosión sincrónica de los huevos para poder seguir correctamente el desempeño de las larvas.

Para obtener plantas dañadas por herbivoría (plantas Ov+H y SOv+H; Fig. 4.1) se permitió a las larvas recién nacidas que se alimentaran de las hojas durante cuatro días. Para ello, las plantas sin oviposición previa recibieron un total de 100 neonatos (aprox.), uno por hoja (plantas SOv+H; Fig. 4.1). Estas larvas fueron transferidas con un pincel desde sauces de *S. babylonica* adicionales no experimentales que contenían huevos (Fig. 4.1). La transferencia se realizó inmediatamente después de la eclosión de los huevos (incluso antes de que las larvas dañaran la hoja). Simultáneamente, otros 100 neonatos (aprox.) recién nacidos de los huevos presentes en plantas que recibieron oviposición previa, fueron movidos con un pincel e inmediatamente colocados junto al huevo eclosionado (planta Ov+H; Fig. 4.1). Este procedimiento garantizó que todas las larvas analizadas experimentaran la misma manipulación con el pincel y que todas las plantas estuvieran expuestas al mismo número de larvas alimentándose. Los neonatos restantes que nacieron de las plantas Ov+H se descartaron. En este caso, se utilizaron menos larvas que el número de huevos permitido en la medición anterior para evitar una defoliación masiva.

La recolección de volátiles se realizó en cada grupo experimental: después de 4 días de desarrollo de los huevos (Ov y SOv; Fig. 4.1) y después de 4 días de herbivoría de las larvas (Ov+H y SOv+H; Fig. 4.1). En las plantas que habían sido sometidas a daños por herbivoría (Ov+H y SOv+H; Fig. 4.1), se retiraron momentáneamente las larvas, una hora antes de la colecta de volátiles. Las mismas se transfirieron a cajas de plástico transparentes que contenían ramas frescas cortadas (10 cm de longitud) de *S. babylonica* var *sacramenta* no dañadas y se mantuvieron allí durante el muestreo de volátiles (6 h) en otra cámara. Una vez finalizada la recolección, las larvas fueron devueltas a una hoja del sauce del que provenían, para continuar el estudio de desempeño de *N. oligospilus*.

## Diseño experimental II

Este experimento se diseñó para estudiar el efecto de la oviposición de *N. oligospilus* sobre la acumulación de fitohormonas y salicinoides en las hojas de *S. babylonica*. Para ello, se seleccionaron hojas individuales de sauces en maceta, se encerró cada hoja en una bolsa de *voile* y se liberaron dentro 3 hembras de *N. oligospilus* para la puesta de huevos (tratamiento: hojas con huevos). Luego se cosecharon las hojas cuatro días después del día de la oviposición (20-60 huevos puestos por hoja). Dado que la avispa sierra causa una herida muy pequeña en la hoja durante la oviposición, se utilizó una carga mayor de huevos por hoja, respecto del *Diseño experimental I*, para aumentar la probabilidad de respuesta fitohormonal. Simultáneamente, se cosecharon hojas de sauces en maceta que no fueron sometidos a oviposición (tratamiento control: hojas sin huevos).

En todos los casos se cosecharon al mismo tiempo hojas maduras en una posición equivalente (dos hojas por control y dos por planta con huevos). Cada par de sauces fue tratado en semanas diferentes y consecutivas a lo largo de la temporada de verano (es decir, cada semana se consideró como un factor aleatorio de bloqueo del diseño experimental).

Debido al hecho de que los huevos son puestos dentro de la epidermis (Braccini et al., 2013), éstos no pueden ser removidos sin dañar la hoja. Por este motivo, se procesaron las muestras de hojas con los huevos adentro. Para comprobar la posibilidad de que los huevos contuvieran un nivel de fitohormonas que pudiera interferir con el análisis de las hojas, se tomaron tres muestras de huevos del oviducto de hembras recién emergidas y se cuantificó su contenido químico. Las hembras se diseccionaron bajo un microscopio estereoscópico (Olympus SZ61, Tokio, Japón) para extraer los ovarios y aislar los oocitos. Cada muestra de oocitos constaba de 400-1300 huevos (i.e. sin discriminar por estadio de maduración) y se muestrearon aproximadamente de 10-30 hembras. Las hojas y los oocitos de las hembras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta el análisis de fitohormonas y salicinoides.

#### **4.2.3. Análisis de fitohormonas y salicinoides**

Las hojas y los oocitos de las hembras del *Diseño experimental II* se liofilizaron y se molieron hasta obtener un polvo fino, se extrajeron con metanol y se analizaron mediante HPLC-MS (para fitohormonas) y HPLC-DAD (para salicinoides). Los resultados del contenido de fitohormonas y salicinoides fueron relativizados al peso seco de la muestra de hojas (ng/g).

Para mayor detalle sobre la extracción, análisis y cuantificación de estos compuestos, ver **Metodología general, sección 2.3 y 2.4.1.**

#### 4.2.4. Desempeño de *N. oligospilus*

Se eligió al azar un grupo de 10-12 larvas recién nacidas en cada de sauce de las plantas con y sin oviposición y se determinaron las siguientes variables: Crecimiento larval de 1 día, tiempo de desarrollo larval y prepupal, biomasa larval, biomasa pupal, proporción de prepupas tardías y supervivencia larval (Fig. 4.2).

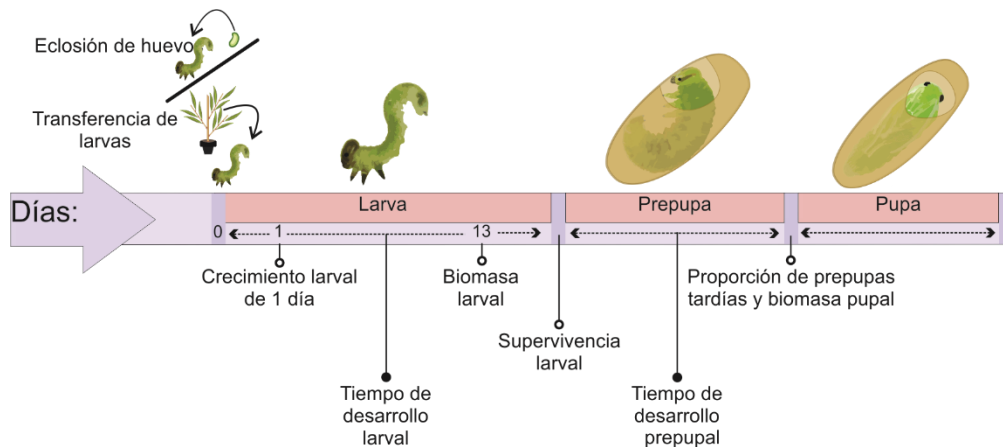
Para estimar el *crecimiento larval de 1 día*, se midió el tamaño de las larvas neonatas a la hora de haber sido transferidas y a las 24 horas posteriores (Fig. 1 y 2). Se eligió una medición indirecta del tamaño porque las larvas neonatas son muy pequeñas y delicadas, por lo que su manipulación para pesarlas provoca su muerte (Valladares et al., 2020). Se fotografiaron las mismas larvas a la hora y a las 24 horas luego de nacer con una cámara digital (Canon EOS 700 D Rebel T5i) ajustada a un microscopio estereoscópico (Olympus SZ61, Tokio, Japón). En el campo visual se colocó una regla milimétrica para escalar la medición. El área de las larvas se delimitó mediante una vista dorsal del cuerpo que incluía la cabeza, el tórax y el abdomen, excluyendo las patas. Esto se cuantificó mediante el software de procesamiento de imágenes, ImageJ versión 1.45 s (National Institute of Health, Bethesda, Maryland). Por último, se calculó el *crecimiento larval de 1 día* como la diferencia entre el área de las larvas, luego de una y de 24 horas de vida.

Luego de 13 días de alimentación en plantas con y sin oviposición, las larvas se transfirieron a cajas de plástico transparente (33 × 23 × 14 cm) que contenían ramas frescas cortadas (10 cm de longitud) de plantas de *S. babylonica* sanas, mantenidas hidratadas en pequeños frascos con agua corriente. Las ramas se reemplazaban por otras frescas cada dos días. Las larvas continuaron su desarrollo dentro de las cajas, hasta que se completó el ciclo.

El *tiempo de desarrollo de las larvas* se estimó como el número de días transcurridos desde la eclosión del huevo hasta el inicio del armado del capullo (Fig. 4.2). La *biomasa de las larvas* se midió a los 13 días de desarrollo (próximas a empupar), pesándolas en una balanza (Denver Instrument TP 214, sensibilidad 0.1 mg) (Fig. 4.2). La *supervivencia de las larvas* se estimó como la proporción de larvas que armaron el capullo para empupar (es decir, número de neonatos transferidos o nacidos *in situ*/número de capullos totales formados, Fig. 4.2).

El *tiempo de desarrollo prepupal* se midió como el número de días en que las prepupas tardaron en cambiar al estado de pupa (el tiempo transcurrido entre el armado del capullo realizado por larvas maduras del último estado y la adquisición de la morfología de pupa, Fig. 4.2). La fase de capullo dura normalmente entre 7 y 10 días (incluyendo los estados

de prepupa y pupa, tras la cría en *S. babylonica* a 25°C, Alderete 2005), pero hay un porcentaje de prepupas que tardaron más en este ensayo (más de 10 días como lo reportado anteriormente por Alderete, 2005). Debido a esto, todas las prepupas fueron cuantificadas y clasificadas en *regulares* (igual o menos de 10 días dentro del capullo) y *tardías* (más de 10 días dentro del capullo). La *proporción de prepupas tardías* se estimó como el número de prepupas tardías/total de prepupas. Para cuantificar la *biomasa de las pupas*, éstas se extrajeron del capullo cuando el insecto adquirió una morfología adulta inmadura en la que se observaron patas, pterotecas y alas distinguibles (Ovruski y Smith,1993), y luego se pesaron (ver pupa en Fig. 4.2). Los estados dentro del capullo se identificaron bajo lupa binocular 40x (Olympus SZ61, Tokio, Japan), generando una pequeña abertura en uno de los extremos que se volvía a cerrar cuidadosamente sin afectar el desarrollo normal del insecto (procedimiento según Alderete 2005).



**Figura 4.2.** Variables de desempeño de *N. oligospilus* determinadas en *S. babylonica* var *sacramenta* con y oviposición. Los números indican el día de desarrollo en el que se registró la medición. El día 0 se refiere a la eclosión del huevo o a la transferencia del neonato desde la planta adicional no experimental. Los tiempos de desarrollo de cada estado están indicados con círculos negros y se encuentran representados con una doble flecha punteada. Las franjas violetas entre estados delimitan el momento de la transición de un estado a otro.

#### 4.2.5. Colecta de volátiles y análisis químico

Las plantas del *Diseño experimental I* se colocaron en una cámara de condiciones ambientales controladas. Fueron iluminadas desde arriba con lámparas LED azules y rojas y con una lámpara de haluro metálico de alta presión, de una intensidad de luz de 350  $\mu\text{mol/m s}$ . Las muestras de espacio de cabeza se tomaron encerrando toda la planta (de

aproximadamente 1 m de altura) en una bolsa de polietileno, que luego se eluyeron con un solvente conteniendo un estándar interno y se analizaron mediante GC-MS.

Se utilizaron bolsas vacías para realizar los blancos de sistema y poder restar los contaminantes. Los volátiles detectados se cuantificaron con el área de cada pico del cromatograma de iones totales relativizada al área del estándar interno. Los compuestos se expresaron como el equivalente en masa del estándar interno (ng/μl). Previamente, se restaron los valores del blanco de las muestras.

Para detalles sobre la colecta de volátiles, elución, parámetros de la corrida cromatográfica e identificación de los compuestos ver **Metodología general, sección 2.2**.

#### 4.2.6. Análisis estadístico

El efecto de la oviposición sobre las concentraciones de fitohormonas y salicinoides en las hojas de sauce se realizó con un LMM para cada compuesto.

Para evaluar si la oviposición previa afectaba al desempeño de *N. oligospilus*, se realizó un LMM para cuatro de las variables de las larvas: crecimiento larval de 1 día, tiempo de desarrollo larval, biomasa larval y pupal. Para el análisis de la proporción de prepupas tardías y la supervivencia de las larvas, se realizó un GLMM con distribución binomial y logit como función de enlace. Para todas las variables de desempeño, se tomó el tratamiento de oviposición (OV) como parte fija del modelo y a la semana (factor de bloqueo) y la planta (para evitar la pseudoreplicación) como efectos aleatorios anidados. El histograma y el gráfico de densidad de la distribución del tiempo de desarrollo de las prepupas se construyó con el paquete ggplot2 (Wickham, 2016) y el cálculo de los días de desarrollo promedio de las prepupas regulares y tardías se realizó con el paquete plyr (Wickham, 2011).

Para determinar las diferencias entre los compuestos individuales y los volátiles totales, se realizó un GLMM con diseño de medidas repetidas. El modelo consistió en una distribución gamma con función de enlace logarítmica. Los tratamientos de oviposición (OV) y daño por herbivoría (HE), y sus interacciones (OVxHE) se colocaron como efectos fijos; la semana y la planta como efectos aleatorios anidados. Para identificar un patrón en las mezclas de volátiles relacionado con los tratamientos de la planta (OV y HE), las concentraciones relativas de todos los componentes volátiles se sometieron a un análisis de correspondencia multivariado para todos los tratamientos con los paquetes FactoMineR (Lê et al., 2008) y factoextra (Kassambara y Mundt, 2020). Se seleccionaron para el análisis

aquellos componentes principales que explican la variabilidad de forma significativa. A los compuestos volátiles que no eran detectables, se les asignó un valor de cero en la muestra correspondiente.

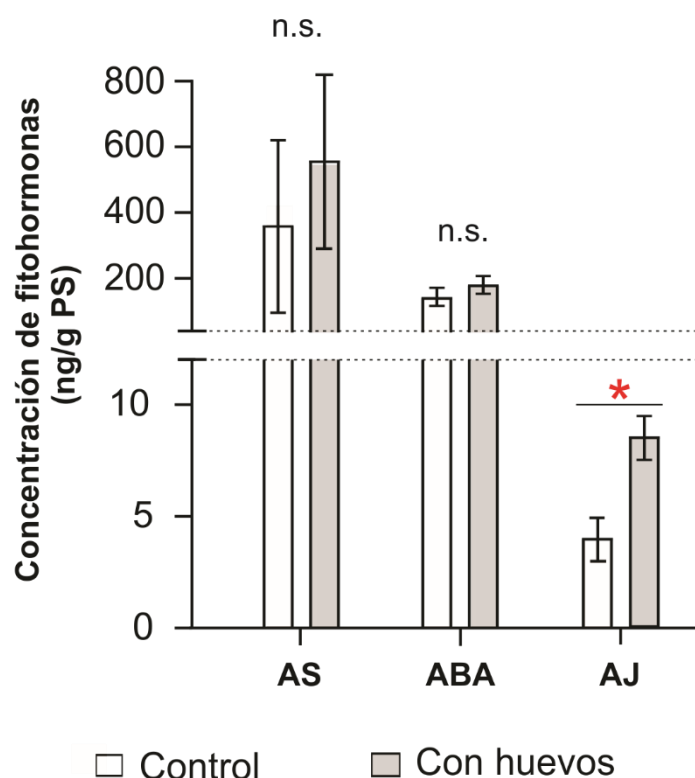
Para detalles en cuanto al uso de paquetes de RStudio para realizar los modelos LMM y GLMM, ver **Metodología general, sección 2.5**.

### **4.3. Resultados**

#### **4.3.1. Efecto de la oviposición sobre las fitohormonas y los salicinoides del sauce americano**

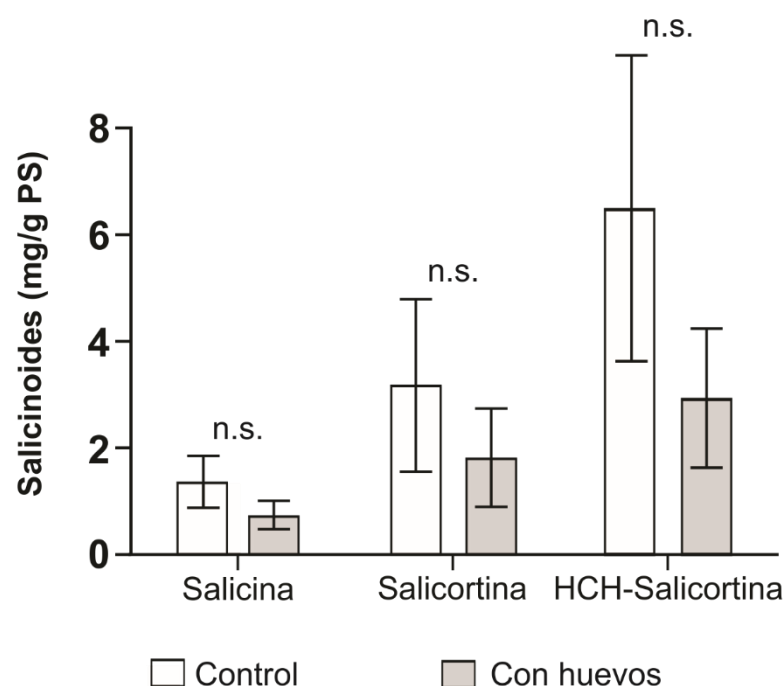
Entre las fitohormonas analizadas, sólo los niveles de JA se incrementaron en respuesta a la oviposición luego de 4 días de desarrollo del huevo ( $P=0.01$ ; Fig. 4.3). Las concentraciones promedio de SA y ABA no difirieron significativamente entre las hojas con y sin oviposición ( $P=0.5$  y  $P=0.36$ , respectivamente). Para descartar que los huevos *per se* no contengan una cantidad basal de fitohormona que interfiera en el estudio, se analizaron los oocitos de las hembras. Estas muestras también presentaban SA, ABA y JA, pero sus concentraciones promedio eran 6, 8 y 100 veces inferiores a las muestras control de hojas sin huevos, respectivamente (medias y valores de error estándar:  $77.5 \pm 2.6$ ;  $3.5 \pm 0.5$ ;  $0.7 \pm 0.3$  ng/g de peso seco). Teniendo en cuenta que esos niveles de fitohormonas correspondían a 2000 huevos aproximadamente, concluimos que su contribución a la cuantificación fitohormonal de la hoja fue insignificante.





**Figura 4.3.** Niveles de fitohormonas (mg de compuesto/ g de peso seco de hoja) de *S. babylonica* var *sacramento* en hojas control sin huevos (barras blancas) y con huevos de cuatro días de desarrollo (barras grises). Concentraciones de ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA) y ácido jasmónico (JA) en los tratamientos. Se muestran las medias  $\pm$  los errores estándar estimados para todos los valores. El análisis estadístico de los valores medios se realizó mediante LMM entre tratamientos. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre las hojas control y con huevos para JA ( $P < 0.05$ ). No se encontraron diferencias significativas en el resto de los compuestos (n.s.:  $P > 0.05$ ). Repeticiones biológicas (plantas) por tratamiento: N=4.

Por otro lado, los niveles de los salicinoides identificados mostraron una tendencia hacia la disminución de sus concentraciones promedio frente a la oviposición, pero no se obtuvieron diferencias significativas en ningún compuesto (salicina:  $P = 0.26$ ; salicortina:  $P = 0.13$ ; HCH-salicortina:  $P = 0.06$ ; Fig. 4.4). Solamente se observó una tendencia en la HCH-salicortina, donde su concentración promedio fue menor en hojas con huevos respecto a hojas control (Fig. 4.4).

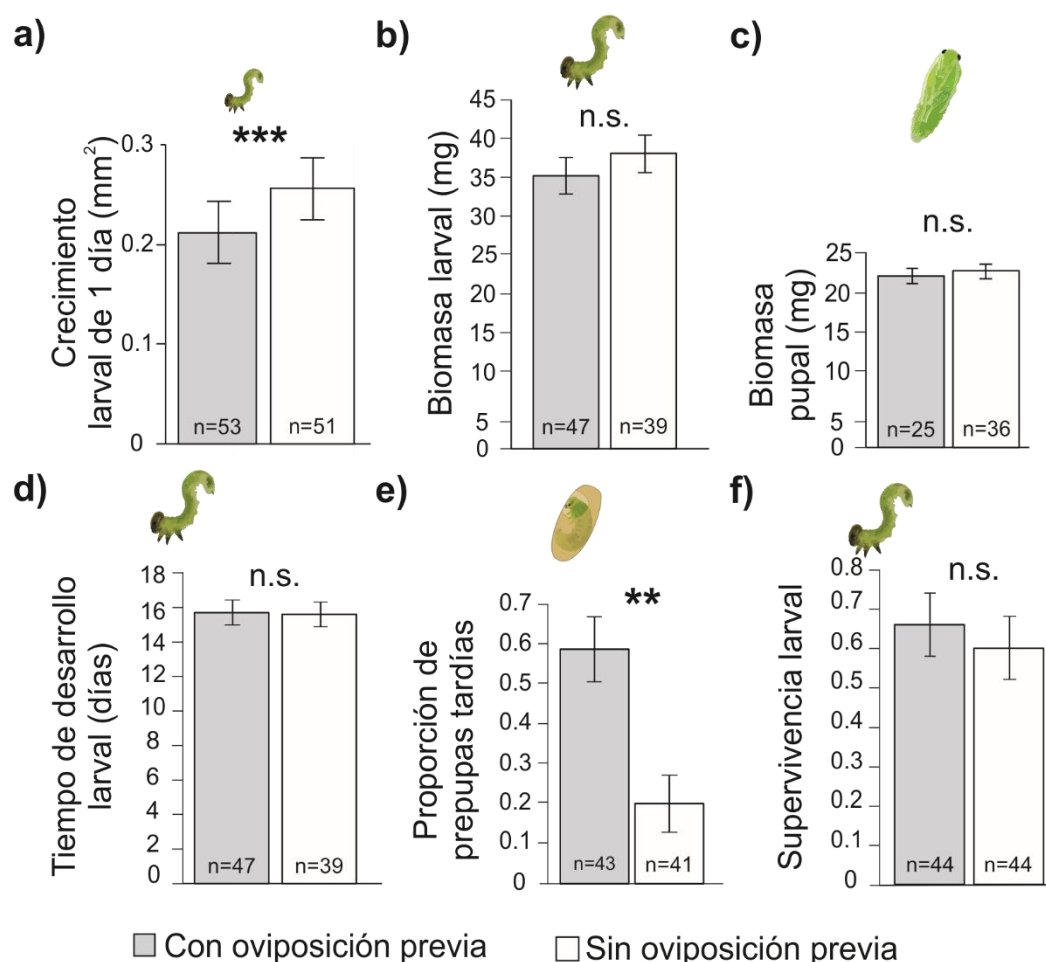


**Figura 4.4.** Nivel de salicinoides (mg de compuesto / g de peso seco de hoja) de *S. babylonica* var *sacramenta* en hojas control sin huevos (barras blancas) y con huevos de cuatro días de desarrollo (barras grises). Se muestran las medias  $\pm$  los errores estándar estimados para todos los valores. El análisis estadístico de los valores medios se realizó mediante LMM entre tratamientos. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los compuestos (n.s.:  $P > 0.05$ ). Repeticiones biológicas (plantas) por tratamiento:  $N=4$ .

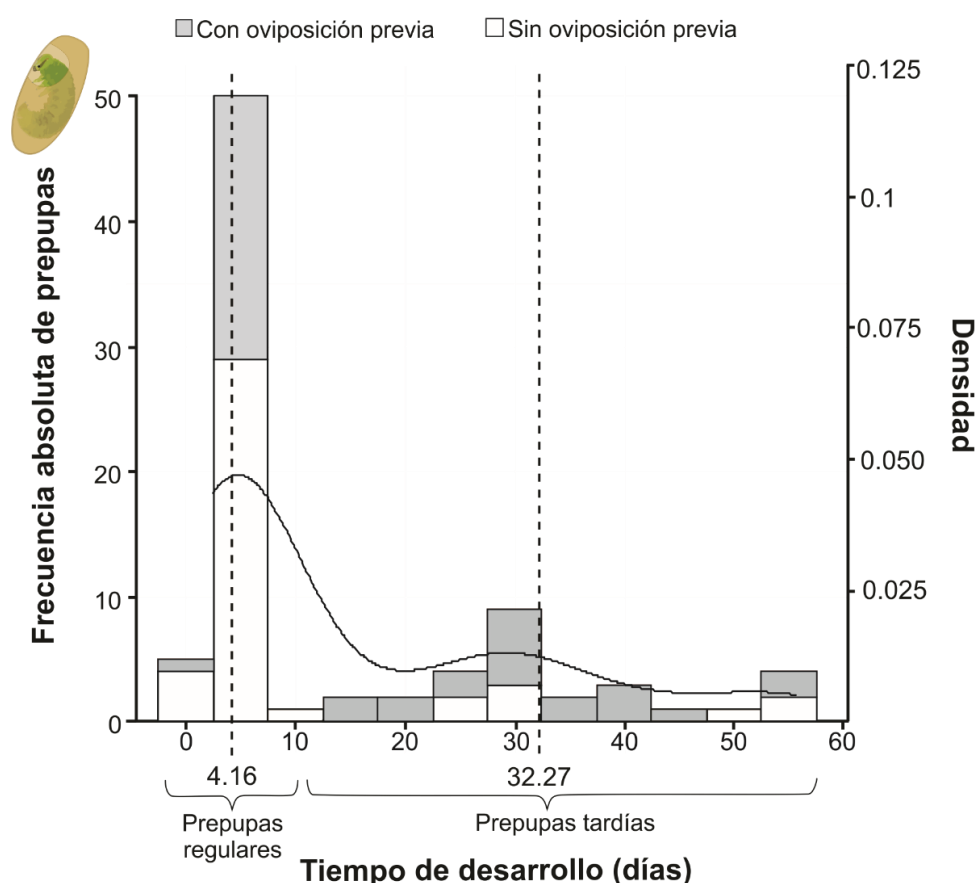
#### 4.3.2. Efecto de la oviposición en el desempeño de la avispa sierra

La oviposición afectó al desempeño de *N. oligospilus* en dos de los estados del ciclo de vida: larval neonato y prepupal. Las larvas de 1 día de vida que habían empezado a alimentarse en plantas con oviposición (Ov+H) tuvieron un crecimiento menor que aquellas que se alimentaron en plantas sin huevos (SOv+F;  $P=0.003$ ; Fig. 4.5a). El peso medio de la biomasa de las larvas maduras (es decir, de 13 días) en Ov+H no difirió significativamente de SOv+H, pero fue marginalmente menor ( $P=0.08$ ; Fig. 4.5b). No se encontraron diferencias significativas en la biomasa de las pupas ( $P=0.28$ ; Fig. 4.5c) ni en el tiempo de desarrollo larval ( $P=0.95$ ; Fig. 4.5d). El desarrollo prepupal mostró una distribución de los datos de frecuencias bimodal y una distribución desigual entre los sauces con y sin huevos (Fig. 4.6). La moda mayor correspondió a la mayor frecuencia conformada por las prepupas regulares y coincidió con su tiempo de desarrollo medio ( $4.16 \pm 1.28$  días, Fig. 4.6). El tiempo de desarrollo medio de las prepupas tardías fue ocho veces mayor que el de las regulares ( $32.27 \pm 12.36$  días) y también se correspondió con la segunda frecuencia más alta (moda menor, Fig. 4.6). Cabe destacar que la distribución

mostró que las proporciones de prepupas regulares y tardías estaban asociadas con los tratamientos de oviposición (Fig. 4.6). Esto se evidenció por el hecho de que la proporción de prepupas tardías fue significativamente mayor cuando las larvas comenzaron su desarrollo alimentándose en plantas Ov+F en lugar de plantas SOv+F ( $P=0.007$ , Fig. 4.5e). Por otro lado, la oviposición no afectó la supervivencia de las larvas ( $P=0.45$ , Fig. 4.5f).



**Figura 4.5.** Desempeño de *N. oligospilus* sobre *S. babylonica* var *sacramenta* cuyas larvas se desarrollaron sobre sauces con oviposición (barras grises) y sin oviposición previa (barras blancas). Se muestran las medias  $\pm$  los errores estándar estimados para todos los valores. El análisis estadístico para los valores medios se realizó por LMM, y las proporciones por GLMM mediante la prueba de Wald  $\chi^2$ . Los asteriscos (\*\*/\*\*\*) indican diferencias significativas entre las larvas de las plantas Ov+F y SOv+F a  $P<0.01/0.001$ ; n.s.:  $P > 0.05$ . El número total de larvas por tratamiento se muestra dentro de cada barra. Repeticiones biológicas (plantas) por tratamiento: N=5.



**Figura 4.6.** Histograma y gráfico de densidad de la distribución del tiempo de desarrollo de las prepupas. La frecuencia absoluta de prepupas que se desarrollaron a partir de sauces con oviposición (barras grises) y sin oviposición (barras blancas) se muestra en cada barra del tiempo de desarrollo. El tiempo de desarrollo promedio de las prepupas regulares y tardías se indica con líneas verticales punteadas. La función de densidad de probabilidad estimada (línea sólida) muestra la distribución de frecuencia bimodal de los datos.

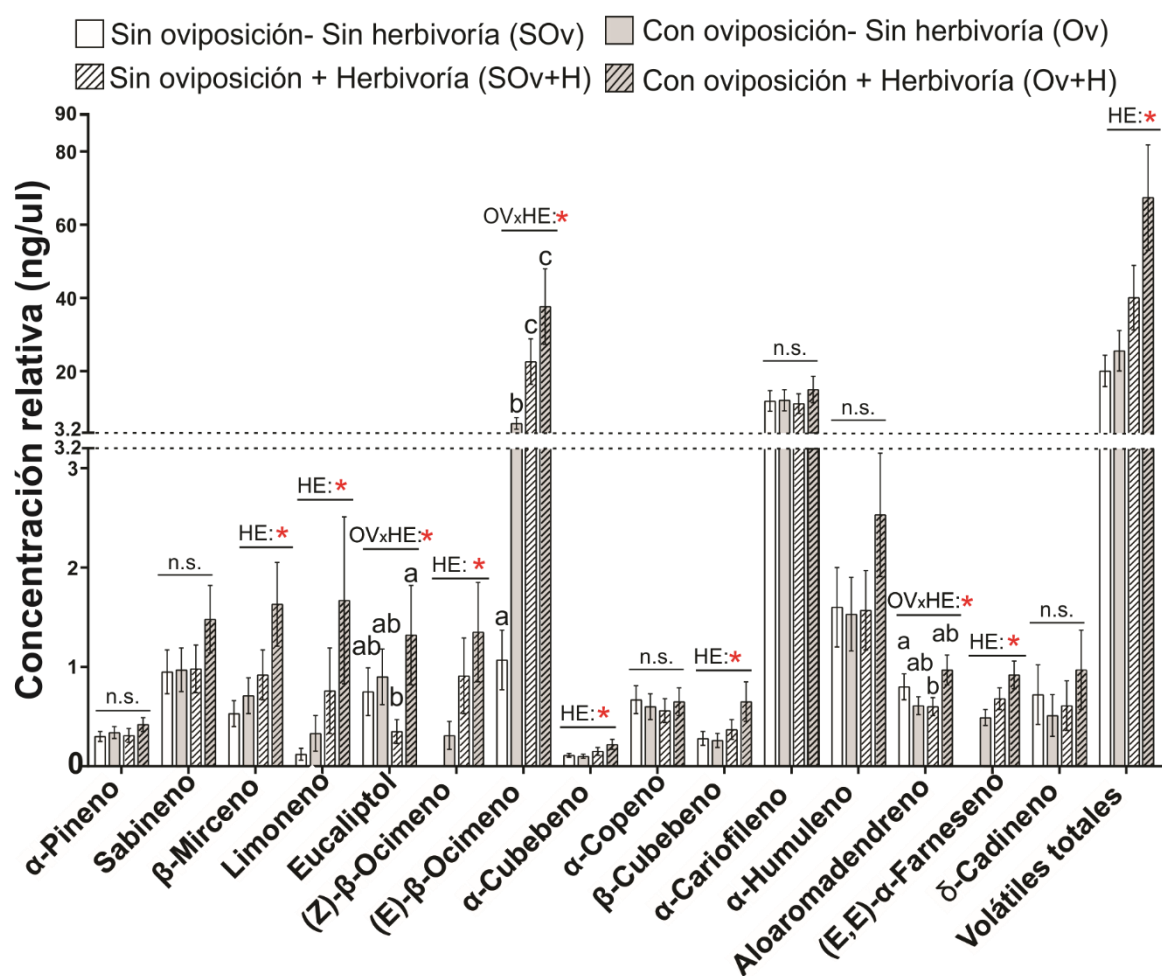
#### 4.3.3. Efecto de la oviposición y del daño por alimentación sobre la emisión de volátiles

Se identificaron un total de 13 compuestos en el tratamiento sin oviposición y sin herbivoría (SOv) y 15 compuestos en el resto de los tratamientos (Ov, Ov+H y SOv+H, Fig. 4.7; Tabla Anexa 1). El perfil de emisión es de origen terpenoide, abarcando mono y sesquiterpenos. Luego de la herbivoría, los mismos compuestos detectados en los sauces con oviposición (Ov+H) también se encontraron en los sauces sin oviposición (SOv+H; Tabla Anexa 1).

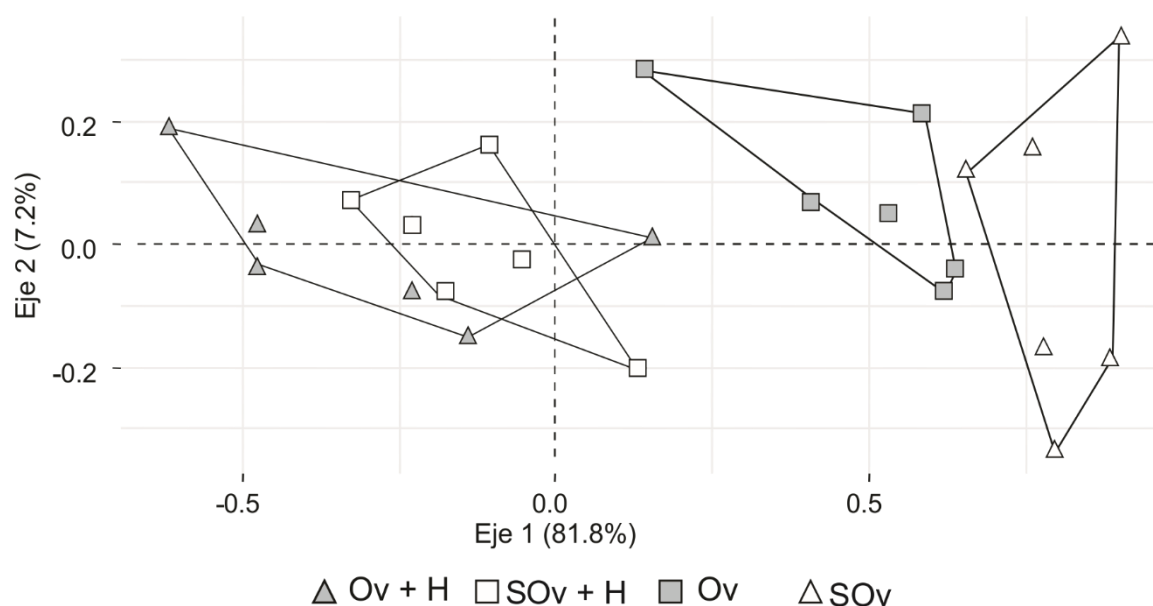
La oviposición en las hojas *per se* aumentó significativamente la cantidad de (E)- $\beta$ -Ocimeno respecto de los sauces sin oviposición (Ov/SOv:  $P=0.002$ ; Fig. 4.7). Además, otros dos compuestos, el (Z)- $\beta$ -Ocimeno y el  $\alpha$ -Farneseno, que fueron indetectables en

plantas sin oviposición, estuvieron presentes en el tratamiento con oviposición (Ov/SOv, Fig. 4.7) y se incrementaron con la herbivoría de las larvas (HE:  $P=0.05$  y  $P=0.03$  respectivamente; Fig. 4.7; Tabla Anexa 1). Con el tratamiento de herbivoría, los niveles de (E)- $\beta$ -Ocimeno aumentaron significativa e independientemente de la experiencia previa de oviposición (Ov/Ov+H:  $P=0.0008$ ; SOv/SOv+H:  $P<0.0001$ ; SOv+H/Ov+H:  $P=0.56$ ; Fig. 4.7; Tabla Anexa 1). Otros cuatro compuestos ( $\beta$ -Mirceno, Limoneno y  $\alpha$  y  $\beta$ -Cubebeno) también aumentaron significativamente tras el daño por herbivoría (HE:  $P<0.01$ ; Fig. 4.7; Tabla Anexa 1). Aunque la interacción fue altamente significativa para el Eucaliptol y el Aloaromadendreno, la prueba de Tukey no mostró diferencias entre las medias de las concentraciones de cada tratamiento (OVxHE;  $P<0.01$ ; Fig. 4.7; Tabla Anexa 1). El resto de los compuestos volátiles se mantuvo sin cambios en todos los tratamientos (n.s.; Fig. 4.7). La emisión total de volátiles aumentó significativamente en respuesta a la herbivoría, pero no se encontraron diferencias según la experiencia previa de oviposición (HE:  $P<0.001$ ; Fig. 4.7; Tabla Anexa 1).

Las concentraciones relativas de volátiles se sometieron a un análisis de correspondencia como técnica multivariada para visualizar las diferencias entre tratamientos. Los resultados mostraron que el principal patrón de variabilidad de los componentes volátiles estaba asociado a los tratamientos (oviposición y herbivoría), con el primer eje explicando el 81.8% de la inercia total (Fig. 4.8). El eje 1 contrastó el tratamiento de herbivoría (Ov+H y SOv+H; Fig. 4.8) con el de oviposición (Ov y SOv; Fig. 4.8). Por lo tanto, el análisis de correspondencia mostró que existe un perfil de emisión de volátiles similar en ambos tratamientos de herbivoría, independientemente de la oviposición previa (O+H y SOv+H; Fig. 4.8). Las plantas con y sin oviposición mostraron perfiles diferentes entre sí y también en comparación con ambos tratamientos de herbivoría (Ov y SOv; Fig. 4.8).



**Figura 4.7.** Emisión de compuestos orgánicos volátiles de *S. babylonica* var *sacramenta* para los cuatro tratamientos: Sin oviposición-sin herbivoría (barras blancas lisas), con oviposición-sin herbivoría (barras grises lisas), sin oviposición con herbivoría (barras blancas rayadas), con oviposición- con herbivoría (barras grises rayadas). Se muestran las medias  $\pm$  los errores estándar estimados para todos los valores. El análisis estadístico de los valores medios se realizó para cada compuesto con un GLMM mediante la prueba de Wald  $\chi^2$ ,  $P < 0.05$ . Los asteriscos rojos indican valores significativos para los factores: OV= factor oviposición, HE= factor herbivoría, OV x HE= su interacción. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey,  $P < 0.05$ ; n.s. no significativo:  $P > 0.05$ ). Los datos fueron transformados a partir de la escala logit. Repeticiones biológicas (plantas) por tratamiento: N=5. Una lista completa de todos los volátiles identificados se encuentra en la Tabla Anexa 1.



**Figura 4.8.** Análisis de correspondencia de los perfiles de emisión de volátiles *S. babylonica* var *sacramenta* con oviposición y posterior herbivoría. Las elipses representan un gráfico del casco convexo de las muestras de cada tratamiento. Los símbolos se refieren a todas las muestras de cada tratamiento de sauce: ( $\triangle$  SOv) plantas sin oviposición-sin herbivoría, ( $\square$  Ov) plantas con oviposición-sin herbivoría ( $\square$  SOv+H) plantas sin oviposición- con herbivoría y ( $\triangle$  Ov+H) plantas con oviposición-con herbivoría. El porcentaje de inercia explicado por cada eje se expresa entre paréntesis.

#### 4.4. Discusión

En este capítulo se pudo demostrar que la oviposición de un himenóptero especialista, *N. oligospilus* sobre *S. babylonica*, puede cambiar la calidad de las hojas ante la inminente alimentación de las larvas, perjudicando el crecimiento de los futuros neonatos, la biomasa de las larvas maduras (marginamente) y, predominantemente, el tiempo de desarrollo de las prepupas (Fig. 4.5). Estos cambios pueden ser desencadenados por varias señales defensivas. La oviposición incrementó los niveles de JA (Fig. 4.3) y alteró cualitativamente el perfil de emisión de volátiles, pero no se observaron cambios en el perfil de salicínoides (Fig. 4.4). Sin embargo, los daños causados por la herbivoría provocaron cambios aún más drásticos en la emisión de volátiles respecto de la oviposición (Fig. 4.7 y 4.8). Por otro lado, no se encontró ninguna evidencia de *priming* en la emisión de volátiles del sauce luego de la oviposición de la avispa de la sierra (Fig. 4.7 y 4.8).

El desempeño de los insectos herbívoros puede verse afectado negativamente cuando se alimentan de plantas que presentan puestas de huevos. Sin embargo, la mayoría de los estudios previos sobre este fenómeno se llevaron a cabo en una gran variedad de especies herbáceas en comparación con las leñosas (Austel et al., 2016; Hilker

y Fatouros, 2016; Lortzing et al., 2020). En los resultados de este capítulo, se observó que el desempeño de las larvas de avispa sierra que nacieron en plantas con oviposición previa se vio afectado al principio del desarrollo, mostrando un crecimiento menor de los neonatos y una biomasa larval marginalmente menor respecto a las plantas sin oviposición previa (Fig. 4.5). La prepupa fue el estado más afectado por la oviposición, evidenciándose a través del retraso en la transición a pupa (Figs. 4.5 y 4.6). En estudios anteriores se ha reportado que la alimentación de los insectos en hojas con oviposición previa disminuyó el desempeño en la etapa larval (p.ej. alta mortalidad y reducción del peso) y/o afectó los cambios de estado a través de una extensión del tiempo de desarrollo de la larva a pupa (Pashalidou, 2015a; Austel et al., 2016; Bandoly et al., 2016; Hilker y Fatouros, 2016; Lortzing et al., 2019; Paniagua Voirol et al., 2020;). En los resultados de este capítulo, se encontró que una gran proporción de prepupas incrementó hasta ocho veces su tiempo de desarrollo, alargando consecuentemente el ciclo de vida el doble de la duración reportada de esta avispa sierra sobre *S. babylonica* (i.e. 60 días aprox.; Alderete, 2005). Resultados similares se encontraron en larvas de *N. oligospilus* alimentadas con hojas senescentes de *S. babylonica* donde aumentó la mortalidad de las larvas de primer estadio y se duplicó el tiempo de desarrollo de las prepupas (Alderete, 2005). Considerando que las hojas senescentes alcanzan una menor calidad nutricional a medida que avanza la temporada, (es decir, disminuye el nitrógeno y el carbono de la hoja, debido a la relocalización y reciclaje de componentes; Kudo, 2003), puede causar un impacto en la fisiología de la prepupa. Así, prolongar la transición a pupa puede ser también una estrategia para superar condiciones desfavorables debidas a cambios en la calidad de las hojas del sauce (como aquellos causados por la senescencia de las hojas o la oviposición).

El estado inmóvil prolongado de las pupas podría aumentar significativamente la exposición a la depredación por parte de los enemigos naturales. Para insectos forestales como la avispa sierra, el estado de pupa es especialmente vulnerable a la depredación (Olofsson, 1987; Haack y Mattdon, 1993; Lindstedt et al., 2019). Las avispas sierra de la familia Diprionidae pueden escapar de los depredadores de pupa formando sus capullos directamente sobre las hojas, en lugar del hacerlo en el suelo, evitando el contacto con los depredadores mamíferos, aunque esto pueda aumentar la exposición a las aves insectívoras (Hanski y Parviainen, 1985). Aunque no hay datos certeros, esta estrategia podría ser utilizada por *N. oligospilus* que también puede tejer capullos en las hojas del sauce o enterrarse en el suelo.

La oviposición previa pudo haber disminuido la calidad nutricional de las hojas mediada por la inducción de JA, el principal regulador de las defensas inducidas por herbívoros en las plantas. Dado que el nivel de esta fitohormona aumentó con la



oviposición, los sauces podrían percibir el huevo de la avispa de la sierra como una señal de advertencia contra la herbivoría inminente. De forma similar, se observó la inducción de JA en *A. thaliana* con oviposición de la mariposa especialista *Pieris brassicae* que desencadenó un efecto fuerte de *priming* contra las larvas recién nacidas (Valsamakis et al., 2020). Dado que tanto el SA como el JA parecen tener un papel importante en la regulación de las defensas de la planta contra las larvas luego de la eclosión de los huevos (Reymond, 2013; Hilker y Fatouros, 2016), no se puede descartar la participación del SA en la regulación de la respuesta a la oviposición de *N. oligospilus* debido a los niveles basales altos reportados en este capítulo. Además, se ha reportado previamente, que la inducción de defensas indirectas como la emisión de COVs que ocurre en respuesta al daño por herbivoría se encuentra regulada por JA en especies de salicáceas (Irmisch et al., 2013; Mrazova y Sam, 2018; Clavijo McCormick et al., 2019). Estos estudios mostraron una inducción concomitante de la emisión de JA y COVs inducidos por oviposición, sugiriendo que la emisión de estos volátiles sería una respuesta defensiva indirecta o una señal que puede activar las defensas en otras partes de la misma planta o incluso en otras plantas. No se pudo dilucidar si este aumento de JA puede ser inducido por patrones moleculares asociados a los huevos que podrían estar presentes en las secreciones de oviposición de la avispa de la sierra (Braccini et al., 2013) o por el daño en la hoja que las hembras causan al insertar el ovipositor en el tejido foliar, como han informado estudios anteriores en otros sistemas (Hilker et al., 2005; Bruessow et al., 2010; Paniagua Voirol et al., 2020; Hundacker et al., 2021).

Dentro de los resultados de este capítulo se observó como particularidad, que los huevos presentaron cantidades bajas de las fitohormonas JA, AS y ABA. Previamente se reportó la presencia de JA y SA en huevos de lepidópteros junto con otros órdenes de insectos herbívoros (Tooker y De Moraes, 2007), pero poco se sabe sobre su función biológica. La aplicación de JA exógeno puede inducir respuestas defensivas en las plantas como la emisión de COVs (Meiners y Hilker, 2000), lo que sugiere que la presencia de JA en los huevos de los insectos podría contribuir a la emisión de COVs luego de la oviposición. Tooker y De Moraes (2007) propusieron posibles funciones para el SA, como presentar propiedades antimicrobianas y antifúngicas que pueden conferir cierta protección frente a patógenos (Krebs et al., 1983; Cowan, 1999), proteger a los huevos impidiendo que los radicales libres dañinos oxiden moléculas biológicas importantes, incluido el ADN (Zuo et al., 2002) o estar involucrado en la inducción de defensas asociadas al SA. Sin embargo, son necesarios más estudios para explicar el posible rol de estas fitohormonas presentes en los huevos de los insectos.

En salicáceas se observó que, no sólo se indujeron COVs después del daño por herbivoría, sino que también aumentaron las defensas directas, tales como, inhibidores de tripsin proteasa y varios derivados fenólicos (Boeckler et al., 2011; Fabisch et al., 2019; Eberl et al., 2021). Aunque los salicinoides y los taninos condensados son la principal clase de metabolitos especializados constitutivos presentes en especies de sauces y álamos (Barbehenn y Constabel, 2011; Boeckler et al., 2011), la inducción de estos compuestos por la herbivoría presenta un patrón muy variable y poco claro (Ruuhola et al., 2001; Stevens y Lindroth, 2005; Fields y Orians, 2006; Julkunen-tiitto et al., 1995). En los resultados de este capítulo, aunque se aprecia una tendencia a la reducción, no se encontraron cambios en la acumulación de salicinoides como respuesta a la oviposición (Fig. 4.4). Aunque no hay estudios previos que hayan estudiado los cambios en el perfil de salicinoides con la oviposición de los insectos, sí hay antecedentes sobre la disminución o falta de respuesta de estos compuestos frente a la herbivoría (Julkunen-Tiitto et al., 1995; Osier y Lindroth, 2001). En un estudio realizado en *Populus nigra*, no se observó ninguna inducción, sino más bien una disminución del 20-40 % en la concentración de salicinoides cuatro semanas después de la herbivoría del lepidóptero generalista *Lymantria dispar* (Boeckler et al., 2013). Del mismo modo, Roth et al. (1998) observaron niveles significativamente más bajos de salicinoides en *Populus tremuloides* después de cuatro semanas continuas de herbivoría de la oruga del bosque *Malacosoma disstria* (i.e. generalista de plantas leñosas) en comparación con los controles no tratados. Esta tendencia en el descenso de la concentración de salicinoides sugiere que la oviposición de *N. oligospilus* podría inhibir la inducción de genes de defensa asociados con la síntesis de estos compuestos, como fue previamente reportado en *A. thaliana* frente a la oviposición del especialista *Pieris brassicae* (Bruessow et al., 2010).

En este capítulo se observó que la composición del perfil de COVs fue muy sensible al tipo de daño recibido en las hojas de los sauces (oviposición o herbivoría; Fig. 4.7 y 4.8). La oviposición aumentó particularmente la emisión de tres terpenoides, (E,E)- $\alpha$ -Farneseno, (Z) y (E)- $\beta$ -Ocimeno, siendo este último uno de los principales compuestos de la mezcla total en las plantas con oviposición (del 5% de la mezcla total en las plantas Ov, al 22% en las plantas Ov+H). Este monoterpeno, entre otros terpenoides, es uno de los principales COVs reportados para álamos y sauces que aumenta tras la herbivoría (Yoneya y Takabayashi, 2013; Clavijo McCormick et al., 2019). Además, se han reportado al (E,E)  $\alpha$ -Farneseno y al (Z) y (E)  $\beta$ -Ocimeno como compuestos involucrados en la atracción de parasitoides y/o depredadores de insectos herbívoros en plantas que experimentaron oviposición y/o daño por herbivoría (Clavijo McCormick et al., 2012 y sus referencias; Krugner et al., 2014; Nurkomar et al., 2018). Los depredadores de herbívoros no sólo detectaron individualmente los compuestos mayoritarios y minoritarios presentes en los

volátiles emitidos por las plantas dañadas, sino que también percibieron cambios en sus cantidades relativas dentro de la mezcla total de volátiles (Clavijo McCormick et al., 2012). El parasitoide de huevos *Closterocerus ruforum* de la avispa sierra del pino *Diprion pini* fue más atraído por la mezcla de volátiles que contenía (E)- $\beta$ -Farneseno respecto de este compuesto ofrecido de forma individual (Beyaert et al., 2010). En algunos sistemas tritróficos, es necesario el daño por herbivoría luego de la oviposición para desencadenar la atracción de enemigos naturales (Conti y Colazza, 2012). Incluso la preferencia de los parasitoides por su insecto hospedero varía con el estado del insecto y con la duración de la herbivoría de las larvas, coincidiendo con los cambios en la composición de las mezclas volátiles (Pashalidou et al., 2015b). La oviposición y la herbivoría de las larvas de *N. oligospilus* indujeron la emisión de diferentes tipos de COVs en *S. babylonica* que podrían ser explotados de forma diferencial por los enemigos naturales (p.ej. depredadores de pupas y larvas de *N. oligospilus*; Alderete, 2005; Alderete et al., 2010; Luft Albarracin et al., 2013), como se ha informado previamente en otros sistemas planta-insecto (Yoneya et al., 2009; Hilker y Meiners, 2011).

La emisión de COVs también puede ser una señal disuasoria en la que las hembras evitan las plantas con huevos de hembras conespecíficas (Fatouros et al., 2012). Previamente se observó que las hembras de *N. oligospilus* disminuyeron su preferencia de oviposición hacia plantas dañadas por larvas conespecíficas respecto a plantas sanas, en el sauce nativo sudamericano *S. humboldtiana* (Valladares et al., 2020). Esta respuesta comportamental fue asociada a la mayor liberación de Germacreno D en las plantas dañadas. En estudios previos también se observó que los COVs inducidos por oviposición pueden ser percibidos por plantas vecinas y prepararlas para el ataque de los herbívoros, incrementando su resistencia. Las plantas de *Brassica nigra* expuestas previamente a COVs inducidos por oviposición en plantas vecinas conespecíficas respondieron con la inducción de sus defensas, afectando negativamente el desempeño larval de *Pieris brassicae* y positivamente el *fitness* de la planta debido a un aumento en la producción de semillas y flores (Pashalidou et al., 2020). Una respuesta similar de *priming* se encontró en los álamos, donde las plantas de *Populus* spp libres de huevos que se encontraban próximas a plantas con huevos, aumentaron la emisión de COVs y generaron una respuesta disuasoria en la oviposición de la polilla *Micromelalopha sieversi* (Guo et al., 2019). En ambos estudios, se probaron los efectos de la exposición de las plantas a COVs inducidos por oviposición individuales, obteniendo una respuesta defensiva inducida. Sería interesante probar si los tres terpenoides inducidos por la oviposición de *N. oligospilus* podrían actuar como una señal de *priming* para la herbivoría inminente o como un repelente conespecífico para la oviposición de las hembras.

Como se mencionó anteriormente, se conoce que la oviposición de insectos herbívoros reduce el desempeño de los que se alimentan en plantas herbáceas anuales, especialmente en plantas modelo como *A. thaliana*. Los resultados de este capítulo muestran la utilidad de ampliar nuestros conocimientos desde las plantas modelo anuales típicas más estudiadas y sus insectos asociados a plantas no modelo como las leñosas y a sus insectos herbívoros asociados menos estudiados, como el himenóptero avispa sierra del sauce. Por un lado, se encontraron algunas similitudes y paralelismos con otros sistemas más estudiados en los patrones de defensa contra la alimentación de las larvas tras la oviposición de las hembras. Además, surgen nuevas preguntas sobre la forma en que la oviposición podría afectar a la dinámica poblacional del insecto, ya que se observó un gran efecto sobre la duración de las prepupas causando la prolongación del ciclo de vida hasta el doble de la duración reportada de esta avispa sierra sobre *S. babylonica* (i.e. 60 días aprox.; Alderete, 2005).

## **Capítulo 5:**

**Respuestas químicas frente al daño de *N. oligospilus* en el sauce comercial *S. babylonica* var *sacramenta* y el sauce nativo *S. humboldtiana* y su efecto sobre el desempeño de la avispa sierra**

## 5.1. Introducción

El genotipo de la planta determina la expresión de caracteres defensivos y, por ende, su aptitud nutricional como alimento para los insectos herbívoros. Las variaciones genotípicas entre distintas especies, variedades e híbridos traen aparejadas diferencias en la expresión de las defensas y esto puede traducirse en diferentes grados de susceptibilidad al ataque de insectos, como fue observado previamente en salicáceas (Orians et al., 1997; Hallgren et al., 2003; Torp et al., 2013). Los bosques cultivados de plantas leñosas están conformados por clones comerciales que presentan escasa diversidad genética respecto de las poblaciones naturales (Santos-del-Blanco et al., 2015; Olsson et al., 2020) y no suelen ofrecer niveles de resistencia adecuados para hacer frente a la aparición de plagas y enfermedades que se desplazan a nuevos territorios como consecuencia del cambio climático (Biselli et al., 2022). Esto puede deberse a que el proceso de domesticación ha conducido a una reducción de los niveles de defensas debido a la selección de rasgos específicos para mejorar el rendimiento y la calidad de las plantas destinadas al consumo humano (Evans, 1993). Esto se debería, en parte, a que la producción de defensas puede ser costosa generándose una restricción de los recursos de la planta priorizando el crecimiento o la defensa (Herms y Mattson, 1992; Rosenthal y Dirzo, 1997). En muchos casos, en plantas domesticadas con fines agrícolas, se ha observado una menor resistencia a los daños causados por insectos herbívoros en comparación con sus parientes silvestres (Kempel et al., 2011; Turcotte et al., 2014; Moreira et al., 2018b; Paudel et al., 2019).

Hasta mediados del siglo XX, el sauce nativo de Sudamérica, *S. humboldtiana* Willd habría sido un árbol frecuente en el margen de los ríos patagónicos y platenses, pero sus poblaciones comenzaron a decrecer y estar gravemente amenazadas por la introducción de especies exóticas (Dezzotti et al., 2020). Esto se debe en parte a la fácil hibridación con sauces europeos y asiáticos de gran vigor y alta capacidad de enraizamiento que fueron ocupando el hábitat donde anteriormente crecía *S. humboldtiana*. Este sauce nativo presenta una gran adaptación a condiciones ambientales desfavorables y su resistencia al daño por insectos suele observarse en el campo (Leonardo Gallo, comunicación personal) y en el laboratorio (Valladares et al., 2020).

En un trabajo previo, Valladares y colaboradoras (2020) reportaron una respuesta rápida e intensa de *S. humboldtiana* frente a la herbivoría de *N. oligospilus*. Se observó una disminución drástica de la supervivencia de larvas desarrolladas sobre plantas que fueron previamente dañadas durante 48 h por herbivoría de larvas conespecíficas respecto de las plantas sanas. A su vez, esta inducción por herbivoría provocó una variación en la emisión

de COVs y el rechazo significativo de las hembras a oviponer en las plantas previamente dañadas, tanto en ramas con daño local como sistémico (Valladares et al., 2020). El efecto opuesto se observó en *S. babylonica*, donde la preferencia de oviposición se mantuvo similar entre plantas sanas y dañadas (Valladares et al., 2016). Estas variaciones en la inducción de los COVs junto con el fuerte impacto de 48 horas de herbivoría sobre la supervivencia de larvas de *N. oligospilus* en el sauce nativo *S. humboldtiana*, sugieren una respuesta de inducción de defensas rápida y efectiva. Sin embargo, aún no está descripta la composición de metabolitos especializados de defensa en esta especie. Considerando que *S. babylonica var sacramenta* es el clon exótico comercial más antiguo del país, propagado vegetativamente durante décadas con fines productivos, es probable que presente una menor variación genética y menor capacidad de resistir el daño por herbívoros, respecto del nativo *S. humboldtiana*, del cual no hemos encontrado registros de que haya sido formalmente domesticado. Por lo tanto, es interesante estudiar las respuesta químicas asociadas con las defensas de estos dos sauces en su interacción con *N. oligospilus*.

Objetivo específico III:

El objetivo de este capítulo fue estudiar los metabolitos especializados en el sauce nativo *S. humboldtiana* por comparación con el clon comercial *S. babylonica var sacramenta* y sus efectos sobre la interacción con la avispa sierra *N. oligospilus*. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

III a) Comparar la respuesta química constitutiva e inducida por el daño de la avispa sierra a través del análisis de los metabolitos especializados asociados con las defensas característicos de sauces (salicinoides, taninos condensados y volátiles).

III b) Comparar la preferencia de oviposición y el desempeño de *N. oligospilus* al desarrollarse sobre *S. humboldtiana* y *S. babylonica var sacramenta*.

III c) Comparar el crecimiento vegetativo inicial entre *S. humboldtiana* y *S. babylonica var sacramenta*.

Hipótesis III:

III a) Los metabolitos especializados (salicinoides, taninos condensados y COVs) difieren tanto en su composición constitutiva como inducida según la especie de sauce.

III b) La preferencia de oviposición y el desempeño de *N. oligospilus* varían dependiendo de la especie de sauce.

III c) El crecimiento vegetativo inicial varía según la especie de sauce.

Predicción III:

III a) Se espera que *S. humboldtiana* muestre una respuesta inducida por el daño de *N. oligospilus*, de mayor intensidad (según Valladares et al., 2020) a través de una mayor composición y/o aumento en la concentración de salicinoides y/o taninos condensados respecto de *S. babylonica*. A su vez, se espera una emisión inducida de COVs característica y distintiva del sauce comercial.

III b) De acuerdo a los resultados de Valladares y colaboradoras (2020) se espera que en la especie *S. humboldtiana*, las hembras de *N. oligospilus* presenten una menor preferencia de oviposición y un peor desempeño larval respecto de *S. babylonica*.

III c) Dado que *S. babylonica var sacramenta* es un clon comercial de larga trayectoria de producción en el país, se espera que su tasa de crecimiento vegetativo inicial sea mayor respecto del nativo *S. humboldtiana*.

Dado que los resultados mostraron un desempeño de *N. oligospilus* inverso al esperado sobre ambas especies de sauce, se propuso una hipótesis *ad hoc* (III d). Teniendo en cuenta que la avispa sierra es un herbívoro especialista, es probable que haya desarrollado mecanismos para tolerar a los salicinoides, ya que la forma de detoxificación de estos compuestos se encuentra asociada al grado de especialización alimentaria de los insectos (Boeckler et al., 2016; Schnurrer y Paetz, 2022). Se espera entonces que un herbívoro que se alimenta de varias familias de plantas (i.e. insecto generalista) no pueda alimentarse de sauces con alto contenido de salicinoides. Por lo tanto, se incorporó al insecto modelo generalista *S. frugiperda* para evaluar su desempeño al desarrollarse sobre *S. babylonica* y *S. humboldtiana*.

Hipótesis *ad hoc* III d:

Un herbívoro generalista como *S. frugiperda* sólo es capaz de desarrollarse sobre sauces con bajo contenido de salicinoides.

Predicción III d:

Las larvas de *S. frugiperda* tendrán un mejor desempeño al alimentarse de *S. babylonica var sacramenta* el sauce con menor concentración de salicinoides, respecto de *S. humboldtiana*, contrariamente a lo que ocurre con el desempeño de *N. oligospilus*.



## 5.2. Materiales y métodos

### 5.2.1. Material biológico

#### 5.2.1.1. Sauces

Se utilizaron estacas de *Salix babylonica* var *sacramento* (Soveny Americano) y de *S. humboldtiana* que se obtuvieron de sauces del estaquero de FAUBA. Las estacas se plantaron individualmente en macetas de 5 litros durante el final del invierno de los años 2019 y 2021 y se mantuvieron al aire libre en condiciones naturales (para más detalle ver **Metodología general, sección 2.1.1**). Las plantas crecieron durante 3-5 meses alcanzando una altura máxima aproximada de 1.5 m. Dos días antes de comenzar los bioensayos, se ingresaron a la cámara de condiciones controladas descripta previamente para aclimatarse y se mantuvieron en ese lugar.

#### 5.2.1.2. *Nematus oligospilus*

Para los ensayos de preferencia de oviposición y de desempeño de este capítulo se utilizaron hembras recién emergidas o de hasta 1 día de vida, obtenidas de la cría generada y alimentada con sauces híbridos *S. alba* × *S. alba*, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperiodo. Dichas hembras se utilizaron para oviponer sobre los sauces *S. babylonica* var *sacramento* y *S. humboldtiana*, (para detalles de la cría, ver **Metodología general, sección 2.1.1**)

#### 5.2.1.3. *Spodoptera frugiperda*

Para los ensayos de desempeño de *S. frugiperda* sobre *S. babylonica* var *sacramento* y *S. humboldtiana*, se estableció una colonia en una cámara de cría, con una temperatura controlada y constante de 24°C. Las larvas fueron alimentadas con un gelificado básico enriquecido con cereales, levadura de cerveza, azúcares, y conservantes. Cada puesta de huevos fue mantenida en un vaso plástico traslúcido propio hasta que eclosionaron y las larvas alcanzaran el estadio de larva 3, momento en el cual se separaron para evitar canibalismo. Se colocaron entonces individualmente en placas de Petri (un individuo por placa), hasta que alcanzaron el estado de pupa. Posteriormente se retiraron las pupas de las placas, se limpiaron, y se colocaron en una jaula común de tela sintética, donde algunos

días después eclosionaron los adultos. La dieta de los adultos consistió en una solución de melaza y agua que liban. En la jaula se colocaron cintas plásticas en las que las hembras oviponen, y donde más tarde se colectan los huevos que darán origen a la siguiente cohorte.

### 5.2.2. Preferencia de oviposición de *N. oligospilus* sobre *S. babylonica* var *sacramento* y *S. humboldtiana*

Para estudiar la preferencia de oviposición, se realizaron ensayos de elección dual dentro de la cámara de ambiente controlado mencionada anteriormente, según el protocolo descrito por Braccini et al. (2015). La arena experimental consistió en una caja de plástico transparente (33 x 23 x 14 cm, largo x ancho x alto) en cuya cara superior presentaba una tela tipo voile para la circulación de aire (Fig. 5.1). Cada caja contenía un par de ramas cortadas de cada genotipo e hidratadas en floreros. Cada florero contó con una rama de sauce fresco de 2 hojas sanas maduras (10 cm de longitud, cortada de la porción media de una rama de sauce en estaquero). En lados opuestos de la diagonal de la arena se colocó un florero de cada genotipo y en el centro se liberó una hembra (recién emergida o de menos de 10 h de vida) permitiéndole poner huevos por 24 h (Fig. 5.1). Cada hembra podía desplazarse libremente por la arena, teniendo disponibles ambas caras de las hojas de cada genotipo de sauce. Se contabilizó el número de huevos colocados por genotipo luego de 24 h y se realizaron un total de 10 réplicas.



**Figura 5.1.** Esquema del ensayo de elección dual. Se muestra la arena experimental, con un florero de *S. babylonica* var *sacramento* (naranja) y *S. humboldtiana* (violeta) en cada extremo de la diagonal. En el centro se libera a la hembra de *N. oligospilus* que circula libremente por la arena.

### 5.2.3. Desempeño de *N. oligospilus* sobre *S. humboldtiana* y *S. babylonica* y la respuesta química de los sauces

#### 5.2.3.1. Diseño experimental y muestreo de plantas

Se realizó un mismo experimento para estudiar el desempeño de *N. oligospilus* y la respuesta química constitutiva e inducida por el daño de la avispa sierra de los siguientes metabolitos especializados: salicinoides, taninos condensados y compuestos volátiles.

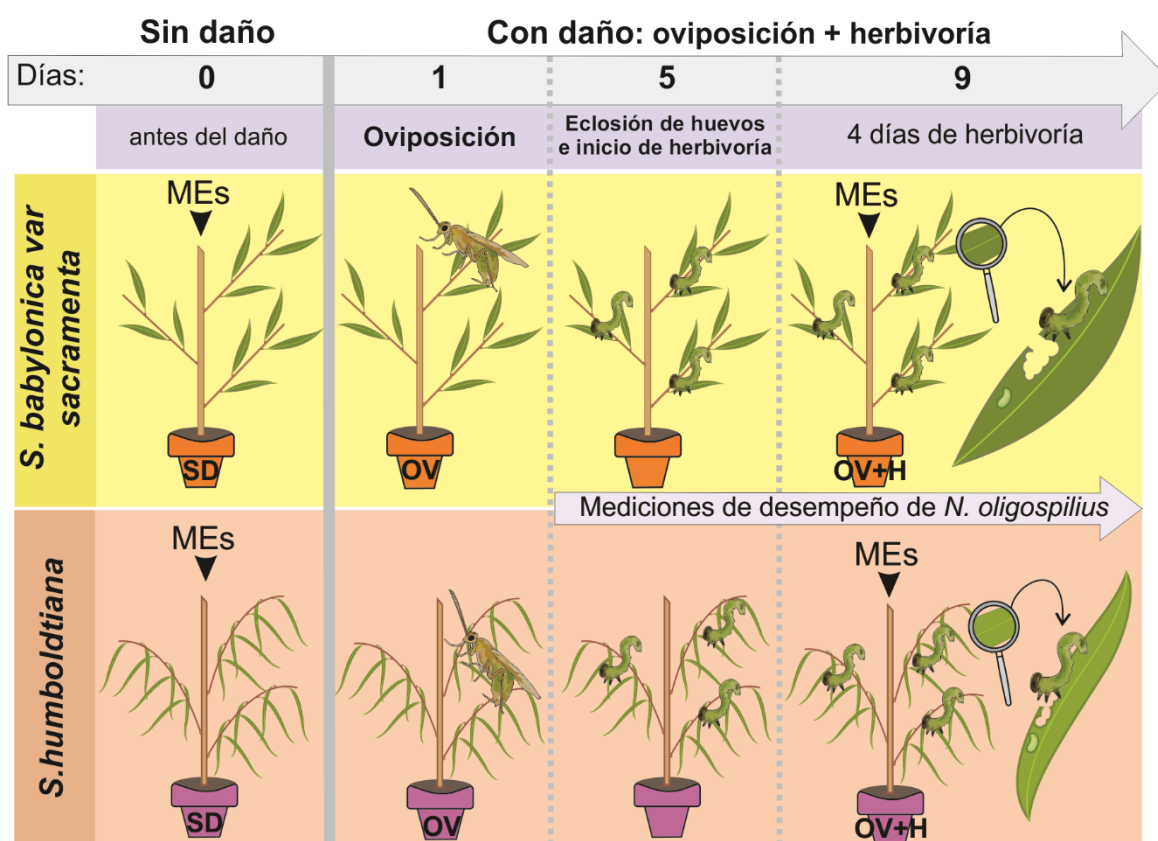
Para todas las mediciones se utilizaron sauces cultivados en maceta durante 4 meses. El mismo grupo de plantas estuvo sujeto al mismo esquema experimental con dos tratamientos secuenciales: 1) Sin daño y 2) Con daño (Fig. 5.2). Para simplificar la terminología, se denominará al tratamiento “con daño” al que abarca oviposición y posterior herbivoría de 4 días de las larvas. Este tratamiento de daño se realizó de esta manera para representar las condiciones naturales en que ocurre el ciclo de la avispa sierra sobre los sauces. Los tratamientos se llevaron a cabo de a pares de sauces, uno de cada especie (p.ej. tratamiento sin daño en *S. babylonica* var *sacramento* vs. tratamiento sin daño en *S. humboldtiana*) de forma simultánea. Cada par de sauces fue tratado en semanas diferentes y consecutivas a lo largo de la temporada de verano (es decir, cada semana se consideró como un factor aleatorio de bloqueo del diseño experimental para controlar la variabilidad entre bloques). La cantidad de réplicas biológicas (plantas) por tratamiento fue 5.

Para obtener plantas sin daño (SD; Fig. 5.2), se trasladaron los sauces en maceta intactos del vivero y se mantuvieron durante 48 h dentro de una cámara de condiciones ambientales de temperatura y luz controladas.

Para obtener plantas con daño, los sauces sin daño fueron sometidos a la oviposición de las hembras (OV; Fig. 5.2) y luego a la herbivoría (H) de las larvas durante 4 días después de la eclosión de los huevos (OV+H; Fig. 5.2). Para obtener las plantas con daño se seleccionó la rama más larga como representativa de la planta, debido a que presenta la mayor cantidad de hojas, y se la envolvió en una bolsa de tela tipo voile. Dentro de la bolsa, se liberaron 15 hembras recién emergidas (o de hasta 1 día de vida) y se les permitió oviponer libremente sobre las hojas durante 2 horas. Cada sauce recibió entre ~100-200 huevos aprox. distribuidos entre ~50 hojas en *S. babylonica* y ~120 hojas en *S. humboldtiana* (10-15% de las hojas presentaron al menos 1 huevo; 2-4 huevos promedio por hoja). Una vez eclosionados los huevos, se permitió a las larvas recién nacidas que se alimentaran de las hojas durante 4 días, dando por finalizado el tratamiento con daño (OV+H, Día 9; Fig. 5.2).

Para estudiar el contenido de salicinoides y taninos condensados en la respuesta constitutiva e inducida por herbivoría en ambos sauces, se cosecharon hojas de las plantas sin daño y con daño (MEs Día 0 y 9 en Fig. 5.2). Se seleccionaron hojas individuales (6 en *S. babylonica* y 12 en *S. humboldtiana*), se cortaron por el pecíolo con una tijera y se cosecharon dos veces de la misma planta (sin y con daño; Fig. 5.2). Se cosechó el doble de hojas en *S. humboldtiana* debido a que su área foliar corresponde a la mitad del área de las hojas de *S. babylonica*. En todos los casos se cosecharon hojas maduras en una posición equivalente (porción media de la rama; 30 cm desde el ápice) y de manera simultánea en ambas especies de sauce. La toma de muestras de hojas se realizó una vez finalizada la recolección de volátiles en los tratamientos sin daño y con daño. Las muestras de hojas se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

La recolección de volátiles se realizó en cada especie de sauce, en plantas sin daño (MEs día 0; Fig. 5.2) y con daño (MEs día 9; Fig. 5.2). Una hora antes de la colecta de volátiles las larvas se retiraron y se transfirieron a cajas de plástico transparente que contenían ramas (10 cm de largo) con hojas frescas en floreros con agua corriente de las especies *S. babylonica* var *sacramento* o *S. humboldtiana* (según corresponda) y se mantuvieron allí durante las 6 h que duró el muestreo de volátiles. Una vez finalizada la recolección, las larvas se devolvieron a los sauces de los que provenían para continuar con el estudio de desempeño de *N. oligospilus*.



**Figura 5.2.** Esquema del diseño experimental para evaluar el desempeño de *N. oligospilus* sobre *S. babylonica* var. *sacramento* y *S. humboldtiana* y la respuesta química de los sauces con y sin daño. Ambas especies fueron sometidas a dos tratamientos secuenciales: sin daño (SD, Día 0) y con daño (OV+H, Día 9). El tratamiento con daño OV+H comprende oviposición (OV) seguida de 4 días de herbivoría (H). Se indica con una flecha el momento en que se midieron los metabolitos especializados (MEs, Días 0 y 9; volátiles, salicinoides y taninos condensados). A partir del Día 5 cuando eclosionan los huevos, se comenzó con el seguimiento para la evaluación del desempeño de la avispa sierra. Réplicas biológicas (plantas): N=5 (20 larvas por planta).

### 5.2.3.2. Variables de desempeño medidas en *N. oligospilus*

Para evaluar si existen diferencias en el desempeño de *N. oligospilus* al desarrollarse sobre diferentes especies de sauces, se realizó un ensayo de no elección en el que se siguió su desarrollo desde el estado huevo hasta pupa (Día 5, Fig. 5.2) y se midieron las siguientes variables: proporción de huevos eclosionados, biomasa larval y pupal, días de desarrollo larval, prepupal y pupal, proporción de prepupas tardías y supervivencia (Fig. 5.3).

Para estimar la *proporción de huevos eclosionados*, se eligieron al azar de 5 a 10 hojas en plantas dañadas de ambas especies de sauce, y se identificó y registró la ubicación de 100 a 120 huevos seleccionados. Luego de 5 días de desarrollo de los mismos (momento

de eclosión), se cuantificó la cantidad de huevos eclosionados respecto del total seleccionado (Fig. 5.3).

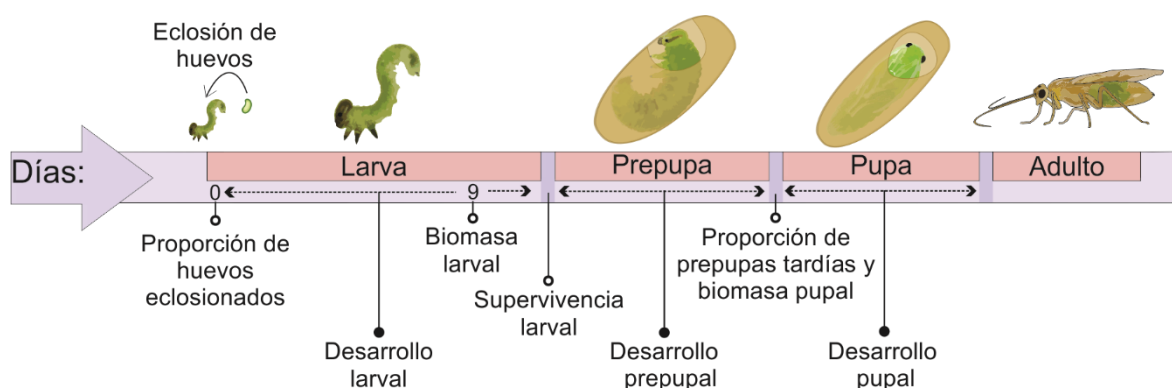
Una vez eclosionados los huevos, un grupo de 20 larvas fue elegido y seleccionado al azar para continuar el seguimiento de su desarrollo. Al séptimo día de vida, se transfirieron las larvas a cajas plásticas transparentes (33 x 23 x 14 cm) donde eran alimentadas con hojas frescas de ramas cortadas (10 cm de longitud) provenientes de sauces sanos de *S. babylonica* var *sacramento* o *S. humboldtiana* de estaquero. Las ramas se mantenían hidratadas dentro de frascos plásticos con agua corriente (7 cm alto x 5 cm diámetro). Las ramas fueron reemplazadas por otras más frescas cada dos días. Las larvas continuaron su desarrollo dentro de las cajas hasta la formación del capullo. Estos fueron trasladados a frascos cilíndricos transparentes hasta la emergencia de las hembras, para controlar y registrar los cambios de estado del ciclo.

*El tiempo de desarrollo larval* se estimó como el número de días transcurridos desde la eclosión del huevo hasta el inicio del armado del capullo (Fig. 5.3). *La biomasa larval* se midió a los 9 días de desarrollo pesándolas en una balanza (Denver Instrument TP 214, sensibilidad 0.1 mg) (Fig. 5.3). Se eligió este periodo de tiempo para realizar la medición, debido a que las larvas crecidas en *S. humboldtiana* armaban el capullo 4 días antes (al día 9 de vida) que las larvas desarrolladas en *S. babylonica* var *sacramento* (al día 13 de vida). Para garantizar una mayor precisión en la biomasa los individuos se pesaron a la misma hora en que nacieron.

*La supervivencia de las larvas* se estimó como la proporción de larvas que armaron el capullo para empupar (es decir, número de larvas nacidas *in situ*/número de capullos totales formados, Fig. 5.3).

*El tiempo de desarrollo prepupal* se midió como el número de días que las prepupas tardaron en cambiar al estado de pupa (el tiempo transcurrido entre el tejido del capullo realizado por larvas maduras del último estado y la adquisición de la morfología de pupa, Fig. 5.3). Al igual que lo observado en el Capítulo 4, hubo un porcentaje de prepupas que tardaron más de 10 días en empupar (alejándose de la duración común de 7-10 días, Alderete 2005). Por lo tanto, las prepupas fueron cuantificadas y clasificadas en regulares (igual o menos de 10 días dentro del capullo) y prepupas tardías (más de 10 días dentro del capullo). *La proporción de prepupas tardías* se estimó como el número de prepupas tardías/total de prepupas. Para cuantificar la *biomasa pupal*, se extrajeron del capullo cuando el insecto adquirió una morfología adulta inmadura en la que se observaron patas, antenas y pterotecas distinguibles (Ovruski y Smith, 1993), y luego se pesaron (ver pupa en Fig. 5.3). Los estados dentro del capullo se identificaron bajo lupa binocular 40x (Olympus

SZ61, Tokio, Japón), generando una pequeña abertura en uno de los extremos que se volvía a cerrar (procedimiento según Alderete, 2005). El *tiempo desarrollo pupal* se registró como la cantidad de días que transcurrieron desde la formación de la pupa hasta la formación del adulto (Fig. 5.3). Este seguimiento se realizó con la pupa fuera del capullo, ubicadas individualmente dentro de cilindros plásticos (5 cm alto x 3 cm diámetro) tapados en su extremo con tela tipo voile.



**Figura 5.3.** Variables de desempeño de *N. oligospilus* determinadas en los sauces *S. humboldtiana* y *S. babylonica* var *sacramenta*. El día 0 se refiere a la eclosión de los huevos. Los números indican el día en que se registró la medición durante el desarrollo larval. Los tiempos de desarrollo de cada estado están indicados con círculos negros y se encuentran representados con una doble flecha punteada. Las franjas violetas entre estados delimitan el momento de transición de un estado a otro.

### 5.2.3.3. Análisis de salicinoides y taninos condensados

Las hojas de ambas especies de sauce bajo los tratamientos sin daño y con daño, se procesaron y analizaron mediante UHPLC-MS en el caso de los salicinoides y colorimétricamente en el caso de los taninos condensados.

Las variables de cada metabolito fueron expresadas como porcentaje del compuesto respecto del peso seco del material vegetal (% PS).

Para mayor detalle sobre el análisis y cuantificación de estos compuestos, ver **Metodología general, sección 2.4.2 y 2.4.3.**

### 5.2.3.4. Colecta de volátiles y análisis químico

Para caracterizar el perfil constitutivo e inducido por herbivoría de los compuestos volátiles de ambas especies de sauce se colectaron volátiles sin y con daño por oviposición

seguido de herbivoría. Las plantas se colocaron en una cámara de condiciones ambientales controladas y fueron iluminadas desde arriba con lámparas LED azules y rojas y con una lámpara de haluro metálico de alta presión, de una intensidad de luz de 350  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ . Las muestras de espacio de cabeza se tomaron encerrando toda la planta (de aproximadamente 1 m de altura) en una bolsa de polietileno, que luego se eluyeron con un solvente con un estándar interno y se analizaron mediante GC-MS.

Se utilizaron bolsas vacías para realizar los blancos de sistema y poder restar los contaminantes. Los volátiles detectados se cuantificaron con el área de cada pico del cromatograma de iones totales relativizada al área del estándar interno. Los compuestos se expresaron como el equivalente en masa del estándar interno ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ). Previamente, se restaron los valores del blanco de las muestras.

Para detalles sobre la colecta de volátiles, elución, parámetros de la corrida cromatográfica, identificación y cuantificación de los compuestos ver **Metodología general sección 2.2**.

#### **5.2.4. Crecimiento vegetativo de *S. humboldtiana* y *S. babylonica* var. *sacramento***

Para evaluar las diferencias en el crecimiento de ambas especies, se hizo un seguimiento semanal del crecimiento de las ramas de sauces en maceta, 10 ejemplares de *S. babylonica* var. *sacramento* y 10 de *S. humboldtiana*. Desde el comienzo del estudio, las plantas se dejaron al aire libre bajo condiciones ambientales naturales. Para ello, a fines de agosto del 2019 se colocaron 10 estacas de cada especie (30-35 cm long.; 1-1.5 diam.) con sus bases sumergidas en agua, y 15 días después se plantaron en macetas de 5 L con tierra abonada ubicadas dentro de bateas con agua *ad libitum*. Luego de 1 mes, se trasplantaron a macetas de 10 L para evitar limitar su crecimiento. En cada ejemplar se identificaron las yemas vegetativas (las que van a originar a la rama y a las hojas, Fig. 5.4a) mediante su posición en el tallo y se siguió su crecimiento cada  $7 \pm 2$  días a lo largo de 9 semanas. Durante este periodo de tiempo, el tallo principal (estaca) no se desarrolla verticalmente, por eso se eligió seguir el crecimiento de las ramificaciones laterales. De cada yema, se desarrollaron primero las hojas sin apreciarse a simple vista la aparición del tallo de la ramificación. Por lo tanto, una vez que se lo pudo distinguir, se comenzó a cuantificar su longitud. Para ello, se consideró como longitud de la rama lateral al largo desde el nudo del tallo principal donde nace la rama lateral hasta el ápice sin considerar



las hojas juveniles en desarrollo del extremo apical (Fig. 5.4b y c). Luego de 30 días desde la plantación en maceta, se comenzó a medir la longitud de las ramas laterales. La mitad de los ejemplares de *S. humboldtiana* no sobrevivieron durante este ensayo.



**Figura 5.4.** Medición del crecimiento de las ramas laterales en *S. babylonica* var *sacramento* y *S. humboldtiana*. **a)** Yemas vegetativas (puntas de flecha) en una estaca de *S. humboldtiana* de 7 días post-plantación. **b)** Rama lateral en una estaca de *S. babylonica* de 31 días post-plantación. La barra indica la longitud medida desde el nudo hasta el ápice. **c)** Ápice de una rama lateral en una estaca de *S. babylonica* donde se señalan las hojas juveniles que no se tuvieron en cuenta en la medición.

A lo largo del crecimiento, una de las ramas predominó en longitud respecto de las otras, y esa fue la que se consideró como la representativa de la variable de crecimiento de los sauces (longitud de la rama predominante). Como los intervalos temporales en que se hicieron las mediciones no fueron exactamente equidistantes, se relativizó la longitud de la rama a la cantidad de días entre mediciones. Así, se calculó la tasa de crecimiento diaria de la rama predominante como las diferencias en la longitud de la rama en cada intervalo

de tiempo medido, relativizado a esa cantidad de días. Finalmente, se compararon las tasas de crecimiento diarias de ambas especies de sauce.

### **5.2.5. Desempeño de un insecto modelo generalista, *Spodoptera frugiperda*, sobre *S. babylonica* var *sacramenta* y *S. humboldtiana***

Para evaluar si existen diferencias en el desempeño del herbívoro generalista *S. frugiperda* alimentándose de *S. humboldtiana* y *S. babylonica* se siguió su desarrollo desde larva neonata y se midieron las siguientes variables a los 10 días de desarrollo: *supervivencia*, *biomasa* y *área defoliada*.

Para ello se utilizaron sauces plantados en macetas de 4 meses de crecimiento que fueron trasladados 48 h previas al inicio de los ensayos hacia la cámara para su aclimatamiento. A partir de 3 puestas de huevos, y 24 h posteriores a su eclosión, se trasladaron 8 larvas neonatas sin alimentar (una por hoja) en cada planta. Cada larva se ubicó dentro de una pequeña jaula-clip (conocidas como *clip-cages* en inglés) que permite confinar a la larva en una porción de la hoja sin dañarla (Fig. 5.5). Cada jaula-clip estaba conformada por una pinza metálica, un cilindro plástico transparente (2.5 cm diámetro x 4 cm alto), con una tapa plástica superior (con una abertura de tela voile) y una tapa inferior (3 cm diámetro) de cartón con fieltro. Los extremos de la pinza se encuentran adheridos al cilindro y a la tapa inferior. La hoja queda prensada entre la tapa y el extremo inferiores del cilindro que contiene fieltro para evitar dañar la hoja. Una vez colocado el dispositivo en las hojas, se introducía la larva levantando la tapa superior.

La *supervivencia de las larvas* se estimó como la proporción de larvas que habían sobrevivido a los 10 días y que habían causado defoliación en la hoja (es decir, número de larvas nacidas vivas/número de larvas iniciales). En esta instancia también se pesaron las larvas en una balanza (Denver Instrument TP 214, sensibilidad 0.1 mg) y se registró su *biomasa*. Luego se midió el *área defoliada* de las hojas a partir de fotos analizadas mediante el software de procesamiento de imágenes, ImageJ versión 1.45 s (National Institute of Health, Bethesda, Maryland). Para todas las mediciones fueron utilizados 6 réplicas biológicas (plantas).



**Figura 5.5.** Jaula-clip colocada en una hoja de *S. babylonica* var *sacramenta*.

### 5.2.6. Análisis estadístico

Para evaluar la preferencia de oviposición entre ambos sauces se estimó la proporción promedio ( $p_i$ ) y sus intervalos de confianza (95%) para una de las especies de sauces. Se realizó un GLM con distribución binomial y logit como función de enlace. Se consideró aquel intervalo que no contenían a la proporción 0.5 como indicador positivo de la preferencia de oviposición por una de las especies de sauce por sobre la otra.

Para evaluar si el desempeño de *N. oligospilus* y *S. frugiperda* varió con la especie de sauce, se realizó un LMM sobre cinco de las variables de las larvas: tiempo de desarrollo larval, biomasa larval y pupal, área defoliada. Para el análisis de la proporción de prepupas tardías y larvas vivas de ambas especies de insecto, se realizó un GLMM con distribución binomial y logit como función de enlace. Para todas las variables de desempeño, se tomó como tratamiento la especie de sauce (E) como parte fija del modelo y a la semana (factor de bloqueo) y la planta (para evitar la pseudoreplicación) como efectos aleatorios anidados. El histograma y el gráfico de densidad de la distribución del tiempo de desarrollo de las prepupas se construyó con la librería ggplot2 (Wickham, 2016) y el cálculo de los días de desarrollo promedio de las prepupas regulares y tardías se realizó con la librería plyr (Wickham, 2011).

Para determinar las diferencias entre los salicinoides y taninos condensados, se realizó un LMM, en el que se colocaron los tratamientos de especie (E), daño (D) por oviposición seguido de herbivoría, y su interacción (ExD) como efectos fijos, y a la semana y la planta como efectos aleatorios anidados. Para aquellos compuestos que estuvieron presentes sólo en una especie de sauce (i.e. tremulacina y tremuloidina), el LMM se

construyó únicamente con el daño (D) como efecto fijo y a la planta como efecto aleatorio para evitar pseudoreplicación.

Para determinar las diferencias entre los compuestos individuales y los volátiles totales, se realizó un GLMM para cada compuesto. El modelo consistió en una distribución log normal con función de enlace logarítmica. Los tratamientos de especie (E) y daño (D) por oviposición y herbivoría y su interacción (ExD) se colocaron como efectos fijos, y la semana y la planta como efectos aleatorios anidados.

Para identificar un patrón en las mezclas de compuestos volátiles y de salicinoides relacionado con los tratamientos de los sauces (E y D), las concentraciones de todos los componentes volátiles y de los salicinoides se sometieron respectivamente a un análisis multivariado de correspondencia y de componentes principales para todos los tratamientos con las librerías FactoMineR (Lê et al., 2008) y factoextra (Kassambara y Mundt, 2020). Se seleccionaron para el análisis aquellos componentes principales que explican la variabilidad de forma significativa. A los compuestos que no eran detectables, se les asignó un valor de cero en la muestra correspondiente para su análisis estadístico.

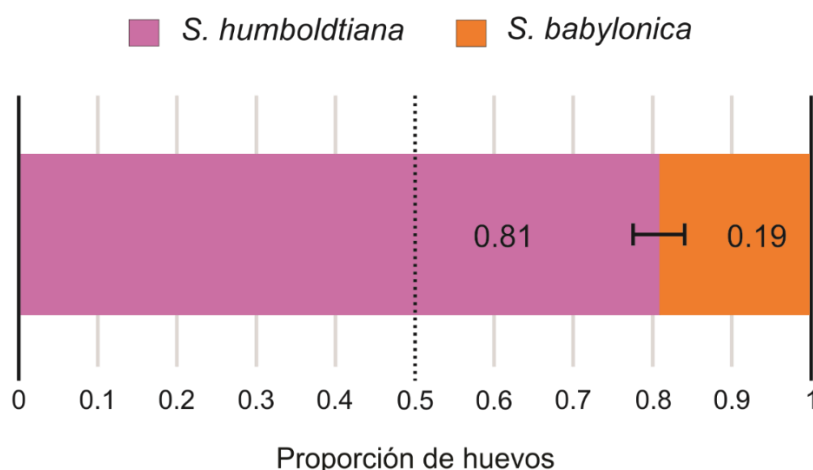
Para comparar la tasa de crecimiento vegetativo inicial entre ambos sauces se realizó un LMM, en el que se colocó a la de especie (E) de sauce, al tiempo (T) como variable cuantitativa y a su interacción (ExT) en la parte fija del modelo y a la planta como efecto aleatorio (para evitar la pseudoreplicación). Luego se construyó cada regresión lineal con la función `plot_model` de la biblioteca `sjPlot` (Lüdtke et al., 2022).

Para detalles en cuanto a la comprobación de supuestos y al uso de paquetes de RStudio para realizar los modelos LMM y GLMM, ver **Metodología general, sección 2.5**.

## 5.3. Resultados

### 5.3.1. Preferencia de oviposición de *N. oligospilus*

Los resultados indicaron que las hembras de *N. oligospilus* colocaron una mayor proporción promedio de huevos en *S. humboldtiana* (0.81, IC 95% [0.84, 0.78]) respecto de *S. babylonica* (Fig. 5.6). Esto implicó una oviposición con una cantidad promedio de  $45 \pm 4.5$  y  $10 \pm 3.8$  huevos (media  $\pm$  error estándar) en *S. humboldtiana* y *S. babylonica* respectivamente.

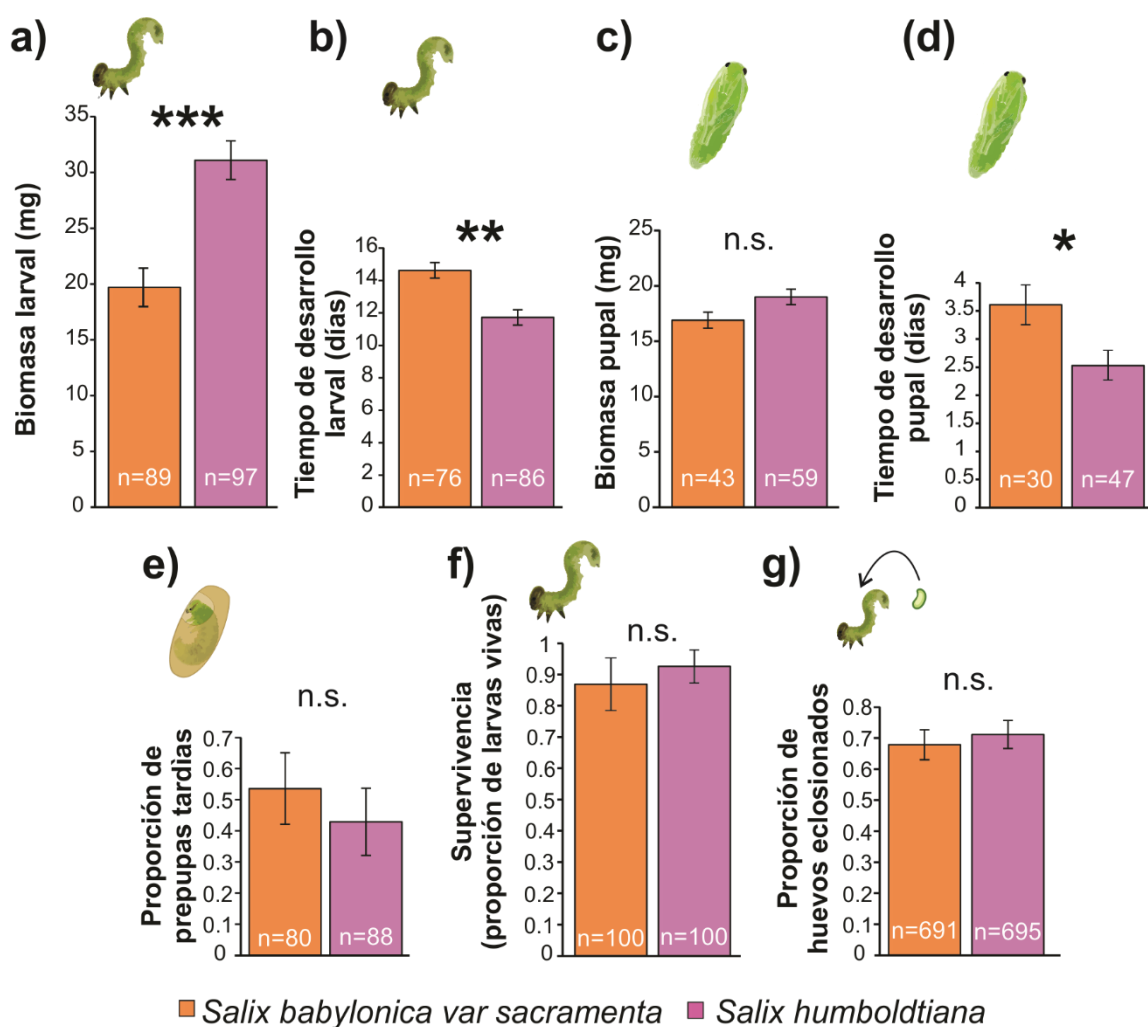


**Figura 5.6.** Preferencia de oviposición de las hembras de *N. oligospilus*. Se muestran las proporciones promedio estimadas de huevos para *S. humboldtiana* (violeta) y *S. babylonica* var sacramenta (naranja). La barra indica el intervalo de confianza al 95%. La línea punteada muestra la proporción de huevos esperada si no hubiera preferencia de oviposición. Repeticiones biológicas (par de plantas) por tratamiento: N=10 (1 hembra/ 55 huevos promedio por tratamiento).

### 5.3.2. Desempeño de *N. oligospilus* sobre *S. humboldtiana* y *S. babylonica* var sacramenta

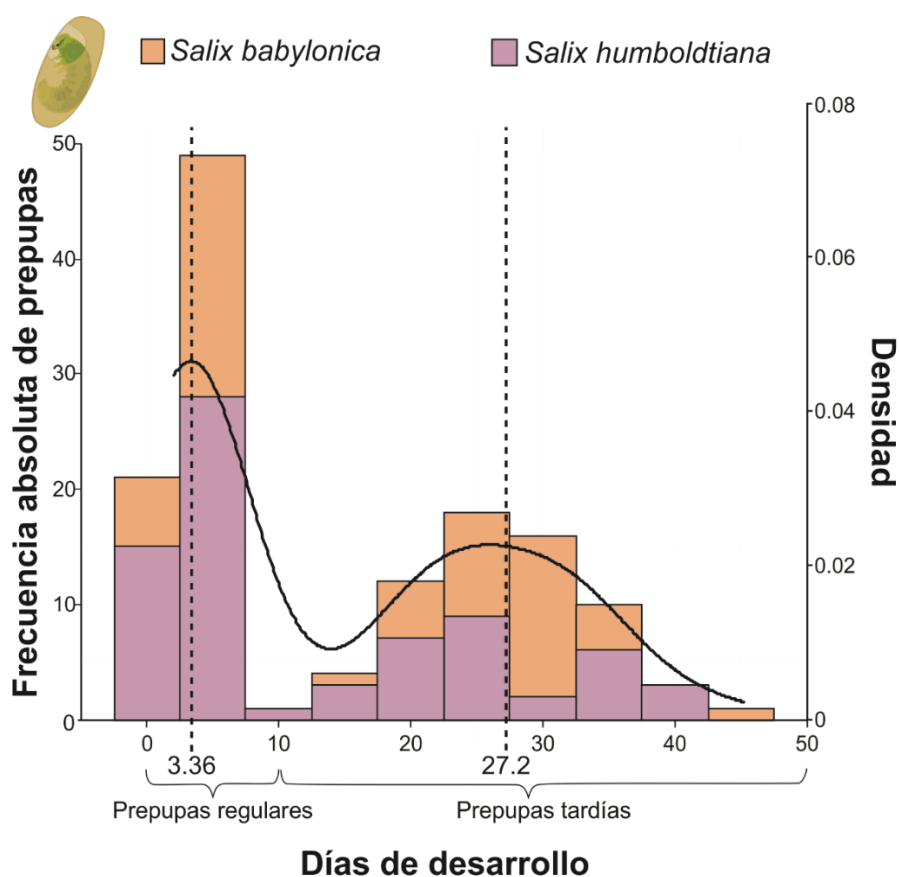
La comparación del desempeño de las larvas de avispa sierra que iniciaron su desarrollo sobre un sauce de *S. babylonica* var sacramenta o de *S. humboldtiana* mostró diferencias significativas, principalmente en la duración del estado larval y pupal. Las larvas alimentadas en *S. humboldtiana* alcanzaron una biomasa media mayor y tuvieron un tiempo de desarrollo más corto en comparación con las larvas que se alimentaron de *S. babylonica* (biomasa larval:  $P < 0.0001$ ; tiempo larval:  $P = 0.002$ ; Fig. 5.7 a y b). La duración del estado pupal también fue menor en *S. humboldtiana*, mientras que la biomasa pupal, no mostró diferencias significativas, pero fue marginalmente mayor en aquellas larvas desarrolladas en *S. humboldtiana* (tiempo pupal:  $P = 0.04$ ; biomasa pupal:  $P = 0.09$ ; Fig. 5.7 c y d). El análisis del tiempo de desarrollo prepupal mostró una distribución de frecuencias bimodal de los datos y una distribución equilibrada entre especies de sauce (Fig. 5.8). La moda máxima correspondió a la frecuencia mayor conformada por las prepupas regulares y coincidió con su media de tiempo de desarrollo ( $3.36 \pm 1.3$  días; Fig. 5.8). La media del desarrollo de las prepupas tardías fue ocho veces mayor que el de las regulares ( $27.2 \pm 6.64$  días; Fig. 5.8) y también se correspondió con la segunda frecuencia más alta (moda, m; Fig. 5.8). Cabe destacar que la distribución mostró que las proporciones de prepupas regulares y tardías no estaban relacionadas con la especie de sauce (Fig. 5.8). Esto se evidenció por el hecho de que la proporción de prepupas tardías no fue significativamente

distinta en larvas que comenzaron su desarrollo en *S. babylonica* var *sacramento* o en *S. humboldtiana* F ( $P=0.5$ ; Fig. 5.7 e). El desarrollo en ambas especies de sauce tampoco afectó a la supervivencia de las larvas ni a la eclosión de los huevos (supervivencia:  $P=0.21$ ; eclosión:  $P=0.43$ ; Fig. 5.7 f y g).



**Figura 5.7.** Desempeño de *N. oligospilus* sobre *S. babylonica* var *sacramento* (barras naranjas) y *S. humboldtiana* (barras violetas). Se muestran las medias  $\pm$  los errores estándar estimados para todos los valores. El análisis estadístico para los valores medios se realizó por LMM, y las proporciones por GLMM mediante la prueba de Wald  $\chi^2$ . Los asteriscos (\*/\*\*/\*\*\*) indican diferencias significativas ( $P<0.05$ /  $P<0.01$ /  $P<0.001$ ) entre las larvas desarrolladas en cada especie de sauce. El número total de larvas por tratamiento se muestra dentro de cada barra. Repeticiones biológicas (plantas) por tratamiento: N=5.

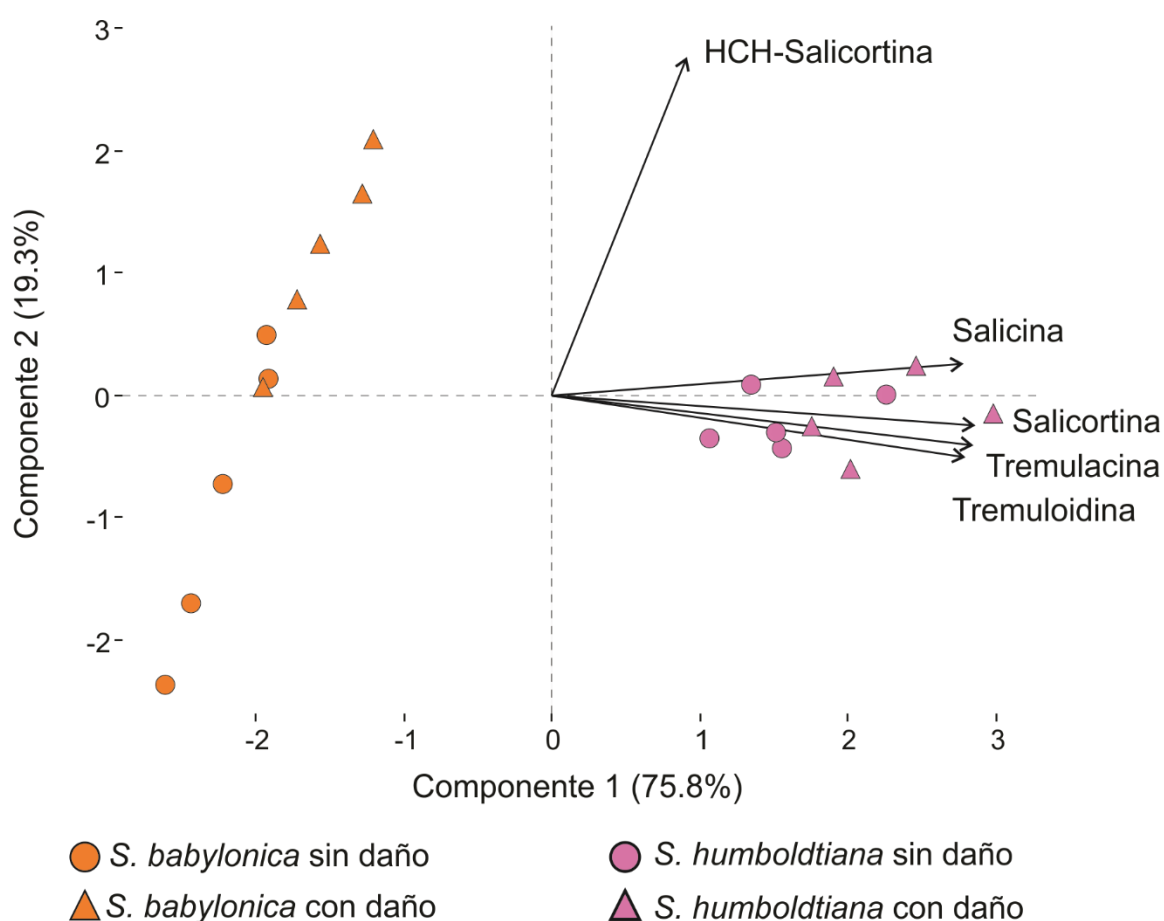




**Figura 5.8.** Histograma y gráfico de densidad de la distribución del tiempo de desarrollo de las prepupas. Se muestra la frecuencia absoluta de prepupas que se desarrollaron sobre *Salix babylonica* var *sacramento* (barras naranjas) y sobre *Salix humboldtiana* (barras violetas), en cada intervalo de días de desarrollo. Las medias de los tiempos de desarrollo de las prepupas regulares y tardías se indican con líneas punteadas verticales. La función de densidad de probabilidad estimada (línea sólida) muestra la distribución de frecuencia bimodal de los datos.

### 5.3.3. Análisis de salicinoides y taninos condensados

Se identificaron 5 tipos de salicinoides en las hojas de los sauces, todos presentes en *S. humboldtiana*, pero sólo 3 de ellos en *S. babylonica* (Fig. 5.9 a, Tabla Anexa 2). Cada especie tuvo un patrón de salicinoides propio, donde *S. humboldtiana* se diferencia de *S. babylonica* principalmente por las concentraciones altas de estos compuestos (Fig. 5.9). A su vez se puede distinguir un patrón de inducción diferencial entre especies de sauce, en el que no parecería haber cambio en las concentraciones de salicinoides para *S. humboldtiana* (Fig. 5.9). Por el contrario, en *S. babylonica* se pueden diferenciar la respuesta constitutiva de la inducida, principalmente por la concentración de HCH-salicortina (Fig. 5.9).



**Figura 5.9.** Análisis de componentes principales *biplot* del perfil constitutivo e inducido de salicinoides en *S. babylonica* var *sacraementa* (símbolos naranjas) y *S. humboldtiana* (símbolos violetas) sin (círculos) y con daño por oviposición seguido de herbivoría (triángulos). Se representan los tratamientos (símbolos naranjas y violetas) y los salicinoides (vectores). La varianza explicada por cada eje está expresada entre paréntesis.

Las concentraciones medias de cada compuesto variaron según la especie de sauce y el daño, definiendo la respuesta constitutiva e inducida (i.e. sin y con daño de oviposición seguido de herbivoría). En cuanto a la respuesta constitutiva, *S. humboldtiana* presentó una mayor concentración promedio de salicinoides totales, la cual fue 7 veces mayor respecto de *S. babylonica* (E:  $P < 0.0001$ ; Fig. 5.10 a; Tabla Anexa 2), y estuvo conformada mayoritariamente por tremulacina representando un 44% del total. Particularmente la salicina y la salicortina fueron los compuestos cuyos niveles se encontraron significativamente más altos en *S. humboldtiana* que en *S. babylonica* independientemente del daño (E:  $P < 0.0001$ ; Fig. 5.10 a; Tabla Anexa 2). En cambio, la HCH-salicortina, fue el salicinoide mayoritario en *S. babylonica* (82% del total), cuya concentración media constitutiva no presentó diferencias significativas respecto de *S. humboldtiana* ( $P = 0.1$ ; Fig. 5.10 a; Tabla Anexa 2).



Por otro lado, la concentración media de taninos condensados fue significativamente mayor en *S. humboldtiana* que en *S. babylonica* independientemente del daño por herbivoría (E:  $P=0.03$ ; Fig. 5.10 c).

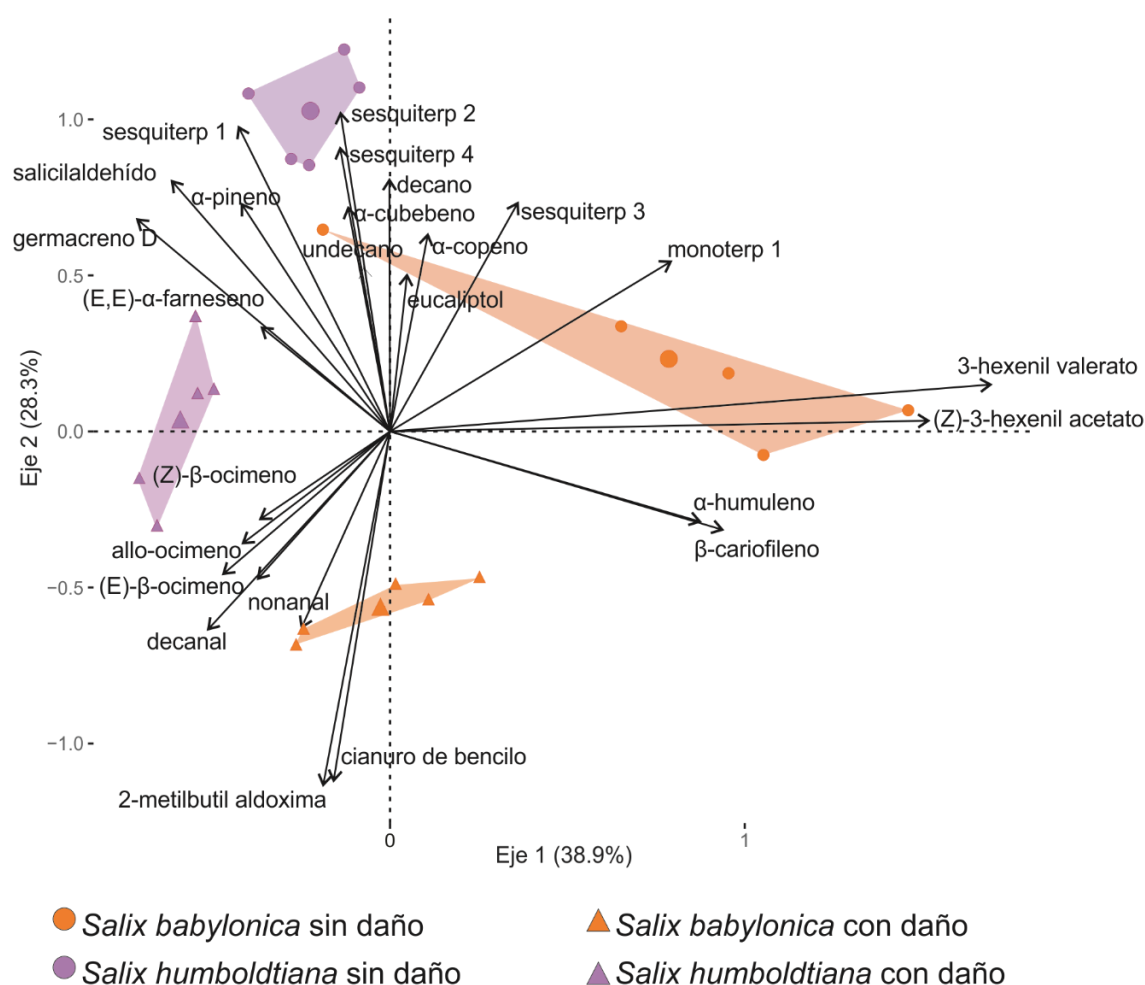
En cuanto a la respuesta inducida, hubo un aumento significativo de las concentraciones medias de salicina y salicortina independientemente de la especie de sauce (D:  $P=0.01$ ; Fig. 10 a; Tabla Anexa 2). Sin embargo, HCH-salicortina fue el salicinoide que aumentó frente al daño únicamente en *S. babylonica* ( $P=0.0006$ , Fig. 10 a; Tabla Anexa 2). Para este compuesto, la respuesta de inducción implicó un incremento de su concentración del 123.87%, 30 veces más alta que en *S. humboldtiana* (% inducción: 4.01; Fig. 5.10 b; Tabla Anexa 2). Un efecto similar se observó en la salicina y salicortina presentes en *S. babylonica*, donde la respuesta de inducción fue 4 y 8 veces mayor respectivamente en comparación de *S. humboldtiana*, a pesar de que ambos compuestos aumentaron ante el daño independientemente de la especie de sauce (% de inducción: 229.3 y 117.28 en *S. babylonica*; 26.6 y 25.8 en *S. humboldtiana*, Fig. 5.10b; Tabla Anexa 2). En términos globales, también el porcentaje de inducción de los salicinoides totales fue 9 veces mayor en *S. babylonica* que en *S. humboldtiana*, aunque su aumento haya sido significativo e indistinto para ambas especies de sauces (D:  $P=0.07$ ; Fig. 5.10 a y b; Tabla Anexa 2). El resto de los salicinoides propios de *S. humboldtiana*, tremulacina y tremuloidina, no cambiaron sus concentraciones promedio con el daño (D:  $P=0.33$  y  $P=0.64$  respectivamente; Fig. 10 a; Tabla Anexa 2).



#### 5.3.4. Análisis de compuestos orgánicos volátiles

Se cuantificaron e identificaron un total de al menos 31 compuestos orgánicos volátiles en el espacio de cabeza, de los cuales 29 estaban presentes en *S. babylonica* var *sacramenta* ( $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, cianuro de bencilo, 3-metilbuil aldoxima y 3-hexil valerato únicos de esta especie) y 26 en *S. humboldtiana* (siendo el salicilaldehído y el germacreno-D exclusivos en este sauce; Tabla Anexa 3). Los COVs detectados se clasificaron en 9 categorías: monoterpenos, sesquiterpenos, homoterpenos, aldehídos, ésteres, aromáticos, alcanos y compuestos nitrogenados (Fig. 5.12; Tabla Anexa 3).

Cada especie tuvo un perfil de emisión de COVs propio, distinguiéndose entre ellas un perfil constitutivo y uno inducido (i.e. sin y con daño por oviposición seguido de herbivoría). Esto se pudo evidenciar en el análisis de correspondencia de las concentraciones relativas de los COVs, donde se observó un patrón de agrupamiento de las unidades experimentales de acuerdo con la especie de sauce y el tipo de daño (constitutivo e inducido; Fig. 5.11). Las concentraciones relativas de volátiles se sometieron a un análisis de correspondencia para visualizar las diferencias entre tratamientos. Los resultados mostraron que ambos ejes explicaron un porcentaje similar de variabilidad de los COVs, con el primer eje explicando el mayor porcentaje de la inercia total (Fig. 5.11). Este análisis mostró que existe un perfil de emisión de volátiles distinto para cada especie, que difiere según el daño y que hay compuestos más asociados con uno u otro tratamiento (i.e. ángulo menor de 90 ° conectado el tratamiento y el compuesto con el origen; Fig. 5.11).



**Figura 5.11.** Análisis de correspondencia *biplot* de los perfiles de emisión constitutivos e inducidos de volátiles en *S. babylonica* var. *sacramento* (símbolos naranjas) y *S. humboldtiana* (símbolos violetas) sin (círculos) y con daño por oviposición seguido de herbivoría (triángulos). Las elipses representan un gráfico del casco convexo de las muestras de cada tratamiento. Los símbolos se refieren a todas las muestras de cada tratamiento. Los símbolos de mayor tamaño corresponden a los centroides de las elipses. Se muestran sólo los vectores de los compuestos (flechas) que se encontraban mejor representados en ambas dimensiones ( $\cos^2 \geq 0.5$ ). El porcentaje de inercia explicado se expresa entre paréntesis. Réplicas biológicas (plantas): N=5.

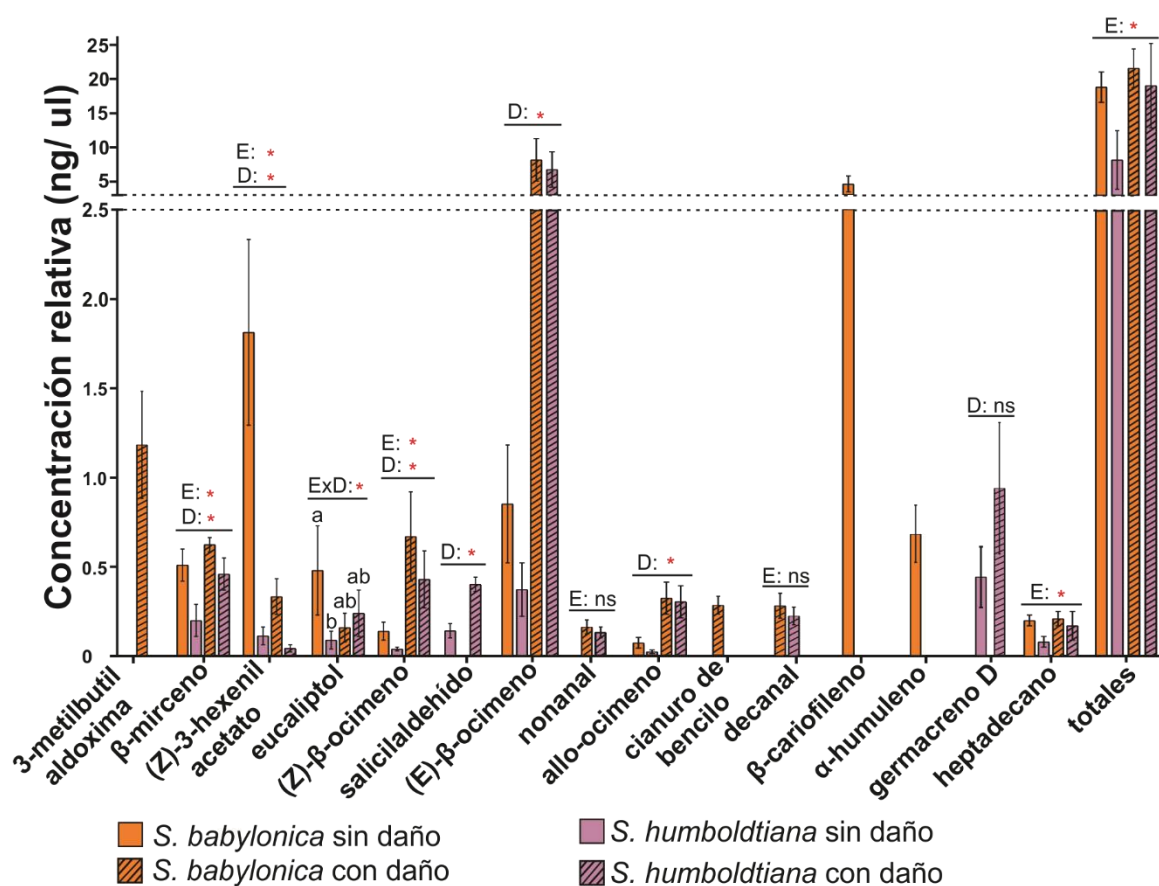
Los tipos de compuestos que dominaron la mezcla total fueron mono y sesquiterpenos, tanto en diversidad de compuestos como en abundancia relativa en ambas especies de sauces independientemente del daño por oviposición y herbivoría (porcentaje total de terpenos: 80-90 %; Fig. 5.12 a-d). Además, se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones medias relativas de compuestos específicos entre ambas especies independientemente de si hubo o no daño (Fig. 5.13).



**Figura 5.12.** Emisión constitutiva e inducida de compuestos volátiles de *S. babylonica* var *sacramento* y *S. humboldtiana* sin y con daño por oviposición seguido de herbivoría. Se muestra la proporción relativa de los grupos de volátiles presentados con respecto a la mezcla completa de olores. Los compuestos que se encontraban en mayor proporción están especificados con líneas punteadas. Una lista completa de todos los volátiles identificados se encuentra en la Tabla Anexa 3.

Los perfiles de emisión constitutiva resultaron distintos en ambas especies, evidenciándose en las proporciones relativas de las familias químicas de COVs respecto de la mezcla total (Fig. 5.12 a y c). Antes del daño, los sesquiterpenos fueron los que se encontraron en mayor proporción en *S. babylonica* var *sacramento* y en *S. humboldtiana* (53% y 61% respectivamente, Fig. 5.12 a y c). Particularmente, *S. babylonica* presentó una mayor concentración media constitutiva de COVs totales respecto de *S. Humboldtiana* (E: P=0.02; Fig. 5.13; Tabla Anexa 3) y estuvo conformada mayoritariamente por β-cariofileno representando un 29% del total, seguido por (Z)-3-hexenil acetato (10%) y α-copeno (9%) (Fig. 5.12 a; Tabla Anexa 3). En la emisión constitutiva se encontraron compuestos exclusivos de cada especie de sauce: β-ocimeno y α-humuleno en *S. babylonica* y

salicilaldehído y germacreno-D en *S. humboldtiana* (Fig. 5.13). Además, se identificaron compuestos que estuvieron presentes en ambas especies y cuyos niveles constitutivos fueron significativamente más altos en *S. babylonica* respecto de *S. humboldtiana*: 5 monoterpenos ( $\beta$ -mirceno, eucaliptol, (Z)- $\beta$ -ocimeno, 2 monoterpenos no identificados), un volátil de hoja verde ((Z)-3-hexenil acetato) y heptadecano (Fig. 5.13; Tabla Anexa 3). En cambio, en *S. humboldtiana*, el compuesto de mayor abundancia relativa fue  $\alpha$ -copeno (19%), seguido de  $\alpha$ -pineno y (E)- $\beta$ -ocimeno (estos últimos dos representaron el 7% aproximadamente; Fig. 5.12 c).



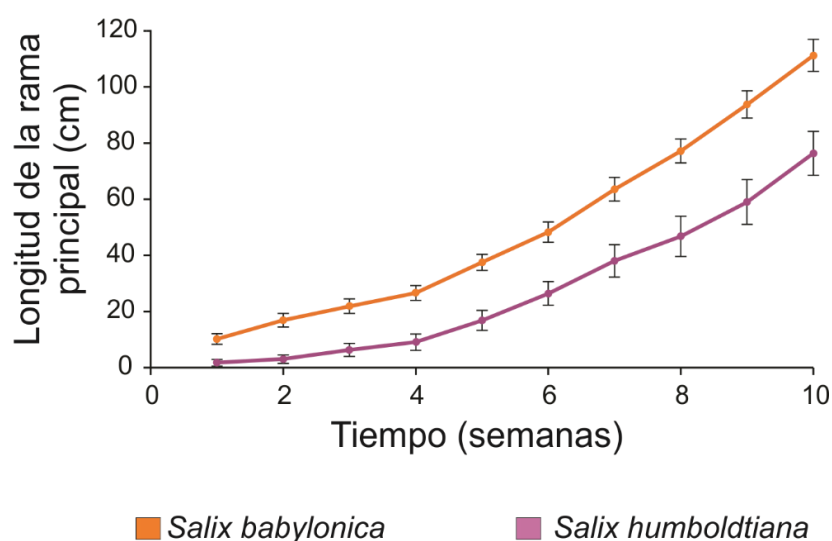
**Figura 5.13.** Emisión constitutiva e inducida de compuestos orgánicos volátiles de *S. babylonica* var *sacramento* (barras naranjas) y *S. humboldtiana* (barras violetas) sin y con daño por oviposición seguido de herbivoría (barras lisas y rayadas respectivamente). Se muestran las medias  $\pm$  los errores estándar estimados para todos los valores. El análisis estadístico se realizó para cada compuesto mediante un GLMM. Los asteriscos rojos (\*) indican valores significativos (E= factor especie, D= factor daño, O x D= su interacción, prueba de Wald  $\chi^2$ ,  $P < 0.05$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey,  $P < 0.05$ ; n.s., no significativo:  $P > 0.05$ ). Los datos fueron transformados a partir de la escala log. Repeticiones biológicas (plantas) por tratamiento: N=5. Sólo se muestran los compuestos identificados que aumentaron su concentración tras la inducción por el daño y los que mostraron diferencias según la especie de sauce. Una lista completa de todos los volátiles identificados se encuentra en la Tabla Anexa 3.

En cuanto a la respuesta inducida, se observó que el perfil de emisión de COVs en ambas especies, cambió en respuesta al daño (Fig. 5.11, 5.12, 5.13). Se indujo (i.e. aumentó la concentración con el daño) un total de 9 compuestos de los cuales 8 se encontraron en *S. babylonica* y 7 en *S. humboldtiana* (Fig. 5.13; Tabla Anexa 3). A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en la cantidad total de COVs por la inducción (D:  $P=0.16$ ; Fig. 5.13; Tabla Anexa 3), se observó un porcentaje de inducción mayor en *S. humboldtiana* respecto de *S. babylonica* (i.e. 57 vs 12 % respectivamente). A su vez, las abundancias relativas de varios compuestos se modificaron con la inducción en ambas especies alterando la composición de la mezcla total (Fig. 5.12 b y d). Los monoterpenos fueron los compuestos que dominaron la mezcla total por sobre los sesquiterpenos, a diferencia de lo observado en la emisión de COVs constitutiva (Fig. 5.12). Entre los monoterpenos, el (E)- $\beta$ -ocimeno fue el compuesto mayoritario en respuesta al daño, pasando de conformar el 7% al ~40% de la mezcla total en ambos sauces (Fig. 5.12). Su concentración relativa aumentó significativamente 8 y 22 veces más en *S. babylonica* y *S. humboldtiana* respectivamente (D:  $P<0.0001$ ; Fig. 5.13; Tabla Anexa 3). Sus isómeros, (Z)- $\beta$ -ocimeno y allo-ocimeno, también incrementaron sus niveles frente al daño independientemente de la especie de sauce (D:  $P=0.0001$  para ambos monoterpenos, Fig. 5.13, Tabla Anexa 3). Por el contrario, se observó una disminución de los niveles de otros compuestos, principalmente de sesquiterpenos, luego del daño de herbivoría en ambas especies (Tabla Anexa 3).

Además, se encontraron compuestos que estaban presentes en muy baja concentración (trazas) o eran indetectables sin daño y que en respuesta al daño pasaron a ser compuestos con cantidades detectables. Entre ellos, los aldehídos decanal y nonanal pasaron de ser indetectables constitutivamente a conformar un 2 y 3% de la mezcla total en respuesta a la herbivoría en *S. babylonica* y *S. humboldtiana* (Fig. 5.12, 5.13, Tabla Anexa 3). Por otro lado, 2 compuestos nitrogenados (2-metilbutiraldoxima y cianuro de bencilo) fueron detectados sólo ante el daño por herbivoría y únicamente en *S. babylonica* conformando el 7% del total de COVs emitidos (Fig. 5.12 b; 5.13; Tabla Anexa 3). El otro compuesto propio de la respuesta de *S. humboldtiana* ante la inducción por herbivoría fue el salicilaldehído que aumentó su concentración relativa 4 veces, conformando el 3% de la mezcla total (D:  $P=0.01$ , Fig. 5.13, 5.12 b; Tabla Anexa 3).

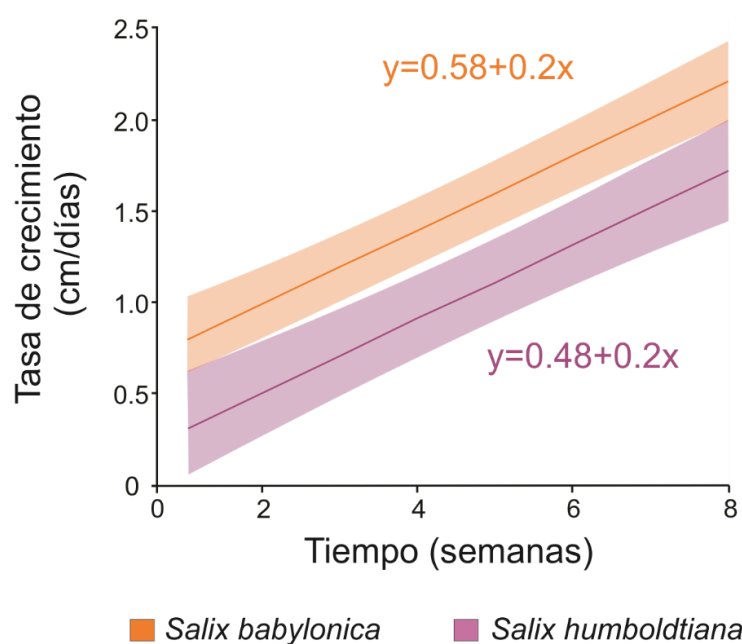
### 5.3.5. Crecimiento inicial de *S. babylonica* y *S. humboldtiana*

La longitud de la rama principal fue mayor en *S. babylonica* respecto de *S. humboldtiana* en cada semana medida (Fig. 5.14). Al analizar la tasa de crecimiento diaria, no se encontró una interacción significativa entre la especie (E) de sauce y el tiempo (T) de crecimiento (ExT:  $P=0.98$ ; Fig. 5.15), pero sí hubo un efecto significativo del tiempo y de la especie de manera independiente (T:  $P<0.0001$ ; E:  $P=0.005$ ; Fig. 5.15). Esto significa que la tasa de crecimiento inicial es distinta para cada especie y que aumenta a lo largo del tiempo medido con la misma pendiente en ambos sauces (Fig. 5.15).



**Figura 5.14.** Longitud de la rama principal (cm) en función del tiempo (semanas) en *Salix babylonica* (curva naranja) y *Salix humboldtiana* (curva violeta). Se muestran las medias y los errores estándar para cada día.

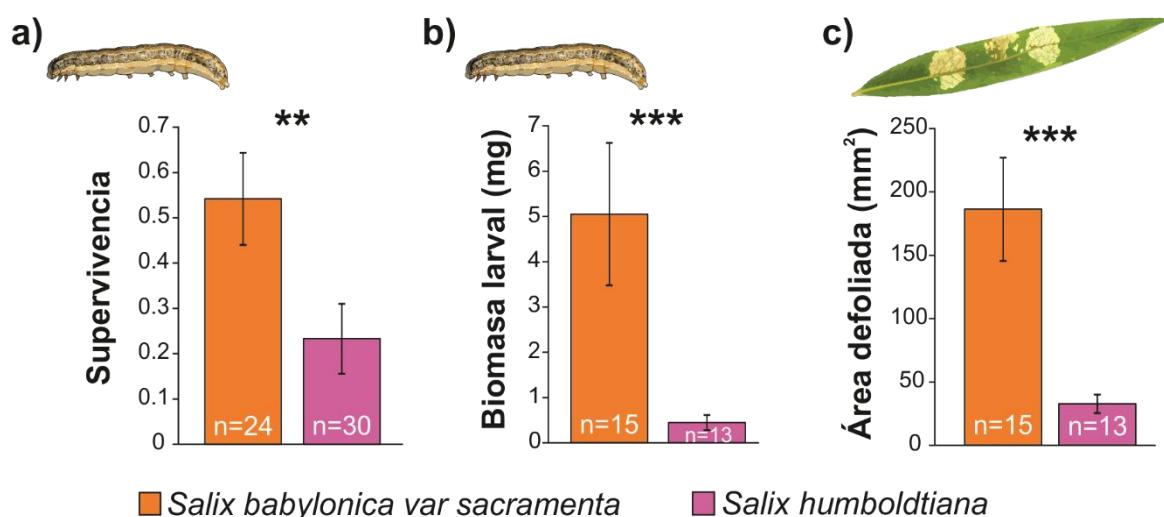




**Figura 5.15.** Funciones estimadas de las tasas de crecimiento diaria (cm/ día) en función del tiempo (semanas) de la rama principal en *Salix babylonica* var *sacramento* (curva naranja) y *Salix humboldtiana* (curva violeta). Se muestran las rectas y las funciones estimadas con sus bandas de confianza ( $\alpha=0.05$ ). Réplicas biológicas (plantas) de *S. babylonica* (N=10) y de *S. humboldtiana* (N=5).

### 5.3.6. Desempeño de *Spodoptera frugiperda*, un insecto modelo generalista, sobre *S. babylonica* var *sacramento* y *S. humboldtiana*

La comparación del desempeño de las larvas de *S. frugiperda* que iniciaron su desarrollo sobre un sauce de *S. babylonica* var *sacramento* o de *S. humboldtiana* mostró diferencias significativas en todas las variables medidas. Las larvas alimentadas sobre *S. babylonica* alcanzaron, luego de 10 días de desarrollo, una biomasa mayor y tuvieron una mayor supervivencia en comparación con las larvas que se alimentaron de *S. humboldtiana* (biomasa:  $P < 0.0001$ ; supervivencia:  $P = 0.02$ ; Fig. 5.16 a, b y d). Estos resultados fueron congruentes con el área defoliada por las larvas alimentadas sobre *S. babylonica* que fue mayor que la consumida sobre *S. humboldtiana* ( $P = 0.0003$ ; Fig. 5.16 c y e).



**Figura 5.16.** Desempeño de *S. frugiperda* sobre *S. babylonica* var *sacramenta* (barras naranjas) y *S. humboldtiana* (barras violetas). Se muestran las medias ± los errores estándar estimados para todos los valores. El análisis estadístico para los valores medios se realizó por LMM, y la proporción de larvas vivas por GLMM mediante la prueba de Wald  $\chi^2$ . Los asteriscos (\*\*/\*\*\*) indican diferencias significativas ( $P < 0.01$ /  $P < 0.001$ ) entre las larvas desarrolladas en cada especie de sauce. El número total de larvas por tratamiento se muestra dentro de cada barra. Repeticiones biológicas (plantas) por tratamiento: N=5.

## 5.4. Discusión

Los resultados de este capítulo mostraron que existen diferencias en la respuesta química (salicinoides, taninos condensados y COVs) tanto constitutiva como inducida entre el sauce comercial *S. babylonica* var *sacramenta* y el sauce nativo *S. humboldtiana*. Esto tuvo consecuencias diferenciales en la preferencia de oviposición y el desempeño de un insecto especialista como *N. oligospilus* y de un generalista modelo como *S. frugiperda* (Fig. 5.7 y 5.16). El sauce comercial presentó una mayor respuesta porcentual de inducción de salicinoides, mientras que el sauce nativo mostró mayores niveles constitutivos de estos compuestos y de taninos condensados (Fig. 5.10; Tabla Anexa 2). Esta mayor composición constitutiva de metabolitos especializados podría asociarse con la menor tasa de crecimiento vegetativo observada para *S. humboldtiana* respecto *S. babylonica* (Fig. 5.15). Por otro lado, los patrones de COVs constitutivos también variaron según la especie de sauce, pudiendo haber influido en la preferencia de oviposición de las hembras de la avispa sierra (Fig. 5.11, 5.12, 5.13; Tabla Anexa 3). Este es otro ejemplo que muestra que la variación en la química defensiva puede mediar fuertemente las interacciones entre el sauce y los insectos herbívoros explicando la susceptibilidad diferencial de estas plantas frente al ataque de los insectos.

El contenido de salicinoides y taninos condensados en salicáceas está determinado en gran parte por el genotipo, y su variación está mediada genéticamente (Orians et al.,

2000; Klaper et al., 2001; Donaldson y Lindroth, 2007; Boecklet et al., 2011). En los resultados de este capítulo se mostró por primera vez la caracterización fitoquímica del sauce nativo *S. humboldtiana*, que se distinguió por presentar una mayor composición de taninos condensados y salicinoides respecto de *S. babylonica* (Fig. 5.10). En el clon comercial de *S. nigra* “Alonzo nigra IV”, también se encontró una concentración alta de salicinoides. (Fig. Anexa 4). Esto suma evidencia a favor de que las variaciones en el perfil de salicinoides podrían deberse a las diferencias genotípicas entre sauces como se ha reportado en otras salicáceas (Orians y Fritz, 1995; Osier y Lindroth, 2001). Este resultado también apoya la idea de la pérdida en el contenido de salicinoides en *S. babylonica* var *sacramento* como un rasgo asociado a una menor variación genética y a la disminución de metabolitos especializados por efecto de la domesticación. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos y mediciones para reforzar esta idea.

Los taninos condensados y los salicinoides pueden tener efectos neutros, positivos (estimulantes de alimentación y oviposición en herbívoros adaptados; Schultz, 1989; Kolehmainen et al., 1995; Orians et al., 1997) o mayormente negativos en generalistas (p. ej. compuestos tóxicos o disuasores de la alimentación; Bryant et al., 1993; Matsuki y Maclean, 1994; Osier y Lindroth, 2001). Sin embargo, respecto a los taninos condensados, pocos resultados apoyan su rol como compuestos defensivos contra los insectos herbívoros (Barbehenn y Constabel, 2011), incluso para salicáceas como *Populus* contra lepidópteros generalistas (Hemming y Lindroth, 1995; Lindroth y St Clair, 2013). En los resultados de este capítulo se mostró que el desempeño sobre el sauce nativo con mayor composición de salicinoides y taninos condensados afectó negativamente al generalista modelo *S. frugiperda*, pero positivamente al especialista *N. oligospilus* (Fig. 5.7 y 5.16). A pesar de que *S. humboldtiana* presentó un contenido mayor de taninos condensados respecto del sauce comercial (Fig. 5.10 c), dicha concentración resultó ser sólo 1.4 veces superior, indicando una diferencia leve entre ambos sauces. En cambio, para los salicinoides, se encontró una concentración total 8 veces mayor en *S. humboldtiana* respecto de *S. babylonica*. Por lo tanto, esas diferencias en el contenido de taninos condensados podrían ser insuficientes para explicar el desempeño negativo del generalista *S. frugiperda* sobre el sauce nativo, siendo los salicinoides mejores candidatos a defensas directas. Los resultados de este capítulo sugieren que los taninos condensados, a diferencia de los salicinoides, podrían tener un rol secundario o nulo en la respuesta defensiva de estos sauces frente a los insectos estudiados.

Con la especialización alimentaria, se propuso que, junto a la pérdida de la capacidad de utilizar varias familias de plantas hospederas, los herbívoros especialistas adquirirían la capacidad de tolerar defensas específicas de las plantas, detoxificarlas, e incluso

secuestrarlas, a modo de manipular a los hospederos en su beneficio y desarrollar formas de reducir la depredación y el parasitismo (Whittaker y Feeny, 1971; Ali y Agrawal, 2012). Los resultados de este trabajo mostraron para *N. oligospilus* una supervivencia larval alta y similar en ambos sauces (mayores al 85%; Fig. 5.7 f) indicando una gran capacidad de reproducirse en cualquiera de las especies. Incluso se observó que las hembras prefieren oviponer sobre *S. humboldtiana* que contiene mayor concentración y composición de salicinoides. Esto sugiere que los salicinoides en un insecto especialista como la avispa sierra, no tendrían un rol defensivo, sino que podrían formar parte de las claves de oviposición como fue reportado previamente en este sistema en el Capítulo 3 y en los trabajos de Braccini et al. (2013) y Fernández et al. (2019) y para otros sistemas también (Orians et al., 1997; Roininen et al., 1999)

Numerosos trabajos han reportado el efecto adverso de los salicinoides sobre el desempeño de los insectos generalistas que se alimentan de salicáceas (Clausen et al., 1989; Lindroth y Bloomer, 1991; Hemming y Lindroth, 1995; Ruuhola et al., 2001). Sin embargo, se sugiere que son necesarios niveles de salicinoides que superen cierto umbral de concentración para afectar negativamente el desempeño de lepidópteros en *Populus* spp (i.e. mayor al 6% del peso seco foliar; Hemming y Lindroth, 1995). Esto coincide con los valores obtenidos en este capítulo donde la supervivencia y la biomasa larval del generalista modelo *S. frugiperda* fue afectada negativamente al alimentarse de *S. humboldtiana* que contiene ~6.5 % del peso seco en salicinoides totales (Fig. 5.10 a). Dado que este insecto pudo desarrollarse con una supervivencia mayor sobre *S. babylonica* (~1% del peso seco en salicinoides totales: Fig. 5.10 a) esto indicaría que el generalista tolera bajas concentraciones de salicinoides y el especialista altas concentraciones, como fue sugerido anteriormente (Barbehenn y Constabel, 2011). Los salicinoides se activan como defensas al degradarse luego de su ingestión, de manera que el grado de toxicidad sobre los insectos dependería de la forma en que se metabolizan, determinando así su efecto sobre el herbívoro (Appel, 1993; Haruta et al., 2001). La diferencia en las formas de detoxificación se encuentra asociada al grado de especialización alimentaria de los insectos (Boeckler et al., 2016; Schnurrer y Paetz, 2022), y podría explicar la ineficacia de los salicinoides contra la mayoría de los herbívoros especialistas como en el caso de *N. oligospilus* y la gran eficacia contra insectos no especializados como el generalista *S. frugiperda* (Volf et al., 2015).

Otros componentes como las proteínas podrían ser los que determinan la calidad de la planta hospedera afectando directamente el desempeño de los insectos herbívoros (Awmack y Leather, 2002). En otra avispa sierra especialista *Nematus calis*, se observó que su tasa de crecimiento era mayor al alimentarse de especies de sauce con mayores

concentraciones de salicinoides pero que el contenido de proteínas sería el que explicaría mejor las variaciones existentes en su desempeño (Matsuki y MacLean, 1994). Dichos resultados coinciden con lo observado en larvas de *N. oligospilus*, cuyo tiempo de desarrollo fue menor al alimentarse sobre *S. nigra* con un contenido menor de proteínas, y mayor en fenólicos y salicinoides totales respecto de *S. babylonica* (Braccini et al., 2013; Fig. Anexa 4). En esta tesis en el sauce nativo *S. humboldtiana* se encontró un mejor desempeño de la avispa sierra (i.e. menor tiempo de desarrollo) aun consumiendo una composición mayor de salicinoides y taninos condensados respecto del sauce comercial (Fig. 5.10 a y c). Esto indicaría que podrían ser otros los rasgos de la planta (i.e. contenido de proteínas) que expliquen el óptimo desempeño de este insecto especialista.

La inducción de los salicinoides en salicáceas presenta un patrón poco claro que varía mayormente según la duración de la herbivoría, el tipo y localización del daño, el genotipo y edad de la planta (Ruuhola et al., 2001; Stevens y Lindroth, 2005; Fields y Orians, 2006; Fabisch et al., 2019) incluso hay casos en los que no fue detectada (Julkunen-Tiitto et al., 1995; Boeckler et al., 2013). En este capítulo se mostró una inducción diferencial de salicinoides según la especie de sauce luego del daño por oviposición seguido por la herbivoría de *N. oligospilus*, a diferencia de los taninos condensados que no mostraron variación por el daño (Fig. 5.10). Si bien, la salicina y la salicortina aumentaron su concentración con el daño en ambas especies, los porcentajes de inducción fueron notablemente altos en *S. babylonica*, mostrando niveles basales bajos pero una respuesta de inducción mucho mayor respecto del sauce nativo (Fig. 5. 10 b). Adicionalmente, la HCH-salicortina se indujo sólo en *S. babylonica* (Fig. 5.10 a y b) reforzando las diferencias de inducción entre ambas especies tras una herbivoría de 4 días de duración. Considerando estudios previos en los que se realizaron tiempos de herbivoría breves (p.ej. 48-96 h) la inducción de salicinoides en salicáceas parecería poco usual a corto plazo. Dentro de los estudios en los que se observó inducción, se reportó sólo para la salicina en hojas con daño local y sistémico de 44 h en *Populus nigra* y en *Populus trichocarpa*, para tres insectos herbívoros (lepidópteros generalistas: *Amata mogadorensis* y *L. dispar*; escarabajos especialistas de sauces: *Phratora vulgatissima*, *Chrysomela populi*; Fabisch et al., 2019). Otro salicinoide como la tremuloidina también fue inducido tras 48 h de herbivoría por el lepidóptero generalista *Choristoneura conflictana* en *P. tremuloides* (Clausen et al., 1989). Estos resultados son de los menos frecuentes reportados en la bibliografía debido al corto tiempo de inducción.

Las variación en la susceptibilidad de distintas especies y genotipos de salicáceas se asociaron a la emisión de COVs constitutivos pudiendo ser utilizados por los insectos herbívoros como indicadores de la calidad de la planta hospedera para su alimentación y

oviposición (Peacock et al., 2001; Clavijo McCormick et al., 2016; Ling et al., 2022). En los resultados de este capítulo se mostró que la preferencia de oviposición de la avispa sierra fue menor para *S. babylonica* respecto de *S. humboldtiana* y que podría estar asociado con las diferencias en el perfil de emisión de COVs constitutivo entre ambas especies. Particularmente *S. babylonica* liberó de manera exclusiva el compuesto  $\beta$ -cariofileno representando la mayor proporción de la mezcla total de COVs (Fig. 5.12, 5.13; Tabla Anexa 2). Estos resultados coinciden con lo reportado para las hembras de *N. oligospilus* que se orientaban preferentemente hacia los volátiles de *S. nigra*, y evitaban a *S. viminalis* que emitía de forma exclusiva  $\beta$ -cariofileno (Braccini et al., 2015). A su vez se observó una disminución en la preferencia de tres especies de escarabajos especialistas de salicáceas por aquellos sauces que emitían una mayor concentración constitutiva del volátil de hoja verde (Z)-3-hexenil acetato (Peacock et al., 2001; Ling et al., 2022). Coincidiendo con estos antecedentes, en los resultados de este capítulo se mostraron diferencias en la emisión constitutiva de COVs según la especie de sauce, encontrándose en mayor concentración el (Z)-3-hexenil acetato en *S. babylonica* (Fig. 5.12, 5.13; Tabla Anexa 3). Por lo tanto, las hembras de avispa sierra podrían ser capaces de detectar compuestos específicos (p.ej. (Z)-3-hexenil acetato y  $\beta$ -cariofileno) que aporten información sobre la calidad de la planta hospedera y así distinguir y elegir entre especies de sauces más adecuadas para oviponer.

Como se discutió en el Capítulo 4, los COVs inducidos por la herbivoría de los insectos, pueden actuar también como señales para los enemigos naturales de los herbívoros y otros miembros de la comunidad proporcionando información sobre la planta dañada (Dicke y Baldwin, 2010). La inducibilidad de los volátiles de las plantas por la herbivoría de insectos especialistas y generalistas se ha demostrado tanto en álamos como en sauces (Peacock et al., 2001; Philippe y Bohlmann, 2007; Clavijo McCormick et al., 2014; Fabisch et al., 2019). Los resultados de este capítulo mostraron que el daño de *N. oligospilus* provocó una inducción significativa que implicó el aumento en la concentración de 9 compuestos, donde la mayoría difirió según la especie de sauce (Fig. 5.13). Sin embargo, sólo unos pocos COVs son indicadores confiables del daño por herbivoría (Douma et al., 2019). Los compuestos que mejor indicaron la herbivoría de insectos, principalmente para la interacción *Populus* spp y *L. dispar*, fueron, entre otros, compuestos nitrogenados como (Z)-3-metilbutil aldoxima y cianuro de bencilo y, en menor medida, monoterpenos como (E)- $\beta$ -ocimeno y aromáticos como salicilaldehído (Douma et al., 2019). Coincidentemente con los compuestos reportados, el daño por la avispa sierra generó de manera exclusiva en cada especie de sauce, el aumento de COVs nitrogenados en *S. babylonica* (i.e. 3-metilbutil aldoxima y cianuro de bencilo), y del compuesto aromático salicilaldehído, en *S. humboldtiana* (Fig. 5. 11, 5.12 b, d; 5.13, Tabla Anexa 3). A su vez, el (E)- $\beta$ -ocimeno fue el monoterpeno con mayor incremento de su concentración en ambas especies de sauce,

conformando un 43 % de la mezcla total (Fig. 5.12; Fig. 5.13 b, d). Los compuestos como la 2-metilbutil aldoxima, cianuro de bencilo y el (E)- $\beta$ -ocimeno se han reportado, entre otros, como atrayentes de enemigos naturales de *L. dispar* (p.ej. parasitoide *Glyptapanteles liparidis*; Clavijo McCormick et al., 2014). A su vez, el cianuro de bencilo y el salicilaldehído, son evitados por las larvas de *L. dispar* indicando que pueden ser utilizados como señales para identificar la variación en la calidad de *P. nigra* frente a un daño por herbivoría (Clavijo McCormick et al., 2016). Por lo tanto, las diferencias en la inducción de los COVs emitidos por ambos sauces, podrían ser señales fiables y propias de cada especie y así ser explotadas diferencialmente por insectos conespecíficos y por parasitoides y predadores de *N. oligospilus*, como se ha sugerido en la discusión del Capítulo 4 y como se ha informado previamente para *P. nigra* y *L. dispar* (Clavijo McCormick et al., 2014).

Como se mencionó en la introducción, las plantas tendrían una reserva limitada de recursos que podrían invertir priorizando el crecimiento o la defensa (Herms y Mattson, 1992). Dicho equilibrio podría verse afectado durante la domesticación resultando en una disminución de las defensas de las plantas al seleccionarse el crecimiento rápido por sobre otros rasgos (Kennedy y Barbour, 1992). Las diferencias en las respuestas constitutivas e inducidas entre ambas especies de sauce mostradas en este capítulo podrían deberse a que *S. babylonica* var *sacramenta* estuvo sometida a un proceso de domesticación en el que uno de los rasgos seleccionados era la tasa de crecimiento para aumentar su productividad. Por lo tanto, la mayor tasa de crecimiento de este sauce comercial respecto del nativo (Fig. 5.15), podría estar asociada a menor concentración constitutiva de salicinoides y taninos condensados. Particularmente, la producción de salicinoides requiere una gran inversión energética, ya que el contenido total puede alcanzar hasta el 22% de la masa foliar seca en las primeras fases de desarrollo de la hoja (Volf et al., 2015). Una inversión tan considerable ha llevado a un compromiso entre la producción de salicinoides y el crecimiento en sauces y álamos (Ruuhola y Julkunen-Tiitto, 2003; Osier y Lindroth, 2001; Kruger et al., 2020). La misma relación entre el crecimiento y las defensas se ha reportado para los taninos condensados en especies de *Populus*, mostrando tasas de crecimiento negativamente correlacionadas con la producción de estos compuestos (Kosola et al., 2004; Stevens et al., 2007). Estos resultados podrían proporcionar pruebas de que el proceso de selección y mejora de la variedad comercial influiría en la estrategia defensiva de los sauces.

## **Capítulo 6:**

### **Discusión general**



## 6.1. Contribuciones al estado de conocimiento y contraste de hipótesis

A lo largo de esta tesis se buscó evaluar el perfil químico de *Salix* spp y su relación con la selección de esta planta como hospedera por la avispa sierra *N. oligospilus*, una de las principales plagas que atacan de manera exclusiva este género en Argentina. Para ello se estudiaron tres etapas del proceso de selección como eventos concatenados: evaluación del hospedero, oviposición y herbivoría. En el **Capítulo 3** se evaluó la primera fase, caracterizando el perfil de salicinoides de la superficie foliar de varios genotipos comerciales de *Salix* spp con distinta susceptibilidad al ataque de la avispa sierra. Los resultados expuestos en este capítulo apoyan la **Hipótesis I**<sup>4</sup> planteada. Se encontró que existe una correlación positiva entre el contenido de salicinoides de la superficie foliar y la preferencia de oviposición de *N. oligospilus* (Fig. 3.2). Durante la búsqueda de una zona de la superficie de la hoja donde insertar el huevo, este himenóptero la contacta de manera repetitiva con las antenas y el ovipositor antes de la oviposición. Esta observación sumada a resultados previos que muestran sensillas gustativas en antenas y cercos del ovipositor y a los resultados del **Capítulo 3** indicaría que la avispa está detectando las señales químicas de contacto que ofrece la planta, y que los principales compuestos involucrados podrían ser los salicinoides. A su vez, esta tesis muestra evidencia a favor y por primera vez en sauces, de que estos compuestos polares podrían estar presentes sobre la superficie de sus hojas, ubicados entre las ceras cuticulares.

En el **Capítulo 4**, se estudió la segunda fase de selección del hospedero, evaluando el efecto de la oviposición de *N. oligospilus* sobre la respuesta defensiva del sauce comercial *S. babylonica* var *sacramenta* y sobre el desempeño de la avispa sierra. Los resultados de este capítulo apoyan la **Hipótesis II**<sup>5</sup> a, pero no así la **II b**<sup>6</sup>. Se demostró que la planta respondió ante la oviposición de *N. oligospilus* per se como un factor que activó la señalización de defensas a través del aumento del ácido jasmónico. Esto sugiere que esta planta es capaz de detectar compuestos inductores presentes en los huevos, en la secreción asociada a ellos y/o generados por el daño causado al insertar el ovipositor en

<sup>4</sup> Hipótesis I: Los salicinoides de la superficie foliar de *Salix* forman parte de las claves de reconocimiento del hospedero de *N. oligospilus*.

<sup>5</sup> Hipótesis II a: La oviposición sobre las hojas desencadena una respuesta defensiva inducida en *S. babylonica* que afecta posteriormente el desempeño de la avispa sierra.

<sup>6</sup> Hipótesis II b: La oviposición sobre las hojas actúa como un estímulo de *priming*, preparando a la planta para la inminente herbivoría de las larvas a través de la emisión de compuestos volátiles

la hoja. Dicha respuesta inducida afectó negativamente el desempeño de las larvas neonatas de la avispa sierra (Fig. 4.5), y, notablemente, también el estado de prepupa a través de un incremento en la proporción de individuos que retrasaban su transición a pupa (Fig. 4.5 y 4.6). Los perfiles de salicinoides no cambiaron significativamente frente a la presencia de los huevos, sino que tendieron a disminuir sus concentraciones. Esta tesis aporta evidencia sobre el efecto de la oviposición en plantas leñosas, un modelo muy poco explorado en este tópico. A su vez, los resultados del **Capítulo 4**, mostraron que la oviposición indujo la emisión de compuestos volátiles que podrían ser indicadores confiables de la presencia de huevos (i.e. (E) y (Z)- $\beta$ -ocimeno y el (E,E)- $\alpha$ -farneseno; Fig. 4.7), ya que son inducidos específicamente luego de la oviposición antes de la alimentación de las larvas. Las plantas inducidas por la herbivoría de las larvas mostraron la concentración total de COVs más alta de todos los tratamientos, independientemente de si presentaron o no oviposición previa (Fig. 4.7 y 4.8). Esto indicaría que la oviposición en estas condiciones no actúa como señal temprana de alarma (i.e. *priming*) particularmente para la emisión de COVs y, por lo tanto, estos resultados no apoyaron la Hipótesis II b.

Por último, durante el **Capítulo 5**, se estudió la etapa final del proceso de selección de la planta hospedera. Para ello se consideró que la variación genética de la planta repercute en las defensas químicas y, por ende, afecta la susceptibilidad a *N. oligospilus*. En este capítulo también se comenzó con el estudio de las defensas químicas en el único sauce nativo de Sudamérica, *S. humboldtiana*. Los resultados apoyaron la **Hipótesis III a**<sup>7</sup>, ya que se mostró que la composición constitutiva e inducida de salicinoides, taninos condensados y COVs, difiere según la especie de sauce. Contrariamente a la predicción planteada, el análisis de salicinoides mostró que *S. humboldtiana* no mostró una respuesta alta de inducción, pero sí mayores niveles constitutivos de salicinoides y taninos condensados que en *S. babylonica* (Fig. 5.10). Si bien estos compuestos se indujeron en ambos sauces, *S. babylonica* presentó una inducción mucho mayor de salicinoides generada por el daño de la avispa sierra (i.e. ~100-200 % vs ~4-24 %; Fig. 5.10 a y b). A su vez, este sauce presentó una mayor tasa de crecimiento respecto del nativo apoyando la **Hipótesis III c**<sup>8</sup>. Este resultado probablemente se deba a que, durante el proceso de domesticación de *S. babylonica* se seleccionaron clones con una mayor tasa de crecimiento, lo que conllevaría a importantes costos de asignación de recursos en desmedro de la producción constitutiva de salicinoides y taninos condensados.

<sup>7</sup> Hipótesis III a: Los metabolitos especializados (salicinoides, taninos condensados y COVs) difieren tanto en su composición constitutiva como inducida según la especie de sauce.

<sup>8</sup> Hipótesis III c: El crecimiento vegetativo inicial varía según la especie de sauce.

A su vez, a través de los resultados de los ensayos de no elección y de elección dual de *N. oligospilus*, se observaron diferencias en el desempeño y preferencia de oviposición de la avispa sierra según la especie de sauce, por lo que se apoyó la **Hipótesis III b**<sup>9</sup>. Sin embargo, contrariamente a la predicción asociada, *S. humboldtiana* resultó el más preferido para oviponer, y la especie en la que las larvas presentaron un mejor desempeño respecto de *S. babylonica* (Fig. 5.6 y 5.7). Estos resultados refuerzan la idea de que, en este insecto especialista, los salicinoides estarían involucrados en el reconocimiento de la planta hospedera y no como compuestos defensivos, como se sugirió en el **Capítulo 3**. Por lo tanto, se demostró que el sauce nativo resultó ser un hospedero susceptible al ataque de esta plaga, y que la alta concentración de salicinoides no afecta su desempeño, probablemente porque el insecto ha desarrollado mecanismos de detoxificación para tolerar estos compuestos. Esto derivó en la propuesta de una **Hipótesis ad hoc III d**<sup>10</sup>, que fue apoyada a partir de los resultados de desempeño del lepidóptero *S. frugiperda* usado como modelo de insecto generalista. La baja supervivencia de este insecto polífago al alimentarse de *S. humboldtiana*, sugiere que la concentración elevada de salicinoides sí podría tener un rol defensivo contra herbívoros con menor grado de especialización (Fig. 5.16). De esta manera, los resultados de este capítulo apoyan la idea del rol diferencial de los salicinoides, como claves de reconocimiento para insectos especialistas y disuasores de generalistas.

Por otro lado, el análisis de los COVs emitidos mostró que los compuestos constitutivos propios de cada especie (Fig. 5.11, 5.12, 5.13; Tabla Anexa 3) podrían estar involucrados en la orientación de las hembras de la avispa sierra a distancia, resultando atraídas por compuestos exclusivos liberados por *S. humboldtiana* (p.ej. salicilaldehído y germacreno D) y/o repelidas por los emitidos por *S. babylonica* var *sacramento* (p.ej. por  $\beta$ -cariofileno y  $\alpha$ -humuleno). A su vez, las diferencias encontradas en el patrón de emisión inducido característico de cada sauce (cianuro de bencilo, 3-metilbutil aldoxima en *S. babylonica* y salicilaldehído en *S. humboldtiana*) podrían influir a nivel intra y/o interespecífico, conformando claves químicas para parasitoides y/o depredadores indicadoras de la presencia de larvas hospederas o incluso para *N. oligospilus* como señal de alerta para evitar plantas con competidores conespecíficos para su descendencia (Valladares et al., 2020). Sin embargo, estas posibilidades aun no fueron evaluadas.

<sup>9</sup> Hipótesis III b: La preferencia de oviposición y el desempeño de *N. oligospilus* varían dependiendo de la especie de sauce.

<sup>10</sup> Hipótesis ad hoc III d: Un herbívoro generalista como *S. frugiperda* sólo es capaz de desarrollarse sobre sauces con bajo contenido de salicinoides.

## 6.2. Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis han surgido una serie de nuevos interrogantes que se proponen abordar en futuras investigaciones:

- Si bien se ha sugerido que los salicinoides podrían ser los compuestos estimulantes de oviposición y de reconocimiento de la planta hospedera para algunos insectos especialistas de salicáceas, no se sabe cuál de ellos es el que está involucrado específicamente en la respuesta medida. Es necesario realizar ensayos de electrofisiología, con cada uno para determinar si generan actividad neuronal en *N. oligospilus*. Estos ensayos se hicieron en el crisomélido especialista de salicáceas *Chrysomela populi* y mostraron que las neuronas receptoras gustativas de un tipo de sensilia en las antenas responden a la salicina (Pentzold et al., 2019). Además, sería interesante realizar ensayos de preferencia y comportamiento utilizando soluciones artificiales elaboradas con estándares individuales de estos compuestos para determinar unívocamente la participación de cada uno de ellos como claves de contacto. Esto se realizó con tremulacina que estimula *per se* la oviposición de la avispa sierra especialista de salicáceas *Euura lasiolepis* (Roininen et al., 1999). Incluso evaluar si son las proporciones relativas de cada compuesto las que contribuyen al reconocimiento de la planta hospedera. A su vez, sería interesante evaluar si las larvas son capaces de secuestrar los salicinoides como parte de su estrategia defensiva contra los depredadores, ayudaría a comprender la preferencia de las hembras por sauces con mayor contenido de salicinoides.
- Durante la oviposición, la hembra cubre al huevo con una secreción del ovipositor. En otros sistemas esta secreción suele contener a los compuestos inductores específicos que disparan la respuesta de la planta en presencia del huevo. Sería interesante entender cómo funciona esta respuesta para ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de defensa inducidos por oviposición de herbívoros, especialmente en plantas leñosas donde hay muy poca información.
- Los sauces varían la composición de COVs emitidos tras la inducción por la oviposición y la herbivoría de *N. oligospilus*. Estudiar si los parasitoides y depredadores que interactúan naturalmente con este insecto plaga en los sauces pueden orientarse a través de los COVs liberados por estas plantas, contribuiría a ampliar el conocimiento sobre el rol biológico de estos compuestos como defensas indirectas frente al ataque de la avispa sierra. De esta manera, se podrían utilizar como estrategias de control biológico a través

de la elaboración de cebos para proteger tanto plantaciones de sauces comerciales como sauces nativos. A su vez, sería necesario evaluar cuáles son las claves volátiles que orientan a la avispa sierra hacia su planta hospedera y así poder desarrollar estrategias de manejo integrado que afecten su comportamiento para, por ejemplo, mejorar los sistemas de vigilancia actuales basados únicamente en la utilización de trampas cromáticas pegajosas.

- Si bien los salicinoides y los taninos condensados, son los metabolitos asociados con las defensas directas en salicáceas, en la interacción entre el sauce y la avispa sierra se desconocen cuáles serían los factores que prolongaron el tiempo de desarrollo larval y prepupal de *N. oligospilus*. Por lo tanto, el estudio de otros metabolitos defensivos poco explorados en *Salix* spp (p.ej. inhibidores de proteasas), o de componentes nutricionales (p.ej. proteínas, azúcares) puede contribuir a entender en qué medida repercutirían en el ciclo de vida de este insecto y en su dinámica poblacional. A su vez, evaluar la interacción entre los sauces y otros insectos herbívoros de distinto grado de especialización y modo alimentario, ayudaría a ampliar el conocimiento sobre las diferentes estrategias defensivas en estas plantas leñosas.
- Debido a que se evaluaron clones de pocos individuos de sauce nativo, es necesario incorporar un mayor número individuos que aporten variabilidad genética intraespecífica para que los resultados presentados sean más abarcativos y extrapolables a nivel poblacional. Por tal motivo se está determinando la pureza de varios individuos de *S. humboldtiana* en distintas localidades del país para luego evaluar el perfil fitoquímico de esta especie.
- Sólo los árboles jóvenes pueden estudiarse con facilidad en condiciones experimentales de laboratorio y a veces sus respuestas defensivas difieren de las de los árboles maduros. Esto se debe principalmente a que la concentración de salicinoides cambia notablemente con la ontogenia de la planta en algunas salicáceas (Boeckler et al., 2011). Por lo tanto, extender el estudio de las defensas en plantas leñosas sobre árboles maduros contribuiría a conocer con mayor profundidad y de manera más realista las estrategias defensivas de estas plantas frente a los insectos herbívoros.

### 6.3. Consideraciones finales

Los resultados de esta tesis representan un avance para entender la interacción entre un himenóptero especialista y el sauce, una planta leñosa que constituye un modelo poco explorado para estudiar las defensas contra insectos herbívoros. Sin embargo, aún son necesarios más estudios para entender con mayor profundidad la ecología química del género *Salix* y sus insectos asociados.

En esta tesis se demostró, además, la importancia de estudiar distintas especies y genotipos de sauces para entender la susceptibilidad frente a los insectos herbívoros a través de la caracterización los metabolitos especializados defensivos, como los salicinoides. Barker et al. (2018) mostraron que la estructura de las comunidades de insectos estaría determinada por la genética de las plantas y, por ende, por su composición fitoquímica, entre otros rasgos. Los resultados de esta tesis sugieren que la variación genotípica en la composición de salicinoides dentro de un cultivo de sauces podría explicar la presencia de los insectos especialistas y generalistas asociados como se ha reportado para *Populus tremuloides* (Barker et al., 2019). A su vez, se sugirió que estos compuestos pueden ser beneficiosos actuando como estimulantes de oviposición, pero a su vez ser perjudiciales para el desempeño de los generalistas. Por lo tanto, los salicinoides podrían ser usados como indicadores tanto de la susceptibilidad como de resistencia de la planta, según el insecto atacante. El conocimiento sobre la composición de los salicinoides podría contribuir a desarrollar estrategias de manejo en las que se pueda disminuir el impacto del daño generado por estos insectos. Esto se podría realizar mediante el uso de plantaciones multi-clonales con el fin de aumentar la diversidad genética y fitoquímica de los cultivos y, por ende, favorecer la biodiversidad de los herbívoros y sus enemigos naturales asociados. Por otro lado, la identificación y caracterización de estos compuestos químicos, puede contribuir a predecir la susceptibilidad frente a los insectos herbívoros aportando información para los programas de mejoramiento genético mediante cruzamientos con especies resistentes. También podría ser útil para los programas de rescate de especies de árboles amenazadas como *S. humboldtiana*. En este último caso, el conocimiento de la fitoquímica podría definir en qué medida la presencia de los salicinoides, determinan la persistencia de la especie nativa por su interacción con los insectos herbívoros, durante el proceso de multiplicación y repoblación de la especie nativa.

## Bibliografía

- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. In Carol Stream: Allured publishing corporation. Allured Publishing Corporation.
- Adati, T., & Matsuda, K. (1993). Feeding stimulants for various leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) in the leaf surface wax of their host plants. *Applied entomology and zoology*, 28(3), 319-324. doi:10.1303/aez.28.319.
- Adema, M., Villarreal, B., Weber, C., Galarco, S., & Sharry, S. (2022). Propagación vegetativa (macro y micro) y evaluación de la capacidad de remoción de iones Cu<sup>2+</sup> de *Salix humboldtiana* Willd (sauce criollo). *Revista De La Facultad De Agronomía*, 121(Especial 2), 104. <https://doi.org/10.24215/16699513e104>.
- Aerts, R. J., Barry, T. N., & McNabb, W. C. (1999). Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 75(1-2), 1-12. doi:10.1016/S0167-8809(99)00062-6
- Alderete, C. (2005). Estudios poblacionales de *Nematus oligospilus* Foerster (Hymenoptera: Tenthredinidae), en Tucumán, plaga de sauces (Salicáceas) en Argentina. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Naturales e IML, UNT.
- Alderete, M., Liljestrom, G., and Fidalgo, P. (2010). Bio-ecología y perspectivas para el manejo de la avispa sierra del sauce. Serie técnica: Manejo Integrado de Plagas Forestales. INTA ediciones 10, 12 p.
- Ali, J. G., & Agrawal, A. A. (2012). Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. *Trends in plant science*, 17(5), 293-302. doi: 10.1016/j.tplants.2012.02.006.
- Amico, I., Gallo, L., Li, S., and Gallardo, C. (2018). Sauce criollo: rescate genético y cultural en la Provincia de Chubut.
- Appel, Heidi M. (1993). Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. *Journal of chemical ecology*, 19 (7), 1521e1552. doi:10.1007/BF00984895
- Arimura, G. I., Matsui, K., Takabayashi, J. (2009). Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. *Plant and Cell Physiology*, 50(5), 911-923. doi: 10.1093/pcp/pcp030
- Austel, N., Eilers, E. J., Meiners, T., and Hilker, M. (2016). Elm leaves "warned" by insect egg deposition reduce survival of hatching larvae by a shift in their quantitative leaf metabolite pattern. *Plant, Cell & Environment*, 39 (2), 366–376. doi: 10.1111/pce.12619.
- Awmack, C. S. & Leather, S. R. (2002). Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual review of entomology*, 47 (1), 817–844. doi: 10.1146/annurev.ento.47.091201.145300.
- Babst, B. A., Harding, S. A., and Tsai, C. J. (2010). Biosynthesis of phenolic glycosides from phenylpropanoid and benzenoid precursors in populus. *Journal of chemical ecology*, 36, 286–297. doi: 10.1007/s10886-010-9757-7.
- Badenes-Pérez, F. R., Gershenzon, J., and Heckel, D. G. (2014). Insect attraction versus plant defense: Young leaves high in glucosinolates stimulate oviposition by a specialist herbivore despite poor larval survival due to high saponin content. *PLoS One* 9. doi: 10.1371/journal.pone.0095766.
- Badenes-Pérez, F. R., Reichelt, M., Gershenzon, J., Heckel, D. G. (2011). Phylloplane location of glucosinolates in *Barbarea* spp. (Brassicaceae) and misleading assessment of host suitability by a specialist herbivore. *New Phytologist*, 189, 549–556. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03486.x.
- Baldwin, I. T., Halitschke, R., Paschold, A., Von Dahl, C. C., Preston, C. A. (2006). Volatile signaling in plant-plant interactions: "talking trees" in the genomics era. *Science*, 311(5762), 812-815. doi: 10.1126/science.1118446.

- Bandoly, M., Grichnik, R., Hilker, M., and Steppuhn, A. (2016). Priming of anti-herbivore defence in *Nicotiana attenuata* by insect oviposition: Herbivore-specific effects. *Plant, Cell & Environment*, 39, 848–859. doi: 10.1111/pce.12677.
- Bandoly, M., Hilker, M., and Steppuhn, A. (2015). Oviposition by *Spodoptera exigua* on *Nicotiana attenuata* primes induced plant defence against larval herbivory. *Plant Journal* 83, 661–672. doi: 10.1111/tpj.12918.
- Barbehenn, R. V., & Peter Constabel, C. (2011). Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry* 72, 1551–1565. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.01.040.
- Barker, H. L., Holeski, L. M., & Lindroth, R. L. (2019a). Independent and interactive effects of plant genotype and environment on plant traits and insect herbivore performance: a meta-analysis with *Salicaceae*. *Functional Ecology*, 33(3), 422–435. doi: 10.1111/1365-2435.13249.
- Barker, H. L., Riehl, J. F., Bernhardsson, C., Rubert-Nason, K. F., Holeski, L. M., Ingvarsson, P. K., & Lindroth, R. L. (2019b). Linking plant genes to insect communities: Identifying the genetic bases of plant traits and community composition. *Molecular Ecology*, 28(19), 4404–4421.
- Bellocq, I., Loetti, V., and Rubio, A. (2019). Ecología y manejo de la avispa sierra (*Nematus oligospilus*) en plantaciones de salicáceas del Delta del Río Paraná - Síntesis de 10 años de investigación.
- Bernays, E. A., & Chapman, R. E. (1994). Chemicals in plants. Host-plant selection by phytophagous insects, 14–60. doi: 10.1007/978-0-585-30455-7\_3.
- Berry, J. A. (1997). *Nematus oligospilus* (Hymenoptera: Tenthredinidae), a recently introduced sawfly defoliating willows in New Zealand. *New Zealand Entomologist* 20, 51–54. doi: 10.1080/00779962.1997.9722670.
- Bertea, C. M., Casacci, L. Pietro, Bonelli, S., Zampollo, A., and Barbero, F. (2020). Chemical, Physiological and Molecular Responses of Host Plants to Lepidopteran Egg-Laying. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–7. doi: 10.3389/fpls.2019.01768.
- Beyaert, I., Wäschke, N., Scholz, A., Varama, M., Reinecke, A., and Hilker, M. (2010). Relevance of resource-indicating key volatiles and habitat odour for insect orientation. *Animal Behaviour*, 79 (5), 1077–1086. doi: 10.1016/j.anbehav.2010.02.001.
- Biselli, C., Vietto, L., Rosso, L., Cattivelli, L., Nervo, G., and Fricano, A. (2022). Advanced Breeding for Biotic Stress Resistance in Poplar. *Plants* 11, 1–36. doi: 10.3390/plants11152032.
- Bittner, N., Hundacker, J., Achotegui-Castells, A., Anderbrant, O., and Hilker, M. (2019). Defense of Scots pine against sawfly eggs (*Diprion pini*) is primed by exposure to sawfly sex pheromones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116 (49), 24668–24675. doi: 10.1073/pnas.1910991116.
- Björkman, C., Larsson, S., Bommarco, R. (1997) Oviposition preferences in pine sawflies: a trade-off between larval growth and defence against natural enemies. *Oikos*, 79, 45–52. doi: 10.2307/3546088.
- Blande, J.D. (2017). Chapter eleven - plant communication with herbivores. In: Becard, G. (Ed.), *Advances in botanical research, How Plants Communicate with Their Biotic Environment*. Academic Press, pp. 281–304. doi: 10.1016/bs.abr.2016.09.004.
- Boeckler G.A., Towns M, Unsicker SB, Mellway RD, Yip L, Hilke I, Gershenzon J, Constabel CP. (2014). Transgenic upregulation of the condensed tannin pathway in poplar leads to a dramatic shift in leaf palatability for two tree-feeding Lepidoptera. *Journal of Chemical Ecology*, 40: 150–158. doi: 10.1007/s10886-014-0383-7.
- Boeckler, G. A., Gershenzon, J., and Unsicker, S. B. (2011). Phenolic glycosides of the *Salicaceae* and their role as anti-herbivore defenses. *Phytochemistry* 72, 1497–1509. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.01.038.
- Boeckler, G. A., Gershenzon, J., and Unsicker, S. B. (2013). Gypsy moth caterpillar feeding has only a marginal impact on phenolic compounds in old-growth black poplar. *Journal of Chemical Ecology*, 39, 1301–1312. doi: 10.1007/s10886-013-0350-8.



- Boeckler, G. A., Paetz, C., Feibicke, P., Gershenzon, J., and Unsicker, S. B. (2016). Metabolism of poplar salicinoids by the generalist herbivore *Lymantria dispar* (Lepidoptera). *Insect biochemistry and molecular Biology*, 78, 39–49. doi: 10.1016/j.ibmb.2016.08.001.
- Boevé, J.-L. & Schaffner, U. (2003). Why does the larval integument of some sawfly species disrupt so easily? The harmful hemolymph hypothesis. *Oecologia* 134:104–111. doi: 10.1007/s00442-002-1092-4.
- Bonnet, C., Lassueur, S., Ponzio, C., Gols, R., Dicke, M., and Reymond, P. (2017). Combined biotic stresses trigger similar transcriptomic responses but contrasting resistance against a chewing herbivore in *Brassica nigra*. *BMC Plant Biology*, 17, 1–14. doi: 10.1186/s12870-017-1074-7.
- Borodowski, E.D. & Suárez, R.O. (2004). El cultivo de álamos y sauces: su historia en el Delta del Paraná. *SAGPyA Forestal* 32: 5-13.
- Braccini, C. L., Vega, A. S., Chludil, H. D., Leicach, S. R., and Fernandez, P. C. (2013). Host selection, oviposition behaviour and leaf traits in a specialist willow sawfly on species of *Salix* (Salicaceae). *Ecological Entomology*, 38, 617–626. doi: 10.1111/een.12053.
- Braccini, C. L., Vega, A. S., Coll Aráoz, M. V., Teal, P. E., Cerrillo, T., Zavala, J. A., et al. (2015). Both Volatiles and Cuticular Plant Compounds Determine Oviposition of the Willow Sawfly *Nematus oligospilus* on Leaves of *Salix* spp. (Salicaceae). *Journal of chemical ecology*, 41, 985–996. doi: 10.1007/s10886-015-0637-z.
- Brilli, F., Ciccioli, P., Frattoni, M., Prestininzi, M., Spanedda, A. F., & Loreto, F. (2009). Constitutive and herbivore-induced monoterpenes emitted by *Populus* × *euroamericana* leaves are key volatiles that orient *Chrysomela populi* beetles. *Plant, cell & environment*, 32(5), 542-552. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.01948.x
- Broberg, C. L., Howard Inkster, J. A., and Borden, J. H. (2010). Phenological and chemical differences among hybrid poplar clones (Salicaceae) varying in resistance to *Cryptorhynchus lapathi* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 29–48. doi: 10.1016/j.bse.2009.12.036.
- Brooks, M. E., Kristensen, K., van Benthem, K. J., Magnusson, A., Berg, C. W., Nielsen, A., Skaug, H. J., Mächler, M., & Bolker, B. M. (2017). glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. *R Journal*, 9(2), 378–400. doi: 10.32614/rj-2017-066
- Bruce T, Wadhams L, Woodcock C. (2005). Insect host location a volatile situation. *Trends in Plant Science*, 10(6): 269-74. doi: 10.1016/j.tplants.2005.04.003
- Bruce, T. J. A., Midega, C. A. O., Birkett, M. A., Pickett, J. A., and Khan, Z. R. (2010). Is quality more important than quantity? Insect behavioural responses to changes in a volatile blend after stemborer oviposition on an African grass. *Biology letters*, 6, 314–317. doi: 10.1098/rsbl.2009.0953.
- Bruessow, F., Gouhier-Darimont, C., Buchala, A., Metraux, J. P., and Reymond, P. (2010). Insect eggs suppress plant defence against chewing herbivores. *Plant Journal* 62, 876–885. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04200.x.
- Bruinsma, M., Dicke, M. (2008). Herbivore-induced indirect defense: from induction mechanisms to community ecology. *Induced Plant Resistance to Herbivory*, 31–60. doi: 10.1007/978-1-4020-8182-8\_2.
- Bruzzese, E. & McFadyen, R. (2006). Arrival of leaf-feeding willow sawfly *Nematus oligospilus* forster in Australia - Pest or beneficial? *Plant Protection Quarterly*, 21, 43–44.
- Bryant, J. P., Reichardt, P. B., Clausen, T. P., & Werner, R. A. (1993). Effects of mineral nutrition on delayed inducible resistance in Alaska paper birch. *Ecology*, 74(7), 2072-2084. doi: 10.2307/1940853.
- Büchel, K., McDowell, E., Nelson, W., Descour, A., Gershenzon, J., Hilker, M., et al. (2012). An elm EST database for identifying leaf beetle egg-induced defense genes. *BMC Genomics* 13, 1–18. doi: 10.1186/1471-2164-13-242.

- Buschhaus, C. & Jetter, R. (2011). Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: How do plants seal their epidermal surfaces? *Journal of experimental botany*, 62, 841–853. doi: 10.1093/jxb/erq366.
- Cabarcos P. D. (1995). Efectos sobre el crecimiento producidos por la defoliación de avispa sierra en una plantación comercial de sauces del Delta del Paraná. Informe de Beca de Iniciación, Exp. Agrop. INTA Delta del Paraná.
- Calatayud PA, Chimtawi M, Tauban D, Marion-Poll F, Le Rü BP et al. (2006) Sexual dimorphism of antennal, tarsal and ovipositor chemosensilla in the African stemborer, *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera: Noctuidae). *Annales de la Société Entomologique de France* 42: 403–412. doi:10.1080/00379271.2006.10697472.
- Caron, V., Ede, F., Sunnucks, P., and O'Dowd, D. J. (2014). Distribution and rapid range expansion of the introduced willow sawfly *Nematus oligospilus* Förster (Hymenoptera: Tenthredinidae) in Australasia. *Austral Entomology*, 53, 175–182. doi: 10.1111/aen.12067.
- Carr, T. G., Roininen, H., and Price, P. W. (1998). Oviposition Preference and Larval Performance of *Nematus oligospilus* (Hymenoptera: Tenthredinidae) in Relation to Host Plant Vigor. *Environmental Entomology*, 27, 615–625. doi: 10.1093/ee/27.3.615.
- Cha, D. H., Hochwender, C. G., Bosecker, E. M., Tucker, R. E., Kaufman, A. D., Fritz, R. S., et al. (2009). Do exotic generalist predators alter host plant preference of a native willow beetle? *Agricultural and Forest Entomology*, 11, 175–184. doi: 10.1111/j.1461-9563.2008.00410.x.
- Charles, J. G. & Allan, D. J. (2000). Development of the willow sawfly, *Nematus oligospilus*, at different temperatures, and an estimation of voltinism throughout new zealand. *New Zealand Journal of Zoology*, 27, 197–200. doi: 10.1080/03014223.2000.9518226.
- Charles, J. G., Allan, D. J., & Fung, L. (1998). Susceptibility of willows to oviposition by the willow sawfly, *Nematus oligospilus*. In *Proceedings of the New Zealand Plant Protection Conference* Vol. 51, pp. 230–234. doi:10.30843/nzpp.1998.51.11658.
- Cheng, D., Vrieling, K., and Klinkhamer, P. G. L. (2011). The effect of hybridization on secondary metabolites and herbivore resistance: implications for the evolution of chemical diversity in plants. *Phytochemistry Reviews*, 10:107–117. doi: 10.1007/s11101-010-9194-9.
- Clausen T.P., Reichardt P.B., Bryant J.P., Werner R.A, Post K., Frisby K. (1989) Chemical model for short-term induction in quaking aspen (*Populus tremuloides*) foliage against herbivores. *Journal of chemical ecology*, 15: 2335–2346. doi: 10.1007/BF01012085.
- Clavijo McCormick, A. C., Irmisch, S., Boeckler, G. A., Gershenson, J., Köllner, T. G., and Unsicker, S. B. (2019). Herbivore-induced volatile emission from old-growth black poplar trees under field conditions. *Scientific Reports*, 9, 1–10. doi: 10.1038/s41598-019-43931-y.
- Clavijo McCormick, A. C., Reinecke, A., Gershenson, J., and Unsicker, S. B. (2016). Feeding Experience Affects the Behavioral Response of Polyphagous Gypsy Moth Caterpillars to Herbivore-induced Poplar Volatiles. *Journal of chemical ecology*, 42, 382–393. doi: 10.1007/s10886-016-0698-7.
- Clavijo McCormick, A., Irmisch, S., Reinecke, A., Boeckler, G. A., Veit, D., Reichelt, M., et al. (2014). Herbivore-induced volatile emission in black poplar: Regulation and role in attracting herbivore enemies. *Plant, Cell & Environment*, 37, 1909–1923. doi: 10.1111/pce.12287.
- Clavijo McCormick, A., Unsicker, S. B., and Gershenson, J. (2012). The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. *Trends in plant science*, 17, 303–310. doi: 10.1016/j.tplants.2012.03.012.
- Colazza, S., Fucarino, A., Peri, E., Salerno, G., Conti, E., and Bin, F. (2004). Insect oviposition induces volatile emission in herbaceous plants that attracts egg parasitoids. *Journal of Experimental Biology*, 207, 47–53. doi: 10.1242/jeb.00732.
- Conti, E., & Colazza, S. (2012). Chemical ecology of egg parasitoids associated with true bugs. *Psyche (London)* 2012. doi: 10.1155/2012/651015.

- Conti, E., Frati, F., and Salerno, G. (2012). Oviposition Behaviour of *Lygus rugulipennis* and its Preferences for Plant Wounds. *Journal of insect behavior*, 25, 339–351. doi: 10.1007/s10905-011-9302-8.
- Cortizo, S., Cerrillo, T., Thomas, E., and Monteverde, S. (2016). Subprograma Salicáceas (*Salix* y *Populus*), Domesticación y Mejoramiento de Especies Forestales. Ed: Marcó M. y Llavallol C. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Ministerio de Agroindustria. UCAR (Unidad para el Cambio Rural), 86–112.
- Cortizo, S.; Abiatti, N. y Mema, V. (2009). Nuevas posibilidades para ampliar la diversidad clonal de las plantaciones de álamo del Delta del Paraná. Segundo Congreso Internacional de las Salicáceas en Argentina. Mendoza: 8 pp.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12:564–582. doi: 10.1128/CMR.12.4.564.
- Coyle, D. R., Mcmillin, J. D., Hall, R. B., Hart, E. R., and Entomol, E. (2003). Effects of Cottonwood Leaf Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) Larval Defoliation, Clone, and Season on *Populus* Foliar Phagostimulants. *Physiological Ecology*, 32, 452–4625. doi: 10.1603/0046-225X-32.3.452.
- Craig T.P. & Ohgushi T. (2002). Preference and performance are correlated in the spittlebug *Aphrophora pectoralis* on four species of willow. *Ecological Entomology*, 27: 529-540. doi: 10.1046/j.1365-2311.2002.00448.x.
- Craig, T.P., Itami, J.K. & Price, P.W. (1989) A strong relationship between oviposition preference and larval performance in a shoot galling sawfly. *Ecology*, 70, 1691–1699. doi: 10.2307/1938103
- Curley, J.P. (2016), compete: Analyzing competitive interaction data: R package version 0.1
- Dalzell SA, Shelton HM. (2002). Genotypic variation in proanthocyanidin status in the *Leucaena* genus. *Journal of Agricultural Science*, 138: 209–220. doi: 10.1017/S0021859601001848
- Danner H., Böeckler G.A., Irmisch S., Yuan J.S., Chen F., Gershenzon J., Unsicker S.B., Köllner T.G. (2011) Four terpene synthases produce major compounds of the gypsy moth feeding-induced volatile blend of *Populus trichocarpa*. *Phytochemistry*, 72: 897–908. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.03.014
- Dapoto, G., Olave, A., and Bondoni, A. (2011). Plagas de las Salicáceas en Patagonia Norte. Importancia de los principales artrópodos presentes en los valles irrigados del Río Negro y del Neuquén. Jornadas de Salicáceas 2011. Tercer Congreso Internacional de Salicáceas en Argentina, 14.
- De Santis L. 1981. Estudio de una nueva plaga defoliadora del sauce criollo en la provincia de Chubut. *Novedades del Museo de La Plata* (1): 9.
- de Vries, H. 1995. An improved test of linearity in dominance hierarchies containing unknown or tied relationships. *Animal Behaviour*, 50: 1375-1389. doi: 10.1016/0003-3472(95)80053-0.
- de Vries, H. 1998. Finding a dominance order most consistent with a linear hierarchy: a new procedure and review. *Animal Behaviour*, 55: 827-843. doi: 10.1006/anbe.1997.0708.
- Denno R.F., Larsson S., Olmstead K.L. (1990) Role of enemy-free space and plant quality in host-plant selection by willow beetles. *Ecology*, 71:124–137. doi: 10.2307/1940253
- Desurmont, G. A., & Weston, P. A. (2011). Aggregative oviposition of a phytophagous beetle overcomes egg-crushing plant defences. *Ecological Entomology*, 36, 335–343. doi: 10.1111/j.1365-2311.2011.01277.x.
- Devadas S.K., Enyedi A. & Raina R. (2002) The *Arabidopsis* hrl1 mutation reveals novel overlapping roles for salicylic acid, jasmonic acid and ethylene signalling in cell death and defence against pathogens. *The Plant Journal*, 30, 467–480. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01300.x.
- Dezzotti, A., Sbrancia, R. E., Attis Beltrán, H., Velásquez, A., and Mortoro, A. (2020). Aspectos históricos, ecológicos y sociales asociados a *Salix humboldtiana* en la ribera del río Agrio en la Patagonia Argentina. *Ciencia & Investigación Forestal* 26, 45–68. doi: 10.52904/0718-4646.2020.532.

- Dicke, M. & Baldwin, I. T. (2010). The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends in plant science*, 15, 3, 167-175. doi: 10.1016/j.tplants.2009.12.002.
- Dicke, M. (1999). Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods?. In *Proceedings of the 10th international symposium on insect-plant relationships*, 131-142, Springer Netherlands. doi: 10.1007/978-94-017-1890-5\_16.
- Dickmann, D. I., Kuzovkina, J., Isebrands, J., & Richardson, J. (2014). *Poplars and willows: trees for society and the environment*. Rome: FAO CABI.
- Diezel C., von Dahl C.C., Gaquerel E. & Baldwin I.T. (2009) Different Lepi- dopteran elicitors account for cross-talk in herbivory-induced phytohormone signaling. *Plant Physiology*, 150, 1576–1586. doi: 10.1104/pp.109.139550.
- Dixon, R. A., Achrine, L., Kota, P., Liu, C.-J., Reddy, M. S., and Wang, L. (2002). The phenyl-propanoid pathway and plant defence-a genomics perspective. *Molecular plant pathology*, 3(5):371–390. doi: 10.1046/j.1364-3703.2002.00131.x.
- Donaldson J.R., Lindroth R.L. (2007). Genetics, environment, and their interaction determine efficacy of chemical defense in trembling aspen. *Ecology*, 88:729–739. doi: 10.1890/06-0064
- Donaldson, J. R., Stevens, M. T., Barnhill, H. R., & Lindroth, R. L. (2006). Age-related shifts in leaf chemistry of clonal aspen (*Populus tremuloides*). *Journal of chemical ecology*, 32, 1415-1429. doi: 10.1007/s10886-006-9059-2.
- Doss, R. P., Oliver, J. E., Proebsting, W. M., Potter, S. W., Kuy, S., Clement, S. L., et al. (2000). Bruchins: Insect-derived plant regulators that stimulate neoplasm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (11), 6218–6223. doi: 10.1073/pnas.110054697.
- Douma, J. C., Ganzeveld, L. N., Unsicker, S. B., Boeckler, G. A., & Dicke, M. (2019). What makes a volatile organic compound a reliable indicator of insect herbivory?. *Plant, Cell & Environment*, 42(12), 3308-3325. doi: 10.1111/pce.13624.
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K., and Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 198, 16–32. doi: 10.1111/nph.12145.
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A., & Orlova, I. (2006). Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical reviews in plant sciences*, 25(5), 417-440. doi: 10.1080/07352680600899973.
- Eberl, F., Fabisch, T., Luck, K., Köllner, T. G., Vogel, H., Gershenzon, J., & Unsicker, S. B. (2021). Poplar protease inhibitor expression differs in an herbivore specific manner. *BMC Plant Biology*, 21, 1-11. doi: 10.1186/s12870-021-02936-4.
- Eder, J. & Cosio, E. G. (1994). Elicitors of plant defense responses. In *International review of cytology* (Vol. 148, pp. 1-36). Academic Press. doi: 10.1016/S0074-7696(08)62404-3.
- Egonyu, J. P., Ekesi, S., Kabaru, J., Irungu, L., & Torto, B. (2013). Cashew volatiles mediate short-range location responses in *Pseudotheraptus wayi* (Heteroptera: Coreidae). *Environmental entomology*, 42(6), 1400-1407. doi: 10.1603/EN13233.
- Erb, M., and Reymond, P. (2019). Molecular Interactions between Plants and Insect Herbivores. *Annual review of plant biology*, 70, 527–557. doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-095910.
- Evans, L. T. (1996). *Crop evolution, adaptation and yield*. Cambridge university press.
- Fabisch, T., Gershenzon, J., and Unsicker, S. B. (2019). Specificity of Herbivore Defense Responses in a Woody Plant, Black Poplar (*Populus nigra*). *Journal of chemical ecology*, 45, 162–177. doi: 10.1007/s10886-019-01050-y.
- Fatouros, N. E., Lucas-Barbosa, D., Weldegergis, B. T., Pashalidou, F. G., van Loon, J. J. A., Dicke, M., et al. (2012). Plant volatiles induced by herbivore egg deposition affect insects of different trophic levels. *PLoS One* 7. doi: 10.1371/journal.pone.0043607.

- Fatouros, N. E., Pineda, A., Huigens, M. E., Broekgaarden, C., Shimwela, M. M., Figueroa Candia, I. A., et al. (2014). Synergistic effects of direct and indirect defences on herbivore egg survival in a wild crucifer. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281. doi: 10.1098/rspb.2014.1254.
- Feistel, F., Paetz, C., Lorenz, S., & Schneider, B. (2015). The absolute configuration of salicortin, HCH-salicortin and tremulacin from *Populus trichocarpa* × *deltoides* Beaupré. *Molecules*, 20(4), 5566-5573. doi: 10.3390/molecules20045566.
- Fernández, P. C., Braccini, C. L., Dávila, C., Barrozo, R. B., Aráoz, M. V. C., Cerrillo, T., ... & Zavala, J. A. (2019). The use of leaf surface contact cues during oviposition explains field preferences in the willow sawfly *Nematus Oligospilus*. *Scientific reports*, 9(1), 4946. doi: 10.1038/s41598-019-41318-7.
- Ferrier S.M. & Price P.W. (2004). Oviposition preference and larval performance of a rare bud-galling sawfly (Hymenoptera: Tenthredinidae) on willow in Northern Arizona. *Environmental Entomology*, 33(3): 700-708. doi: 10.1603/0046-225X-33.3.700.
- Fields, M. J., & Orians, C. M. (2006). Specificity of phenolic glycoside induction in willow seedlings (*Salix sericea*) in response to herbivory. *Journal of chemical ecology*, 32, 2647–2656. doi: 10.1007/s10886-006-9188-7.
- Flinta, C. M., (1960). Prácticas de plantación forestal en América Latina. FAO. 1ª edición. Cuaderno de Fomento Forestal N° 15
- Fox, J., & Weisberg, S. (2019). Nonlinear Regression, Nonlinear Least Squares, and Nonlinear Mixed Models in R. *population*, 150, 200.
- Fritz, R. S., Mouliá, C., & Newcombe, G. (1999). Resistance of hybrid plants and animals to herbivores, pathogens, and parasites. *Annual review of ecology and systematics*, 30, 1, 565-591. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.30.1.565.
- Frost, C. J., Mescher, M. C., Carlson, J. E., and De Moraes, C. M. (2008). Plant defense priming against herbivores: Getting ready for a different battle. *Plant physiology*, 146, 818–824. doi: 10.1104/pp.107.113027.
- Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., and Bak, S. (2013). Plant defense against insect herbivores. doi: 10.3390/ijms140510242.
- Galizia, C. G. & Menzel, R. (2000). Odour perception in honeybees: coding information in glomerular patterns. *Current Opinion in Neurobiology*, 10, 504e510. doi: 10.1016/S0959-4388(00)00109-4.
- Gallo, L., A. Martínez, J. Bozzi, I. Amico & M. Hansen (2016). Hacia el rescate genético del sauce criollo (*Salix humboldtiana*). Programa para su conservación y la restauración de ecosistemas ribereños patagónicos. *Presencia* 66: 13-17.
- Gammell, M. P., Vries, H. D., Jennings, D. J., Carlin, C. M., & Hayden, T. J. (2003). David's score: a more appropriate dominance ranking method than Clutton-Brock et al.'s index. *Animal behaviour*, 66(3), 601-605. doi: 10.1006/anbe.2003.2226.
- Gange, A.C. (1995). Aphid performance in an alder (*Alnus*) hybrid zone. *Ecology*, 76: 2074–2083. doi:10.2307/1941682.
- Gaquerel, E., Gulati, J., and Baldwin, I. T. (2014). Revealing insect herbivory-induced phenolamide metabolism: from single genes to metabolic network plasticity analysis. *The Plant Journal*, 79(4):679–692. doi: 10.1111/tpj.12503.
- Gatehouse, J. A. (2002). Plant resistance towards insect herbivores: A dynamic interaction. *New Phytologist* 156, 145–169. doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00519.x.
- Geiselhardt, S., Yoneya, K., Blenn, B., Drechsler, N., Gershenson, J., Kunze, R., & Hilker, M. (2013). Egg laying of cabbage white butterfly (*Pieris brassicae*) on *Arabidopsis thaliana* affects subsequent performance of the larvae. *PLoS One*, 8(3), e59661. doi: 10.1371/journal.pone.0059661.
- Giménez R.A. (2006). Las plagas de las salicáceas: principales preocupaciones y técnicas de manejo disponibles. *Actas jornadas de salicáceas*, 125-129 pp.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 205-227. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923.

- Golfari, L. (1958). Condiciones ecológicas del cultivo de las Salicáceas en la Argentina. *Rev. Inv. Agríc.* 12 (2): 173-224, 1 mapa, 68 figuras, 4 cuadros, Buenos Aires.
- González R.H., Barría G., Guerrero M.A. (1986). *Nematus desantisi* Smith, a new species of forest importance in Chile (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Revista Chilena de Entomología*, 14: 13-15.
- González-Estrada, E., & Villaseñor, J. A. (2018). An R package for testing goodness of fit: goft. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, 88(4), 726–751. doi:10.1080/00949655.2017.1404604.
- Gripenberg, S., Mayhew, P. J., Parnell, M., & Roslin, T. (2010). A meta-analysis of preference–performance relationships in phytophagous insects. *Ecology letters*, 13(3), 383-393. doi: 10.1111/j.1461-0248.2009.01433.x.
- Guo, L., Liu, F., Zhang, S., Kong, X., and Zhang, Z. (2019). Egg Deposition of *Micromelalopha sieversi* (Staudinger) on Clones of *Populus* from Section *Aigeiros* Induces Resistance in Neighboring Plants. *Forest*, 10, 110. doi: 10.3390/f10020110.
- Gutbrodt B., Dorn S., Mody K. (2012) Drought stress affects constitutive but not induced herbivore resistance in apple plants. *Arthropod Plant Interact*, 6:171–179. doi: 10.1007/s11829-011-9173-0
- Haack, R. A., & Mattson, W. J. (1993). Life history patterns of North American tree-feeding sawflies. Life history patterns of North American tree-feeding sawflies., 503-545.
- Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1989). Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *Journal of Chemical Ecology*, 15(6), 1795–1810. doi: 10.1007/BF01012267
- Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1991). Tannins and lignins. *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites*, 1, 355-388.
- Hallgren, P., Ikonen, A., Hjältén, J., and Roininen, H. (2003). Inheritance patterns of phenolics in F1, F2, and back-cross hybrids of willows: implications for herbivore responses to hybrid plants. *Journal of chemical ecology*, 29:1143–1158. doi: 10.1023/A:1023829506473
- Hanski, I. & Parviainen, P. (1985). Cocoon Predation by Small Mammals, and Pine Sawfly Population Dynamics. *Oikos* 45, 125. doi: 10.2307/3565230.
- Hansson, B. S. (2002). A bug's smell—research into insect olfaction. *Trends in Neurosciences*, 25(5), 270-274. doi: 10.1016/S0166-2236(02)02140-9.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (1995). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports*, 12(6), 639-657. doi: 10.1039/NP9951200639.
- Hartig, F., & Hartig, M. F. (2021). Package ‘DHARMA’. R package version 0.3, 3.
- Hartley, S. E., & Lawton, J. H. (1987). Effects of different types of damage on the chemistry of birch foliage, and the responses of birch feeding insects. *Oecologia* 74, 432–437.
- Haruta M., Pedersen J.A., Constabel C.P. (2001) Polyphenol oxidase and herbivore defense in trembling aspen (*Populus tremuloides*): cDNA cloning, expression, and potential substrates. *Physiologia Plantarum*, 112:552–558. doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1120413.x
- Haukioja, E. (2006). Tree defenses against insects, in *Multigenic and induced systemic resistance in plants* (Springer, Boston, MA), 279–295.
- Hemming, J. D. C., and Lindroth, R. (1995). Intraspecific variation in aspen phytochemistry: effects on performance of gypsy moths and forest tent caterpillars. *Oecologia*, 103, 79–88. doi: 10.1007/BF00328428.
- Hermes, D. A., & Mattson, W. J. (1992). The dilemma of plants: to grow or defend. *The quarterly review of biology*, 67(3), 283-335. doi: 10.1086/417659
- Hilfiker, O., Groux, R., Bruessow, F., Kiefer, K., Zeier, J., and Reymond, P. (2014). Insect eggs induce a systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 80, 1085–1094. doi: 10.1111/tpj.12707.
- Hilker, M. & Fatouros, N. E. (2015). Plant responses to insect egg deposition. *Annual Review of Entomology*, 60, 493–515. doi: 10.1146/annurev-ento-010814-020620.

- Hilker, M. & Fatouros, N. E. (2016). Resisting the onset of herbivore attack: Plants perceive and respond to insect eggs. *Current opinion in plant biology*, 32, 9–16. doi: 10.1016/j.pbi.2016.05.003.
- Hilker, M. & Meiners, T. (2006). Early herbivore alert: Insect eggs induce plant defense. *Journal of chemical ecology*, 32, 1379–1397. doi: 10.1007/s10886-006-9057-4.
- Hilker, M. & Meiners, T. (2010). How do plants “notice” attack by herbivorous arthropods? *Biological Reviews* 85, 267–280. doi: 10.1111/j.1469-185X.2009.00100.x.
- Hilker, M. & Meiners, T. (2011). Plants and insect eggs: How do they affect each other? *Phytochemistry* 72, 1612–1623. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.02.018.
- Hilker, M., Kobs, C., Varama, M., and Schrank, K. (2002). Insect egg deposition induces *Pinus sylvestris* to attract egg parasitoids. *Journal of Experimental Biology* 205, 455–461. doi: 10.1242/jeb.205.4.455.
- Hilker, M., Stein, C., Schröder, R., Varama, M., and Mumm, R. (2005). Insect egg deposition induces defence responses in *Pinus sylvestris*: Characterisation of the elicitor. *Journal of Experimental Biology* 208, 1849–1854. doi: 10.1242/jeb.01578.
- Hundacker, J., Bittner, N., Weise, C., Bröhan, G., Varama, M., and Hilker, M. (2021). Pine defense against eggs of an herbivorous sawfly is elicited by an annexin-like protein present in egg-associated secretion. *Plant Cell Environ* 45, 1033–1048. doi: 10.1111/pce.14211.
- Irmisch, S., Clavijo McCormick, A., Boeckler, G. A., Schmidt, A., Reichelt, M., Schneider, B., ... & Köllner, T. G. (2013). Two herbivore-induced cytochrome P450 enzymes CYP79D6 and CYP79D7 catalyze the formation of volatile aldoximes involved in poplar defense. *The Plant Cell*, 25(11), 4737–4754. doi: 10.1105/tpc.113.118265.
- Irmisch, S., Clavijo McCormick, A., Günther, J., Schmidt, A., Boeckler, G. A., Gershenzon, J., ... & Köllner, T. G. (2014). Herbivore-induced poplar cytochrome P450 enzymes of the CYP 71 family convert aldoximes to nitriles which repel a generalist caterpillar. *The Plant Journal*, 80(6), 1095–1107. doi: 10.1111/tbj.12711.
- Jetter, R. & Riederer, M. (1994). Epicuticular crystals of nonacosan-10-ol: In-vitro reconstitution and factors influencing crystal habits. *Planta*, 195, 257–270. doi: 10.1007/BF00199686.
- Jetter, R., Kunst, L., and Samuels, A. L. (2007). Composition of Plant Cuticular Waxes. *Annual Plant Reviews*, 23, 145–181. doi: 10.1002/9780470988718.ch4.
- Jetter, R., Schäffer, S., and Riederer, M. (2000). Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: Evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant Cell Environ*, 23, 619–628. doi: 10.1046/j.1365-3040.2000.00581.x.
- Julkunen-tiitto, A. R., Bryant, J. P., Kuropat, P., and Roininen, H. (1995). Slight tissue wounding fails to induce consistent chemical defense in three willow (*Salix* spp.) clones. *Oecologia*, 101, 467–471. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00329425>.
- Karban, R. & Baldwin, I. T. (1997). Induced responses to herbivory. University of Chicago Press.
- Karban, R. & Myers, J. H. (1989). Induced plant responses to herbivory. *Annual review of ecology and systematics*. Vol. 20, 331–348. doi: 10.1146/annurev.es.20.110189.001555.
- Karp, A., Hanley, S. J., Trybush, S. O., Macalpine, W., Pei, M., and Shield, I. (2011). Genetic Improvement of Willow for Bioenergy and Biofuels. *Journal of integrative plant biology*, 53, 151–165. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.01015.x.
- Kassambara, A. & Mundt, F. (2020). Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses. R package version. 1, 337–354.
- Kassambara, A. (2020). Package ‘ggpubr’. R package version 0.1, 6(0).
- Kaur, H., Heinzl, N., Schöttner, M., Baldwin, I. T., and Gális, I. (2010). R2R3-NaMYB8 regulates the accumulation of phenylpropanoid-polyamine conjugates, which are essential for local and systemic defense against insect herbivores in *Nicotiana attenuata*. *Plant physiology*, 152(3):1731–174. doi: 10.1104/pp.109.151738.

- Kawazu, K., Mochizuki, A., Sato, Y., Sugeno, W., Murata, M., Seo, S., & Mitsuhashi, I. (2012). Different expression profiles of jasmonic acid and salicylic acid inducible genes in the tomato plant against herbivores with various feeding modes. *Arthropod-Plant Interactions*, 6, 221-230. doi: 10.1007/s11829-011-9174-z.
- Kazan, K., & Manners, J. M. (2008). Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant physiology*, 146(4), 1459-1468. doi: 10.1104/pp.107.115717
- Kempel, A., Schädler, M., Chrobock, T., Fischer, M., & van Kleunen, M. (2011). Tradeoffs associated with constitutive and induced plant resistance against herbivory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(14), 5685-5689. doi: 10.1073/pnas.1016508108.
- Kennedy, G. G., & Barbour, J. D. (1992). Resistance variation in natural and managed systems. Plant resistance to herbivores and pathogens: ecology, evolution, and genetics., 13-41.
- Kessler, A., Poveda, K., & Poelman, E. H. (2012). Plant-induced responses and herbivore population dynamics. *Insect outbreaks revisited*, 91-112. doi: 10.1002/9781118295205.ch5.
- Kim, J., Tooker, J. F., Luthe, D. S., De Moraes, C. M., and Felton, G. W. (2012). Insect eggs can enhance wound response in plants: a study system of tomato *Solanum lycopersicum* L. and *Helicoverpa zea* Boddie. *PLoS One*, 7, 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0037420.
- Klaper, R., Ritland, K., Mousseau, T. A., & Hunter, M. D. (2001). Heritability of phenolics in *Quercus laevis* inferred using molecular markers. *Journal of Heredity*, 92(5), 421-426. doi: 10.1093/jhered/92.5.421.
- Knudsen, J. T., Eriksson, R., Gershenzon, J., & Ståhl, B. (2006). Diversity and distribution of floral scent. *The botanical review*, 72(1), 1-120. doi: 10.1663/0006-8101(2006)72[1:DADOFS]2.0.CO;2.
- Koch, F. & Smith, D. R. (2000). *Nematus oligospilus* Förster (Hymenoptera: Tenthredinidae), an introduced willow sawfly in the Southern Hemisphere. *Proceedings-entomological society of washington*, 102, 292–300. Available at: <http://biostor.org/reference/57035>.
- Koch, J. R., Creelman, R. A., Eshita, S. M., Seskar, M., Mullet, J. E., & Davis, K. R. (2000). Ozone sensitivity in hybrid poplar correlates with insensitivity to both salicylic acid and jasmonic acid. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiology*, 123(2), 487-496. doi: 10.1104/pp.123.2.487.
- Koch, K. & Ensikat, H. J. (2008). The hydrophobic coatings of plant surfaces: epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly. *Micron*, 39(7), 759-772. doi: 10.1016/j.micron.2007.11.010.
- Koes, R., Verweij, W., and Quattrocchio, F. (2005). Flavonoids: A Colorful Model for the Regulation and Evolution of Biochemical Pathways. *Trends in plant science*, 10, 236–242. doi: 10.1016/j.tplants.2005.03.002
- Kolehmainen, J., Julkunen-Tiitto, R., Roininen, H., & Tahvanainen, J. (1995). Phenolic glucosides as feeding cues for willow-feeding leaf beetles. *Entomologia experimentalis et applicata*, 74(3), 235-243. doi: 10.1111/j.1570-7458.1995.tb01896.x
- Kosola, K. R., Dickmann, D. I., Hall, R. B., & Workmaster, B. A. A. (2004). Cottonwood growth rate and fine root condensed tannin concentration. *Tree Physiology*, 24(9), 1063-1068. doi: 10.1093/treephys/24.9.1063.
- Krebs, H. A., Wiggins, D., Stubbs, M., Sols, A., & Bedoya, F. (1983). Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochemical Journal*, 214(3), 657-663. doi: 10.1042/bj2140657.
- Kruger, E. L., Keefover-Ring, K., Holeski, L. M., and Lindroth, R. L. (2020). To compete or defend: linking functional trait variation with life-history tradeoffs in a foundation tree species. *Oecologia*, 192, 893–907. doi: 10.1007/s00442-020-04622-y.
- Krugner, R., Wallis, C. M., and Walse, S. S. (2014). Attraction of the egg parasitoid, *Gonatocerus ashmeadi* Girault (Hymenoptera: Mymaridae) to synthetic formulation of a (E)- $\beta$ -ocimene and (E,E)- $\alpha$ -farnesene mixture. *Biological Control*, 77, 23–28. doi: 10.1016/j.biocontrol.2014.06.005.



- Kudo, G. (2003). Variations in leaf traits and susceptibility to insect herbivory within a *Salix miyabeana* population under field conditions. *Plant Ecology*, 169, 61–69. doi: 10.1023/A:1026209017627.
- Landau, H. (1951). On dominance relations and the structure of animal societies: I. Effect of inherent characteristics. *The bulletin of mathematical biophysics*, 13, 1-19. doi: 10.1007/BF02478336
- Lê, S., Josse, J., and Husson, F. (2008). FactoMineR: an R Package for Multivariate Analysis. *Journal of statistical software*, 25, 1–18. doi: 10.18637/jss.v025.i01.
- Lehrman, A., Boddum, T., Stenberg, J. A., Orians, C. M., and Björkman, C. (2013). Constitutive and herbivore-induced systemic volatiles differentially attract an omnivorous biocontrol agent to contrasting *Salix* clones. *AoB Plants*, 5. doi: 10.1093/aobpla/plt005.
- Lenth, R., Singmann, H., Love, J., Buerkner, P., & Herve, M. (2020). emmeans: estimated marginal means. R package version 1.4. 4. *Am. Stat*, 34(4), 216-221.
- Lin, S., Binder, B. F., & Hart, E. R. (1998). Insect feeding stimulants from the leaf surface of *Populus*. *Journal of chemical ecology*, 24, 1781-1790. doi: 10.1023/A:1022351415467.
- Lindroth, R. L. & Bloomer, M. S. (1991). Biochemical ecology of the forest tent caterpillar: responses to dietary protein and phenolic glycosides. *Oecologia*, 86, 408-413. doi: 10.1007/BF00317609
- Lindroth, R. L. & Clair, S. B. S. (2013). Adaptations of quaking aspen (*Populus tremuloides* Michx.) for defense against herbivores. *Forest Ecology and Management*, 299, 14-21. doi: 10.1016/j.foreco.2012.11.018.
- Lindroth, R. L., Hsia, M. S., & Scriber, J. M. (1987). Characterization of phenolic glycosides from quaking aspen. *Biochemical Systematics and Ecology*, 15(6), 677-680. doi: 10.1016/0305-1978(87)90045-7.
- Lindstedt, C., Murphy, L., & Mappes, J. (2019). Antipredator strategies of pupae: how to avoid predation in an immobile life stage?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374(1783), 20190069. doi: 10.1098/rstb.2019.0069.
- Ling, J., Li, X., Yang, G., & Yin, T. (2022). Volatile metabolites of willows determining host discrimination by adult *Plagioderia versicolora*. *Journal of Forestry Research*, 33(2), 679-687. doi: 10.1007/s11676-021-01349-1
- Little, D., Gouhier-Darimont, C., Bruessow, F., and Reymond, P. (2007). Oviposition by pierid butterflies triggers defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 143, 784–800. doi: 10.1104/pp.106.090837.
- Liu, J., Osbourn, A., and Ma, P. (2015). MYB transcription factors as regulators of phenyl-propanoid metabolism in plants. *Molecular Plant*, 8(5):689–708. doi: 10.1016/j.molp.2015.03.012.
- Lombarkia, N. & Derridj, S. (2002). Incidence of apple fruit and leaf surface metabolites on *Cydia pomonella* oviposition. In *Proceedings of the 11th International Symposium on Insect-Plant Relationships* (pp. 79-87). Springer Netherlands. doi: 10.1007/978-94-017-2776-1\_9.
- López, J., Marcó, M., Harrand, L., Pathauer, P., García, M., López, A., ... & Llavallol, C. I. (2016). Domesticación y mejoramiento de especies forestales. Ed: Marcó M. y Llavallol C. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Ministerio de Agroindustria. UCAR (Unidad para el Cambio Rural).
- Lortzing, T., Kunze, R., Steppuhn, A., Hilker, M., and Lortzing, V. (2020). *Arabidopsis*, tobacco, nightshade and elm take insect eggs as herbivore alarm and show similar transcriptomic alarm responses. *Scientific Reports*, 10, 1–16. doi: 10.1038/s41598-020-72955-y.
- Lortzing, V., Oberländer, J., Lortzing, T., Tohge, T., Steppuhn, A., Kunze, R., & Hilker, M. (2019). Insect egg deposition renders plant defence against hatching larvae more effective in a salicylic acid-dependent manner. *Plant, Cell & Environment*, 42(3), 1019-1032. doi: 10.1111/pce.13447.
- Lüdecke, D., Bartel, A., Schwemmer, C., Powell, C., Djalovski, A., & Titz, J. (2022). sjPlot: Data Visualization for Statistics in Social Science. R Package Version 2.8.12, <https://CRAN.R-Project.Org/Package=sjPlot>, 1.
- Luft Albarracin, E., Hill, J. G., and Alderete, M. (2013). Aportes biológicos de *Gelis tenellus* (Hymenoptera: Ichneumonidae), parasitoide de *Nematus oligospilus* (Hymenoptera: Tenthredinidae)

- en Argentina. *Acta zoológica lilloana* 57 - Suplemento, V Reunion Argentina de Parasitoidólogos, 90–92.
- Malagón-Aldana, L. A., Serna, F., & Smith, D. R. (2017). On the natural history of the willow sawfly *Nematus oligospilus* (Hymenoptera, Tenthredinidae) inhabiting *Salix humboldtiana*, in Colombia. *Journal of Hymenoptera Research*, 55, 189-199. doi: 10.3897/jhr.55.11566.
- Marazzi, C., Patrian, B., and Städler, E. (2004). Secondary metabolites of the leaf surface affected by sulphur fertilisation and perceived by the cabbage root fly. *Chemoecology*, 14, 87–94. doi: 10.1007/s00049-003-0265-x.
- Massad, T. J., Trumbore, S. E., Ganbat, G., Reichelt, M., Unsicker, S., Boeckler, A., ... & Ruehlw, S. (2014). An optimal defense strategy for phenolic glycoside production in *Populus trichocarpa*—isotope labeling demonstrates secondary metabolite production in growing leaves. *New Phytologist*, 203(2), 607-619. doi: 10.1111/nph.12811.
- Matsuki, M., & MacLean, S. F. (1994). Effects of different leaf traits on growth rates of insect herbivores on willows. *Oecologia* 100, 141–152. doi: 10.1007/BF00317141.
- Mayhew, P. J. (1997). Adaptive patterns of host-plant selection by phytophagous insects. *Oikos*, 417-428. doi: 10.2307/3546884.
- McKey, D. (1974). Adaptive patterns in alkaloid physiology. *The American Naturalist*, 108(961), 305-320. doi: 10.1086/282909.
- Meiners, T. & Hilker, M. (2000). Induction of plant synomones by oviposition of a phytophagous insect. *Journal of chemical ecology*, 26, 221–232. doi: 10.1023/A:1005453830961.
- Mellway, R. D., Tran, L. T., Prouse, M. B., Campbell, M. M., & Constabel, C. P. (2009). The wound-, pathogen-, and ultraviolet B-responsive MYB134 gene encodes an R2R3 MYB transcription factor that regulates proanthocyanidin synthesis in poplar. *Plant Physiology*, 150(2), 924-941. doi: 10.1104/pp.109.139071.
- Méndez, E. (2012). Revisión del género *salix* (salicaceae) en la Provincia de Mendoza, Argentina. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo*, 44 (2), 157–192.
- Mitchell, C., Brennan, R. M., Graham, J., and Karley, A. J. (2016). Plant defense against herbivorous pests: Exploiting resistance and tolerance traits for sustainable crop protection. *Frontiers in plant science*, 7, 1–8. doi: 10.3389/fpls.2016.01132.
- Mole, S. (1993). The systematic distribution of tannins in the leaves of angiosperms: a tool for ecological studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21(8), 833-846. doi: 10.1016/0305-1978(93)90096-A.
- Moreira, X., Abdala-Roberts, L., Gols, R., & Francisco, M. (2018b). Plant domestication decreases both constitutive and induced chemical defences by direct selection against defensive traits. *Scientific reports*, 8(1), 12678. doi: 10.1038/s41598-018-31041-0
- Moreira, X., Nell, C. S., Katsanis, A., Rasmann, S., & Mooney, K. A. (2018a). Herbivore specificity and the chemical basis of plant–plant communication in *Baccharis salicifolia* (Asteraceae). *New Phytologist*, 220(3), 703-713. doi: 10.1111/nph.14164.
- Mrazova, A. & Sam, K. (2018). Application of methyl jasmonate to grey willow (*Salix cinerea*) attracts insectivorous birds in nature. *Arthropod-Plant Interactions*, 12, 1–8. doi: 10.1007/s11829-017-9558-9.
- Müller, C. & Riederer, M. (2005). Plant surface properties in chemical ecology. *Journal of chemical ecology*, 31, 2621-2651. doi: 10.1007/s10886-005-7617-7.
- Müller, C. (2006). Plant-Insect Interactions on Cuticular Surfaces. *Annual Plant Reviews online*, 23, 398–422. doi: 10.1002/9781119312994.ap0241.
- Müller, C., Agerbirk, N., Olsen, C. E., Boevé, J. L., Schaffner, U., & Brakefield, P. M. (2001). Sequestration of host plant glucosinolates in the defensive hemolymph of the sawfly *Athalia rosae*. *Journal of chemical ecology*, 27, 2505-2516. doi: 10.1023/A:1013631616141

- Mur, L. A., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H., & Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?. *Journal of experimental Botany*, 59(3), 501-520. doi: 10.1093/jxb/erm239.
- Núñez-Farfán, J., Fornoni, J., and Valverde, P. L. (2007). The evolution of resistance and tolerance to herbivores. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 38, 541–566. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095822.
- Nurkomar, I., Pudjianto, Manuwoto, S., Buchori, D., Matsuyama, S., Taylor, D., & Kainoh, Y. (2018). (E, E)- $\alpha$ -Farnesene as a host-induced plant volatile that attracts *Apanteles taragamae* (Hymenoptera: Braconidae) to host-infested cucumber plants. *Biocontrol Science and Technology*, 28(1), 34-48. doi: 10.1080/09583157.2017.1413340.
- Olofsson, E. (1987). Mortality Factors in a Population of *Neodiprion sertifer* (Hymenoptera: Diprionidae). *Oikos*, 48, 297. doi: 10.2307/3565517.
- Olsson, S., Farsakoglou, A. M., Jorge, V., Grivet, D., Guerin, V., Ojeda, D. I., ... & Scotti, I. (2020). Comparative analysis of genetic diversity in natural and breeding populations. Poster. GenTree Final Conference.
- Orians, C. M. & Fritz, R. S. (1995). Secondary chemistry of hybrid and parental willows: Phenolic glycosides and condensed tannins in *Salix sericea*, *S. eriocephala*, and their hybrids. *Journal of chemical ecology*, 21, 1245–1253. doi: 10.1007/BF02027559.
- Orians, C. M., Griffiths, M. E., Roche, B. M., & Fritz, R. S. (2000). Phenolic glycosides and condensed tannins in *Salix sericea*, *S. eriocephala* and their F1 hybrids: not all hybrids are created equal. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(7), 619-632. doi: 10.1016/S0305-1978(99)00101-5
- Orians, C. M., Huang, C. H., Wild, A., Dorfman, K. A., Zee, P., Dao, M. T. T., et al. (1997). Willow hybridization differentially affects preference and performance of herbivorous beetles. *Entomologia experimentalis et applicata*, 83, 285–294. doi: 10.1046/j.1570-7458.1997.00183.x.
- Osier, T. L. & Lindroth, R. L. (2001). Effects of genotype, nutrient availability, and defoliation on aspen phytochemistry and insect performance. *Journal of chemical ecology*, 27, 1289-1313. doi: 10.1023/A:1010352307301.
- Osier, T. L. & Lindroth, R. L. (2004). Long-term effects of defoliation on quaking aspen in relation to genotype and nutrient availability: Plant growth, phytochemistry and insect performance. *Oecologia*, 139, 55–65. doi: 10.1007/s00442-003-1481-3.
- Ovruski S.M. (1991). Distribución geográfica de *Nematus desantisi* Smith (Hym.: Tenthredinidae), plaga de salicáceas. *Ciencia e Cultura (Brasil)*, 43(7): 36-37.
- Ovruski, S. M. & Smith, D. R. (1993). Descriptions of immature stages of *Nematus desantisi* (Hymenoptera: Tenthredinidae), a pest of Salicaceae in Argentina and Chile. *Entomological News*, 104(4), 153-160.
- Ovruski, S.M. & Fidalgo, P. (1991). Distribución geográfica de *Nematus desantisi* Smith (Hymenoptera: Tenthredinidae), plaga de salicáceas. *Ciência e Cultura Supplement*, 43(7), 36-37.
- Paniagua Voirol, Hilker, M., Lortzing, V., Johnston, P. R., Fatouros, N. E., and Kunze, R. (2020). Plant responses to insect eggs are not induced by egg-associated microbes, but by a secretion attached to the eggs. *Plant, Cell & Environment*, 43, 1815–1826. doi: 10.1111/pce.13746.
- Paré, P. W., & Tumlinson, J. H. (1997). De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. *Plant physiology*, 114(4), 1161-1167., 2731–2739. <https://doi.org/10.1002/ecy.2534>.
- Pashalidou, F. G., Eyman, L., Sims, J., Buckley, J., Fatouros, N. E., De Moraes, C. M., & Mescher, M. C. (2020). Plant volatiles induced by herbivore eggs prime defences and mediate shifts in the reproductive strategy of receiving plants. *Ecology Letters*, 23(7), 1097-1106. doi: 10.1111/ele.13509.
- Pashalidou, F. G., Fatouros, N. E., Van Loon, J. J., Dicke, M., & Gols, R. (2015a). Plant-mediated effects of butterfly egg deposition on subsequent caterpillar and pupal development, across different species of wild Brassicaceae. *Ecological Entomology*, 40(4), 444-450. doi: 10.1111/een.12208.

- Pashalidou, F. G., Gols, R., Berkhout, B. W., Weldegergis, B. T., van Loon, J. J., Dicke, M., & Fatouros, N. E. (2015b). To be in time: egg deposition enhances plant-mediated detection of young caterpillars by parasitoids. *Oecologia*, 177, 477-486. doi: 10.1007/s00442-014-3098-0.
- Paudel, S., Lin, P. A., Foolad, M. R., Ali, J. G., Rajotte, E. G., & Felton, G. W. (2019). Induced plant defenses against herbivory in cultivated and wild tomato. *Journal of Chemical Ecology*, 45, 693-707. doi: 10.1007/s10886-019-01090-4.
- Peacock, L., Lewis, M., and Powers, S. (2001). Volatile compounds from *Salix* spp. varieties differing in susceptibility to three willow beetle species. *Journal of chemical ecology*, 27, 1943-1951. doi: 10.1023/A:1012278417424.
- Peña-Cortés H., Albrecht T., Prat S., Weiler E.W. & Willmitzer L. (1993) Aspirin prevents wound-induced gene-expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta*, 191, 123-128. doi:10.1007/BF00240903.
- Pentzold, S., Marion-Poll, F., Grabe, V., & Burse, A. (2019). Autofluorescence-based identification and functional validation of antennal gustatory sensilla in a specialist leaf beetle. *Frontiers in Physiology*, 10, 343. doi: 10.3389/fphys.2019.00343.
- Peters, D. J. & Constabel, C. P. (2002). Molecular analysis of herbivore-induced condensed tannin synthesis: Cloning and expression of dihydroflavonol reductase from trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant Journal*, 32, 701-712. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01458.x.
- Philippe, R. N. C. & Bohlmann, J. (2007). Poplar defense against insect herbivores. *Canadian Journal of Botany*, 85, 1111-1126. doi: 10.1139/B07-109.
- Pinheiro, J. C. & Bates, D. M. (2000). Linear mixed-effects models: basic concepts and examples. *Mixed-effects models in S and S-Plus*, 3-56. doi: 10.1007/0-387-22747-4\_1.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., & Team, R. C. (2022). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-126. <http://cran.r-project.org/package=nlme>.
- Pirk, G. I., and Lopez De Casenave, J. (2011). Seed Preferences of Three Harvester Ants of the Genus *Pogonomyrmex* (Hymenoptera : Formicidae ) in the Monte Desert: Are They Reflected in the Diet ? *Entomological Society of America*, 104, 212-220. doi: 10.1603/AN10093.
- Popp, C., Burghardt, M., Friedmann, A., & Riederer, M. (2005). Characterization of hydrophilic and lipophilic pathways of *Hedera helix* L. cuticular membranes: permeation of water and uncharged organic compounds. *Journal of experimental botany*, 56(421), 2797-2806. doi: 10.1093/jxb/eri272.
- Porter, L. J. (1992). Structure and chemical properties of the condensed tannins. *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance*, 245-258. doi: 10.1007/978-1-4615-3476-1\_14.
- Price, P. & H. Roininen (1993). Adaptative Radiation in Gall Induction. En: "Sawfly Life History Adaptations to Woody Plants". Wagner, F. and K. Raffa (eds.). Academic Press. USA. Cap. 9: 229 - 257.
- Ragonese, A. E. (1993). Fitotécnica de salicáceas en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. INTA. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, 47(2), 35.
- Rank, N. E., Köpf, A., Julkunen-Tiitto, R., & Tahvanainen, J. (1998). Host preference and larval performance of the salicylate-using leaf beetle *Phratora vitellinae*. *Ecology*, 79(2), 618-631. doi: 10.1890/0012-9658(1998)079[0618:HPALPO]2.0.CO;2.
- Raupp, M. J. & Denno, R. F. (1983). Leaf age as a predictor of herbivore distribution and abundance. In R. F. Denno, & M. S. McClure (Eds.), *Variable Plants and Herbivores in Natural and Managed Systems* (pp. 91-124). New York, NY: Academic Press.
- Reymond, P. (2013). Perception, signaling and molecular basis of oviposition-mediated plant responses. *Planta*, 238, 247-258. doi: 10.1007/s00425-013-1908-y.
- Riffell, J. A., Lei, H., Christensen, T. A., & Hildebrand, J. G. (2009). Characterization and coding of behaviorally significant odor mixtures. *Current Biology*, 19(4), 335-340. doi: 10.1016/j.cub.2009.01.041.

- Ringelmann, A., Riedel, M., Riederer, M., & Hildebrandt, U. (2009). Two sides of a leaf blade: *Blumeria graminis* needs chemical cues in cuticular waxes of *Lolium perenne* for germination and differentiation. *Planta*, 230, 95-105. doi: 10.1007/s00425-009-0924-4.
- Roininen, H., Price, P. W., Julkunen-Tiitto, R., Tahvanainen, J., and Ikonen, A. (1999). Oviposition stimulant for a gall-inducing sawfly, *Euura lasiolepis*, on willow is a phenolic glucoside. *Journal of chemical ecology*, 25, 943–953. doi: 10.1023/A:1020813305196.
- Rondoni, G., Bertoldi, V., Malek, R., Djelouah, K., Moretti, C., Buonauro, R., & Conti, E. (2018). *Vicia faba* plants respond to oviposition by invasive *Halyomorpha halys* activating direct defences against offspring. *Journal of Pest Science*, 91, 671-679. doi: 10.1007/s10340-018-0955-3
- Rosenthal, J. P., & Dirzo, R. (1997). Effects of life history, domestication and agronomic selection on plant defence against insects: evidence from maizes and wild relatives. *Evolutionary Ecology*, 11, 337–355. doi: 10.1023/A:1018420 504439
- Roth, S., Lindroth, R. L., Volin, J. C., & Kruger, E. L. (1998). Enriched atmospheric CO<sub>2</sub> and defoliation: effects on tree chemistry and insect performance. *Global Change Biology*, 4(4), 419-430. doi: 10.1046/j.1365-2486.1998.00164.x.
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Rubert-Nason, K. F., & Lindroth, R. L. (2019). Analysis of condensed tannins in *Populus* spp. using reversed phase UPLC-PDA(-) esi-MS following thiolytic depolymerisation. *Phytochemical Analysis*, 30(3), 257-267. doi: 10.1002/pca.2810.
- Rubert-Nason, K. F., Couture, J. J., Major, I. T., Constabel, C. P., and Lindroth, R. L. (2015). influence of genotype, environment, and gypsy moth herbivory on local and systemic chemical defenses in trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Journal of chemical ecology*, 41, 651–661. doi: 10.1007/s10886-015-0600-z.
- Rubert-Nason, K., Keefover-Ring, K., & Lindroth, R. L. (2017). Purification and Analysis of Salicinoids. *Current Analytical Chemistry*, 14(4), 423–429. doi: 10.2174/1573411014666171221131933
- Ruuhola, T. & Julkunen-Tiitto, R. (2003). Trade-off between synthesis of salicylates and growth of micropropagated *Salix pentandra*. *Journal of chemical ecology*, 29, 1565-1588. doi: 10.1023/A:1024266612585.
- Ruuhola, T. M., Sipura, M., Nousiainen, O., and Tahvanainen, J. (2001). Systemic induction of salicylates in *Salix myrsinifolia* (Salisb.). *Annals of Botany*, 88, 483–497. doi: 10.1006/anbo.2001.1491.
- Sabelis, M. W., Janssen, A., & Takabayashi, J. (2011). Can plants evolve stable alliances with the enemies' enemies?. *Journal of Plant Interactions*, 6(2-3), 71-75. doi: 10.1080/17429145.2011.556262.
- Salminen, J.-P., Karonen, M., and Sinkkonen, J. (2011). Chemical ecology of tannins: recent developments in tannin chemistry reveal new structures and structure–activity patterns. *Chemistry–A European Journal*, 17(10):2806–2816. doi: 10.1002/chem.201002662.
- Santner, A. & Estelle, M. (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*, 459, 1071–1078. doi: 10.1038/nature08122.
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I. A., and Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature chemical biology*, 5, 301–307. doi: 10.1038/nchembio.165.
- Santos-del-Blanco, L., Alía, R., González-Martínez, S. C., Sampedro, L., Lario, F., & Climent, J. (2015). Correlated genetic effects on reproduction define a domestication syndrome in a forest tree. *Evolutionary Applications*, 8(4), 403-410. doi: 10.1111/eva.12252.
- Schaffner, U., Boevé, J. L., Gfeller, H., & Schlunegger, U. P. (1994). Sequestration of *Veratrum* alkaloids by specialist *Rhadinoceraea nodicornis* Konow (Hymenoptera, Tenthredinidae) and its ecoethological implications. *Journal of Chemical Ecology*, 20, 3233-3250. doi: 10.1007/BF02033723.

- Schenk P.M., Kazan K., Wilson I., Anderson J.P., Richmond T., Somerville S.C. & Manners J.M. (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 11655–11660. doi: 10.1073/pnas.97.21.11655.
- Schiestl, F. P. & Johnson, S. D. (2013). Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends in ecology & evolution*, 28(5), 307–315. doi: 10.1016/j.tree.2013.01.019
- Schnitzler, J. P., Louis, S., Behnke, K., and Loivamäki, M. (2010). Poplar volatiles - biosynthesis, regulation and (eco)physiology of isoprene and stress-induced isoprenoids. *Plant Biology*, 12, 302–316. doi: 10.1111/j.1438-8677.2009.00284.x.
- Schnurrer, F. & Paetz, C. (2022). On the Metabolic Conversion of Salicortin-like Chemical Defenses (Salicortinoids) in the Lepidopteran Specialist Herbivore *Cerura vinula* (Notodontidae). doi: 10.21203/rs.3.rs-2143465/v1.
- Schönherr, J. (2006). Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *Journal of Experimental Botany*, 57(11), 2471–2491. doi: 10.1093/jxb/erj217.
- Schoonhoven, L. M., van Loon, J. J. A., and Dicke, M. (2005). *Insect-Plant Biology*. Oxford University Press on Demand Available at: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/lancaster/reader.action?docID=422809&ppg=228>.
- Schott, J., Fuchs, B., Böttcher, C., and Hilker, M. (2021). Responses to larval herbivory in the phenylpropanoid pathway of *Ulmus minor* are boosted by prior insect egg deposition. *Planta*, 255, 1–16. doi: 10.1007/s00425-021-03803-0.
- Schultz, J. C. (1989). Tannin-insect interactions. Chemistry and significance of condensed tannins, 417–433. doi: 10.1007/978-1-4684-7511-1\_26.
- Shiojiri, K., Ozawa, R., Kugimiya, S., Uefune, M., van Wijk, M., Sabelis, M. W., & Takabayashi, J. (2010). Herbivore-specific, density-dependent induction of plant volatiles: honest or “cry wolf” signals?. *PLoS One*, 5(8), e12161. doi: 10.1371/journal.pone.0012161.
- Signorelli, A. & Gaute, M. (2012). Mapa de Plantaciones Forestales. Área de Sistemas de Información Geográfica e Inventario Forestal de la Dirección de Producción Forestal del MAGyP.
- Singh, S., Kaur, I., and Kariyat, R. (2021). The multifunctional roles of polyphenols in plant-herbivore interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 1–19. doi: 10.3390/ijms22031442.
- Smith, D. R. (1979). Suborder Symphyta. *Catalog of Hymenoptera in America North of Mexico*, 3–137. doi: 10.5109/2401.
- Smith, D. R. (1993). Systematics, life History, and distribution of sawflies. *sawfly life history adaptations to woody plants* (San Diego, CA: Academic Press), 3–32.
- Snyder, D. T., Schilling, M. C., Hochwender, C. G., and Kaufman, A. D. (2015). Profiling phenolic glycosides in *Populus deltoides* and *Populus grandidentata* by leaf spray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Methods* 7, 870–876. doi: 10.1039/c4ay02639j.
- Stanton, B. J., Serapiglia, M. J., & Smart, L. B. (2014). The domestication and conservation of *Populus* and *Salix* genetic resources. In *Poplars and willows: Trees for society and the environment* (pp. 124–199). Wallingford UK: CABI. doi: 10.1079/9781780641089.012.
- Staudt, M. & Lhoutellier, L. (2007). Volatile organic compound emission from holm oak infested by gypsy moth larvae: evidence for distinct responses in damaged and undamaged leaves. *Tree physiology*, 27(10), 1433–1440. doi:10.1093/treephys/27.10.1433.
- Stevens, M. T. & Lindroth, R. L. (2005). Induced resistance in the indeterminate growth of aspen (*Populus tremuloides*). *Oecologia* 145, 298–306. doi: 10.1007/s00442-005-0128-y.
- Stevens, M. T., Waller, D. M., & Lindroth, R. L. (2007). Resistance and tolerance in *Populus tremuloides*: genetic variation, costs, and environmental dependency. *Evolutionary Ecology*, 21, 829–847. doi: 10.1007/s10682-006-9154-4.

- Stroud, E. A., Jayaraman, J., Templeton, M. D., & Rikkerink, E. H. (2022). Comparison of the pathway structures influencing the temporal response of salicylate and jasmonate defence hormones in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 13. doi: 10.3389/fpls.2022.952301.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). *Plant physiology and development* (No. Ed. 6). Sinauer Associates Incorporated.
- Thieme H. & Benecke R. (1971) Die Phenolglykoside der Salicaceen, 8, Mitteilung: Untersuchung über die Glykosidakkumulation in einigen mitteleuropäischen *Populus*-Arten; *Pharmazie* 26:227–231.
- Thompson, J. N. (1988). Coevolution and alternative hypotheses on insect/plant interactions. *Ecology*, 69(4), 893-895. doi: 10.2307/1941238.
- Tissier, A., Ziegler, J., & Vogt, T. (2015). Specialized plant metabolites: diversity and biosynthesis. *Ecological biochemistry: environmental and interspecies interactions*, 14-37. doi: 10.1002/9783527686063.ch2.
- Tooker, J. F. & De Moraes, C. M. (2007). Jasmonate, salicylate, and benzoate in insect eggs. *Journal of chemical ecology*, 33, 331–343. doi: 10.1007/s10886-006-9216-7.
- Torp, M., Lehrman, A., Stenberg, J.A., Julkunen-Tiitto, R., and Björkman, C. (2013). Performance of an Herbivorous Leaf Beetle (*Phratora vulgatissima*) on *Salix* F2 Hybrids: The Importance of Phenolics. *Journal of chemical ecology*, 39, 516–524. doi: 10.1007/s10886-013-0266-3.
- Toscani, H. A. (1987). Nueva plaga de sauces en el Delta. Periódico Delta Primera edición Diciembre 55 (1276): 4-5.
- Toscani, H. A., (1992). La "avispa sierra" (*Nematus desantisi*), nueva plaga defoliadora de los sauces en el Delta del Paraná. I.N.T.A. Est. Exp. Agr. Delta del Paraná, Centro Regional Entre Ríos: 11 pp.
- Toscani, H. A., (1994). Manual para la Protección de Cultivos de Salicáceas en la Región del Delta del Paraná. Est. Exp. Agr. Delta Del Paraná. I.N.T.A.: 80 pp.
- Turcotte, M. M., Turley, N. E., & Johnson, M. T. (2014). The impact of domestication on resistance to two generalist herbivores across 29 independent domestication events. *New Phytologist*, 204(3), 671-681. doi: 10.1111/nph.12935.
- Turlings, T. C. & Tumlinson, J. H. (1992). Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(17), 8399-8402. doi: 10.1073/pnas.89.17.8399.
- Turlure, C., Schtickzelle, N., Van Dyck, H., Seymoure, B., & Rutowski, R. (2016). Flight morphology, compound eye structure and dispersal in the bog and the cranberry fritillary butterflies: an inter- and intraspecific comparison. *PLoS One*, 11(6), e0158073. doi: 10.1371/journal.pone.0158073.
- Ullah, C., Tsai, C. J., Unsicker, S. B., Xue, L., Reichelt, M., Gershenzon, J., & Hammerbacher, A. (2019). Salicylic acid activates poplar defense against the biotrophic rust fungus *Melampsora larici-populina* via increased biosynthesis of catechin and proanthocyanidins. *New Phytologist*, 221(2), 960-975. doi: 10.1111/nph.15396.
- Unsicker, S. B., Gershenzon, J., & Köllner, T. G. (2015). Beetle feeding induces a different volatile emission pattern from black poplar foliage than caterpillar herbivory. *Plant signaling & behavior*, 10(3), e987522. doi: 10.4161/15592324.2014.987522.
- Urban, A.J. & Eardley, C. D. (1995). A recently introduced sawfly, *Nematus oligospilus* Forster (Hymenoptera: Tenthredinidae), that defoliates willows in southern Africa. *African Entomology*, 3(1), 23-27. doi: 10.10520/AJA10213589\_104.
- Valladares, G. A., Coll-Aráoz, M. V., Alderete, M., Vera, M. T., & Fernández, P. C. (2020). Previous herbivory alerts conspecific gravid sawflies to avoid unsuitable host plants. *Bulletin of Entomological Research*, 110(4), 438-448. doi:10.1017/S0007485319000786.
- Valladares, G., Braccini, C., Alderete, M., Araoz, V. C., Vera, T., and Fernández, P. C. (2016). Oviposition choices of the willow sawfly *Nematus oligospilus* is affected by conspecific herbivory in the native willow *Salix humboldtiana*. 4th Congress of the Latin American Association of Chemical Ecology, p. 203.

- Valsamakis, G., Bittner, N., Fatouros, N. E., Kunze, R., Hilker, M., & Lortzing, V. (2020). Priming by timing: *Arabidopsis thaliana* adjusts its priming response to Lepidoptera eggs to the time of larval hatching. *Frontiers in plant science*, 11, 1969. doi: 10.3389/fpls.2020.619589.
- Van Asch, M. & Visser, M. E. (2007). Phenology of forest caterpillars and their host trees: The importance of synchrony. *Annu. Rev. Entomol.*, 52, 37–55. doi: 10.1146/annurev.ento.52.110405.091418.
- Vattuone E.M. (1989). La falsa oruga de los sauces y álamos (*Nematus desantisi* Smith) en la provincia de Catamarca. CIRPON, Rev. Invest. VII (1-4): 85.
- Visser J. (1986). Host odor perception in phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*, 31(1), 121-44. doi: 10.1146/annurev.en.31.010186.001005.
- Volf, M., Hrcek, J., Julkunen-Tiitto, R., and Novotny, V. (2015). To each its own: Differential response of specialist and generalist herbivores to plant defence in willows. *Journal of Animal Ecology*, 84, 1123–1132. doi: 10.1111/1365-2656.12349.
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., & Sharma, H. C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant signaling & behavior*, 7(10), 1306-1320. doi: 10.4161/psb.21663.
- Wasternack, C. & Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of botany*, 111(6), 1021-1058. doi: 10.1093/aob/mct067.
- Wennström, A., Niemi Hjulström, L., Hjältén, J., & Julkunen-Tiitto, R. (2010). Mother really knows best: host choice of adult phytophagous insect females reflects a within-host variation in suitability as larval food. *Chemoecology*, 20, 35-42. doi: 10.1007/s00049-010-0040-8.
- White, T. C. R. (2015). Senescence-feeders: a new trophic sub-guild of insect herbivores. *Journal of Applied Entomology* 139, 11–22. doi: 10.1111/jen.12147.
- Whittaker, R. H. & Feeny, P. P. (1971). Allelochemicals: Chemical Interactions between Species: Chemical agents are of major significance in the adaptation of species and organization of communities. *Science*, 171(3973), 757-770. doi: 10.1126/science.171.3973.75.
- Wickham, H. (2011). The split-apply-combine strategy for data analysis. *Journal of statistical software*, 40, 1-29. doi: 10.18637/jss.v040.i01.
- Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. Available at: <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- William E. Acree, Jr., James S. Chickos, "Mass Spectra" en NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, Eds. P.J. Linstrom and W.G. Mallard, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899, <https://doi.org/10.18434/T4D303>.
- Wu, J. & Baldwin, I. T. (2010). New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annual review of genetics*, 44, 1-24. doi: 10.1146/annurev-genet-102209-163500.
- Xu, W., Dubos, C., & Lepiniec, L. (2015). Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB–bHLH–WDR complexes. *Trends in plant science*, 20(3), 176-185. doi: 10.1016/j.tplants.2014.12.001
- Yang, J. O., Nakayama, N., Toda, K., Tebayashi, S., & Kim, C. S. (2013). Elicitor (s) in *Sogatella furcifera* (Horvath) causing the Japanese rice plant (*Oryza sativa* L.) to induce the ovicidal substance, benzyl benzoate. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77(6), 1258-1261. doi: 10.1271/bbb.130055.
- Yoneya, K. & Takabayashi, J. (2013). Interaction–information networks mediated by plant volatiles: a case study on willow trees. *Journal of Plant Interactions*, 8(3), 197-202. doi: 10.1080/17429145.2013.782514.
- Yoneya, K., Kugimiya, S., & Takabayashi, J. (2009). Can herbivore-induced plant volatiles inform predatory insect about the most suitable stage of its prey?. *Physiological Entomology*, 34(4), 379-386. doi: 10.1111/j.1365-3032.2009.00701.x.
- Zacharuk, R. Y. (1980). Ultrastructure and function of insect chemosensilla. *Annual review of entomology*, 25(1), 27-47. doi: 10.1146/annurev.en.25.010180.00033.



- Zhao, J., Pang, Y., & Dixon, R. A. (2010). The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization. *Plant physiology*, 153(2), 437-443. doi: 10.1104/pp.110.155432.
- Zuo, Y., Wang, C., & Zhan, J. (2002). Separation, characterization, and quantitation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC– MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(13), 3789-3794. doi: 10.1021/jf020055f.
- Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N. J., Saveliev, A. A., & Smith, G. M. (2009). Mixed effects models and extensions in ecology with R (Vol. 574, p. 574). New York: springer.

## Anexo

**Tabla Anexa 1.** Tiempo de retención (TR) e identificación de los compuestos orgánicos volátiles (COVs ng/μl, media ± errores estándar estimados) colectados para los tratamientos de oviposición (OV) y herbivoría (HE) en los cuatro grupos de plantas tratadas: Sin oviposición-sin herbivoría (NO), con oviposición-sin herbivoría (O), sin oviposición con herbivoría (NO+H), con oviposición- con herbivoría (O+H). Los valores P corresponden a valores significativos (OV= factor oviposición, HE= factor herbivoría, OVxHE= su interacción, prueba de Wald  $\chi^2$ ,  $P < 0.05$ ). El análisis estadístico se realizó para cada compuesto mediante un GLMM. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey,  $P < 0.05$ ; n.s, no significativo:  $P > 0.05$ ). Los datos fueron transformados a partir de la escala logit. Los COVs con asterisco (\*) y los P valor en negrita presentan diferencias significativas en al menos un factor. La identificación se realizó en base al índice de Kovats calculado (IK), espectro de masas (EM) y/o al estándar comercial (EC). Réplicas biológicas (plantas) por tratamiento: N=6.

| TR (min) | COVs               | Clasificación | Oviposición (OV)     |                      | Herbivoría (HE)      |                      | P valor                                              | Identificación | IK   |
|----------|--------------------|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------------------------------------|----------------|------|
|          |                    |               | O                    | NO                   | O+H                  | NO+H                 |                                                      |                |      |
| 7.96     | $\alpha$ - Pineno  | Monoterpeno   | 0.34 ± 0.06          | 0.30 ± 0.05          | 0.42 ± 0.07          | 0.31 ± 0.07          | OV (P=0.64)<br>HE (P=0.31)<br>OVxHE (P=0.58)         | EC, IK, EM     | 929  |
| 9.12     | Sabineno           | Monoterpeno   | 0.97 ± 0.22          | 0.95 ± 0.22          | 1.48 ± 0.34          | 0.98 ± 0.24          | OV (P=0.93)<br>HE (P=0.06)<br>OVxHE (P=0.23)         | IK, EM         | 969  |
| 9.68     | $\beta$ - Mirceno* | Monoterpeno   | 0.71 ± 0.18 <b>a</b> | 0.53 ± 0.13 <b>a</b> | 1.63 ± 0.42 <b>b</b> | 0.92 ± 0.25 <b>b</b> | OV (P=0.32)<br><b>HE (P=0.002)</b><br>OVxHE (P=0.49) | EC, IK, EM     | 989  |
| 10.76    | Limoneno*          | Monoterpeno   | 0.33 ± 0.18 <b>a</b> | 0.12 ± 0.06 <b>a</b> | 1.67 ± 0.84 <b>b</b> | 0.76 ± 0.43 <b>b</b> | OV (P=0.1)<br><b>HE (P=0.006)</b><br>OVxHE (P=0.8)   | EC, IK, EM     | 1025 |

|       |                     |               |                       |                       |                        |                       |                                                      |            |      |
|-------|---------------------|---------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------------------------------------|------------|------|
| 10.81 | Eucaliptol*         | Monoterpeno   | 0.90 ± 0.28 <b>ab</b> | 0.75 ± 0.24 <b>ab</b> | 1.32 ± 0.50 <b>b</b>   | 0.35 ± 0.12 <b>a</b>  | OV (P=0.64)<br>HE (P=0.3)<br><b>OVxHE (P=0.03)</b>   | EC, IK, EM | 1027 |
| 11.09 | (Z)-β-ocimeno*      | Monoterpeno   | 0.31 ± 0.14           | indetectable          | 1.35 ± 0.50            | 0.91 ± 0.38           | <b>O/O+H/NO+H (P=0.05)</b>                           | EC, IK, EM | 1036 |
| 11.40 | (E)-β-ocimeno*      | Monoterpeno   | 5.78 ± 1.58a          | 1.07 ± 0.30 <b>b</b>  | 37.66 ± 10.30 <b>c</b> | 22.66 ± 6.20 <b>c</b> | <b>OV*HE (P=0.03)</b>                                | EC, IK, EM | 1046 |
| 18.14 | α-Cubebeno*         | Sesquiterpeno | 0.10 ± 0.02 <b>a</b>  | 0.11 ± 0.02 <b>a</b>  | 0.22 ± 0.05 <b>b</b>   | 0.15 ± 0.04 <b>b</b>  | OV (P=0.57)<br><b>HE (P=0.004)</b><br>OVxHE (P=0.15) | IK, EM     | 1352 |
| 18.55 | α-Copaeno           | Sesquiterpeno | 0.61 ± 0.13           | 0.67 ± 0.14           | 0.65 ± 0.14            | 0.56 ± 0.12           | OV (P= 0.64)<br>HE (P=0.76)<br>OVxHE (P=0.4)         | IK, EM     | 1382 |
| 18.71 | β-Cubebeno*         | Sesquiterpeno | 0.26 ± 0.07 <b>a</b>  | 0.28 ± 0.07 <b>a</b>  | 0.65 ± 0.20 <b>b</b>   | 0.37 ± 0.10 <b>b</b>  | OV (P=0.76)<br><b>HE (P=0.004)</b><br>OVxHE (P=0.15) | IK, EM     | 1393 |
| 19.13 | β-Cariofileno       | Sesquiterpeno | 12.1 ± 2.87           | 11.9 ± 2.83           | 15. ± 3.60             | 11.2 ± 2.66           | OV (P=0.94)<br>HE (P=0.16)<br>OVxHE (P=0.2)          | EC, IK, EM | 1427 |
| 19.57 | α-Humuleno          | Sesquiterpeno | 1.53 ± 0.37           | 1.60 ± 0.40           | 2.53 ± 0.62            | 1.57 ± 0.40           | OV (P=0.86)<br>HE (P= 0.01)<br>OVxHE (P=0.07)        | EC, IK, EM | 1464 |
| 19.6  | Aloaromandreno*     | Sesquiterpeno | 0.61± 0.09 <b>a</b>   | 0.80 ± 0.13 <b>ab</b> | 0.97 ± 0.15 <b>b</b>   | 0.60 ± 0.09 <b>ab</b> | <b>OVxHE (P&lt; 0.001)</b>                           | IK, EM     | 1467 |
| 20.2  | (E,E)- α-Farneseno* | Sesquiterpeno | 0.49 ± 0.08 <b>b</b>  | indetectable          | 0.92 ± 0.14 <b>a</b>   | 0.68 ± 0.11 <b>ab</b> | <b>O/O+H/NO+H (P= 0.03)</b>                          | EC, IK, EM | 1519 |

|      |                       |               |                      |                      |                       |                      |                                                         |        |      |
|------|-----------------------|---------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------------------------------------------|--------|------|
| 20.4 | δ-Cadineno            | Sesquiterpeno | 0.51 ± 0.21          | 0.72 ± 0.30          | 0.97 ± 0.40           | 0.61 ± 0.25          | OV (P=0.54)<br>HE (P=0.26)<br>OVxHE (P=0.32)            | IK, EM | 1537 |
|      | Volátiles<br>totales* | -             | 25.6 ± 5.52 <b>a</b> | 20.1 ± 4.27 <b>a</b> | 67.4 ± 14.38 <b>b</b> | 40.1 ± 8.80 <b>b</b> | OV (P=0.28)<br><b>HE (P&lt;0.001)</b><br>OVxHE (P=0.38) | -      | -    |

**Tabla Anexa 2.** Concentración de compuestos fenólicos (salicinoides y taninos condensados: % peso seco, medias ± error estándar estimados) en hojas de *S. babylonica* y *S. humboldtiana*, para los tratamientos de daño por oviposición seguido de herbivoría (D) en función de la especie de sauce (E). El análisis estadístico se realizó para cada compuesto mediante un LMM. Se muestran los valores para todos los tratamientos: factor Especie (E), factor Daño (D) y la interacción entre ambos (ExD). Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey, P < 0,05). El porcentaje (%) de inducción se refiere a un valor calculado con la diferencia en la concentración antes y después del daño dividido el valor de la concentración antes del daño por 100.

| Compuestos<br>fenólicos                                  |                         | Especie (E)                  |              |        |                 |             |       | P valor                                                                             |
|----------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------|--------------|--------|-----------------|-------------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                          |                         | S. babylonica var sacramento |              |        | S. humboldtiana |             |       |                                                                                     |
|                                                          |                         | Daño (D)                     |              | %      | Daño (D)        |             | %     |                                                                                     |
|                                                          |                         | Sin daño                     | Con daño     |        | inducción       | inducción   |       |                                                                                     |
| S<br>A<br>L<br>I<br>C<br>I<br>N<br>O<br>I<br>D<br>E<br>S | Salicina                | 0.03±0.02                    | 0.09±0.02    | 229.33 | 0.23±0.02       | 0.29±0.02   | 26.60 | E (P<0.0001)<br>D (P=0.01)<br>ExD (P=0.9)                                           |
|                                                          | Salicortina             | 0.09±0.01                    | 0.21±0.03    | 117.28 | 1.72±0.26       | 2.16±0.33   | 25.58 | E (P<0.0001)<br>D (P=0.01)<br>ExD (P=0.09)                                          |
|                                                          | HCH-<br>Salicortina     | 0.58±0.12a                   | 1.30±0.12b   | 123.87 | 1.02±0.12ab     | 1.06±0.12ab | 4.01  | ExD(P=0.002)<br>BA/BD (p=0.0006)<br>HA/HB (P=0.9)<br>BA/HA (P=0.1)<br>BD/HD (P=0.5) |
|                                                          | Tremulacina             | indetectable                 | indetectable | -      | 2.40±0.17       | 2.65±0.17   | -     | D (P=0.33)                                                                          |
|                                                          | Tremuloidina            | indetectable                 | indetectable | -      | 0.03±0.004      | 0.38±0.004  | -     | D (P=0.64)                                                                          |
|                                                          | Salicinoides<br>totales | 0.70±0.27                    | 1.62±0.27    | 130.2  | 5.44±0.27       | 6.22±0.27   | 14.33 | E (P<0.0001)<br>D (P=0.007)<br>ExD (P=0.80)                                         |
| Taninos<br>condensados                                   |                         | 5.98±1.01                    | 4.61±0.77    | -      | 7.00±1.17       | 8.23±1.38   | -     | E (P=0.03)<br>D (P=0.76)<br>ExD (P=0.21)                                            |

**Tabla Anexa 3.** Tiempo de retención (TR) e identificación de los compuestos orgánicos volátiles (COVs ng/μl, media ± errores estándar estimados) colectados en *S. babylonica var sacramenta* y *S. humboldtiana*, para los tratamientos de daño por oviposición seguido de herbivoría (D) en función de la especie de sauce (E). El análisis estadístico se realizó para cada compuesto mediante un GLMM. Los valores de P corresponden a valores para factores: E= factor especie, D= factor daño, ExD= su interacción, prueba de Wald  $\chi^2$ ,  $P < 0.05$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey,  $P < 0.05$ ; n.s, no significativo:  $P > 0.05$ ). Los datos fueron transformados a partir de la escala log. Réplicas biológicas (plantas) por tratamiento: N=5. Los COVs con un asterisco (\*) y los P valor en negrita presentan diferencias significativas en al menos un factor. Se muestra la proporción relativa (PR %) de cada compuesto como su concentración respecto del valor total de COVs por 100. La identificación se realizó en base al índice de Kovats calculado (IK), espectro de masas (EM) y/o al estándar comercial (EC).

|             |                          |                   | Especie (E)                         |           |                     |           |                        |           |                     |           |                                     |     |                    |
|-------------|--------------------------|-------------------|-------------------------------------|-----------|---------------------|-----------|------------------------|-----------|---------------------|-----------|-------------------------------------|-----|--------------------|
| TR<br>(min) | COVs                     | Clasifica<br>ción | <i>S. babylonica var sacramenta</i> |           |                     |           | <i>S. humboldtiana</i> |           |                     |           | P valor                             | IK  | Identifi<br>cación |
|             |                          |                   | Daño (D)                            |           |                     |           | Daño (D)               |           |                     |           |                                     |     |                    |
|             |                          |                   | Sin daño                            |           | Con daño            |           | Sin daño               |           | Con daño            |           |                                     |     |                    |
|             |                          |                   | Media ± ES                          | PR<br>(%) | Media ± ES          | PR<br>(%) | Media ± ES             | PR<br>(%) | Media ± ES          | PR<br>(%) |                                     |     |                    |
| 6.47        | 2-Metilbutil<br>aldoxima | Comp.<br>Nitrog.  | -                                   | -         | 1.18±0.3            | 5,49      | -                      | -         | -                   | -         | -                                   | 857 | EM                 |
| 8.51        | α- Pineno *              | Monoterp          | 0.35±0.13 <b>ab</b>                 | 2,77      | 0.142±0.05 <b>a</b> | 0,76      | 0.41± 0.16 <b>ab</b>   | 7,19      | 0.76 ± 0.3 <b>b</b> | 5,44      | <b>ExD(P=0.02)</b>                  | 932 | EC, IK,<br>EM      |
| 9.7         | Sabineno                 | Monoterp          | 0.57 ± 0.28                         | 3,40      | 0.35 ± 0.17         | 2,18      | 0.16±0.08              | 3,42      | 0.45±0.24           | 3,54      | E(P=0.2)<br>D(P=0.6)<br>ExD(P=0.06) | 972 | IK, EM             |

|       |                            |                |             |      |              |      |             |      |                 |      |                                                           |      |               |
|-------|----------------------------|----------------|-------------|------|--------------|------|-------------|------|-----------------|------|-----------------------------------------------------------|------|---------------|
| 10.25 | $\beta$ - Mirceno*         | Monoterp       | 0.51± 0.09  | 2,77 | 0.62 ± 0.04  | 3,10 | 0.2±0.09    | 1,33 | 0.46±0.09       | 2,59 | <b>E(P=0.007)</b><br><b>D(P=0.04)</b><br>ExD(P=0.3)       | 991  | IK, EM        |
| 10.5  | Decano*                    | Alcano         | 0.23±0.13   | 2,18 | 0.06±0.04    | 0,48 | 0.13±0.08   | 1,80 | 0.05±0.04       | 0,39 | E(P=0.2)<br><b>D(P=0.01)</b><br>ExD(P=0.6)                | 1000 | EC, IK,<br>EM |
| 10.73 | 3-Hexenil<br>*acetato      | VHV<br>(éster) | 1.81 ±0.52  | 9,56 | 0.33± 0.1    | 1,67 | 0.11± 0.05  | 2,05 | 0.04± 0.02      | 0,25 | <b>E(P&lt;0.0001)</b><br><b>D(P=0.001)</b><br>ExD(P=0.53) | 1008 | IK, EM        |
| 11.35 | Limoneno                   | Monoterp       | 0.41 ± 0.13 | 3,00 | 0.52± 0.13   | 2,68 | 0.33± 0.13  | 3,66 | 0.43± 0.13      | 2,24 | E(P=0.46);<br>D(P=0.38);<br>ExD(P=0.95)                   | 1028 | EC, IK,<br>EM |
| 11.42 | Eucaliptol*                | Monoterp       | 0.48± 0.25a | 3,35 | 0.16± 0.08ab | 0,88 | 0.09± 0.05b | 2,78 | 0.24±<br>0.13ab | 2,33 | <b>ExD(P=0.02)</b>                                        | 1031 | EC, IK,<br>EM |
| 11.66 | (Z)- $\beta$ -<br>Ocimeno* | Monoterp       | 0.14± 0.05  | 0,98 | 0.67± 0.25   | 3,29 | 0.04± 0.01  | 0,86 | 0.43± 0.16      | 2,91 | <b>E(P=0.04)</b><br><b>D(P=0.0001)</b><br>ExD(P=0.34)     | 1039 | EC, IK,<br>EM |
| 11.75 | Salicil<br>aldehído*       | Aromático      | trazas      | 1,31 | indetectable | -    | 0.14± 0.04  | 2,14 | 0.4± 0.04       | 2,84 | <b>D(P=0.01)</b>                                          | 1042 | IK, EM        |
| 11.96 | (E)- $\beta$ -<br>Ocimeno* | Monoterp       | 0.85± 0.33  | 6,12 | 8.1± 3.1     | 40,6 | 0.37± 0.15  | 7,44 | 6.68± 2.6       | 43,1 | E(P=0.1)<br><b>D(P&lt;0.0001)</b><br>ExD(P=0.3)           | 1049 | EC, IK,<br>EM |
| 13.5  | Undecano                   | Alcano         | 0.18± 0.08  | 1,50 | 0.12± 0.05   | 0,63 | 0.08± 0.04  | 1,60 | 0.09± 0.04      | 0,70 | E(P=0.12)<br>D (P=0.57)<br>ExD (P=0.49)                   | 1109 | EC, IK,<br>EM |
| 13.64 | Nonanal                    | Aldehído       | trazas      | 0,08 | 0.16±0.04    | 0,86 | trazas      | 0,26 | 0.13±0.03       | 0,93 | E(P=0.33)                                                 | 1106 | EC, IK,<br>EM |

|       |                      |               |              |      |           |      |              |      |              |      |                                                              |      |            |
|-------|----------------------|---------------|--------------|------|-----------|------|--------------|------|--------------|------|--------------------------------------------------------------|------|------------|
| 14.01 | DMNT                 | Homoterp      | 0.08±0.06    | 0,60 | 0.18±0.1  | 0,96 | 0.16±0.09    | 2,03 | 0.48±0.15    | 4,14 | E(P=0.38)<br>D (P=0.28)<br>ExD (P=0.64)                      | 1120 | IK, EM     |
| 14.35 | Allo-ocimeno*        | Monoterp      | 0.07±0.03    | 0,31 | 0.32±0.09 | 1,53 | 0.02±0.01    | 0,16 | 0.3±0.09     | 1,43 | E(P=0.22);<br><b>D (P=0.0001)</b><br>ExD (P=0.31)            | 1134 | IK, EM     |
| 14.59 | Cianuro de bencilo   | Comp. Nitrog. | indetectable | -    | 0.28±0.05 | 1,36 | indetectable | -    | indetectable | -    | IC sup=0.39;<br>IC inf=0.18                                  | 1144 | IK, EM     |
| 16.11 | Decanal              | Aldehído      | indetectable | -    | 0.28±0.07 | 1,46 | indetectable | -    | 0.22±0.05    | 1,73 | E (p=0.12)                                                   | 1207 | EC, IK, EM |
| 16.62 | (Z)-3-Hexil valerato | Éster         | 1.81±0.85    | 4,39 | 0.33±0.05 | 0,26 | indetectable | 0,31 | indetectable | -    | D (P=0.16)                                                   | 1274 | IK, EM     |
| 16.76 | Monoterp. inident 1* | Monoterp      | 0.4±0.1      | 2,40 | 0.03±0.01 | 0,17 | 0.09±0.04    | 1,36 | 0.04±0.02    | 0,14 | <b>E(P=0.0004)</b><br><b>D (P&lt;0.0001)</b><br>ExD (P=0.07) | 1245 | IK, EM     |
| 17.58 | Monoterp inident 2*  | Monoterp      | 0.14±0.03    | 0,79 | 0.20±0.05 | 1,00 | 0.04±0.03    | 0,30 | 0.11±0.05    | 0,72 | <b>E(P=0.02)</b><br>D(P=0.1)<br>ExD (P=0.89)                 | 1292 | IK, EM     |
| 18.5  | α-Cubebeno           | Sesquite      | 0.1±0.04     | 0,50 | 0.06±0.02 | 0,34 | 0.11±0.04    | 1,83 | 0.05±0.02    | 0,30 | E(P=0.74)<br>D (P=0.05)<br>ExD (P=0.72)                      | 1357 | IK, EM     |
| 18.88 | α-Copeno*            | Sesquiter     | 1.60±0.6     | 9,18 | 0.54±0.2  | 2,71 | 0.98±0.36    | 18,8 | 0.56±0.21    | 5,44 | E(P=0.5)<br><b>D (P=0.03)</b><br>ExD (P=0.46)                | 1385 | IK, EM     |
| 19.47 | β-Cariofileno        | Sesquiter     | 4.53±1.17    | 29   | 3.71±0.96 | 19,2 | indetectable | -    | indetectable | -    | D (P=0.4)                                                    | 1432 | EC, IK, EM |



|       |                          |           |              |      |              |      |              |      |              |      |                                                       |      |               |
|-------|--------------------------|-----------|--------------|------|--------------|------|--------------|------|--------------|------|-------------------------------------------------------|------|---------------|
| 19.57 | Sesquiterp<br>inident 1  | Sesquiter | 0.08±0.001   | 0,49 | indetectable | -    | 0.15±0.001   | 2,37 | 0.17±0.001   | 0,88 | E(P=0.21)<br>D (P=0.99)<br>ExD (P=0.99)               | 1440 | IK, EM        |
| 19.63 | Sesquiter<br>inident 2*  | Sesquiter | 0.30±0.1     | 1,71 | 0.05±0.04    | 0,27 | 0.47±0.13    | 6,95 | 0.24±0.09    | 1,25 | E(P=0.24)<br><b>D (P=0.01)</b><br>ExD (P=0.22)        | 1445 | IK, EM        |
| 19.66 | Sesquiterp<br>inident 3* | Sesquiter | 0.34±0.07    | 1,83 | 0.05±0.03    | 0,24 | 0.24±0.06    | 3,43 | 0.11±0.04    | 0,53 | E(P=0.24)<br><b>D (P=0.0005)</b><br>ExD (P=0.14)      | 1448 | IK, EM        |
| 19.88 | α-Humuleno               | Sesquiter | 0.68±0.16    | 3,67 | 0.49±0.04    | 2,45 | indetectable | -    | indetectable | -    | D (P=0.29)                                            | 1466 | EC, IK,<br>EM |
| 20.21 | D<br>Germacreno          | Sesquiter | indetectable | 0,87 | indetectable | 0,34 | 0.44±0.17    | 8,10 | 0.94±0.37    | 6,92 | D (P=0.24)                                            | 1494 | IK, EM        |
| 20.4  | (E,E)-α-<br>Farneseno    | Sesquiter | 0.42±0.15    | 2,13 | 0.48±0.21    | 2,16 | 0.51±0.15    | 7,38 | 0.83±0.21    | 4,68 | E(P=0.32)<br>D (P=0.32);<br>ExD (P=0.49)              | 1511 | EC, IK,<br>EM |
| 20.65 | Sesquiterp<br>inident 4* | Sesquiter | 0.59±0.16    | 3,77 | 0.16±0.04    | 0,81 | 0.72±0.2     | 11,7 | 0.42±0.11    | 2,75 | <b>E(P=0.04)</b><br><b>D(P=0.003)</b><br>ExD (P=0.15) | 1535 | IK, EM        |
| 22.32 | Heptadecano<br>*         | Alcano    | 0.20±0.03    | 1,09 | 0.21±0.04    | 1,07 | 0.08±0.03    | 0,66 | 0.17±0.08    | 0,61 | <b>E(P=0.01)</b><br>D(P=0.15)<br>ExD (P=0.38)         | 1703 | EC, IK,<br>EM |
|       | Volátiles<br>totales     | -         | 18.82±2.24   | -    | 21.58±2.84   | -    | 8.16±4.29    | -    | 19.04±6.17   | -    | <b>E(P=0.02)</b><br>D(P=0.16)<br>ExD (P=0.28)         | -    | -             |

**Figura Anexa 4.** Concentración de salicinoides en hojas enteras de plantas sanas de *S. babylonica* var *sacramento* y *S. nigra* “Alonzo nigra 4 INTA”. Se muestran las medias  $\pm$  errores estándar.

