

ESTUDIOS PRELIMINARES EN EL CONTROL DE AFIDOS.

I. *Sustancias tipo auxinas y/o inhibidores en plantas de MEDICAGO SATIVA L. Susceptibles, Resistentes e Inmunes al ataque de áfidos.*

GUILLERMO ALMIELA PONS¹ y JOSÉ S. MOYANO²

SUMMARY

PRELIMINARY STUDIES ON THE CONTROL OF APHIDS. I. Inhibitor and auxin-like substances in Plants of MEDICAGO SATIVA L. susceptible, resistant and immune to aphid's attack.

By means of the Avena coleptile assay of ether extracts of alfalfa plants it is intended to determine to what extent natural substances of the type of inhibitors and/or auxins are implicated in the degree of susceptibility, resistant and immunity observed in different lines of alfalfa (Medicago sativa L.) grown in the field.

No activity of auxins-like substances was found in the extracts, but those of the type of inhibitors were prominent and were in direct relation to the degree of resistant.

It is discussed some possible mechanisme involved through the action of these types of substances.

INTRODUCCION

Entre los insectos que parasitan a la alfalfa, (MEDICAGO SATIVA L.) en la región de Anguil, La Pampa, los áfidos¹¹ ocupan, por los daños que ocasionan, un destacado lugar⁶. Como esta plaga está ampliamente extendida y causa daños importantes en dicho cultivo, resulta interesante el estudio de otros medios de control que puedan ser más efectivos y de más amplia aplicación que los insecticidas propiamente dichos.

Uno de los modos de acercarse a este problema es tratar de entender primero, qué tipo de sustancias o factores presentes en la planta huésped, pueden estar relacionados con las condiciones de susceptibilidad, resistencia o inmunidad al parásito. La obtención o

¹ Investigador en el Instituto de Biología Vegetal. Cátedra de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias (UNC).

² Técnico preparador de la misma Cátedra.

selección de líneas resistentes, ofrece una de esas posibilidades, y el "test" biológico "Coleoptiles de avena de crecimiento recto"¹⁰ provee un método adecuado para la evaluación de sustancias tipo auxinas y/o inhibidores.

La resistencia de la alfalfa al ataque de ciertos áfidos, ha sido estudiada desde diversos puntos de vista.^{1, 4, 7, 6, 15, 18, 19, 22.} Entre ellos las sustancias del tipo de las auxinas y/o inhibidores naturales han sido señaladas por diversos autores, como responsables en buena parte, de los caracteres de resistencia a diversos parásitos.^{13, 14, 17.} Auxinas libres del tipo del Acido Indol-3-Acético y derivados, fueron halladas en mayor concentración no solamente en plantas susceptibles^{9, 19} sino también en parásitos alimentados sobre dichas plantas^{10, 12, 13, 14.} En otros casos, la presencia de sustancias de tipo inhibidores, se han postulado como factores de resistencia^{2.}

El presente trabajo, tuvo por objeto estudiar cuali y cuantitativamente, sustancias naturales de tales características que podrían estar involucradas en el grado de susceptibilidad o resistencia al ataque de aquellos áfidos, observado en líneas de *MEDICAGO SATIVA L.*, provenientes de un ensayo planeado con otros fines en la Estación Experimental de Anguil. La Pampa.

MATERIAL Y METODO

Material vegetal: Las diferentes líneas de *M. SATIVA L.*, señaladas aquí como SUSCEPTIBLES, RESISTENTES e INMUNES al ataque de pulgones, fueron gentilmente provistas por el Ing. Agr. Guillermo Covas, de un ensayo que con otros propósitos conducía el mencionado investigador en la Estación Experimental citada.

En el momento de la toma de muestras, las plantas de todas las líneas se hallaban en estado de fructificación. En ese período agrícola (1969-1970) el ataque de pulgones en la zona fue catalogado como muy severo.

Extracción, separación y evaluación de sustancias tipo auxínicas y/o inhibidores. Para la extracción de este tipo de sustancias se tomaron 35 gr. de material fresco de la parte aérea, eliminándose los frutos.

Dicho material fue macerado en alcohol etílico 75 % durante 24 h, evaporando el solvente y agregando éter sulfúrico a la fracción acuosa remanente. La fase etérea fue separada de la acuosa, después de dejarla en maceración a 5º C., durante 24 h. y liberada de pigmentos mediante el empleo de carbón activado. El filtrado etéreo se concentró a sequedad en corriente de aire, llevándose el residuo a un volumen apropiado con alcohol de 96º.

La separación de las sustancias tipo auxínicas y/o inhibidoras se realizó por cromatografía unidireccional, sobre papel Whatman nº 3, empleándose como solvente Isopropanol - Amoníaco - Agua

(8:1:1:) v/v. La actividad de estas sustancias se puso de manifiesto revelando biológicamente el cromatograma, mediante el "test" de crecimiento recto de secciones de coleoptiles de trigo de uso común en nuestros laboratorios de Fisiología Vegetal²³. Los cromatogramas se dividieron en 10 partes iguales (bandas) de Rf conocido, eluyéndose cada una con 10 cc. de "buffer" Citrato/Nitrato, pH 4,6.

La actividad de dichas sustancias se expresó en porcentaje de crecimiento de las secciones de coleoptiles de trigo, en relación al testigo considerado 100 %. La de cada banda correspondiente a los diversos valores de Rf se representó en forma de histogramas para cada variante.

RESULTADOS

Puede apreciarse (fig. 1) que las diferencias entre las distintas bandas de cada cromatograma son aparentes principalmente en la fracción correspondiente a sustancias de tipo inhibidores, ya que las de tipo auxinas no acusan diferencias significativas.

Las bandas de Rf 0,6-0,7; 0,7-0,8 y 0,8-0,9 revelan acción inhibidora y a pesar que coinciden en las 3 variables, son más intensas en las líneas Inmunes y Resistentes. Una banda de inhibición en Rf 0,3-0,4 aparece en las líneas Resistentes y Susceptibles, mientras que las Inmunes son las únicas que muestran una banda de inhibición en Rf 0,9-1,0. El resto de las bandas, tanto de inhibición como de presunta actividad auxínica, no resultaron estadísticamente significativas.

Al calcular el área total de inhibición en cada variable, se tomaron únicamente los valores significativos, observándose que las áreas correspondientes a las líneas Resistentes e Inmunes resultaron, en ambos casos, 122 % mayores que las Susceptibles. En Inmunes, las bandas de inhibición son continuas y abarcan un Rf de 0,5 a 1,0, mientras que en las Resistentes, aunque el valor superficial de las áreas de inhibición es el mismo que en las Inmunes, las citadas bandas son discontinuas.

De acuerdo a la ubicación de las bandas de inhibición en las tres líneas, parece evidente que sólo las que se hallan entre valores de Rf 0,5-0,6 en Resistentes e Inmunes y 0,9-1,0 en las inmunes, tendrían significación biológica ya que las restantes Rf 0-6-0,9 aparecen también en las Susceptibles, aunque la diferencia podría ser de orden cuantitativo.

DISCUSION

Es conocido, para muchas especies vegetales, que la resistencia al ataque de parásitos de esta familia presenta gradaciones, sin que pueda considerarse que manifiesten una inmunidad absoluta. Sin embargo, la línea por nosotros denominada Inmune, se comportó como

tal. Estas categorías, Inmune, Resistente y Susceptible, fueron establecidas subjetivamente de acuerdo a la magnitud del ataque observado.

Los cromatogramas de extractos provenientes de plantas Resistentes e Inmunes, muestran no solamente mayor número de bandas de inhibición, sino que éstas presentan una mayor actividad inhibidora, comparadas con las análogas provenientes de plantas Susceptibles. Esto parecería dar una pauta de la implicancia de este tipo de sustancias, como parte constituyente del grado de resistencia observado en relación al ataque de áfidos.

En la mayoría de las plantas la actividad auxínica disminuye con el avance del ciclo vegetativo anual. Es evidente en nuestros "test", la ausencia de actividad de este tipo de hormona en plantas en estado de fructificación, pero no se descarta la posibilidad de su intervención como factor parcial de susceptibilidad en un estado más juvenil del ciclo vegetativo de la planta.

Se ha postulado²⁵ que los áfidos pueden destruir las auxinas en el floema, pero esto no parece ser nuestro caso, ya que las plantas inmunes, no mostraron actividad alguna de sustancias de tipo auxínico.

Comunmente los áfidos se establecen en ciertas áreas de alimentación, e.g., floema normal. La poca capacidad de fijación de los áfidos para con la línea Resistente y su incapacidad con respecto a la Inmune, puede ser el resultado de una inhabilidad del áfido para establecerse en dichas áreas de alimentación, en razón de que las sustancias de tipo inhibidores que se movilizan en esa vía vascular, actuarían a modo de repelentes, haciendo que el áfido no pueda reconocer esas zonas¹⁵. En la línea Resistente, únicamente algunos áfidos podrían reconocer la zona floemática normal, mientras que la mayoría se vería obligada a alimentarse en el tejido del mesófilo donde, por analogía con otros metabolitos, la distribución de tales sustancias inhibitoras sería más localizada y/o de movimiento más lento.

Este ensayo preliminar no descarta la incidencia de otros factores intrínsecos como causales de Resistencia, tales como pH del jugo floemático⁵, calidad de aminoácidos, azúcares, etc.²⁵, microelementos³ otros metabolitos, como también posibles diferencias estructurales.

Es también posible que la capacidad de reacción de las líneas Resistentes e Inmunes, esté ligada a factores de naturaleza genética. Muchas sustancias pertenecientes al grupo de los flavonoides, fenoles, ácidos oxicianámicos, etc., han sido determinadas en diversas especies de vides² y postuladas como causas de la resistencia al ataque de filoxera.

Por lo tanto es lícito pensar que al menos una fracción del componente Resistente e Inmune, podría estar ligado a la presencia de tales sustancias inhibitoras.

El aislamiento y conocimiento de la estructura química de las sustancias cuya actividad se ha puesto de manifiesto, puede ser de considerable importancia práctica, especialmente como base para formular repelentes a estos parásitos y anima aún más a seguir explorando esta línea de investigación.

RECONOCIMIENTO

Los autores expresan su reconocimiento a los Ings. Agrs. Ricardo M. Tizio y Sinibaldo O. Trione, por sus comentarios críticos sobre el manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BLANCHARD, R. A., and J. E. DUDLEY. 1934. "Alfalfa plants resistant to pea aphid". J. Econ. Entomol. 27: 262-64.
- 2 — BREIDER, H. 1968. "Calidad y resistencia de la vid. Acción de los elementos químicos de resistencia de los híbridos productores directos, en los seres vivos consumidores de sus mostos y vinos". Bol. Inst. Nacion. Investig. Agronóm. España. 28 N° 59: 289-307.
- 3 — DADD R. H. and D. L. KRIEGER. 1967. "Continuous rearing of aphids of the APHIS FABAE Complex on sterile synthetic diet". J. Econ. Entomol. 60 (6) 1512-14.
- 4 — DAHMS, R. G. and R. H. PAINTER. 1940. "Rate of reproduction of the pea aphid on different alfalfa plants". J. Econ. Entomol. 33: 482-85.
- 5 — FIFE, J. M. and V. L. FRAMPTON. 1936. "The pH gradient extending from the phloem into parenchyma of the sugar beet and its relation to the feeding behavior of EUTETTIX TENELLUS". Lour. Agr. Res. 53: 581-93.
- 6 — HARPER, A. M. and C. E. LILLY. 1966. "Effects of the pea aphids on alfalfa in Southern Alberta". J. Econ. Entomol. V. 59, N° 6: 1426-27.
- 7 — HACKEROTT, H. L.; E. L. SORENSEN; T. L. HARVEY; E. E. ORTMAN and R. H. PAINTER. 1963. "Reactions of alfalfa varieties to pea aphids in the field and green house". Crop. Sci. 3: 298-301.
- 8 — HARVEY, T. L. and H. L. HACKEROTT. 1967. "Use of parasitized pea aphids to evaluate alfalfa for resistance. J. Econ. Entomol. 60 (2) 573-75.
- 9 — KNAPP, J. L.; HEDIN, P. A. and W. A. DOUGLAS. 1966. "A chemical analysis of corn silk from single crosses of dent corn rated as resistant, intermediate, and susceptible to the corn enworm". J. Econ. Entomol. 59 (5): 1062-64.
- 10 — LINK, GEORGE K. K.; V. EGGERS, and J. E. NOULTON. 1940. "Avena coleoptile assay of ether extracts of aphids and their hosts". Bot. Gaz. 101 (4): 928-39.
- 11 — MALLEA, A. R. et al. 1969. "Determinación de especies de pulgones que atacan alfalfa". Intersectum. N° 3: 12-3 (Bol. Cátedra Zoología A. F. C. A. Mendoza).
- 12 — MARTIN, J. P. 1942. "Stem galls of sugar cane induced with insect extracts. "Science. N. S. 96 (2480): 39.
- 13 — MAXWELL, G. F. and R. H. PAINTER. 1962. "Auxins in honey-dew of TOXOPTERA GRAMINUM (ROND), PHERIOAPHIS MACULATA (BUCK), MACROSIP-

- HUM PISI (HARR) and their relation to degree of tolerance in host plants". *Ann. Ent. Soc. Amer.* 55 (1).
- 14 — MAXWELL, F. G. and R. H. PAINTER. 1962. "Auxin content of extracts of certain tolerant and susceptible host plants of *TOXOPTERA GRAMINUM*, *MACROSIPHUM PISI* and *TIERIOAPHIS MACULATA*, and relation to host plant resistance". *J. Econ. Entomol.* 55 (1) 48-56.
- 15 — MCMURTRY, J. A. and E. H. STANFORD. 1960. "Observations of feeding habits of the spotted alfalfa aphid on resistant and susceptible alfalfa plants". *J. Econ. Entomol.* 53. (5): 714-16.
- 16 — NUORTEVA, P. 1956. "Studies on the effects of the salivary secretions of some Heteroptera and Homoptera on plant growth. *Ann. Ent. Fennici.* 22: 108-117.
- 17 — NYSTERAKIS, F. 1947. "Zooecidies et substances de croissance". *Compt. Rend. Soc. Biol.* 141: 1218-19.
- 18 — ORTMAN, E. E.; SORENSEN, R. H. PAINTER; T. L. HARVEY and H. L. HACKEROTT. 1960. "Selection and evaluation of pea aphid resistant alfalfa plants". *J. Econ. Entomol.* 53: 881-7.
- 19 — PAINTER, R. H. and C. O. GRANDFIELD. 1935. "Preliminary report on resistance of alfalfa varieties to pea aphids". *ILLINOIA PISI (KALT)*". *J. Amer. Soc. Agron.* 27: 671-4.
- 20 — ROSEN, H. R. 1916. "The development of the *PHYLLOXERA VASTATRIX* leaf gall". *Amer. Jour. Bot.* 3: 337-60.
- 21 — SCHILLINGER, J. A. 1966. "Larval as a method of screening *Triticum* sp. for resistance to the cereal leaf beetle". *J. Econ. Entomol.* 50 (5): 1163-65.
- 22 — SMITH, O. F. and R. N. PEADEN. 1960. "A method of testing alfalfa plants for resistance to the pea aphid". *Agron. Jour.* 52: 609-10.
- 23 — TZIO, R. M.; J. S. MOYANO y H. MORALES. 1968. "Inhibitor-like substances in vine cuttings and their possible relationship to the rooting process". *Phyton* 25 (2): 123-28.
- 24 — WENT, F. W. 1940. "Local and generalized defense reactions in plants and animals". *Amer. Nat.* 74: 107-16.
- 25 — UHLER, L. D. 1951. "Biology and Ecology of the golden rod gall fly, *EUROSTA SOLIDAGNIS* (FITCH). *Agric. Expt. Sta. Men.* 300:51.

