

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

Resistencia en tomate mediada por el gen *Mi-1* frente a la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889). Análisis de la expresión génica y comparación con la resistencia inducida.

TESIS DOCTORAL
CLARA ISABEL RODRÍGUEZ ÁLVAREZ
Madrid, 2013

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

**Resistencia en tomate mediada por el gen *Mi-1*
frente a la mosca blanca *Bemisia tabaci*
(Gennadius, 1889). Análisis de la expresión génica
y comparación con la resistencia inducida.**

Memoria presentada por CLARA ISABEL RODRÍGUEZ ÁLVAREZ, inscrita en el programa de doctorado del departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, para optar al Grado de Doctora en Ciencias Biológicas.

Trabajo realizado en el departamento de Protección vegetal del Instituto de Ciencias Agrarias (ICA-CSIC) de Madrid, bajo la dirección del Doctor Mariano Muñoz Daza y la co-dirección de la Doctora Gloria Nombela Blázquez.

LA DOCTORANDA
Clara Isabel Rodríguez Álvarez

VºBº
DEL DIRECTOR
Dr. Mariano Muñoz Daza

VºBº
DE LA CO-DIRECTORA
Dra. Gloria Nombela Blázquez

VºBº
DEL TUTOR
Dr. Luis E. Hernández Rodríguez

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que han contribuido a la realización de esta Tesis, entre ellos a mis directores de Tesis y, especialmente a mis padres por su apoyo durante todos estos años, por escucharme y por sus consejos. A mis compañeros del CSIC y mis amigos: sin vosotros no hubiera sido lo mismo.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AIA	Alcohol isoamílico
Avr	Gen de avirulencia
<i>B. tabaci</i>	<i>Bemisia tabaci</i>
cDNA	DNA complementario
CDS	Secuencia codificante
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa, enzima que degrada el DNA
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
dpi	Días post-infestación/infección
DTT	del inglés, <i>dithiothreitol</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
gDNA	DNA genómico
H.R.	Humedad relativa
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas
<i>Hsp90</i>	Proteína de choque térmico
JA	Ácido jasmónico
LB	Medio de cultivo <i>Luria bertani</i>
LRR	Repeticiones ricas en Leucina
MES	Ácido 2-(N-morpholino) etano sulfónico
MgCl₂	Cloruro de magnesio
N1	Fase móvil de <i>B.tabaci</i>
NaCl	Cloruro sódico
NaOAc	Sodio acetato
°C	Grados centígrados
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDS	Gen codificante de la fitoeno desaturasa
poly dT	Oligo dT (secuencia corta de nucleóticos con base timina)
ppm	Partes por millón
PTGS	Silenciamiento génico post-transcripcional
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción inversa de la PCR
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SA	Ácido salicílico
SDS	Dodecilsulfato sódico
T.P.	Tiempo de muestreo
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tampón formado por <i>tris-acetato-EDTA</i>
TE	Tampón compuesto por <i>tris-HCl-EDTA</i>

TRV	Virus “rattle” del tabaco
V	Voltios
VIGS	Silenciamiento génico inducido por virus
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
PTI	Respuesta defensiva por reconocimiento basal
ETS	Susceptibilidad provocada por efector
ETI	Respuesta defensiva por reconocimiento del efector
MIP	Manejo integrado de plagas
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
LPS	Lipopolisacáridos
ALP	Fosfatasa alcalina
Gen R	Gen de resistencia
LZ	Cremallera de leucina
NB	Sitio de unión a nucleótidos
CC	<i>Coiled-coil</i>
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitogeno
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
PR	Proteínas relacionadas con la patogénesis
PAL	Enzima fenilalanina amonio liasa
RKN	Nematodos formadores de nódulos
Pin	Inhibidores de proteasas
N2	Segundo estado ninfal de <i>B. tabaci</i>
N3	Tercer estado ninfal de <i>B. tabaci</i>

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. El tomate: cultivo e importancia agronómica.	3
2. <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae).	6
3. Resistencia vegetal.	12
4. El gen <i>Mi-1</i> : gen de resistencia a nematodos e insectos.	24
OBJETIVOS	29
ANTECEDENTES	33
1. Efecto del desarrollo de la planta en la resistencia vegetal.	35
2. Papel del ácido salicílico en la defensa basal y la resistencia mediada por genes <i>R</i> .	39
3. Implicación del gen <i>Hsp90</i> en la resistencia vegetal.	43
4. Reprogramación transcripcional de plantas en interacciones compatibles e incompatibles con organismos nocivos.	49
MATERIALES Y MÉTODOS	57
1. Metodología general.	59
1.1. Material vegetal.	59
1.2. Mantenimiento y cría de <i>Bemisia tabaci</i> .	60
1.3. Tipos de cajas de confinación para adultos.	63
1.4. Tipos de ensayos.	35
1.5. Tratamiento y análisis estadístico de los datos.	37
2. Metodología específica del estudio sobre el efecto del desarrollo de la planta en la resistencia mediada por <i>Mi-1</i> a <i>B. tabaci</i> .	69
2.1. Crecimiento diferencial de las plantas.	69
2.2. Diseños experimentales.	69
3. Metodología específica del estudio sobre el papel del SA en las interacciones tomate- <i>B. tabaci</i> .	71
3.1. Genotipos de tomate y condiciones de crecimiento.	71
3.2. Cuantificación de los ácidos salicílico y jasmónico.	72
3.3. Diseño experimental para conocer la posible implicación del SA en la resistencia basal a <i>B. tabaci</i> y en la resistencia mediada por <i>Mi-1</i> .	74
4. Metodología específica del estudio sobre la implicación de <i>Hsp90</i> en la resistencia mediada por <i>Mi-1</i> a <i>B. tabaci</i> .	77
4.1. Condiciones de cultivo y esquema temporal del proceso de silenciamiento génico.	77
4.2. Construcciones empleadas para VIGS.	78
4.3. Crecimiento de agroclones y agroinfiltración.	79
4.4. Diseño experimental de los bioensayos con plantas infestadas por <i>B. tabaci</i> .	82
4.5. Análisis genómico de plantas de tomate para confirmar la presencia/ausencia del gen <i>Mi-1</i> .	83
4.6. Análisis de la expresión génica	87
5. Metodología específica del análisis del transcriptoma de plantas de tomate.	93
5.1. Condiciones de cultivo.	93
5.2. Diseño experimental.	93
5.3. Procesamiento de las muestras y adquisición de los datos.	95
5.4. Métodos bioinformáticos y estadísticos para la interpretación de datos obtenidos por microarrays.	96
5.5. Validación de datos.	97

RESULTADOS	99
Objetivo 1: Efecto del desarrollo de la planta en la resistencia mediada por <i>Mi-1</i> a <i>B. tabaci</i>.	101
1. Influencia de la edad de la planta en la resistencia mediada por el gen <i>Mi-1</i> frente <i>B. tabaci</i> .	101
1.1. Bioensayos de libre elección.	101
1.2. Bioensayos de no elección.	105
2. Influencia del tamaño de plantas de la misma edad en la resistencia mediada por el gen <i>Mi-1</i> frente a <i>B. tabaci</i> .	109
2.1. Bioensayos de libre elección.	109
2.2. Bioensayos de no elección.	112
Objetivo 2: Papel del SA en la defensa basal y la resistencia mediada por <i>Mi-1</i> a <i>B. tabaci</i>.	117
1. Determinación analítica mediante HPLC-MS del contenido foliar de ácido salicílico y jasmónico, antes y después de la infestación con <i>B. tabaci</i> .	117
2. Papel del SA en la resistencia basal a <i>B. tabaci</i> .	119
3. Implicación del SA en la resistencia mediada por <i>Mi-1</i> a <i>B. tabaci</i> .	123
Objetivo 3: Implicación de <i>Hsp90</i> en la resistencia mediada por <i>Mi-1</i> a <i>B. tabaci</i>.	129
1. Evaluación de los efectos de la Agroinfiltración con el vector TRV.	129
2. Silenciamiento del gen <i>Mi-1</i> en plantas de tomate.	131
3. Silenciamiento del gen <i>Hsp90-1</i> en plantas de tomate.	133
Objetivo 4: Análisis del transcriptoma de plantas de tomate.	137
1. Análisis de la expresión génica global del tomate en la interacción compatible con <i>B. tabaci</i> y en la incompatible (resistencia) mediada por el gen <i>Mi-1</i> .	137
1.1. Efecto de la presencia/ausencia del gen <i>Mi-1</i> sobre el transcriptoma del tomate.	138
1.2. Expresión génica en la fase temprana de la infestación (2dpi): Alimentación y oviposición de las hembras adultas de <i>B. tabaci</i> .	146
1.3. Expresión génica en la fase tardía de la infestación (12 dpi): Establecimiento y alimentación de la fase móvil N1 de <i>B. tabaci</i> .	151
1.4. Comparación de la expresión génica de la planta en las dos fases de la infestación por <i>B. tabaci</i> (2 y 12 dpi) durante la interacción compatible.	156
1.5. Comparación de la expresión génica de la planta en las dos fases de la infestación por <i>B. tabaci</i> (2 y 12 dpi) durante la interacción incompatible.	160
1.6. Validación de los resultados obtenidos en los análisis de microarrays mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).	165
2. Análisis de la expresión génica global del tomate carente del gen <i>Mi-1</i> en la resistencia inducida por BTH a <i>B. tabaci</i> .	169
2.1. Efecto del tratamiento con BTH sobre el transcriptoma del tomate Moneymaker.	169
2.2. Comparación de los cambios en la expresión génica de Moneymaker producidos por el tratamiento con BTH y por la infestación con <i>B. tabaci</i> .	174
2.3. Expresión génica en la interacción incompatible (resistencia) inducida por BTH en Moneymaker. Comparación con la interacción compatible en plantas no tratadas.	177

2.4. Comparación de la expresión génica global del tomate en los dos tipos de resistencia a <i>B. tabaci</i> : inducida por BTH y mediada por <i>Mi-1</i> .	178
DISCUSIÓN	181
1. Efecto del desarrollo de la planta en la resistencia mediada por el gen <i>Mi-1</i> a <i>B. tabaci</i> .	183
2. Papel del ácido salicílico en las interacciones tomate- <i>B. tabaci</i> .	191
3. Implicación del gen <i>Hsp90</i> en la resistencia mediada por <i>Mi-1</i> a <i>B. tabaci</i> .	203
4. Análisis transcriptómico del tomate en su interacción con <i>B. tabaci</i> y la resistencia inducida por BTH.	209
CONSIDERACIONES FINALES	263
CONCLUSIONES	267
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	275

RESUMEN

El tomate es uno de los principales cultivos de hortalizas a nivel mundial con una producción anual de más de 145 millones de toneladas. Además, esta especie posee una gran importancia en investigación ya que desde hace años se ha convertido en una planta modelo, no sólo por los abundantes recursos genéticos que han ido desarrollándose, sino porque los avances obtenidos son aplicables directamente sobre este cultivo confiriéndole una gran relevancia económica. Una de las plagas que produce más daños a este cultivo es la mosca blanca *Bemisia tabaci* debido, no sólo al daño directo por la alimentación del insecto, sino también por sus daños indirectos, como la reducción de la capacidad fotosintética de las hojas y la transmisión de virus. *B. tabaci* está considerada como una de las 100 especies invasoras más importantes del mundo debido a los daños que ocasiona a numerosos cultivos, incluso de plantas ornamentales, a su carácter polífago habiéndose detectado individuos de *B. tabaci* en unas 900 plantas huésped distintas y, además, al desarrollo de resistencias a numerosos químicos utilizados para su control.

El cultivo del tomate, que se ve sometido al ataque de ésta y otras plagas y está expuesto a diversas enfermedades, ha desarrollado, de forma similar a otras plantas, mecanismos que le permiten el reconocimiento de organismos colonizadores así como una respuesta defensiva frente a esta colonización, que pueden regularse mediante genes de resistencia en la planta. En el tomate, uno de estos genes de resistencia es el gen *Mi-1* que confiere resistencia a nematodos, áfidos y moscas blancas, aunque los principales mecanismos moleculares de esta resistencia aún no están muy claros. Con el fin de profundizar en el conocimiento de los mecanismos de la resistencia a *B. tabaci* mediada por el gen *Mi-1*, en la presente Tesis se han planteado diversos estudios en los que se ha evaluado el efecto del nivel de desarrollo de la planta en este tipo de resistencia, el papel del ácido salicílico en la defensa basal en tomate a *B. tabaci* y en la resistencia mediada por *Mi-1*, así como la implicación del gen *Hsp90* en la resistencia mediada por *Mi-1* a moscas blancas. Además, se ha llevado a cabo un análisis

transcriptómico global de la planta de tomate en la resistencia a *B. tabaci* mediada por el gen Mi-1, así como en la resistencia inducida por el tratamiento con BTH, un análogo del ácido salicílico.

Ya se conocía desde hace tiempo que la expresión de Mi-1 es constante a lo largo del desarrollo de la planta, en diferentes órganos de la misma y tras el ataque de nematodos y áfidos, aunque también se había demostrado que la resistencia mediada por Mi-1 a áfidos (pero no a nematodos) depende del grado de desarrollo de la planta. La resistencia a *B. tabaci* mediada por el gen Mi-1 se había demostrado siempre en plantas bien desarrolladas, aunque en algún caso en que se emplearon plantas más pequeñas no se apreciaba dicha resistencia. Sin embargo, en esta Tesis se ha llevado a cabo un estudio en el que, por primera vez, se han comparado directamente plantas de distintas edades y tamaños para demostrar que la resistencia Mi-1 a *Bemisia tabaci* depende del desarrollo vegetal que la edad de la planta tiene más influencia que su tamaño.

Estudios anteriores habían demostrado que la resistencia mediada por Mi-1 a áfidos y nematodos requiere de la participación del ácido salicílico, fitohormona que juega un importante papel en la activación de la respuesta defensiva mediada por algunos genes de resistencia en las plantas. Por esta razón, se ha incluido en esta Tesis un estudio para determinar la posible implicación que esta hormona podía tener en las interacciones tomate-mosca blanca. Así se pudo demostrar que el ácido salicílico desempeña un papel destacado en la resistencia mediada por Mi-1 a *B. tabaci*, si bien no parece estar implicado en la defensa basal del tomate a este insecto.

Las proteínas de resistencia pueden interaccionar con otras proteínas, formando complejos multiproteicos, para dar lugar a la respuesta defensiva. Por ejemplo, la chaperona HSP90 se había descrito hace algún tiempo como parte del complejo multiproteico en la resistencia mediada por Mi-1 a áfidos y nematodos, habiéndose establecido su papel en este complejo, así como en otras rutas de señalización de genes de resistencia, mediante el silenciamiento génico

inducido por virus (VIGS). En uno de los estudios de la presente Tesis se ha empleado esta misma tecnología para silenciar el gen Hsp90, demostrando que dicho gen también es un componente importante en la resistencia Mi-1 del tomate a la mosca blanca *B. tabaci* y, por tanto, se puede establecer otro factor común con la resistencia Mi-1 a áfidos y nematodos.

Desde hace ya unos años, el análisis de perfiles de expresión génica mediante microarrays ha permitido estudiar los cambios transcripcionales que se producen en las plantas en determinadas situaciones como, por ejemplo, tras la alimentación de moscas blancas. Sin embargo, hasta el momento no se habían analizado los cambios globales que se producen en plantas de tomate que contienen el gen Mi-1 tras la infestación por dichas moscas blancas. En este estudio se llevó a cabo un análisis del perfil de expresión génica en las hojas de tomate mediante microarrays, durante la alimentación y oviposición de hembras adultas y durante la actividad del primer estado ninfal tanto en plantas susceptibles (interacción compatible) como en plantas resistentes portadoras del gen Mi-1 (interacción incompatible), comparándose ambas interacciones. Estos análisis mostraron, entre otros resultados más concretos, que la reprogramación transcripcional es mayor durante la interacción incompatible que durante la compatible. Además, la actividad de la ninfa de primer estadio de *B. tabaci* provoca mayores cambios que la alimentación y oviposición de hembras adultas de este insecto, siendo estos cambios más acusados en plantas resistentes. Por otro lado, también se analizaron los cambios globales que se producen tras el tratamiento del tomate susceptible con un análogo del ácido salicílico (BTH), cuyo efecto como agente inductor de resistencia a moscas blancas había sido demostrado en un estudio anterior. El tratamiento con BTH provocó cambios transcripcionales mayores que los observados en la interacción compatible o en la interacción incompatible regulada por Mi-1. Además, el estudio mediante análisis de microarrays ha permitido identificar de forma

individual a numerosos genes y relacionarlos con las resistencias (congénita y/o inducida) del tomate a *B. tabaci*.

INTRODUCCIÓN

1. El tomate: cultivo e importancia agronómica.

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los principales cultivos de hortalizas a nivel mundial. Pertenece a la familia de las solanáceas, que incluye otras especies cultivadas de gran importancia como pimiento, patata, berenjena y tabaco. Las estadísticas de la FAO (www.fao.org) sitúan al tomate en el décimo puesto en la producción mundial de productos alimentarios y agrícolas en el 2010 (Tabla I.1) con una producción de más de ciento cuarenta mil millones de toneladas al año.

Tabla I1. Producción mundial de productos alimentarios y agrícolas en el 2010 según la FAO.

Posición	Producto	Producción (1000\$ Int)	Producción (T)
1	Leche entera vaca (fresca)	179193013	599438003
2	Arroz cáscara	174746524	672015587
3	Carne Vacuna Indígena	167889596	62149658
4	Carne de Cerdo Indígena	167731383	109111963
5	Carne de Pollo Indígena	121631342	85390862
6	Trigo	81235926	650881002
7	Soja	64858495	261578498
8	Maíz	55145544	844405181
9	Caña de azúcar	53638724	1685444531
10	Tomates	53270325	145751507
11	Huevos gallina cásc.	52675769	63571536
12	Papas, patatas	44518965	324181889
13	Hortal Nep	40740756	240114694
14	Uvas	39047995	68311466
15	Leche entera búfala (fresca)	36365698	92517217
16	Algodón Fib	33569019	23487913
17	Manzanas	29173050	69569612
18	Bananos	28347479	102114819
19	Carne Ovina Indígena	23353630	8577067
20	Mangos, mangostanes y guayabas	23152821	38665809

Estas mismas estadísticas sitúan a España en octavo lugar entre los países con mayor producción de tomate a nivel mundial y el tercero a nivel de exportación.

A continuación se comenta la utilidad del tomate como planta modelo en investigación y se hace una breve referencia a las principales plagas y enfermedades que atacan a este cultivo.

1.1. El tomate como planta modelo.

La especie modelo de plantas dicotiledóneas empleada preferentemente en la actualidad es *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. La gran importancia económica de otros cultivos ha llevado a la aparición de otras plantas modelo. Este es el caso del tomate cuyo empleo como especie modelo presenta

numerosas ventajas: es una especie diploide de genoma pequeño ($n=12$), con ciclo de vida corto, fácil control de la polinización e hibridación, alta fertilidad, posibilidad de propagación asexual mediante esquejes, facilidad de regeneración y transformación con *Agrobacterium tumefaciens* (Smith y Townsend) Conn. Existen abundantes recursos genéticos basados en el tomate (<http://solgenomics.net/>), como colecciones de germoplasmas o mutantes, mapas genéticos de alta densidad, transformaciones, bases de datos de *Expressed sequence tag* (EST) y varias plataformas de microarrays para el estudio de la expresión génica entre las que se encuentra Affymetrix (Affymetrix GeneChip Tomato Genome Array), entre otras herramientas moleculares. Por otro lado, ya se ha publicado la secuencia completa del genoma del tomate (The tomato genome consortium, 2012) que ofrece nuevas herramientas para la investigación y mejora de este cultivo. Otra de las ventajas en el empleo del tomate como planta modelo es que los avances realizados se pueden aplicar de forma directa sobre el cultivo por lo que posee una gran relevancia económica.

El tomate ha sido utilizado, entre otros fines, para el estudio de procesos de defensa, principalmente contra patógenos fúngicos y bacterianos (Pedley and Martin, 2003; Rivas and Thomas, 2005) pero también en interacciones con nematodos e insectos (revisado en Kaloshian, 2004). No obstante, los principales mecanismos moleculares de la resistencia en tomate no están muy claros, como se evidencia en la diferente respuesta a nematodos, áfidos y moscas blancas (Milligan *et al.*, 1998; Rossi *et al.*, 1998; Nombela *et al.*, 2003). Parte de esta problemática reside en el hecho de que las rutas de señalización no son lineales y se solapan con otras cascadas de señalización relacionadas con otros fenómenos biológicos (por ejemplo, estrés abiótico, senescencia, diferenciación) no asociados con procesos de defensa (revisado en Fujita *et al.*, 2006).

El tomate es una buena planta modelo para el estudio de las interacciones huésped-patógeno puesto que es susceptible a la mayoría de manipulaciones biotecnológicas, incluyendo la transformación vegetal (Cortina and Culianez-Macia, 2004) y el silenciamiento génico inducido por virus (Liu *et al.* 2002). La disponibilidad de herramientas funcionales ha permitido un análisis global del transcriptoma en diversas interacciones tomate-patógeno

entre las que se encuentra la interacción con nematodos (Bhattarai *et al.* 2008).

1.2. Plagas y enfermedades del tomate.

El tomate puede verse afectado por distintas enfermedades y un elevado número de plagas, influyendo negativamente en la comercialización del mismo y causando graves pérdidas económicas en el sector agrario. Las enfermedades que pueden sufrir las plantas de tomate pueden ser provocadas por hongos, bacterias o virus. El crecimiento de los hongos patógenos se ve favorecido por bajas temperaturas y la humedad, extendiéndose la infección rápidamente en un corto periodo de tiempo. El control químico en campo resulta en muchas ocasiones complicado por la dificultad para detectar el inicio de la infección. Una reciente revisión menciona a diferentes hongos patógenos del tomate, entre los que se encuentran *Phytophthora infestans*, *Oidium lycopersicum*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium fulvum* y *Verticilium dahliae* (Panthee and Chen, 2010). Entre las bacterias patogénicas destaca *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) que daña al tomate penetrando a través de heridas o aperturas naturales y produce una infección sistémica (Davis *et al.*, 1984; Jahr *et al.*, 1999), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* que penetra en las hojas de forma similar a *Cmm* provocando clorosis y manchas necróticas (Whalen *et al.*, 1991), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* que puede contaminar las semillas de tomate o sobrevivir en deshechos de plantas y en malas hierbas (Jones *et al.*, 1986) y *Ralstonia solanacearum* que causa un gran marchitamiento de las hojas limitando la producción agrícola (Hayward, 1991; Fujiwara *et al.*, 2008). Existen diferentes virus que pueden afectar al tomate entre los que destaca el virus del rizado amarillo del tomate (hoja en cuchara) (TYLCV) (Moriones and Navas-Castillo, 2000), el virus del mosaico del tomate (ToMV) y el virus del bronceado del tomate (TSWV).

Algunas de las plagas más relevantes del tomate son: araña roja, trips, minadores de las hojas, orugas de lepidópteros, pulgones, nematodos y moscas blancas. La araña roja *Tetranychus urticae* ha sido detectada en aproximadamente 900 plantas entre las que se encuentra el cultivo del tomate (Egas *et al.*, 2003); el trips *Frankiniella occidentalis* provoca una reducción en el crecimiento de la planta y es un transmisor de virus, especialmente del

TSWV (German *et al.*, 1992; Wijkamp *et al.*, 1995); el minador de hojas *Tuta absoluta* es uno de los minadores más dañinos en Sudamérica (Barrientos *et al.*, 1998; Miranda *et al.*, 1998; Colomo *et al.*, 2002) y fue descrita recientemente en el sur de España (Urbaneja *et al.*, 2007) y posteriormente en otras zonas mediterráneas y en Europa (Potting, 2013; Germain *et al.*, 2009). Aunque este insecto afecta a diferentes solanáceas parece que su principal huésped es el tomate (Desneux *et al.*, 2010); las orugas de algunos lepidópteros, como *Helicoverpa armigera* y *Spodoptera exigua*, provocan graves daños a las hojas y los frutos de diferentes cultivos entre los que se encuentra el del tomate (Center for Integrated Pest Management 1996); los pulgones, como *Macrosiphum euphorbiae* y *Myzus persicae*, producen un daño directo por la alimentación e indirecto por la transmisión de virus provocando graves problemas a los cultivos incluyendo al del tomate, (Emden *et al.*, 1969; McKinlay *et al.*, 1992; Walgenbach, 1997). Entre los nematodos que pueden afectar al tomate se encuentran los nematodos formadores de nódulos (*Meloidogyne* spp.). El segundo estado juvenil de estos nematodos infecta las raíces provocando el desarrollo de células gigantes de las que se alimentan (Hussey 1989; Wyss *et al.* 1992). Entre las especies de moscas blancas hay que destacar a *Bemisia tabaci* que es el objeto central de toda esta tesis, por lo que se le dedica un apartado propio en este capítulo de Introducción.

2. *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae).

Entre las especies de moscas blancas más frecuentes, *Bemisia tabaci* ataca a un gran número de cultivos entre los que se encuentran el pimiento, algodón y tomate. *B. tabaci* ha sido considerada un complejo críptico de especies (Brown *et al.*, 1995) definido como poblaciones aisladas reproductivamente cuyos rasgos morfológicos no permiten su diferenciación. En una revisión posterior (Perring, 2001) se describen siete grupos en los que se incluyen los 24 biotipos determinados hasta ese momento basándose en diferentes estudios en los que emplearon no sólo análisis morfológicos sino también moleculares. En España *B. tabaci* está representada principalmente por dos biotipos, B y Q (Guirao *et al.*, 1997) pero, desde hace varios años, el biotipo Q es el que predomina en las zonas hortícolas del sudeste español, donde el cultivo del tomate posee gran interés económico (Simón *et al.*, 2001). Recientemente, se ha publicado una revisión sobre la taxonomía de *B. tabaci* (De Barro *et al.*, 2011) en la que se concluye que actualmente existe suficiente

evidencia para determinar que *B. tabaci* no es un conjunto de diferentes biotipos sino que se trata de un complejo de 11 grupos que contienen, al menos, 24 especies morfológicamente indistinguibles.

Las moscas blancas, y más concretamente *B. tabaci* son las que generan una mayor preocupación no sólo por sus daños directos al alimentarse de la planta que provocan graves pérdidas en los cultivos (Oliveira *et al.*, 2001) sino también por sus daños indirectos al reducir la capacidad fotosintética de las hojas debido a la melaza excretada por estos insectos (Yee *et al.*, 1996) y a la transmisión de virus (Czosnek and Laterrot 1997; Brown and Czosnek, 2002; Jones, 2003), y por otro lado, por la resistencia que las moscas blancas han creado a diferentes tratamientos químicos (Denholm *et al.*, 1998). A continuación, se describe en mayor detalle el ciclo biológico, la capacidad hospedadora y los daños ocasionados a los cultivos así como el manejo integrado de *B. tabaci*.

2.1. Ciclo biológico

La reproducción de *B. tabaci* es por partenogénesis facultativa arrenoteca, esto es, los huevos que deposita la hembra, si están fecundados pueden dar lugar a hembras o a machos y si no lo están, darán lugar solamente a machos haploides (Byrne and Bellows, 1991). Los huevos de aproximadamente 0,2 mm de longitud y 0,1 mm de diámetro, son depositados por las hembras en el envés de las hojas. Estos huevos de forma elíptica quedan anclados a la hoja mediante una estructura llamada pedicelo (revisado en Byrne and Bellows, 1991). Estudios sobre esta estructura sugirieron y posteriormente confirmaron que no sólo sirve de anclaje a la hoja sino que, además, es el medio de transporte de solutos desde ésta hacia el interior del huevo (Byrne *et al.*, 1990; Buckner *et al.*, 2002). Los huevos en los primeros días son de color blanquecino, tornando a marrón a medida que avanza el desarrollo hacia el primer estado ninfal (N1). El tamaño varía de 0,3 mm en el primer estado ninfal (N1) hasta aproximadamente 0,6 mm en el cuarto estado ninfal (N4). Todos los estados ninfales presentan una forma elíptica y son de color amarillento. Las ninfas se alimentan en el mismo sitio de alimentación desde que se establece la N1 (revisado en Byrne and Bellows, 1991). La N1 es la única fase móvil, que se desplaza ligeramente por el envés de la hoja ya que dispone de patas funcionales (Byrne and Bellows, 1991; Freeman *et al.*, 2001)

probando distintos lugares con su estilete hasta encontrar un sitio de alimentación idóneo en el cual se inmoviliza para comenzar a alimentarse (Byrne and Bellows, 1991). Finalmente, el cuarto estado ninfal (N4) o pupa se transforma en pupa madura sin que suceda exuviación. La pupa madura es de color amarillo, de unos 0,7 mm, destacan dos ojos rojos y el cuerpo adquiere una forma convexa que parece oval y plana vista desde arriba. Los nuevos adultos emergen de las pupas rompiendo la cubierta todavía con las alas pegadas al cuerpo hasta que consiguen desplegarlas por completo y comienzan a alimentarse.

El tiempo de desarrollo, de huevo a adulto, de *B. tabaci* depende principalmente de la temperatura, del biotipo y de la planta huésped (revisado en Drost *et al.*, 1998; Nava-Camberos *et al.*, 2001; Muñiz and Nombela, 2001; Mansaray and Sundufu, 2009). Como ejemplos de estos estudios pueden citarse los realizados en diferentes genotipos como judía (Musa and Ren, 2005), pimiento (González-Zamora y Gallardo, 1999; Muñiz and Nombela, 2001) algodón y melón (Nava-Camberos *et al.*, 2001) y berenjena (Qiu *et al.*, 2003). En cuanto al cultivo que nos interesa en esta tesis, el tomate, Islam and Shunxiang (2007) determinaron que, a 25°C, el periodo de desarrollo de *B. tabaci* desde la puesta del huevo hasta la emergencia del adulto osciló entre 19 y 22 días según la variedad de tomate, aunque no indicaron qué biotipo de *B. tabaci* utilizaron. Otros autores han estudiado el desarrollo de los biotipos B y Q a diferentes temperaturas y sobre distintos genotipos de tomate, observando que, a 25°C, la duración del desarrollo completo del biotipo Q fue de aproximadamente 25 días (Bonato *et al.* 2007, Oriani *et al.*, 2011).

Un parámetro interesante en los estudios sobre biología de insectos-plaga es la tasa intrínseca de crecimiento que indica cómo crecería una población dada después de un cierto periodo de actividad reproductora del insecto. Este parámetro ha sido determinado por diversos autores en pimiento (González-Zamora y Gallardo, 1999), berenjena (Qiu *et al.*, 2003), judía (Musa and Ren; 2005), tomate (Yang and Chi, 2006; Bonato *et al.*, 2007; Islam and Slunxiang, 2007) y soja (Mansaray and Sundufu, 2009).

2.2. Capacidad hospedadora y daños ocasionados a los cultivos.

En cuanto a su capacidad hospedadora, *B. tabaci* está considerada como una de las 100 especies invasoras más dañinas del mundo (Lowe *et al.*, 2000).

Esto es debido por una parte a los daños producidos por el insecto y a las resistencias desarrolladas a determinados productos, y, por otra al enorme número de plantas huésped que puede colonizar. En 2001, Oliveira *et al.* hicieron una revisión de aproximadamente 600 plantas huésped de *B. tabaci* entre las que se encuentran ornamentales, cultivos y herbáceas, pero en la base de datos de especies invasoras (The Global Invasive Species Database, GISD <http://www.issg.org/database/welcome/>), actualizada en el 2005, se habla de unas 900 plantas huésped.

Los daños que pueden ser producidos por el hábito alimenticio y actividad de las moscas blancas se agrupan en daños directos e indirectos.

a) Daños directos: tanto las ninfas como los adultos de *B. tabaci* causan un daño directo sobre la planta huésped al alimentarse insertando su estilete a través de la superficie foliar y extrayendo el floema directamente desde los tubos cribosos (Chu *et al.*, 1995) lo que debilita a la planta. La ninfa N1 puede alcanzar el tejido floemático desde cualquier posición en la superficie abaxial ya que su estilete tiene una longitud de $113,8 \pm 4,2 \mu\text{m}$ (Freeman *et al.*, 2001). Elevadas poblaciones de mosca blanca pueden llegar a dejar a la planta sin nutrientes por un alto consumo de savia para obtener aminoácidos.



Figura 11. Adulto de *B. tabaci* alimentándose en el envés de una hoja de tomate. (Francisco J. Beitia).



Figura 12. Melaza sobre hojas de pimiento (www.seea.es; Pablo Bielza).

b) Daños indirectos: la actividad alimenticia provoca un daño indirecto al permitir la producción de grandes cantidades de una sustancia llamada melaza excretada por los estadios ninfales convirtiéndose en una capa pegajosa que cubre la superficie foliar. Esta melaza favorece el crecimiento de hongos y no sólo confiere mal aspecto a las hojas sino que reduce su capacidad fotosintética (Yee *et al.*, 1996). Además, la melaza puede atraer a hormigas que interfieren con la actividad de

enemigos naturales capaces de controlar las poblaciones de mosca blanca (Queiroz and Oliveira, 2001).

Otro daño indirecto producido por las moscas blancas es la transmisión de enfermedades causadas por virus vegetales. Estos insectos se convierten en vectores de transmisión de virus a través del canal salival del estilete durante la alimentación. Una población relativamente baja de moscas blancas puede ser suficiente para causar un daño considerable por la transmisión de virus (Cohen and Berlinger, 1986).



Figura I3. TYLCV transmitido por mosca blanca (www.seea.es; Pablo Bielza).

Según la GISD (Global Invasive Species Database) *B. tabaci* puede transmitir 111 virus vegetales distintos. Entre los virus más significativos en el cultivo del tomate se encuentra el del rizado amarillo del tomate (hoja en cuchara) o “*Tomato Yellow Leaf Curl Virus*” (TYLCV) (Moriones *et al.* 1993; Brown, 1994; Schuster *et al.* 1996). Estos virus pueden producir muchas más pérdidas económicas que las debidas únicamente a la alimentación (Perring, 2001).

B. tabaci produce numerosos daños sobre cultivos alimentarios y ornamentales debido a las características descritas anteriormente en esta Introducción; sin embargo, en la mayoría de trabajos y libros publicados no se hace referencia al daño económico concreto sino que se explica, de forma general, que la infestación por este insecto produce “pérdidas económicas” en la agricultura. Se considera que esta falta de datos concretos sobre las pérdidas económicas producidas exclusivamente por *B. tabaci* puede ser debida a la cantidad de áreas afectadas, el número de cultivos implicados así como a los diferentes sistemas monetarios de los países perjudicados (Oliveira *et al.*, 2001). En ese trabajo se comentan las pérdidas económicas acaecidas únicamente en algunos puntos del continente americano entre 1991 y 1999, pero no sobre otros países como España. De hecho, ni a través de la FAO ni

del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de nuestro país ha sido posible obtener este tipo de datos.

2.3. Manejo integrado de *B. tabaci*.

Durante muchos años el control de las poblaciones de las plagas se ha basado principalmente en métodos químicos que han demostrado tener algunos inconvenientes como elevada toxicidad ambiental o proliferación de poblaciones resistentes. Por este motivo, resulta más recomendable emplear el control químico en combinación con otros métodos culturales, biológicos, genéticos o de otros tipos, en una estrategia común basada en el Manejo Integrado de Plagas.

El Manejo Integrado de Plagas (MIP) se ha definido en diferentes términos y por diferentes agencias o grupos (Yudelman *et al.*, 1998). Una de las definiciones, propuesta por la FAO (FAO, 2005) explica que el MIP requiere de una atenta consideración de todas las técnicas de control de plagas disponibles, así como la integración de las medidas apropiadas que eviten el desarrollo de las poblaciones de las plagas, de forma que permita mantener el uso de pesticidas y otras intervenciones en niveles económicamente justificables, con objeto de reducir o minimizar los riesgos para la salud pública y el medio ambiente. El MIP impulsa el crecimiento de cultivos sanos con la menor alteración posible del ecosistema y estimula el uso de mecanismos naturales de control de plagas.

En concreto, el Manejo Integrado de *B. tabaci* ha sido descrito como una pirámide con tres componentes clave (Ellsworth and Martinez-Carrillo, 2001; Naranjo, 2001). Estos tres componentes son la detección y muestreo, el uso efectivo de químicos y la evitación o exclusión. El muestreo resulta una pieza central en el manejo integrado desarrollándose los sistemas más adecuados para que la realización de estos muestreos sean rápidos y eficaces y, a partir de los cuales, se pueda determinar el nivel de colonización de una población plaga en un cultivo determinado. El uso de químicos para controlar una plaga debe entenderse como parte de un método MIP y no como una estrategia aislada, sobre todo en el caso de *B. tabaci*. El control a largo plazo de *B. tabaci* ha resultado difícil de mantener con el uso de insecticidas tanto en el campo como en invernaderos (Horowitz and Ishaaya, 1996). Las aplicaciones de estos productos químicos han provocado el desarrollo de resistencias en *B. tabaci* a

numerosos químicos convencionales en todo el mundo (Dittrich *et al.*, 1990; Denholm *et al.*, 1998) que condujeron al desarrollo de nuevos químicos con un modo de acción más específico y respetuosos con el medio ambiente (Palumbo *et al.*, 2001). Existe otro tipo de controles biológicos (Beitia *et al.*, 1997; Delgado, 1997; González-Zamora *et al.*, 1997; Reina y Bejarano, 1997) que permiten reducir los niveles de las poblaciones-plaga. El uso combinado de diferentes métodos de control, como la utilización de machos estériles, inducción de defensas en la planta y técnicas culturales, sigue siendo objeto de estudio (revisado en Gurr and Kvedaras, 2010). Se han realizado diversos trabajos sobre las interacciones del control biológico con el uso de cultivos modificados genéticamente con resistencia a insectos (revisado en Altieri, 2004; Gassmann *et al.*, 2008). Aunque se han registrado efectos negativos en la interacción de control biológico con plantas resistentes (Simmons and Gurr, 2005), también se han observado interacciones positivas en la combinación de ambos métodos (sinergias), dando como resultado una mayor supresión de las poblaciones plagas que al utilizar cada método individualmente.

La exclusión es la base del manejo integrado que incluye diferentes estrategias entre las que se encuentran el manejo de hospedadores alternativos, la conservación de enemigos naturales y los modelos de predicción de plagas y epidemias. Además de estas estrategias, es necesario el estudio del efecto de determinados factores abióticos, como el agua y la temperatura sobre las poblaciones-plaga.

3. Resistencia vegetal.

Entre las muchas estrategias del MIP, la resistencia vegetal se perfila como una de las más eficientes y respetuosas con el medio ambiente, aunque requiere la realización de más investigaciones y en mayor profundidad para conocer este mecanismo en la planta y poder estudiar su efecto en combinación con otros métodos.

Las plantas han desarrollado numerosas estrategias de defensa como medida de protección, algunas de forma constitutiva y otras inducidas, debidas a respuestas frente al ataque de patógenos o plagas. El organismo que ataca a una planta debe evadir, suprimir y hacer frente a diversos mecanismos de defensa que suelen incluir barreras estructurales, así como metabolitos secundarios y agentes microbianos (Dangl and Jones, 2001; Gómez-Gómez,

2004; Bruce and Pickett, 2007). La resistencia vegetal podría definirse como la reducción relativa del tamaño de la población de la plaga por comparación con las variedades estándar, debido a las características genéticas de la planta hospedadora (Ponti *et al.*, 1990).

Las plantas se encuentran en continua exposición al posible ataque de muchos organismos (patógenos o plagas) y han desarrollado diversas estrategias de reconocimiento y respuesta a ellos. De forma general, la defensa en la planta contra el ataque de un organismo incluye el reconocimiento del organismo, la transducción de la señal y la respuesta defensiva.

3.1. Reconocimiento del organismo.

Básicamente, existen dos ramas en el sistema inmunitario de las plantas (Jones and Dangl, 2006): reconocimiento basal de moléculas comunes a muchas clases de organismos patógenos y no patógenos, y reconocimiento específico en respuesta a factores de virulencia del patógeno, que podrían corresponder con la resistencia horizontal o innata y vertical o específica, respectivamente, de la dicotomía clásica (Van der Plank, 1968).

Para explicar el sistema global de las interacciones planta-patógeno, Jones and Dangl (2006) propusieron el modelo del zig-zag (Figura I4), válido también para las interacciones planta-herbívoros. En el modelo se muestra cómo el reconocimiento basal de PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) por los denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs o *pattern recognition receptors*) desencadena una respuesta defensiva llamada PTI (*PAMP-triggered immunity*) que impide la colonización del patógeno (Schwessinger and Zipfel, 2008). Puede suceder que algunos patógenos sean capaces de evadir este reconocimiento basal liberando efectores que interfieren con la respuesta PTI (Abramovitch *et al.*, 2006). Si estos efectores del organismo colonizador no son detectados por la planta, se establecerá una interacción compatible y, por tanto, la planta será colonizada por el organismo (ETS o *Effector-triggered susceptibility*). Sin embargo, si los efectores del organismo son detectados específicamente por proteínas NB-LRR, ya sea de forma directa (hipótesis gen-a-gen) o indirecta (hipótesis del guardián), se desencadena una respuesta defensiva de mayor amplitud a la respuesta PTI, conocida como ETI (*Effector-triggered immunity*) dando como resultado una interacción incompatible (Chisholm *et al.*, 2006).

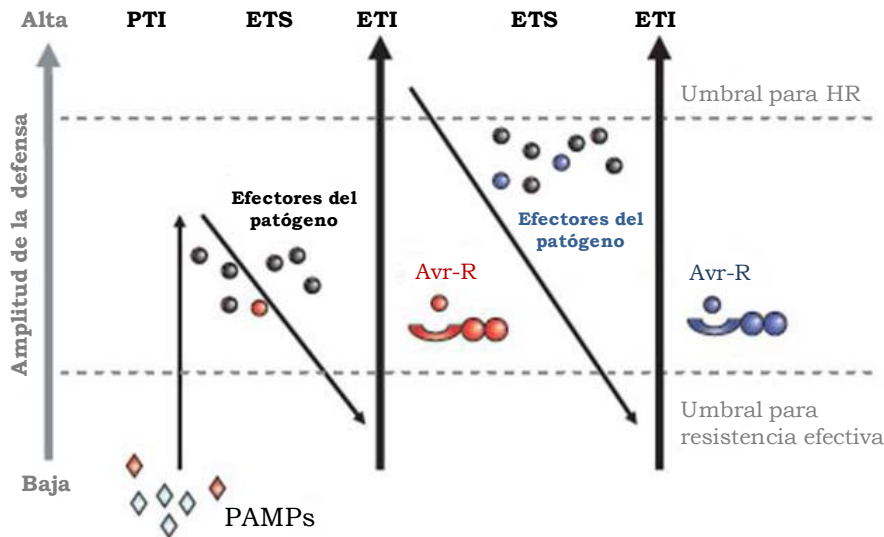


Figura I4. Ilustración del modelo del zig-zag sobre el sistema inmune en plantas (Jones and Dangl, 2006). PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*); PTI (*PAMP-triggered immunity*); ETS (*Effector-triggered susceptibility*); ETI (*Effector-triggered immunity*). Avr-R (reconocimiento específico del patógeno).

En ocasiones, la respuesta ETI va acompañada por una respuesta hipersensible (HR), que es una muerte celular programada iniciada en el punto de infección (Morel and Dangl, 1997), tal y como sucede en plantas de tomate que poseen el gen *Mi-1* tras el ataque de nematodos (Dropkin, 1969).

La selección natural puede actuar sobre aquellos patógenos capaces de modificar o adquirir efectores adicionales para suprimir la resistencia (ETI) estableciéndose de nuevo una interacción compatible con la planta huésped (ETS). Por su parte, las plantas co-evolucionan en esta interacción con el organismo colonizador para dar lugar a nuevas proteínas R que interaccionen con los nuevos o modificados efectores del patógeno y desencadenar nuevamente la respuesta defensiva (ETI).

A continuación se profundiza por separado en cada una de las dos ramas que, según este modelo, constituyen el sistema inmunitario vegetal: reconocimiento basal y reconocimiento específico.

3.1.1. Reconocimiento basal.

Todas las plantas poseen un sistema de reconocimiento basal que implica la detección de efectores del organismo colonizador que pueden incluir patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), toxinas o enzimas degradativas (Hogenhout *et al.*, 2009). Algunos ejemplos de estas moléculas PAMPs son ciertos componentes estructurales de las paredes y membranas

celulares de algunos hongos como el ergosterol y la quitina; lipopolisacáridos (LPS) que forman parte de las membranas celulares de las bacterias Gram negativas y/o la flagelina, componente mayoritario de los órganos de motilidad de las bacterias (Zipfel *et al.*, 2004).

La mayoría de los estudios realizados sobre los efectores se han llevado a cabo en interacciones planta-patógeno (Hogenhout *et al.*, 2009) y los que analizan la interacción planta-insecto se centran en herbívoros masticadores o en áfidos. Existen pocos trabajos realizados con moscas blancas (Funk, 2001; Mutti *et al.*, 2008; Howe and Jander, 2008; Cicero and Brown, 2011; Su *et al.*, 2012). Los elicitores específicos de insectos han sido aislados a partir de sus secreciones orales y en su producción podrían estar implicados microorganismos presentes en los órganos digestivos de los herbívoros (Spiteller *et al.*, 2000), del mismo modo que se sugiere que ciertas bacterias simbiotas presentes en el aparato digestivo de *B. tabaci* podrían manipular a estos insectos llegando a ser responsables, entre otros factores, de la resistencia a insecticidas (Chiel *et al.*, 2007).

Estudios recientes han demostrado que la saliva de herbívoros masticadores y de áfidos contienen elicitores que inducen las respuestas defensivas en la planta (Schmelz *et al.*, 2006; Diezel *et al.*, 2009; de Vos and Jander, 2009). En el caso de *B. tabaci* se identificó una fosfatasa alcalina (ALP) presente en la saliva (Funk, 2001) que podría estar implicada en la alimentación del insecto (Funk, 2001; Yan *et al.*, 2011). De forma general, se asume que el daño producido en la planta, en ausencia de transmisión de virus, es debido a un componente en la saliva de *B. tabaci* (Miles, 1999) por lo que ALP podría ser un elicitador de la respuesta defensiva (Funk, 2001). Recientemente, se han identificado otras sustancias en la saliva de *B. tabaci* que podrían jugar un papel en la inducción de respuestas defensivas en la planta (Su *et al.*, 2012). Se ha sugerido que la saliva de los insectos puede contener activadores o inhibidores de las rutas defensivas de las plantas (Eichenseer *et al.*, 1999; Miles, 1999; Liu *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2012). Por otro lado, Mayer *et al.* (2002) sugieren que la melaza producida por las moscas blancas podría actuar como elicitador debido a su contenido en oligosacáridos, conocidos por inducir repuestas defensivas en las plantas (Yamaguchi *et al.*, 2000).

3.1.2. Reconocimiento específico: genes de resistencia (genes R).

No obstante, los herbívoros han desarrollado efectores que pueden eludir los factores de reconocimiento de la planta provocando la susceptibilidad (Ingle *et al.*, 2006), como el efector Mp10 identificado en áfidos (Bos *et al.*, 2010; Atamian *et al.*, 2013). Por su parte, las plantas han evolucionado hacia una estrategia de reconocimiento específico mediante proteínas de resistencia (R) que pueden reconocer los efectores del patógeno. La interacción planta-patógeno es una lucha evolutiva en la que uno finalmente domina sobre otro (Jones and Dangl, 2006).

Flor (1971) estudió las interacciones planta-patógeno estableciendo la hipótesis gen-a-gen, según la cual para cada gen de resistencia (*R*) en el huésped le corresponde un gen de avirulencia (*Avr*) en el patógeno. El éxito de la resistencia requiere una interacción entre los productos de ambos genes que inician las respuestas defensivas en el hospedador. Keen (1990) explica que el reconocimiento específico de *Avr* mediante un gen *R* provoca una cascada de transducción de la señal que activa las defensas en la planta, tratándose de una interacción directa entre las proteínas R y las proteínas efectoras *Avr*. Un ejemplo de este tipo de interacción es la establecida entre el gen de resistencia en el tomate *Pto* y su correspondiente gen de avirulencia *AvrPto* de *Pseudomonas syringae* pv tomato (Tang *et al.* 1996). Otro ejemplo es la interacción entre el gen *Pita* en el arroz y el gen *Avr-Pita* del hongo *Magnaporthe grisea* (Jia *et al.*, 2000). Sin embargo, en otros estudios no ha sido posible mostrar esa interacción directa entre las proteínas R y *Avr* (Dixon *et al.*, 2000; Luderer *et al.*, 2002).

Debido a esta falta de evidencias, van der Biezen and Jones (1998) propusieron la “hipótesis del guardián”, en la que se postulaba que la interacción es indirecta: la proteína R forma parte de un complejo multiproteico en el que se incluyen también otras proteínas (guardián). Alguna de estas proteínas guardián interactúa directamente con el factor *Avr* produciendo un cambio conformacional en dicha proteína guardián que activa la proteína R para contrarrestar la influencia del factor *Avr* o inducir defensas adicionales en la planta, provocando una respuesta incompatible. Si no existe una proteína R, el factor *Avr* eludirá las defensas de la planta estableciéndose una respuesta compatible (revisado en Dangl and Jones, 2001). Un ejemplo

que apoya este modelo es la interacción entre las proteínas R tipo NBS-LRR, RPM1 (Resistance to *P. syringae* pv. *maculicola*) y RPS2 (Resistance to *P. syringae* expressing *AvrRpt2*) con sus correspondientes proteínas Avr a través de la proteína guardián RIN4, que interacciona con tres proteínas efectoras diferentes AvrRpt2, AvrRPM1 y AvrB (Mackey *et al.*, 2002, 2003; Axtell and Staskawicz, 2003).

3.1.2.1. Clasificación de las proteínas R.

Se han establecido diferentes clasificaciones de proteínas R en función de su estructura (Dangl and Jones, 2001; Martin *et al.*, 2003). Las diferencias entre estas clasificaciones se deben a que Dangl and Jones (2001) engloban las proteínas Ve y Cf en la misma clase y consideran que las proteínas CNL y TNL (descritas más abajo) son subclases de un mismo grupo mientras que Martin *et al.* (2003) consideran que las proteínas Ve y Cf pertenecen a grupos diferentes y que las proteínas CNL y proteínas TNL deben ser consideradas como clases independientes. La clasificación más reciente, establecida por Martin *et al.* (2003), agrupa las proteínas R en seis clases distintas.

La primera clase incluye casi exclusivamente a la proteína Pto y a la proteína Fen muy relacionada con Pto en tomate (Martin *et al.* 2003). Pto contiene un dominio protein quinasa sin LRR, con actividad serín/treonín quinasa (Loh and Martin, 1995). El gen *Pto* confiere resistencia frente a las razas de *P. syringae* que contienen el gen de avirulencia *avrPto* (Tang *et al.*, 1996).

La segunda clase engloba a un gran número de proteínas que presentan una región LRR (repeticiones ricas en leucina) que funcionan como sitios de unión a proteínas, ligando y carbohidratos (Kobe and Kajava, 2001), un dominio NB (sitio de unión a nucleótidos) que está muy conservado y una secuencia LZ (cremallera de leucina) o CC (*coiled-coil*) en la región N-terminal. A esta clase pertenece el gen *Mi-1*, al que me referiré con más detalle posteriormente, responsable de la resistencia a nematodos, áfidos y moscas blancas en tomate (Milligan *et al.* 1998; Rossi *et al.* 1998; Nombela *et al.* 2003).

La tercera clase es similar a la anterior pero en lugar de una secuencia CC, las proteínas que pertenecen a esta clase presentan un dominio con homología a los receptores Toll/Interleukin de *Drosophila* y mamíferos,

respectivamente (TIR-NB-LRR). Un ejemplo es el gen del tomate *Bs4* que codifica una proteína TIR-NB-LRR que ofrece resistencia a *Xanthomonas campestris* (Schornack *et al.* 2004).

La cuarta clase corresponde a proteínas cuya estructura comprende dominios transmembrana con extensiones LRR extracelulares, por ejemplo, los genes *Cf* que confieren resistencia a *Cladosporium fulvum* (revisado en Jones, 1996).

La quinta clase de proteínas R es similar a la anterior en cuanto a que también poseen dominios transmembrana y LRR extracelulares pero, además, incluyen una proteína quinasa. El ejemplo más conocido es la proteína codificada por el gen *Xa21* del arroz que confiere resistencia a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Song *et al.*, 1995).

Por último, la sexta clase incluye aquellas proteínas R que no pueden ser incluidas en ninguna de las otras cinco clases anteriores. Martin *et al.* (2003) hacen una revisión de las proteínas que pueden estar incluidas en esta sexta clase, entre las que destacan las proteínas *Ve*, que confieren resistencia a *Verticillium* en tomate, y son glicoproteínas de superficie celular con señales de endocitosis mediadas por un receptor y secuencia LZ (proteína *Ve1*) o PEST (proteína *Ve2*) (Kawchuk *et al.*, 2001).

Recientemente, van Ooijen *et al.* (2007) realizaron una clasificación de proteínas R pertenecientes a la familia de las solanáceas que se agruparon en 4 clases, todas ellas representadas en el genoma del tomate. En esta clasificación, van Ooijen *et al.* (2007) consideran que las proteínas CNL y TNL pertenecen a clases independientes, como se ha visto en la clasificación de Martin *et al.* (2003) pero incluye en el mismo grupo las proteínas *Cf* y las proteínas *Ve*, tal y como lo describen Dangl and Jones (2001).

3.2. Transducción de la señal: la señalización tras el reconocimiento.

Tras el reconocimiento del organismo colonizador se activan una o más rutas de señalización entre las que se encuentran el cambio en el flujo de iones (Ca^{+2}), la síntesis rápida y transitoria de moléculas como las especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) (Kessler and Baldwin, 2002; Kotchoni and Gachomo, 2006; Bhattarai *et al.*, 2008), la cascada de

activación de proteínas quinasas (generalmente MAP quinasas, MAPK) y la señalización hormonal.

3.2.1. Canales iónicos y calcio (Ca^{+2})

Tras la detección de elicitores se producen cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática debido a la entrada de calcio (Ca^{+2}) y protones, y la salida de potasio y cloruro (revisado en Scheel, 1998). Este flujo de iones provoca la inducción de la explosión oxidativa, activación de genes de defensa y la producción de fitoalexina (Jabs *et al.*, 1997; Pugin *et al.*, 1997). En tomate, el canal de Ca^{+2} se activa en respuesta a la detección de elicitores liberados por patógenos, como es el caso de *Cladosporium fulvum* (Gelli *et al.*, 1997). La participación de Ca^{+2} puede ser detectada por la presencia de calmodulina (Bouché *et al.*, 2005; Chiasson *et al.*, 2005) habiéndose sugerido su implicación en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a nematodos (Bhattacharai *et al.*, 2008). En *Arabidopsis* se detectó un incremento en la expresión de calmodulina durante la alimentación de moscas blancas en el segundo y tercer estado ninfal (N2-N3) (Kempema *et al.*, 2007). Los inhibidores de los canales de Ca^{+2} previenen el aumento de las concentraciones de Ca^{+2} citosólico y retrasan el establecimiento de la respuesta hipersensible (HR) (Scheel, 1998).

3.2.2. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las ROS, en concentraciones moderadas, son empleadas como segundos mensajeros en las cascadas de transducción de la señal defensiva, diferenciación de la pared celular o la activación de MAPK en procesos utilizados por las plantas para adaptarse a diversas clases de estrés (Conrath *et al.*, 2002; Kotchoni and Gachomo, 2006). El estrés abiótico, así como la infección por patógenos, provoca un exceso de ROS que requiere de la activación de defensas adicionales para la regulación de los niveles de estas moléculas y reducir el daño oxidativo sobre lípidos en membranas, proteínas y otros componentes celulares que pueden llegar a provocar la muerte celular (Doke *et al.*, 1996; Foyer and Noctor, 2005; Scandalios, 1997). Uno de los eventos citológicamente observables tras la penetración del patógeno es la producción de H_2O_2 que actúa como una defensa química que provoca daños en los organismos atacantes (Levine *et al.*, 1994; Alvarez *et al.*, 1998; Mellersh *et al.*, 2002). En tomate, se ha observado la acumulación de H_2O_2 en niveles

relativamente altos en respuesta a heridas y diferentes elicitores, entre los que se encuentra la sistemina y el metil jasmonato, sin toxicidad aparente en las plantas (Orozco-Cárdenas and Ryan, 1999). Sin embargo, en la interacción compatible e incompatible tomate-áfidos, no se detectó H_2O_2 hasta 24 horas tras la infestación (Martínez de Ilarduya *et al.*, 2003). Por otro lado, aunque el daño producido por moscas blancas ha sido asociado al daño por patógenos, no se detectó acumulación de H_2O_2 tras una exposición prolongada (21 días) de moscas blancas a *Arabidopsis* a pesar de la inducción de genes implicados en ROS (Kempema *et al.*, 2007).

3.2.3. MAP quinasas (MAPKs)

Las MAPKs juegan un papel muy importante en la respuesta defensiva de las plantas activándose por diferentes estímulos, incluyendo las respuestas defensivas mediadas por genes *R* (Romeis *et al.* 1999; Jin *et al.* 2003; Liu *et al.* 2004; Pedley and Martin 2004). Se ha observado una inducción de la activación de MAPKs en respuesta a diversos tipos de estrés (Xiong and Yang, 2003) y esto se ha asociado directamente a la acumulación de ROS (Moon *et al.*, 2003). Se trata de un proceso de tres pasos en cascada: la activación (fosforilación) de una MAPK por una MAPKK que, a su vez, es activada por una MAPKKK. Estas MAPKs activadas son, generalmente, transportadas al núcleo donde activan componentes de la señalización como factores de transcripción, que regulan directamente la expresión de los genes de respuesta (Khokhlatchev *et al.*, 1998).

En tomate, se ha demostrado la participación de dos MAPKKs (LeMCK1 y LeMCK2) y dos MAPKs (NTF6 y LeMPK3) en la resistencia mediada por *Pto* a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Ekengren *et al.*, 2003). LeMAPK3 también se activa en la respuesta defensiva del tomate contra la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Mayrose *et al.* 2004) y en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* del tomate a áfidos, en la que también participan LeMCK2, LeMPK1 y LeMPK2 (Li *et al.*, 2006).

3.2.4. Señalización hormonal

Las respuestas defensivas de la planta están mediadas por múltiples rutas de señalización (Hammond-Kosack and Parker 2003; Nimchuk *et al.* 2003) en las que están implicadas principalmente tres hormonas vegetales, el

ácido salicílico (SA, *Salicylic Acid*), el ácido jasmónico (JA, *Jasmonic Acid*) y el etileno (ET, *Ethylene*) (Kunkel and Brooks 2002). Estas rutas no funcionan de forma totalmente independiente sino que existe una compleja red de interacciones entre ellas (revisado en Glazebrook, 2001; Pieterse *et al.*, 2001) observándose también la activación simultánea de respuestas defensivas en la planta a estas tres moléculas señaladoras (Schenk *et al.*, 2000; Kunkel and Brooks 2002; Beckers and Spoel 2006; Mur *et al.* 2006). También se ha demostrado la implicación de otras hormonas (citoquininas, giberelinas, auxinas y/o sistemina) en procesos de defensa en la planta (revisado en Bari and Jones, 2009). Los patógenos y los insectos que se alimentan del floema han evolucionado hacia estrategias que les permitan evitar las repuestas defensivas manipulando la red de señalización de la defensa (Abramovitch and Martin, 2004; Walling, 2008).

3.3. Respuesta defensiva.

La detección del patógeno desencadena una batería de cascadas de señalización que activa las repuestas defensivas a nivel local y sistémico. La fusión de factores de transcripción a los receptores NB-LRR podría ser la manera de provocar una reprogramación transcripcional que se traduce en una respuesta defensiva (Thompson and Goggin, 2006; Caplan *et al.*, 2008). Esto puede suponer la sobreexpresión o represión de genes que codifican proteínas defensivas que pueden estar implicadas en el desarrollo de la respuesta hipersensible (HR, *Hypersensitive Response*), ciertas modificaciones de la pared celular, la producción de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran las fitoalexinas, y la generación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR, del inglés, *pathogenesis-related*) como glucanasas y quitinasas.

3.3.1. Respuesta hipersensible (HR).

La resistencia mediada por genes *R* inicia una repuesta defensiva que suele estar caracterizada por una HR, como sucede en la resistencia mediada por *Mi-1* a nematodos en raíces de tomate (Dropkin, 1969). La HR es una muerte celular programada que se produce en el punto de infección o alimentación (Morel and Dangl, 1997) y suele estar asociada a una serie de procesos que incluyen la generación de ROS, cambios en la polaridad de la membrana y en la permeabilidad de ésta a varios iones, reforzamiento de la

pared celular, fosforilación/desfosforilación de proteínas y acumulación de algunas moléculas como el SA y las proteínas PR (Talarczyk and Hennig, 2001). Sin embargo, esta HR no siempre va asociada a la respuesta defensiva, como en algunas interacciones incompatibles planta-patógeno (Jakobek and Lindgren, 1993; Cameron *et al.*, 1994; Jia and Martin, 1999) o en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* del tomate a áfidos (Martínez de Ilarduya *et al.*, 2003), casos en los que no se observó HR.

3.3.2. Modificaciones de la pared celular.

La composición de la pared celular y la deposición de determinados componentes es determinante para la resistencia frente a algunos organismos (Vorwerk *et al.*, 2004), por ejemplo, la deposición de calosa en el punto de infección de determinados patógenos (revisado en Thatcher *et al.*, 2005). Ciertas alteraciones en componentes como la calosa o las pectinas pueden ser importantes en las interacciones planta-insecto (Dreyer and Campbell, 1987; Bi and Felton, 1995; Botha and Matsiliza, 2004). La producción de calosa, lignina y proteínas de pared favorece la formación de nuevos entrecruzamientos con los elementos preexistentes, lo que ocasiona un refuerzo adicional de la pared celular (Hammond-Kosack y Jones, 1996). Por otro lado, enzimas implicadas en el metabolismo de la pared celular, como las peroxidasas, inducidas tras la detección del patógeno, cumplen una función de fortalecimiento y confieren rigidez a la pared con el objetivo de detener el avance del patógeno (Kawano, 2003).

La pared celular del tomate juega un papel activo durante la defensa actuando como fuente de señales polipeptídicas, como la sistemina y los jasmonatos (Narváez-Vásquez *et al.*, 2005). En *Arabidopsis*, las modificaciones de la pared celular mediadas por el gen *XTH33* protegen a la planta frente al ataque de áfidos (Divol *et al.*, 2007). Durante la alimentación de las N2-N3 de moscas blancas sobre *Arabidopsis* se detectaron deposiciones de calosa en las zonas cercanas al punto de alimentación de las ninfas y una inducción en la expresión del gen *CALS1* (Kempema *et al.*, 2007) relacionado, entre otras actividades, con la síntesis de calosa tras la respuesta por herida (Jacobs *et al.*, 2003). Se han propuesto diferentes hipótesis sobre el papel de la calosa en las interacciones planta-patógeno, pero su función en la interacción

Arabidopsis-moscas blancas no ha sido establecido todavía (Kempema *et al.*, 2007).

3.3.3. Metabolismo secundario.

El metabolismo secundario hace referencia a rutas que pueden no ser necesarias para la supervivencia pero proveen recursos adicionales que facilitan la respuesta defensiva. Los mecanismos directos que impiden la alimentación de herbívoros incluyen la síntesis de metabolitos secundarios que influyen en la atracción/disuasión de insectos e inhiben el crecimiento y desarrollo de éstos (revisado en Kessler and Baldwin, 2002 y Kliebenstein, 2004), o la inducción de proteínas que inhiben las enzimas digestivas del insecto y/o disminuyen el valor nutritivo de las plantas (Ryan, 2000; Ussuf *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005). Las defensas indirectas implican la liberación de compuestos volátiles que atraen a parasitoides y depredadores de los herbívoros (revisado en Dicke *et al.*, 2009). En las brassicáceas, los glucosinolatos son metabolitos secundarios necesarios para la defensa innata frente a patógenos y herbívoros (Clay *et al.*, 2009) aunque su papel en la elección del huésped y el desarrollo ninfal de moscas blancas no está claro (Kempema *et al.*, 2007). Las fitoalexinas también han sido descritas como moléculas con actividad antimicrobiana (Glazebrook *et al.*, 1997) así como las proteínas inhibidoras de proteasas y amilasas (Ryan, 1990), las lectinas o tioninas (García-Olmedo *et al.*, 1992) y algunas enzimas involucradas en la síntesis de fenilpropanoides, como la fenilalanina amonio liasa (PAL) o la chalcona sintasa (Bowles, 1990). La fenilalanina es el sustrato para la enzima PAL, que participa en varias rutas metabólicas y es una de las enzimas mejor estudiadas del metabolismo secundario, dirigiendo la formación del SA, así como de otros propanoides importantes para la defensa de la planta.

3.3.4. Proteínas PR.

Las proteínas PR (del inglés, *pathogenesis-related*) son proteínas de defensa con función diferente a las proteínas R codificadas por los genes R. Las proteínas R actúan en la percepción del patógeno o herbívoro y generan la señal para que mediante otros componentes se traduzca esa señal y se genere la cascada de activación de la defensa. Las proteínas PR son componentes directos de la respuesta defensiva en la planta frente al ataque de patógenos, herbívoros, nematodos o insectos. Estas proteínas PR se clasifican en 17

familias (van Loon *et al.*, 2006), algunas de las cuales no están representadas en el tomate. Las familias PR-1, PR-2, PR-4, PR-6, PR-10 y PR-12 han sido descritas en las interacciones compatible e incompatible en tomate a áfidos y/o nematodos (Martínez de Ilarduya *et al.*, 2003 ; Schaff *et al.*, 2007; Bhattarai *et al.*, 2008). Sin embargo, la interacción de moscas blancas con tomate y *Arabidopsis* indujo proteínas de la familia PR-1 y PR-5 (McKenzie *et al.*, 2005; Kempema *et al.*, 2007).

4. El gen *Mi-1*: gen de resistencia a nematodos e insectos.

Existen numerosos genes *R* en diferentes especies vegetales. Recientemente, se ha desarrollado una base de datos bioinformática (PRGdb) a través de la cual se puede encontrar información, por ejemplo, de genes *R* identificados únicamente en tomate obteniendo su secuencia, patógenos contra los que un gen es resistente y referencias más relevantes (Sanseverino *et al.*, 2010). Sin embargo, esta base de datos no es completa, de modo que no se puede obtener el número total de genes *R* clonados hasta el momento. La revisión más reciente sobre genes de resistencia indica que hasta el 2007 se habían clonado 55 genes *R* en diferentes especies vegetales (van Ooijen *et al.*, 2007) de los cuales 40 ya habían sido revisados en 2003 (Martin *et al.*, 2003). *Mi-1* sigue siendo el único gen de resistencia a insectos clonado hasta el momento (revisado en Kaloshian, 2004).

La resistencia a nematodos formadores de nódulos (RKN, *root-knot nematodes*) fue observada por primera vez en una accesión de la especie silvestre de tomate *Lycopersicon peruvianum* (Bailey, 1941). Esta resistencia se introdujo al tomate cultivado utilizando el rescate embrionario de un cruzamiento interespecífico entre *L. peruvianum* y la especie cultivada *L. esculentum* (Smith, 1944). Posteriormente, se determinó que esta resistencia estaba codificada por un solo gen dominante, al que se denominó *Mi*, un acrónimo tomado de las primeras letras del nematodo *Meloidogyne incognita* (Gilbert and McGuire, 1956). El locus *Mi* se localizó en el cromosoma 6 del tomate (Gilbert, 1958) y, a partir de entonces, se realizaron numerosos estudios sobre la variabilidad en la respuesta a *Meloidogyne* spp. (revisado en Roberts and Thomason, 1989). La resistencia *Mi* es efectiva contra *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* pero no contra *M. hapla* (Gilbert and McGuire, 1956; Braham and Winsted, 1957; Roberts and Thomason, 1986).

La clonación de *Mi* se convirtió en uno de los objetivos principales para comprender el funcionamiento de esta resistencia así como su relación con otros genes *R* y permitir la introducción de este gen en otras plantas cultivadas con daños similares a los sufridos en tomate y en las que no se había descrito resistencias. A principios de los 90 se clonó el gen *Aps-1*, estrechamente ligado a *Mi*, que había sido introducido junto a éste en *L. esculentum*, por lo que *Aps-1* comenzó a utilizarse como marcador molecular de la presencia de *Mi* (Aarts *et al.*, 1991; Williamson and Colwell, 1991). Posteriormente se identificó otro marcador, *REX-1*, más ligado a *Mi* de lo que estaba *Aps-1*, lo que permitió su localización en el germoplasma donde la unión entre *Mi* y *Aps-1* se había perdido (Williamson *et al.*, 1994). Más recientemente se han desarrollado un par de cebadores específicos PMiF3/PMiR3 (El Mehrach *et al.*, 2005) para solventar la detección de falsos positivos debidos al marcador *REX-1*.

Estos y otros marcadores han sido muy útiles para el mapeado de *Mi* en el brazo corto del cromosoma 6 (Ho *et al.*, 1992; van Wordragen *et al.*, 1994) localizando *Mi* en una extensión de 650kb de DNA (Messeguer *et al.* 1991; Ho *et al.*, 1992). En esta región del genoma se producía una represión de recombinación en plantas heterocigóticas para *Mi* impidiendo profundizar en su localización (Messeguer *et al.* 1991; Ho *et al.* 1992; Liharska *et al.*, 1996; Ganal and Tanksley, 1996). Finalmente, la combinación de dos estrategias de aproximación (la búsqueda de recombinantes que flanqueasen la región de *Mi* en *L. esculentum* y la segregación de poblaciones de *L. peruvianum*, de donde proviene *Mi*) permitieron localizar a este gen en una región del genoma de menos de 65 kb (Kaloshian *et al.*, 1998).

Esta localización permitió aislar la región del genoma que contenía *Mi* y determinar su secuencia de DNA (Milligan *et al.*, 1998), cuyo análisis reveló la existencia de dos genes homólogos intactos con una identidad del 95% que se denominaron *Mi-1.1* y *Mi-1.2* y que codificaban proteínas con alta similitud a otros genes de resistencia previamente clonados. Ambos genes contienen dos intrones (Figura I5), uno anterior al codón de inicio (ATG) y el segundo intrón posterior a ATG. En *Mi-1.1* el primer intrón contiene 556 pb y el segundo, 75 pb. En *Mi-1.2* el primer intrón cuenta con 1306 pb y el segundo con 75 pb, igual que en *Mi-1.1*.

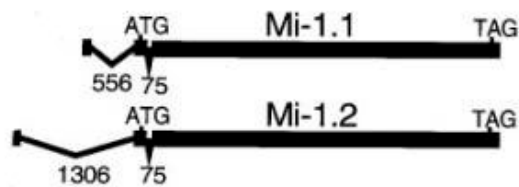


Figura 15. Transcritos de *Mi-1.1* y *Mi-1.2* representados con los exones (líneas horizontales gruesas) e intrones (líneas anguladas). El número de nucleótidos comprendido en cada intrón se indica en la figura. ATG, codón de inicio; TAG, codón de parada. (Adaptado de Milligan *et al.* 1998).

Los estudios de complementación mostraron que la introducción de *Mi-1.2*, pero no de *Mi-1.1*, en plantas susceptibles era suficiente para conferir resistencia a nematodos (Milligan *et al.* 1998).

Previamente al clonaje de *Mi*, se había identificado en tomates portadores del gen cierta resistencia al áfido de la patata *Macrosiphum euphorbiae*, sugiriendo la existencia de un nuevo gen de resistencia, *Meu1*, probablemente localizado en la misma región de 650kb que *Mi*, por lo que este nuevo gen debía estar estrechamente ligado a *Mi* o, incluso, tratarse del mismo gen (Kaloshian *et al.*, 1995). La clonación de *Mi* permitió demostrar que era el gen responsable de la resistencia a áfidos, ya que *Mi-1.2* era el mismo gen que *Meu1* y *Mi* (Rossi *et al.*, 1998) convirtiéndose en el primer gen R responsable de la resistencia a insectos en ser clonado. Unos años después, estudios con moscas blancas sugirieron que *Mi* o algún gen ligado a él, intervenían también en la resistencia a *B. tabaci* (Nombela *et al.*, 2000, 2001). Posteriormente, del mismo modo que para nematodos y áfidos, se emplearon plantas transformadas para ser portadoras de *Mi-1.2*, demostrándose la responsabilidad de este gen en la respuesta resistente a moscas blancas (Nombela *et al.*, 2003).

Mi-1.2 codifica una proteína de la clase CC-NB-LRR (Martin *et al.*, 2003) de 1257 aminoácidos, con una secuencia similar a otras proteínas codificadas por otros genes R (Milligan *et al.*, 1998). El gen clonado con mayor similitud a *Mi-1.2* es *Prf*, un gen del tomate necesario para la resistencia a *Pseudomonas syringae* (Salmeron *et al.* 1996). Ambas proteínas, PRF y MI (así como el resto de proteínas de su misma clase), comparten varios motivos estructurales, incluyendo el sitio de unión a nucleótidos (NBS) y una región de repeticiones ricas en leucina con un carbono terminal (LRR). En la Figura I6 se representa la estructura del gen *Mi-1.2*.

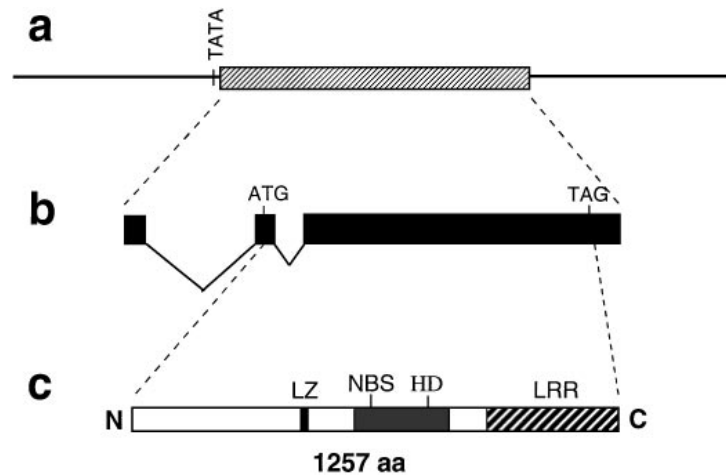


Figura I6. Estructura del gen *Mi-1.2*. (a) Fragmento de 14,7kb que contiene el transcrito primario de *Mi-1.2* (barra) y las secuencias flanqueadoras (líneas finas). (b) Transcrito de *Mi-1.2* con exones (barras horizontales gruesas) e intrones (líneas anguladas). Se indican los codones de inicio (ATG) y parada (TAG). (c) Estructura de la proteína MI. LZ indica la posición de la “cremallera de leucina”; NBS, el sitio de unión a nucleótidos, muy conservado en numerosos genes de resistencia; HD, un dominio hidrofóbico; y LRR, una región de repeticiones ricas en leucina. Las secuencias de DNA y de la proteína que se muestran en la figura están disponibles a través de los números de acceso de GenBank AF039682 y U81378. (Adaptado de Williamson, 1998).

La expresión de *Mi-1.2* se ha detectado en todos los órganos de la planta de tomate, incluso en semillas y frutos inmaduros, siendo esta expresión mayor en raíces y en hojas. Los niveles de los transcritos se mantienen casi constantes a lo largo del desarrollo de la planta, detectándose también en plantas no infestadas (Martínez de Ilarduya and Kaloshian, 2001), como se había observado también para otros genes R (Mes *et al.*, 2000; Ayliffe *et al.*, 1999; Century *et al.*, 1999). La expresión de *Mi-1* prácticamente no se ve alterada tras el ataque de nematodos o áfidos (Martínez de Ilarduya and Kaloshian, 2001). Sin embargo, existe diferencia en la respuesta a estos organismos, puesto que la resistencia a nematodos es evidente desde la germinación de la plántula mientras que, para que la resistencia a áfidos sea efectiva, se requieren plantas de 6-7 semanas de edad. Esta diferencia sugiere una regulación post-transcripcional diferente en raíces y hojas o la participación de otro componente en la ruta de señalización de la resistencia regulado por el desarrollo de forma diferente en ambos órganos.

En relación con esto, se identificó un gen adicional, *Rme1*, necesario en la resistencia mediada por *Mi-1* a nematodos, áfidos y moscas blancas (Martínez de Ilarduya *et al.* 2001, 2004). En la mutación defectiva *rme1* no se

produce un aumento de la susceptibilidad a poblaciones virulentas de nematodos o bacterias patógenas. El gen *Rme1* es específico de la resistencia mediada por *Mi-1* puesto que no está implicado en la resistencia mediada por *I2* o *Pto* (Martínez de Ilarduya *et al.*, 2001, 2004). Además, actúa en los primeros pasos de la cascada de señalización de *Mi-1*, al mismo nivel o justo después del reconocimiento (Martínez de Ilarduya *et al.*, 2004). Pero esta interacción puede ser más compleja. La chaperona Hsp90 es un componente de varios complejos de proteínas R, es necesaria para la función de varias proteínas R del tipo NBS-LRR (Hubert *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2003) y está implicada en la resistencia mediada por *Mi-1* a nematodos y áfidos (Bhattarai *et al.*, 2007). Hsp90 y otras chaperonas están implicadas en el plegamiento de proteínas, degradación de proteínas defectivas y en la regulación de rutas de señalización (Picard, 2002; Pratt and Toft, 2003). Basándose en esta información se creó un modelo para la transducción de la señal de *Mi-1* (Bhattarai *et al.*, 2007) en el que MI-1 formaría un señalosoma con HSP90 y SGT1 que actuaría como guardián de RME1.

La resistencia en tomate mediada por *Mi-1* ha sido empleada con éxito para el control de nematodos. Sin embargo, la resistencia conferida por este gen presenta varias limitaciones tales como la existencia de poblaciones virulentas capaces de romper la resistencia (Kaloshian *et al.*, 1996) y la disminución de la respuesta defensiva por el aumento de la temperatura (Dropkin, 1969; Haroon *et al.*, 1993). La sensibilidad a la temperatura ha sido descrita en otros genes R responsables de la resistencia a nematodos en otros cultivares (Griffin and Hunt, 1972; Jatala and Russell, 1972; Carter, 1982). A pesar de estas limitaciones, el empleo del gen *Mi-1* junto con otros métodos de control continúa siendo de gran importancia en el manejo integrado de plagas y enfermedades.

OBJETIVOS

El objetivo final de este estudio es contribuir a la protección del cultivo del tomate profundizando en el conocimiento de los mecanismos de resistencia de las plantas frente al ataque de la mosca blanca *Bemisia tabaci*. De este objetivo global se pueden desprender objetivos más concretos:

1. Conocer si la resistencia del tomate mediada por el gen *Mi-1* frente a *B. tabaci* se ve influenciada por el grado de desarrollo de la planta. Este objetivo puede desglosarse en dos sub-objetivos:
 - 1.1. Demostrar el efecto que la edad de la planta ejerce sobre esta resistencia.
 - 1.2. Evaluar si las diferencias de tamaño en plantas de la misma edad modifican la eficiencia de dicha resistencia.
2. Determinar la posible implicación de la ruta de señalización del ácido salicílico en las interacciones tomate-*B. tabaci*. Para ello se hace necesario abordar estos sub-objetivos:
 - 2.1. Conocer el posible efecto de la infestación de *B. tabaci* sobre el contenido foliar en ácido salicílico y jasmónico.
 - 2.2. Investigar si esta ruta está implicada en la resistencia basal del tomate a *B. tabaci*.
 - 2.3. Investigar si el ácido salicílico participa en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*.
3. Demostrar la posible implicación del gen *Hsp90* en la resistencia *Mi-1* del tomate a *B. tabaci*. Para alcanzar este objetivo se requiere:
 - 3.1. Constatar que el silenciamiento del gen *Mi-1* produce un aumento de la infestación por *B. tabaci*.
 - 3.2. Evaluar si la resistencia a *B. tabaci* se altera tras silenciar el gen *Hsp90*.
4. Analizar la reprogramación transcripcional global de la planta de tomate en su interacción con *B. tabaci*. Este amplísimo objetivo puede desglosarse en otros más concretos:
 - 4.1. Analizar la expresión génica global del tomate en la resistencia a *B. tabaci* mediada por el gen *Mi-1*.

- 4.1.1. Determinar las diferencias basales (en ausencia de infestación) entre los transcriptomas de plantas de tomate portadoras y carentes del gen *Mi-1*, y comprobar si la infestación por *B. tabaci* modifica esas diferencias basales debidas a la presencia/ausencia de *Mi-1*.
- 4.1.2. Estudiar los cambios en el transcriptoma del tomate en las interacciones compatible e incompatible con *B. tabaci*, considerando separadamente el efecto de las actividades de adultos (fase temprana) y de la primera fase ninfal (fase tardía).
- 4.1.3. Comparar las fases temprana y tardía de la infestación, considerando separadamente las interacciones compatible e incompatible.
- 4.2. Analizar la expresión génica global del tomate en la resistencia a *B. tabaci* inducida por BTH (análogo del ácido salicílico).
 - 4.2.1. Examinar el efecto del tratamiento con BTH sobre la expresión génica de plantas no infestadas de tomate carente del gen y comprobar si las diferencias entre plantas tratadas y no tratadas se modifican tras la infestación con *B. tabaci*.
 - 4.2.2. Estudiar los cambios en el transcriptoma del tomate tratado con BTH que se producen tras la infestación por *B. tabaci*, y comparar esta resistencia inducida con la interacción compatible de las mismas plantas no tratadas con BTH y con la resistencia debida al gen *Mi-1*.

ANTECEDENTES

1. Efecto del desarrollo de la planta en la resistencia vegetal.

Las plantas que presentan cambios en la resistencia frente a organismos invasores suelen presentar una mayor resistencia a medida que la planta avanza en su desarrollo (Panter and Jones, 2002; Ebrahim *et al.*, 2011) tal y como se observó en patata durante la infección con el patógeno *Phytophthora infestans* (Muty and Hossenkhani, 2008). Aunque la posición de la hoja puede ser uno de los factores determinantes en la resistencia a patógenos (Visker *et al.*, 2003), en la resistencia mediada por *Mi-1* a áfidos se observó que dicha posición no era importante pero, en cambio, sí resultaba determinante el desarrollo de la misma en la resistencia frente a estos insectos (Kaloshian *et al.*, 1997). Recientemente, se ha publicado un trabajo en el que se comparó la supervivencia de dos especies de moscas blancas (*Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*) sobre hojas con diferente grado de desarrollo de plantas de tomate susceptibles de la misma edad con resultados diferentes según dicho desarrollo (Zhang and Wang, 2012).

La resistencia mediada por *Mi-1* a nematodos se observa desde las primeras etapas del desarrollo de las plantas portadoras del gen. Sin embargo, la resistencia a áfidos mediada por este gen está regulada por el desarrollo vegetal. Plantas de 5 semanas de edad resultaron ser susceptibles a áfidos mientras que en plantas de 8 semanas de edad se observó resistencia a estos insectos (Kaloshian *et al.*, 1995). Se han observado otras diferencias entre ambos insectos relativas, por ejemplo, a la supervivencia sobre plantas resistentes; mientras los áfidos mueren de inanición sobre plantas que contienen el gen *Mi-1* (Kaloshian *et al.*, 2000), las moscas blancas aunque tienen dificultad para alcanzar el floema de plantas que contienen el gen *Mi-1*, una vez establecen su sitio de alimentación son capaces de alimentarse (Jiang *et al.*, 2001).

La influencia del desarrollo vegetal en la resistencia mediada por genes *R* ha sido también descrita en otras plantas e interacciones, identificándose la resistencia, por ejemplo, del gen *Cf-9B* del tomate a *Cladosporium fulvum* en plantas adultas y no en jóvenes (Panter *et al.*, 2002) así como algunos genes *R* en arroz, que confieren resistencia a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) únicamente en plantas adultas (Zhang and Mew, 1985; Mew, 1987; Goel and Gupta, 1990; Ogawa, 1993; Cao *et al.*, 2007). La influencia del desarrollo de la

planta en la resistencia a patógenos o insectos no siempre va asociada a genes *R*. La resistencia del tomate *Lycopersicon hirsutum* a *Tuta absoluta*, debida a dos compuestos presentes en los tricomas glandulares, incrementa a medida que aumenta la edad de la planta (Leite *et al.*, 2001). En *Arabidopsis*, la resistencia a *Pseudomonas syringae* no sólo aumenta con la edad de la planta sino que además se sugiere la participación del ácido salicílico en este comportamiento (Kus *et al.*, 2002).

Para explicar la relación entre genes *R* y el desarrollo de la planta se realizaron estudios que determinaron el nivel de expresión de estos genes en diferentes momentos del desarrollo de las plantas, relacionando el incremento en el nivel de expresión del gen con un aumento en la resistencia al organismo colonizador, como sucede con el gen *Xa3* del arroz al interactuar con el patógeno *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) (Cao *et al.*, 2007). No obstante, esta relación proporcional entre el nivel de expresión y el nivel de resistencia al organismo invasor no siempre existe, como ocurre, por ejemplo, con el gen *Xa21* del arroz que se expresa tanto en plantas susceptibles como resistentes indicando que la resistencia dependiente del desarrollo de la planta mediada por este gen no está relacionada con su expresión (Century *et al.*, 1999). Algo similar ocurre con el gen *Mi-1* cuya expresión se mantiene constante a lo largo del desarrollo de la planta (Martínez de Ilarduya and Kaloshian, 2001) incluso tras la infestación con nematodos o áfidos (Martínez de Ilarduya and Kaloshian, 2001; Goggin *et al.*, 2004). Una interacción huésped-patógeno muy específica puede requerir tan sólo una pequeña cantidad de proteínas *R*, pudiendo explicar por qué los genes *R* normalmente muestran unos niveles bajos de expresión tanto en plantas no infestadas como en las infestadas (Shen *et al.*, 2002; Paal *et al.*, 2004; Schornack *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005) como sucede con el gen *Mi-1* (Martínez de Ilarduya and Kaloshian, 2001; Goggin *et al.*, 2004). Esto sugiere que, niveles basales de las proteínas *R* sean suficientes para evitar la invasión del patógeno e iniciar la respuesta defensiva.

Sin embargo, debido a que existen ejemplos, como el citado anteriormente en el arroz, en los que la resistencia aumenta al incrementar el nivel de expresión del gen, se ha sugerido que en las interacciones en las que participan genes *R* con expresión constante, fuese necesaria una mayor expresión del gen para aumentar la resistencia al organismo invasor. Por ello,

se transformaron plantas que sobreexpresan este tipo de genes resultando, por ejemplo, en un aumento en el rango de acción del gen *Pto* del tomate (Tang *et al.*, 1999) o un aumento en el nivel de resistencia mediada por los genes *Prf* en tomate y *RPS2* en *Arabidopsis* (Oldroyd and Staskawicz 1998; Tao *et al.* 2000). Pero, en otros casos, la sobreexpresión tuvo un efecto contrario (Xiao *et al.*, 2003; Schornack *et al.*, 2004) o simplemente no ocasionó un aumento de la resistencia (Shirano *et al.*, 2002). Este es el caso del gen *Mi*, cuya sobreexpresión no aumentó la resistencia a áfidos ni provocó que esta resistencia se manifestase en plantas más jóvenes (Goggin *et al.*, 2004). Por todo ello, se ha sugerido que la respuesta defensiva mediada por el gen *Mi* a nematodos e insectos se regula post-transcripcionalmente de forma diferente en raíces y hojas o existe otro componente, regulado por el desarrollo de la planta, con un papel en la resistencia mediada a áfidos pero no a nematodos (Martínez de Ilarduya and Kaloshian, 2001; Goggin *et al.*, 2004). Posteriormente, se determinó que el gen *Rme1* era necesario en la resistencia mediada por *Mi-1* a áfidos y nematodos (Martínez de Ilarduya *et al.*, 2001) y a moscas blancas (Martínez de Ilarduya *et al.*, 2004) aunque no se ha podido establecer si este componente está regulado por el desarrollo de la planta como sucede con el gen *Rcr3* que participa en la resistencia mediada por *Cf-2* a *C. fulvum* (Dixon *et al.*, 2000).

Se puede pensar que, en principio, la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci* puede tener algunos rasgos similares a la resistencia a áfidos. En un estudio realizado con plantas de 8 semanas de edad se observaron diferencias significativas entre plantas con y sin el gen *Mi-1* registrándose un menor desarrollo de *B. tabaci* en plantas resistentes (Nombela *et al.*, 2000). En un trabajo posterior en el que se emplearon plantas de 5 semanas de edad, las plantas que contenían el gen *Mi-1* presentaron una infestación de *B. tabaci* similar al de plantas susceptibles (Pascual *et al.*, 2000). Sin embargo, hasta el momento no se había realizado ningún estudio especialmente diseñado para comparar en los mismos ensayos plantas de diferentes edades o tamaños para demostrar si la actividad del gen *Mi-1* frente a *B. tabaci* se ve afectada, o no, por el grado de desarrollo de la planta.

Para llevar a cabo este estudio se comparó la oviposición de hembras adultas de *B. tabaci* en plantas con y sin el gen *Mi-1* de diferentes edades o tamaños, se analizó la supervivencia de los huevos y la tasa intrínseca de

crecimiento. Otros autores han estudiado ampliamente la biología de moscas blancas en diferentes especies vegetales y a diferentes temperaturas obteniendo información sobre el tiempo de desarrollo de este insecto en cada especie vegetal, la fecundidad, longevidad y otros parámetros sobre su biología así como la temperatura óptima a la que *B. tabaci* se desarrolla (González-Zamora y Gallardo, 1999; Nava-Camberos *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2003; Musa and Ren, 2005; Yang and Chi, 2006; Bonato *et al.*, 2007; Islam and Slunxiang, 2007; Mansaray and Sundufu, 2009; Oriani *et al.*, 2011; Firdaus *et al.*, 2012) pero ninguno de estos trabajos ha empleado plantas resistentes ni plantas susceptibles de diferentes edades o tamaños.

2. Papel del ácido salicílico en la defensa basal y la resistencia mediada por genes de resistencia.

En las respuestas defensivas de la planta intervienen múltiples rutas de señalización entre las que se encuentran la ruta del ácido salicílico (SA, *salicylic acid*) y la ruta del ácido jasmónico (JA, *jasmonic acid*) existiendo una compleja comunicación entre ellas (revisado en Pieterse *et al.*, 2001), así como entre éstas y otras rutas de señalización (revisado en Bari and Jones, 2009). Se han descrito relaciones antagonistas y sinérgicas entre la ruta del SA y la del JA (Schenk *et al.*, 2000; Thaler *et al.*, 2002; Nimchuk *et al.*, 2003; Rojo *et al.*, 2003; Spoel *et al.*, 2003; Bostock, 2005; Beckers and Spoel, 2006; Mur *et al.*, 2006; Zarate *et al.*, 2007; El Oirdi *et al.*, 2011). La relación entre estas rutas de señalización depende de la planta huésped colonizada así como del tipo de interacción, compatible o incompatible, que se establece con el organismo atacante (Thompson and Goggin, 2006).

El ácido salicílico está involucrado en numerosos procesos biológicos como el crecimiento celular, la floración o la termogénesis (Vanacker *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2004). Esta hormona también juega un papel muy importante en la rápida activación de la respuesta defensiva mediada por genes R, la inducción de defensas locales para detener el avance del patógeno y en la resistencia sistémica adquirida (SAR, *Systemic Acquired Resistance*) (revisado en Kunkel and Brooks, 2002; Shah, 2003). Algunos genes *PR*, dependientes de SA (*PR1*, *PR2*, *PR5*), se utilizan como marcadores de SAR. Las moscas blancas inducen la expresión de genes *PR* (Mayer *et al.*, 2002; Sánchez-Hernández *et al.*, 2006; Puthoff *et al.*, 2010). Sin embargo, se han registrado diferencias en la expresión de SA tras la alimentación de moscas blancas en *Arabidopsis* y tomate (Zarate *et al.*, 2007; Puthoff *et al.*, 2010). A partir de estudios realizados en *Arabidopsis* con plantas mutantes en la ruta del SA, se observó que, aunque los transcritos regulados por SA aumentaban tras la alimentación de áfidos y moscas blancas, esta hormona no era esencial en la defensa frente a estos organismos (revisado en Kaloshian and Walling, 2005; Zarate *et al.*, 2007; Kempema *et al.*, 2007). Se han empleado diversos mutantes afectados en esta ruta de señalización para identificar al SA como molécula señalizadora en la resistencia mediada por genes *R* a patógenos en *Arabidopsis* (revisado en Glazebrook, 2001; Rairdan and Delaney, 2002; Hammond-Kosack and Parker 2003, Xiao *et al.*, 2003).

En tabaco y tomate, el papel del SA en procesos de defensa se ha obtenido principalmente mediante el uso de plantas transgénicas que expresan NahG, una enzima bacteriana que degrada el SA convirtiéndolo a catecol (Gaffney *et al.*, 1993). Experimentos con estas plantas transgénicas han demostrado el papel del SA en diversas interacciones, por ejemplo en la defensa basal en tomate a *Botrytis cinerea* (Audenaert *et al.*, 2002) así como a *Pseudomonas syringae* y áfidos (Thaler *et al.*, 2010) y en tabaco a *Oidium neolycopersici* (Achuo *et al.*, 2004). Estas plantas también se utilizaron para determinar la posible implicación del SA en la resistencia mediada por genes *R* en tomate: mientras que la resistencia mediada por los genes *Cf-2* y *Cf-9* a *Cladosporium fulvum* no se ve afectada en las plantas NahG (Brading *et al.*, 2000), en otros estudios con estas plantas se demostró la participación del SA en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a áfidos (Li *et al.*, 2006) ya que los niveles de infestación eran significativamente más altos en las plantas que contenían el gen *Mi-1* y el gen bacteriano NahG (VFNxNahG) que en las plantas también portadoras del gen *Mi-1* pero en las que no se había alterado la ruta del SA (VFN). Un trabajo con nematodos estableció que el SA jugaba un papel importante en la resistencia mediada por *Mi-1* a nematodos (Branch *et al.*, 2004) pero un estudio posterior indicó que el SA no era un componente tan claro de este tipo de resistencia puesto que las plantas que contenían el gen *Mi-1* y degradaban el SA apenas presentaban colonización por los nematodos (Bhattacharai *et al.*, 2008). La aplicación exógena de BTH (análogo del SA) en las plantas VFNxNahG restauró la resistencia a nematodos y áfidos en estas plantas (Branch *et al.*, 2004; Li *et al.* 2006; Bhattacharai *et al.*, 2008) encontrándose un número de individuos similar al registrado en las plantas VFN. Por otro lado, la aplicación exógena de BTH induce resistencia a *B. tabaci* en plantas susceptibles de tomate (Nombela *et al.*, 2005).

El ácido jasmónico (JA) es una hormona derivada del ácido linolénico que juega un importante papel en la regulación de varios procesos del desarrollo y de la defensa de la planta (revisado en Wasternack *et al.*, 2006) junto con otras oxilipinas. En estudios sobre la interacción áfidos-*Arabidopsis*, se observó que, a pesar de que las defensas reguladas por JA no se inducían a niveles altos en respuesta a la alimentación de estos insectos, plantas tratadas con MeJA no eran colonizadas o apenas sufrían colonización, sugiriendo un papel para el JA en la defensa basal a áfidos (Moran and Thompson, 2001; Ellis *et al.*, 2002;

Zhu-Salzman *et al.*, 2004). En tomate, los transcritos de genes de respuesta a herida regulados por JA, *Pin1* y *Pin2*, (Farmer and Ryan, 1992), se acumulan de forma transitoria tras la infestación de áfidos y nematodos, tanto en la interacción compatible como en la interacción incompatible (Martínez de Ilarduya *et al.*, 2003; Bhattarai *et al.*, 2007; Bhattarai *et al.*, 2008). Sin embargo, el JA no participa ni en la defensa basal ni en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a áfidos (Bhattarai *et al.*, 2007) o a nematodos (Bhattarai *et al.*, 2008). La acumulación transitoria del JA también ha sido observada en tomate en respuesta al daño producido por la alimentación del herbívoro *Manduca sexta* (Li *et al.*, 2005) y por herida (Strassner *et al.*, 2002; Suza *et al.*, 2010).

Por otro lado, la infestación con moscas blancas en *Arabidopsis* indujo la expresión de genes regulados por SA mientras que los genes dependientes de JA se reprimían o no variaban su expresión (Zarate *et al.*, 2007). En ese trabajo observaron que el desarrollo ninfal de moscas blancas en plantas susceptibles de *Arabidopsis* sufría un retraso en plantas modificadas para producir altos niveles de JA (mutantes *cev1*), sugiriendo que son las defensas dependientes de JA, y no de SA, las responsables de este fenómeno. Posteriormente, en plantas de tomate susceptibles se observó que la mayoría de PRs acumuladas tras la alimentación de moscas blancas fueron también reguladas por JA y sólo unas pocas se regulaban por SA (Puthoff *et al.*, 2010), contrastando con los resultados obtenidos en *Arabidopsis* (Zarate *et al.*, 2007). Aunque la alimentación de moscas blancas en tomate indujo la expresión de PRs dependientes de la ruta del JA, no se detectó la expresión de los genes *Pin1* y *Pin2* (Puthoff *et al.*, 2010), sugiriendo que el estilete de las moscas blancas no es detectado en la planta como un estrés mecánico que active las respuestas defensivas dependientes de JA (Walling, 2008) lo que contrasta con las respuestas desencadenadas tras el ataque de herbívoros masticadores (Pautot *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2002; Ament *et al.*, 2004). Esta diferencia con respecto a áfidos (Martínez de Ilarduya *et al.*, 2003) podría radicar en el comportamiento alimenticio de ambos insectos (Walling, 2008), o bien que el aumento en los niveles de SA que se producen tras la alimentación de moscas blancas provoca una interacción antagonista entre las defensas reguladas por SA y las de JA, como la descrita en *Arabidopsis* (Zarate *et al.*, 2007).

A la vista de los resultados obtenidos en los estudios realizados con moscas blancas sobre la defensa basal en *Arabidopsis* y sobre la resistencia mediada por *Mi-1* a áfidos en tomate se planteó si la ruta de señalización del SA podía estar también implicada en la defensa basal en tomate y/o en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a moscas blancas, lo que permitiría establecer otro elemento común en la resistencia en tomate a ambos insectos.

3. Implicación del gen *Hsp90* en la resistencia vegetal.

HSP90 es una proteína que participa en diversos procesos (Picard, 2002; Wegele *et al.*, 2004). La chaperona HSP90 es responsable de la activación de un gran número de proteínas formando parte de complejos junto a co-chaperonas específicas que regulan su unión produciendo cambios conformacionales (ampliado en Prodromou, 2012). Las proteínas activadas por HSP90 normalmente están relacionadas con la transducción de señales. Además, esta chaperona es vital para la reprogramación transcripcional puesto que los factores de transcripción dependen de su actividad (Bali *et al.*, 2003; Floer *et al.*, 2008). Los patógenos pueden emplear las chaperonas de la planta para potenciar su virulencia (ampliado en Neckers and Tatu, 2008).

Se sabe que la proteína HSP90 participa de forma temprana en las rutas de señalización de genes de resistencia. Su papel fue establecido mediante el uso de VIGS (Silenciamiento Génico Inducido por Virus) en la resistencia en *N. benthamiana* mediada por el gen *N* a TMV (Lu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004) y por el gen *Rx* a PVX (Lu *et al.*, 2003; Botër *et al.*, 2007) así como su implicación en la inducción de HR provocada por patógenos (Kanzaki *et al.*, 2003). También se ha descrito interacción entre HSP90 y la proteína I-2 del tomate (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005).

En *Arabidopsis*, se han descrito 7 isoformas de HSP90 entre las que se ha localizado una isoforma cloroplástica, otra mitocondrial, otra localizada en el retículo endoplásmico y cuatro isoformas citosólicas (Krishna and Gloor, 2001). De las cuatro isoformas citosólicas, AtHSP90.1 es necesaria para la resistencia mediada por *RPS2* frente a *P. syringae* expresando el gen de avirulencia *AvrRpt2* (Takahashi *et al.*, 2003) mientras la isoforma AtHSP90.2 está implicada en la resistencia de *RPM1* a *P. syringae* expresando *AvrRPM1* (Hubert *et al.*, 2003). En trigo, el silenciamiento del gen *Hsp90.1* provocó una inhibición del desarrollo mientras el silenciamiento de los genes *Hsp90.2* y *Hsp90.3* afectó la respuesta hipersensible (HR) a patógenos (Wang *et al.*, 2011). Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en trigo y cebada, en los que el silenciamiento por VIGS alteró la HR en la interacción con hongos patógenos (Hein *et al.*, 2005; Scofield *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007). En *Arabidopsis*, *AtHsp90.1* se induce por estrés mientras las otras 3 isoformas citosólicas (entre las que se encuentra *AtHsp90.2*) se expresan

constitutivamente (Takahashi *et al.*, 2003). Sin embargo, en tomate, durante la interacción incompatible tomate-áfidos, la expresión de *SlHsp90.1* no se vio alterada tras el ataque de estos insectos durante las 48 horas posteriores a la infestación (Bhattarai *et al.*, 2007), tal y como sucede con el gen *Mi-1* cuya expresión permanece constante a lo largo del desarrollo de la planta y tras el ataque de nematodos y áfidos (Martínez de Ilarduya and Kaloshian, 2001; Goggin *et al.*, 2004). Tras la infestación con moscas blancas portadoras del TYLCV (*Tomato Yellow Leaf Curl Virus*) en plantas de tomate susceptibles y resistentes al virus se observó la reducción en los niveles de la proteína HSP90 (Gorovits *et al.*, 2007). Aunque se ha generado una proteína policlonal para *Mi-1* (van Ooijen *et al.*, 2008) no se han realizado estudios con nematodos o insectos similares al de Gorovits *et al.* (2007) que permitan conocer si los niveles de proteína *Mi-1* también disminuyen (o no) tras el ataque de éstos. A partir de los resultados obtenidos en estudios sobre la funcionalidad de la proteína HSP90 en la resistencia mediada por genes *R*, se han descrito modelos de activación en los que interviene esta proteína (revisado en Shirasu and Schulze-Lefert, 2003 y Sangster and Queitsch, 2005; Bhattarai *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010) interactuando, por ejemplo, con la co-chaperona Hop/Sti (Zhang *et al.*, 2003) que es un complejo que regula la maduración de hormonas esteroides en animales (Pratt and Toft, 2003). Este uno de los ejemplos de complejos descritos en animales y plantas que sugieren una convergencia evolutiva (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005; Mayor *et al.*, 2007).

La implicación de *Hsp90* en la resistencia a áfidos y nematodos, mediada por el gen *Mi-1* del tomate, también ha quedado demostrada mediante la aplicación de la técnica VIGS (Bhattarai *et al.*, 2007) sugiriendo que la hipótesis del guardián (van der Biezen and Jones, 1998) podía explicar este mecanismo de resistencia. En el modelo propuesto por Bhattarai *et al.* (2007) también estaría representado el gen *Rme1* (Martínez de Ilarduya *et al.*, 2001, 2004) como el gen diana para las proteínas Avr de nematodos e insectos que modificarían RME1 permitiendo la unión de HSP90 y SGT1 a la proteína *Mi-1*, para formar un señalosoma que activaría la ruta de señalización y la defensa en la planta. Sin embargo, hasta ahora se desconocía si la resistencia mediada por *Mi-1* a moscas blancas requiere de la interacción con *Hsp90*, compartiendo modelo con áfidos y nematodos o si, por el contrario, dicha resistencia es

independiente de la proteína HSP90. Teniendo en cuenta los antecedentes al respecto, el silenciamiento del gen *Hsp90* mediante VIGS suponía el mejor método a aplicar para alcanzar ese objetivo, por su rapidez, eficacia y fiabilidad.

El término Silenciamiento Génico Inducido por Virus (VIGS, *Virus-Induced Gene Silencing*) se empleó, en un principio, para describir el fenómeno por el cual una planta se recuperaba tras una infección viral (Lindbo *et al.*, 1993; van Kammen, 1997). No obstante, el término se ha utilizado desde entonces para denominar la técnica por la que se inducen mecanismos de defensa en la planta que suprimen (silencian) la expresión del gen endógeno y del virus a través del silenciamiento génico post-transcripcional (Baulcombe, 1999; Ruiz *et al.*, 1998). Esta técnica es eficiente para el silenciamiento de transcritos endógenos en plantas dependiendo, por tanto, de la actividad endógena del mecanismo de silenciamiento del RNA de la célula huésped. Los vectores virales recombinantes, que desencadenan este mecanismo, pueden ser modificados para albergar cualquier transcrito huésped de interés (Baulcombe, 1999; Dinesh-Kumar *et al.*, 2003). Esta técnica presenta varias ventajas sobre otros métodos de estudio de la expresión génica; es rápida, no requiere la creación de transformantes estables, silencia copias redundantes de los genes a silenciar (siendo muy útil en plantas poliploides o en aquellas donde no está secuenciado el genoma) y permite silenciar un gen o varios miembros de una familia multigénica (revisado en Burch-Smith *et al.*, 2004).

Se han modificado diferentes virus de RNA y DNA para ser utilizados como vectores en VIGS (revisado en Burch-Smith *et al.*, 2004 y Huang *et al.*, 2012). Debido a limitaciones en algunos de los vectores, se desarrolló un vector basado en el *tobacco rattle virus* (TRV) (Ratcliff *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002a). Este vector demostró una mayor eficacia en el silenciamiento, incluyendo en tomate (Liu *et al.*, 2002a,b; Ekengren *et al.*, 2003), ya que se puede utilizar en un mayor número de especies, posee una invasión celular uniforme y los síntomas son relativamente moderados. Este vector es un virus bipartito de RNA de sentido positivo (revisado en McFarlane, 1999); TRV-RNA1 contiene la parte vírica replicativa, una proteína de movimiento y una proteína rica en cisteína. TRV-RNA2 contiene la cubierta proteica y dos proteínas no estructurales (Figura C3.1).

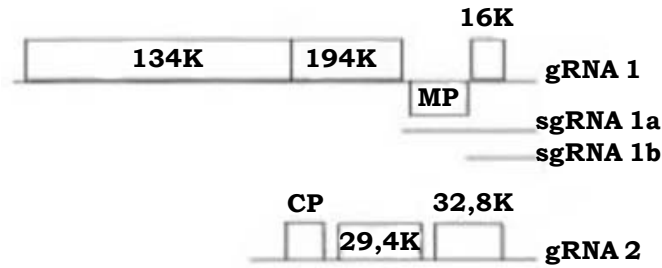


Figura C3.1. Organización genómica del vector TRV. Los fragmentos ORF (*Open Reading Frame*) de la parte TRV-RNA1 corresponden a las proteínas replicativas (134 y 194kDa), la proteína de movimiento (MP) y la proteína rica en cisteína (16kDa). Los fragmentos ORF de la parte TRV-RNA2 corresponden a la cubierta proteica (CP) y las proteínas no estructurales (29,4 y 32,8kDa). gRNA, RNA genómico; sgRNA, RNA subgenómico. (Adaptado de Liu *et al.*, 2002a).

La parte TRV-RNA1 puede replicarse y moverse sistémicamente sin la parte TRV-RNA2, que es la parte que se ha modificado para el silenciamiento por VIGS. Esta modificación consiste en la sustitución de los elementos no estructurales por un sitio de clonación múltiple (MCS, del inglés, *Multiple Cloning Site*), útil para la clonación de los fragmentos del gen diana a silenciar (Figura C3.2) (Liu *et al.*, 2002a). En ese trabajo se puede encontrar una amplia descripción del desarrollo del vector TRV para VIGS.

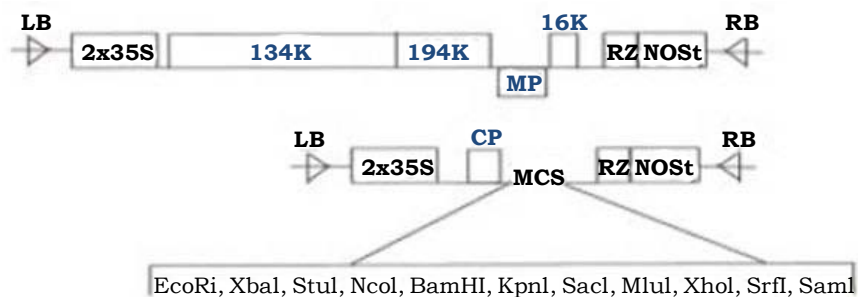


Figura C3.2. Vector TRV para VIGS. Los clones de cDNA de TRV se colocaron entre el promotor duplicado CaMV 35S (2x35S) y la señal de finalización de la transcripción, la Nopalina sintasa (*Nopaline synthase terminator*, NOST), en un vector T-DNA. LB y RB hacen referencia a los límites, a derecha e izquierda, del T-DNA; Rz, corresponde a una riboenzima restricción; MCS, sitio de clonación múltiple. (Adaptado de Liu *et al.*, 2002a).

Posteriormente, se introdujo una modificación en el sistema de clonación para facilitar y realizar más rápidamente esta tarea en tomate, basándose en el sistema GATEWAY (Liu *et al.*, 2002b). Una de las ventajas de VIGS basado en el vector TRV, es que su introducción en las plantas se realiza fácilmente mediante el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* (Ratcliff *et al.*, 2001; Liu *et*

al., 2002a). La introducción de *A. tumefaciens* se puede llevar a cabo por diferentes técnicas que incluye la infiltración mediante jeringa sin aguja, inoculación directa de colonias bacterianas o infiltración al vacío (revisado en Burch-Smith *et al.*, 2004; Hileman *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006).

El silenciamiento génico inducido por virus ha sido utilizado en numerosas plantas solanáceas, *Nicotiana benthamiana* (Ratcliff *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002a; Lu *et al.*, 2003), tomate (Liu *et al.*, 2002b; Ekengren *et al.*, 2003; Bhattarai *et al.*, 2007, 2010; Mantelin *et al.*, 2009, 2011), pimiento (Chung *et al.*, 2004), patata (Brigneti *et al.*, 2004), algunas ornamentales (Chen *et al.*, 2004; Hileman *et al.*, 2005; Reid *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2011), brasicáceas entre las que se incluye la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Burch-Smith *et al.*, 2006; Pflieger *et al.*, 2008) y otras plantas como el trigo, maíz y arroz (Holzberg *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2006; Scofield *et al.*, 2005; Tai *et al.*, 2005). Esta técnica ha sido empleada para analizar el fenotipo de genes en diferentes órganos vegetales incluyendo procesos de floración (Liu *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 2004) y en fruto (Fu *et al.*, 2005; Orzáez *et al.*, 2006).

La inserción de un fragmento del gen *fitoeno desaturasa* (*PDS*), responsable de la biosíntesis de carotenoides, en el vector TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) e inoculado en *Nicotiana benthamiana* provocó un fenotipo de fotoblanqueo en las hojas que se correlacionó con una reducción en los niveles de expresión del gen (Kumagai *et al.*, 1995). Posteriormente, se utilizó otro vector, PVX (*Potato X Virus*), para silenciar el gen *PDS* obteniendo un resultado similar (Ruiz *et al.*, 1998). Este gen se utiliza comúnmente como marcador del silenciamiento en *N. benthamiana* y en tomate (Liu *et al.*, 2002a,b). En *Arabidopsis*, se suele emplear un gen implicado en la biosíntesis de clorofila, *CH42* (Turnage *et al.*, 2002, Burch-Smith *et al.*, 2006). La eficiencia del silenciamiento en tomate, medida en función del fotoblanqueo producido por la supresión del gen *PDS*, es menor a la obtenida en *N. benthamiana* (Liu *et al.*, 2002a,b), observándose el fenotipo de fotoblanqueo en la parte superior de la planta de tomate mientras que en *N. benthamiana* el fotoblanqueo se observa en toda la planta.

Esta técnica ha supuesto un gran adelanto para el estudio de genes, relacionados con el desarrollo vegetal, cuya pérdida de función puede ser letal en plantas (revisado en Robertson, 2004; Purkayastha *et al.*, 2009 y Becker

and Lange, 2010). También se ha investigado el papel de rutas metabólicas y funciones celulares como el de la *Celulosa sintasa* (Burton *et al.*, 2000; Held *et al.*, 2008). De igual modo, ha sido empleada para el estudio de la resistencia vegetal frente a insectos, patógenos y estrés abiótico. El uso de VIGS permitió demostrar la implicación de genes del tabaco *Rar1*, *EDS1* y *NPR1/NIM1* en la resistencia mediada por el gen *N* al virus del mosaico del tabaco (TMV) (Liu *et al.*, 2002a) así como de MEK1, MAPKK, NTF6, MAPK, factores de transcripción WRKY/MYB, COI1 y CTR1 (Jin *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004) y la participación de la proteína NRG1 (Peart *et al.*, 2005). Gracias a esta técnica se han podido caracterizar en tomate genes implicados en la resistencia a *Cladosporium fulvum* (Gabriels *et al.*, 2006) y en la respuesta defensiva mediada por el gen *Pto* a *P. syringae* (Ekengren *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2010). Silenciando genes relacionados con la ruta del JA se pudo confirmar su papel en la activación de defensas a *Manduca sexta* (Kang *et al.*, 2006; Lou and Baldwin, 2006) así como demostrar que la MAPKK1, MEK2 y BAK1 están implicadas en la respuesta inducida a este herbívoro regulando la biosíntesis de JA (Heinrich *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2010). Esta técnica permitió la identificación de las MAPK1, MAPK2 y MAPK3 como necesarias en la respuesta defensiva mediada por sistemina frente al ataque de insectos herbívoros (Kandoth *et al.*, 2007).

En la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a nematodos y áfidos también ha sido empleado el silenciamiento génico inducido por virus para determinar el papel de otros genes, además de *Hsp90*. En áfidos, se demostró la participación de la MAPKK2, MAPK2 y MAPK3 (Li *et al.*, 2006) y el receptor quinasa SERK1 (Mantelin *et al.*, 2011) en la respuesta a estos insectos. Posteriormente, mediante esta técnica se pudo determinar el papel del factor de transcripción WRKY72 en la resistencia basal a áfidos, nematodos y *P. syringae* así como su papel en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a áfidos y nematodos pero no en la resistencia mediada por *Pto* a *P. syringae* (Bhattarai *et al.*, 2010). Por todos estos trabajos, el empleo del Silenciamiento Génico Inducido por Virus en el estudio que se presenta en esta Tesis está basado no sólo en las posibilidades que ofrece la técnica en tomate sino también en los resultados previos obtenidos por otros autores en relación al papel de otros genes en la resistencia mediada por el gen de *Mi-1* a nematodos y áfidos.

4. Reprogramación transcripcional de plantas en interacciones compatibles e incompatibles con organismos nocivos.

Comúnmente se han realizado análisis globales de la expresión génica a partir de análisis de microarrays que permiten la detección de cambios en la expresión simultánea de miles de genes (revisado en Aharoni and Vorst, 2001). En un principio se empleaban únicamente microarrays de expresión de cDNA (también conocidos como de “dos colores”), posteriormente comenzaron a utilizarse también los microarrays de oligonucleótidos, especialmente los desarrollados por la compañía Affymetrix. Este último tipo de microarray presenta una serie de ventajas, frente a los arrays de cDNA, puesto que las sondas se sintetizan directamente sobre el chip, en vez de sintetizarlas in vitro y adherirlas después, y cada gen está representado por un grupo de sondas cortas en lugar de por una única sonda.

La necesidad de interpretar estos macro-resultados ha fomentado, especialmente en los últimos años, la creación de programas bioinformáticos que permitan el análisis fiable de los datos (revisado en Khatri and Draghici, 2005; Dopazo, 2006; Huang *et al.*, 2009). Hasta principios del 2000 no empezaron a ser utilizados de forma generalizada test estadísticos junto con los métodos de ajuste del p-valor (Benjamini and Yekutieli, 2001; Storey and Tibshirani, 2003). La anotación funcional más extendida es la que contiene, entre otros términos, los términos GO (*Gene Ontology*) que proporcionan un significado funcional a los datos previamente seleccionados por su expresión diferencial (Dopazo, 2006). Para el análisis y obtención de los términos GO más abundantes de una lista seleccionada de genes existen numerosos programas (Khatri and Draghici, 2005; Huang *et al.*, 2009). Han ido apareciendo nuevos programas que integran diferentes herramientas permitiendo un análisis funcional más sencillo, por ejemplo, la plataforma Babelomics (Al-Shahrour *et al.*, 2006; Al-Shahrour *et al.*, 2007; Medina *et al.*, 2010). Otros programas como Mapman han desarrollado su propia anotación funcional, BIN, (Thimm *et al.*, 2004) que han ido adaptando a diferentes especies entre las que se encuentran las solanáceas (Urbanczyk-Wochniak *et al.*, 2006; Rotter *et al.*, 2007). Algunos programas se han diseñado específicamente para la interpretación de datos procedentes de una planta, como es el caso del tomate, que cuenta con una base de datos web, TED (*Tomato Expression Database*), que proporciona no sólo herramientas para el

estudio funcional de los datos, sino que además, almacena la información de estudios de microarrays realizados en esta planta (Fei *et al.*, 2006).

El desarrollo de esta tecnología para el análisis de perfiles de expresión, junto con la disponibilidad de bases de datos de secuencia genómica y EST (*expressed sequence tag*) de numerosas plantas, han permitido, entre otros trabajos, el estudio de la reprogramación transcripcional provocada por la alimentación de insectos (revisado en Korth, 2003; Thompson and Goggin, 2006). Las plantas responden a los insectos herbívoros produciendo cambios bioquímicos y fisiológicos que se asocian con cambios en la expresión génica. Uno de los primeros trabajos realizados en esta área, fue la comparación de las respuestas de la alimentación de insectos y el daño por herida en *Arabidopsis* mediante el uso de arrays de cDNA, encontrándose numerosos genes inducidos en ambos tipos de estrés (Reymond *et al.*, 2000). En *Nicotiana attenuate*, tras el ataque del herbívoro *Manduca sexta*, se observó mediante microarrays de cDNA la inducción de varios genes implicados en la síntesis de terpenoides mientras se reprimían genes relacionados con procesos fotosintéticos (Hui *et al.*, 2003). Mediante esta técnica, se pudo confirmar que los elicitores presentes en el regurgitado del herbívoro inducían una respuesta similar a la propia alimentación del insecto (Halitschke *et al.*, 2003).

La técnica de microarrays, tanto de cDNA como de oligonucleótidos, también ha permitido conocer la implicación de rutas de señalización, como el SA, JA y ET, en la respuesta defensiva así como la compleja red de comunicación entre estas rutas (Schenk *et al.*, 2000; Heidel and Baldwin, 2004; Kempema *et al.*, 2007). Los cambios de expresión en tomate durante la interacción compatible con el patógeno *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, obtenidos mediante los microarrays de Affymetrix, demostraron el papel del ET en el desarrollo de la enfermedad (Balaji *et al.*, 2008). El efecto de la toxina liberada por el hongo *Fusicoccum amygdali* en tomate parece ser antagónico en la respuesta a herida y a patógeno puesto que se inducen proteínas PR y se reprime la expresión de genes asociados a herida, tal y como se observó en el análisis de microarrays de cDNA (Frick and Schaller, 2002). También se estudiaron los cambios de expresión mediante ambos tipos de microarrays en *Arabidopsis* (Puthoff *et al.*, 2003; Fuller *et al.*, 2007; Barcala *et al.*, 2010) y tomate (Bar-Or *et al.*, 2005; Bhattarai *et al.*, 2008; Portillo *et al.*, 2009) durante la interacción compatible con nematodos mediante microarrays

y confirmados posteriormente con PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). La mayoría de estos trabajos analizaron los cambios de expresión únicamente en la parte de las raíces que contenían los nódulos con los nematodos mientras que Puthoff *et al.* (2003) emplearon la raíz entera de plantas de *Arabidopsis* de 15 días de edad tras la germinación. Aunque en ambas interacciones se encontraron sobreexpresados genes relacionados con estrés biótico, existen algunas diferencias que pueden ser debidas a distintos factores, por ejemplo, la respuesta de cada planta a estos nematodos (revisado en Escobar *et al.*, 2011).

Las rutas de señalización implicadas en las interacciones planta-áfido han sido estudiadas también mediante análisis comparativos de transcriptoma (de Vos *et al.*, 2007; Kusnierczyk *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Estos estudios sugieren que la alimentación de áfidos provoca cambios en la expresión de enzimas implicadas en la síntesis de metabolitos secundarios, como se ha demostrado en arroz mediante arrays de cDNA (Zhang *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2005). En la mayoría de los estudios realizados con insectos picadores-succionadores en *Arabidopsis*, *Nicotiana attenuata*, ciertas gramíneas y tomate, se han empleado áfidos (revisado en Kaloshian and Walling, 2005 y Thompson and Goggin, 2006) observándose que los cambios inducidos por la alimentación de estos insectos son diferentes a los observados en insectos masticadores pero similares a los provocados por patógenos bacterianos y fúngicos. Por otro lado, existen ciertas similitudes entre las interacciones planta-herbívoro y las interacciones planta-patógeno, como la supresión de procesos fotosintéticos y del metabolismo general, la inducción de ROS, la activación de rutas de señalización independientes de SA, JA y ET y la inducción de genes implicados en el metabolismo secundario (revisado en Kaloshian and Walling, 2005).

El hecho de que las moscas blancas posean el mismo tipo de aparato bucal picador-succionador que los áfidos, indujo a pensar, en un principio, que los cambios provocados por la alimentación de áfidos deberían ser los mismos o muy similares a los inducidos tras la alimentación de moscas blancas. Sin embargo, el estudio de microarrays de Affymetrix en *Arabidopsis* durante la alimentación de ninfas de moscas blancas mostró diferencias cualitativas y cuantitativas con respecto a los resultados obtenidos, no sólo con herbívoros masticadores, sino también con áfidos (Kempema *et al.*, 2007).

Aunque la alimentación de áfidos y moscas blancas en *Arabidopsis* produce la activación de la ruta del SA, sólo en áfidos se ve incrementada la respuesta dependiente de JA (Moran *et al.*, 2002) mientras decrece en la interacción con moscas blancas (Kempema *et al.*, 2007). En este mismo estudio, no se detectaron genes relacionados con la HR o ROS durante la alimentación de moscas blancas pero sí fueron inducidos genes implicados en la deposición de calosa en la pared celular (Kempema *et al.*, 2007). En tomate cherry susceptible, a los 25 días de la infestación con el biotipo B de *B. tabaci*, se obtuvieron mediante arrays de cDNA más de 200 genes diferencialmente expresados en distintos órganos de la planta (McKenzie *et al.*, 2005) entre los que se encontraban sobreexpresados genes codificadores de β -1,3-glucanasas y peroxidasas. El contenido en ambas proteínas también se incrementaba en plantas susceptibles y resistentes al TYLCV, tras la alimentación de moscas blancas, unida a una disminución en los niveles de MAPK, chaperonas y algunas proteínas PR (Gorovits *et al.*, 2007), que corresponden a patrones conocidos de estrés. Recientemente se han analizado, mediante hibridación sustractiva por supresión (SSH) acoplada al análisis de microarray, los cambios de expresión desencadenados por la alimentación de moscas blancas a lo largo de su desarrollo, aunque únicamente sobre plantas de la variedad de tomate susceptible Río Fuego que presentaban de 2 a 3 hojas completamente desarrolladas (Estrada-Hernández *et al.*, 2009) obteniendo un mayor número de genes diferencialmente expresados durante la alimentación del segundo y tercer estado ninfal que durante la alimentación de adultos y oviposición de las hembras.

4.1. Análisis de microarrays para conocer la resistencia mediada por genes R.

Los análisis de microarray de Affymetrix realizados para comparar la respuesta en la resistencia mediada por genes R de la interacción incompatible frente a la respuesta de la interacción compatible, mostraron que los genes de defensa en *Arabidopsis* se activan a niveles más elevados y más rápidamente en las interacciones incompatibles que en las compatibles (Tao *et al.*, 2003). Estudios de la resistencia a áfidos en trigo, mediante hibridación sustractiva por supresión (SSH) acoplada al análisis de microarray, demostraron la activación de la ruta de estrés oxidativo, como sucede en las respuestas resistentes mediadas por genes R inducidos por patógenos (Boyko *et al.*,

2006). En arroz, la alimentación de áfidos analizada mediante arrays de cDNA sugiere una activación de respuestas diferentes a las provocadas por la alimentación de herbívoros masticadores (Zhang *et al.*, 2004). La resistencia a nematodos formadores de nódulos mediada por el gen *Mi-1* también ha sido analizada mediante microarrays de cDNA (Schaff *et al.*, 2007; Bhattarai *et al.*, 2008). A las 24 horas de la inoculación con los nematodos (Bhattarai *et al.*, 2008) se observó que las rutas de defensa reguladas por SA, JA y ET se activan en la interacción compatible e incompatible del tomate con los nematodos, aunque es en esta última en la que se inducen en mayor medida, además de ser en esta respuesta mediada por *Mi-1* en la que se inducen un mayor número de genes.

A pesar de todos los antecedentes referidos que han utilizado los microarrays para estudiar el transcriptoma vegetal durante distintas interacciones planta-parásito, hasta ahora no se había empleado esta tecnología de alto rendimiento para analizar la resistencia del tomate frente a las moscas blancas. Por ello y con el fin de profundizar en el conocimiento de las diversas respuestas que se desencadenan en tomate tras la infestación de *B. tabaci*, en esta tesis se diseñó un estudio con plantas susceptibles (*-Mi-1*) y plantas resistentes (*+Mi-1*) para comparar los cambios de expresión en las interacciones susceptible y resistente durante los primeros días de la infestación. Posteriormente también se empleó el análisis por microarrays para estudiar la reprogramación transcripcional del tomate en la resistencia a *B. tabaci* inducida por factores abióticos, en concreto BTH, en plantas susceptibles (carentes del gen *Mi-1*).

4.2. Resistencia inducida por BTH.

Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH) es un análogo del ácido salicílico (SA) que activa la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Görlach *et al.*, 1996; Friedrich *et al.*, 1996; Lawton *et al.*, 1996). La aplicación de BTH en tabaco confiere resistencia a *Oidium neolycopersici* pero no a *Botrytis cinerea* mientras que la aplicación en tomate induce resistencia a *B. cinerea* pero no a *O. neolycopersici* (Achuo *et al.*, 2004). La inducción de defensas a *Oidium* spp. tras el tratamiento con BTH ha sido observada en otras plantas, incluyendo solanáceas como la patata (Bokshi *et al.*, 2003). Se ha sugerido que la resistencia inducida por BTH en tabaco a *O. neolycopersici* implique modificaciones estructurales (Stadnik and Buchenauer, 1999, 2000)

que en tomate no sean suficientes para impedir o reducir la colonización del patógeno (Achuo *et al.*, 2004). Sin embargo, la aplicación de BTH en plantas de tomate susceptibles ocasionó un retraso en el desarrollo de los áfidos *Myzus persicae* (Boughton *et al.*, 2006) y *Macrosiphum euphorbiae* (Cooper *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006). Aunque el tratamiento con BTH afectó también negativamente el desarrollo de áfidos en plantas de tomate resistentes, este efecto no fue significativo (Cooper *et al.*, 2004). La aplicación exógena de BTH a las plantas de tomate redujo los niveles de infestación por *B. tabaci* y provocó un retraso en el desarrollo de esta mosca blanca que, además, mostró una preferencia por plantas no tratadas frente a plantas tratadas con BTH (Nombela *et al.*, 2005). Esta preferencia había sido observada previamente en tomate y algodón (Inbar *et al.*, 1998, 2001) pero con diferencias no significativas (por lo que no se había considerado relevante) debido al empleo de concentraciones de BTH demasiado bajas y por transcurrir demasiado tiempo entre el tratamiento y las infestaciones.

Hasta el momento se han realizado pocos estudios de microarrays en los que hayan analizado el efecto del tratamiento con BTH (Maleck *et al.*, 2000; Heidel and Baldwin, 2004; Wang *et al.*, 2006; Shimono *et al.*, 2007). Entre ellos, los dos primeros se han interesado, además, en comparar mediante microarrays de cDNA la reprogramación transcripcional provocada por el efecto del BTH con la observada en la respuesta a insectos, aunque ninguno de ellos ha sido en tomate ni con moscas blancas. El primer trabajo, realizado en *Arabidopsis* (Maleck *et al.*, 2000), estudió los cambios en la expresión génica bajo diferentes condiciones de inducción o represión de la resistencia sistémica adquirida, entre los que se encontraba el tratamiento con BTH, pero tuvo en cuenta únicamente aquellos genes que se regulaban diferencialmente en al menos dos de esos tratamientos, por lo que no se pudo obtener información sobre el efecto que el BTH podía provocar, de forma individual, en estas plantas. El tratamiento con BTH en *Nicotiana attenuata* (Heidel and Baldwin, 2004) provocó una respuesta similar a la de una infestación con áfidos en plantas del mismo genotipo pero no tratadas con BTH, observándose en ambos casos, por ejemplo, la represión de genes relacionados con procesos fotosintéticos. No se han encontrado trabajos en los que hayan analizado mediante microarrays plantas tratadas con BTH e infestadas con insectos. El análisis transcriptómico del tomate en la resistencia a *B. tabaci* inducida por

BTH podría proporcionar información relevante para su uso como parte del manejo integrado de *B. tabaci*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Metodología general.

En primer lugar se detalla el material y la metodología general empleada en esta Tesis. A continuación, se detallan las condiciones y la metodología específica para cada uno de los objetivos.

1.1. Material vegetal

1.1.1. Variedades de tomate utilizadas

Para la cría y mantenimiento de la población de *B. tabaci* se escogió el cultivar Marmande por tratarse de una variedad habitual en nuestros cultivos, con alto valor comercial y elevada susceptibilidad a las moscas blancas.

En la mayoría de los ensayos presentados en esta tesis se han empleado los cultivares Moneymaker (*mi-1/mi-1*) y Motelle (*Mi-1/Mi-1*), elegidos por ser quasi-isogénicos, diferenciándose únicamente por la presencia, en el cromosoma 6 de Motelle, de una región de 650kb que contiene el gen *Mi-1*.

Para conocer la posible implicación de la ruta del ácido salicílico (SA) en la resistencia a *B. tabaci* mediada por el gen *Mi-1* se han utilizado plantas de tomate Moneymaker y VFN (*Mi-1/Mi-1*), así como plantas Moneymaker transformadas para expresar el gen *NahG* (Brading et al., 2000) y otras resultantes del cruzamiento VFNx*NahG*. Las plantas transgénicas *NahG* se caracterizan por no acumular SA. Esto se debe a que expresan de forma constitutiva el gen bacteriano *NahG*, que codifica la enzima salicilato hidroxilasa convirtiendo el SA en catecol evitando así la acumulación de esta hormona (Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994). Del cruzamiento VFNx*NahG* se obtuvieron plantas que expresaban conjuntamente los genes *NahG* y *Mi-1*. Las semillas para este estudio fueron proporcionadas por la Dra. Isgouhi Kaloshian del Departamento de Nematología de la Universidad de California, Riverside (USA).

1.1.2. Desinfección de semillas

La desinfección se realizaba manteniendo las semillas en una solución de lejía al 10%, o HCl al 3% en el caso de las semillas *NahG*, durante 10 minutos, y lavándolas repetidamente con agua autoclavada hasta eliminar cualquier resto de lejía. La diferencia en la solución desinfectante empleada para las

semillas NahG se debe a problemas de contaminación por hongos y bacterias en el laboratorio de la Dra. Kaloshian. La desinfección con HCl al 3% les resultaba más eficiente que la desinfección con lejía por lo que en este trabajo se empleó el mismo método desinfectante para evitar posibles contaminaciones.

1.1.3. Condiciones de cultivo

En general, las semillas desinfectadas se sembraban en alveolos sobre un sustrato inerte (vermiculita n°3, Projar) esterilizado por presoclave a 121°C durante 20 minutos, que aseguran una aireación, temperatura e higrometría óptimas. Se mantenían en una cámara climática a 25:20°C y 70% H.R. y con un fotoperiodo de 16:8 h (L:O).

Aproximadamente 2 semanas después de la germinación se trasplantaban a macetas (12mm de diámetro) con el mismo sustrato. Cada 15 días se regaban con solución nutritiva 20-20-20 (Nutrichem, 60, Miller Chemical, Hannover, Pennsylvania, USA) y, entretanto, con agua según necesidad. Cuando las condiciones ambientales o el protocolo de cultivo seguido fueron distintos, se detalla en el apartado de metodología específica correspondiente.

1.2. Mantenimiento y cría de *Bemisia tabaci*

Durante la realización de esta tesis doctoral se llevó a cabo el mantenimiento en condiciones controladas de la población existente en nuestro laboratorio del biotipo Q de la mosca blanca *Bemisia tabaci*, sobre plantas de tomate de la variedad Marmande. La población de *B. tabaci* se obtuvo de otra población mantenida sobre plantas de algodón y pimiento en el laboratorio del Dr. Francisco Beitia en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) y procedente, a su vez, de una sola hembra fecundada capturada en campo.

Las plantas infestadas con *B. tabaci* se mantienen en jaulas de cría con malla anti-trips que evitan el paso de insectos pero permiten la entrada de luz y la aireación. La población se mantiene en condiciones próximas a 24°C, 16:8 h (L:O), 60% H.R. Cada 15 días se riega con solución nutritiva y, entretanto, con agua según necesidad. *B. tabaci* requiere de plantas con hojas bien

desarrolladas y el mantenimiento de la población precisa un control diario de la misma, puesto que se necesita una población realmente elevada para poder llevar a cabo los bioensayos. Además, diversos factores como las altas temperaturas, humedad y una población elevada de mosca blanca favorecen la proliferación de hongos sobre las hojas y su transmisión de una planta a otra, con el consiguiente perjuicio para la cría de esta especie.

1.2.1. Recogida de adultos y selección de hembras de *B. tabaci*

Se recogen los adultos desde las jaulas de cría utilizando un aspirador manual (Figura MG-1) consistentes en un tubo hueco de plástico flexible en uno de cuyos extremos se coloca un pequeño trozo de malla (del mismo tipo de la utilizada para las jaulas de la cría de *B. tabaci*) sujeta con cinta adhesiva.

A continuación se coloca una pieza cónica de plástico, que puede ser una punta desechable de las utilizadas para las pipetas automáticas, con el extremo distal modificado para ajustar el diámetro del mismo, que ha de ser pequeño para que los insectos no puedan escapar una vez aspirados, pero suficientemente amplio para evitar que se dañen al entrar. Los adultos aspirados se van depositando en pequeños tubos de plástico con tapón perforado para permitir la entrada de aire. Desde



Figura MG-1. Aspirador manual y tubo de plástico con tapón perforado.

la aspiración de los adultos hasta su colocación en las plantas no pasan más de 30 minutos para evitar la posible inanición de los insectos.

Cuando era necesario seleccionar sólo hembras entre los insectos adultos, se hacía en base a su morfometría por comparación con los machos, ya que éstos son de menor tamaño. Se utilizaron básicamente dos métodos para la selección de las hembras: enfriamiento y bomba de vacío.

1.2.1.1. Selección de hembras mediante enfriamiento

Los adultos recogidos en el tubo de plástico con tapón perforado se mantienen a 4°C durante 40 segundos aproximadamente. Se vuelca el contenido del tubo sobre una placa petri con papel de filtro negro en el fondo y con un pincel de 3-4 cerdas se recogen las hembras y se van introduciendo en las cajas-pinza. Cuando los adultos comienzan a despertarse se coloca la placa petri cerrada a 4°C durante 20 segundos para continuar con la selección de hembras. Los mismos adultos no se someten a 4°C más de dos veces para evitar su muerte o inviabilidad debido a la baja temperatura.

Este método se empleó en aquellos ensayos en los que se confinaban 5 hembras en una caja-pinza y una caja-pinza por planta. Este es el caso de los ensayos de no elección del estudio sobre la posible influencia del desarrollo de la planta en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci* (objetivo 1) y del estudio sobre el papel del ácido salicílico en la defensa basal y en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci* (objetivo 2).

1.2.1.2. Selección de hembras mediante bomba de vacío

Se utilizó una metodología basada en la filtración al vacío modificándola para este propósito. La estructura consta de un embudo Büchner de porcelana provisto de un anillo o junta de caucho que encaja perfectamente en la boca de un kitasato, matraz de Erlenmeyer con tubuladura lateral, que se conecta a la bomba de vacío (Figura MG-2). Sobre la placa perforada del embudo Büchner se coloca un círculo de papel de filtro negro de forma que tape los orificios pero sin que quede levantado por las paredes laterales. Para ello, el papel se humedece con agua para fijarlo a la base. Los adultos previamente aspirados desde las jaulas de cría se depositan sobre el papel de filtro negro, donde quedan retenidos por efecto del vacío producido bajo el filtro. Utilizando un pincel de 3-4



Figura MG-2. Bomba de vacío empleada para la selección de hembras adultas de *B. tabaci*.

cerdas se seleccionan las hembras y se van introduciendo en las cajas-pinza. También se pueden seleccionar utilizando el aspirador manual en lugar del pincel.

Esta metodología presenta la ventaja de no someter al insecto a bajas temperaturas y permite trabajar con un mayor número de insectos facilitando la tarea de selección de las hembras. Este método se empleó en bioensayos en los que se requerían entre 20-30 hembras por caja-pinza y 3-4 cajas-pinza por planta. En concreto, se empleó en el estudio sobre el papel del SA en la defensa basal a *B. tabaci* y en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*, en el que se cuantificó el SA presente en los folíolos mediante HPLC (objetivo 2), así como en el trabajo sobre la posible implicación del gen *Hsp90* en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci* (objetivo 3) y en el estudio sobre la reprogramación transcripcional en la interacción tomate-*B. tabaci* (objetivo 4).

1.3. Tipos de cajas de confinación para adultos

En los ensayos de no elección se ha empleado diferente número de hembras y cajas de confinamiento por planta. En función de las necesidades de los ensayos se han utilizado dos tipos diferentes de cajas: caja-pinza y tubos tipo Falcon modificados, que detallo a continuación.

1.3.1. Cajas-pinza

Las cajas-pinza fueron diseñadas especialmente para la introducción de insectos de pequeño tamaño que se colocan en un foliolo de modo que los insectos tengan acceso al envés del foliolo (Muñiz and Nombela, 2001) (Figura MG-3a), área preferente de alimentación y puesta de huevos de *B. tabaci*. En esta tesis doctoral se han modificado estas cajas-pinza para reducir el diámetro de las mismas, utilizando tubos Eppendorf de 1,5ml (Figura MG-3b). Estas cajas-pinza se emplearon en los ensayos de no elección en los que se seleccionaron 5 hembras por planta del estudio sobre el efecto del desarrollo de la planta en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci* (objetivo 1) y del trabajo sobre la posible implicación del ácido salicílico en este tipo de resistencia (objetivo 2).

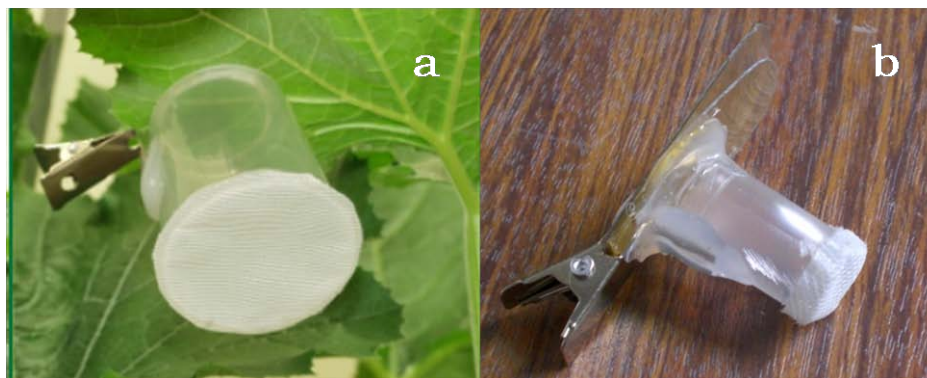


Figura MG-3. Cajas-pinza, empleadas en ensayos de no elección, en las que se introducen los adultos de *B. tabaci*. (a) Imagen de una caja-pinza original publicada en Muñiz and Nombela (2001). (b) Caja-pinza modificada utilizada en determinados ensayos de no elección durante esta tesis.

1.3.2. Tubos tipo Falcon modificados

Se modificaron tubos tipo Falcon de 50ml cortando transversalmente el fondo cónico y colocando, a continuación, una malla anti-trips del mismo tipo de la utilizada para las jaulas de cría. Seguidamente, a la altura del extremo cortado del tubo, se realizaron transversalmente unos orificios por los que se introdujo una varilla de vidrio de 5mm de diámetro para poder desplazar el tubo verticalmente y colocarlo a la altura deseada. Por último, se realizó otro orificio, del mismo diámetro que el de los tubos de plástico con tapón perforado, para introducir éste con las hembras seleccionadas en el interior del tubo tipo Falcon modificado (Figura MG-4).

Estos tubos se utilizaron en los ensayos en los que se requerían 20-30 hembras y 3-4 tubos por planta. Es el caso del ensayo de cuantificación de SA por HPLC (objetivo 2), en el trabajo sobre la posible implicación del gen *Hsp90* en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci* (objetivo 3) y en el estudio sobre la reprogramación transcripcional en la interacción tomate-*B. tabaci* (objetivo 4).



Figura MG-4. Tubos tipo Falcon modificados para utilizar en ensayos de no elección en los que se emplean 20-30 hembras adultas de *B. tabaci* y 3-4 tubos por planta.

1.4. Tipos de bioensayos

En esta tesis se han realizado ensayos de libre elección que permiten determinar si existe fenómeno de antixenosis, esto es, no preferencia por un tipo de planta (genotipo), por parte del insecto. Por otro lado, se han llevado a cabo otros ensayos en los que el insecto no tiene la opción de elegir entre plantas y permiten estudiar una posible antibiosis, que es un tipo de resistencia que afecta a la biología del insecto pudiendo provocar la reducción en la longevidad, mortalidad o la reproducción del insecto.

1.4.1. Ensayos de libre elección

Las plantas de tomate se colocaban en bloques homogéneos distribuidos regularmente en un invernadero libre de insectos bajo condiciones ambientales controladas (Figura MG-5). Se libera un número elevado de adultos de *B. tabaci* permitiéndoles adaptarse a las condiciones ambientales y elegir libremente las plantas por espacio de 6 días, tras los cuales se comenzaba un recuento diario del número de adultos presentes en todas y



Figura MG-5. Plantas de tomate distribuidas en el invernadero para ensayos de libre elección.

cada una de las plantas, que finalizaba cuando los adultos de la siguiente generación comenzaban a emerger. Entonces se realizaba un recuento final del número de pupas y nuevos adultos (contados como sacos pupales vacíos) en cada planta, obteniéndose así información sobre la evolución poblacional de los insectos. Los recuentos se realizaban a primera hora de la mañana porque es el momento en el que los adultos están menos activos y se puede llevar a cabo el recuento con mayor eficacia.

Se han empleado ensayos de libre elección en el trabajo sobre la posible influencia del desarrollo vegetal en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci* (objetivo 1).

1.4.2. Ensayos de no elección

Este tipo de ensayos se llevaban a cabo en cámaras climáticas bajo condiciones controladas de temperatura, humedad relativa y fotoperiodo, cuyos valores se detallan en los apartados de metodología específica de cada estudio. Se introducía un número conocido de hembras fértiles de *B. tabaci* en cajas-pinza o tubos tipo Falcon modificados. Se eligían folíolos bien desarrollados localizados en la zona media-alta de la planta. Tras un periodo corto, que variaba en función del número de hembras presentes, se retiraban las cajas y los insectos y se contabilizaban el número de huevos depositados. Los folíolos que habían estado en contacto con los insectos se marcaban utilizando arandelas de papel (Apli, 13mm de diámetro) evitando cualquier lesión durante su colocación. Se mantenían las plantas en las mismas condiciones ambientales hasta el final del experimento. Se contabilizaba entonces en cada planta el número de individuos de cada una de las fases del desarrollo.

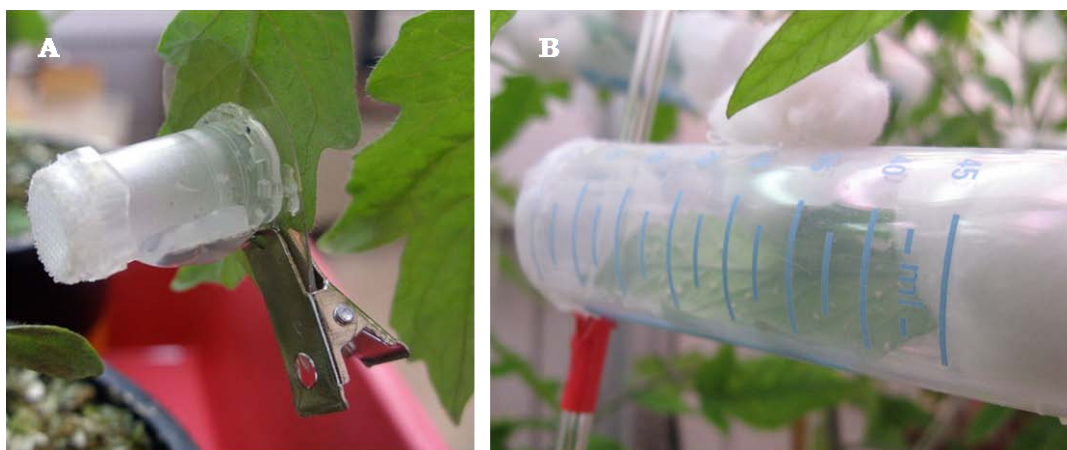


Figura MG-6. Ensayos de no elección utilizando cajas-pinza o tubos tipo Falcon modificados conteniendo 5 y 20-30 hembras adultas, respectivamente.

Se han utilizado este tipo de ensayos de no elección en los cuatro objetivos presentados en esta Tesis.

1.5. Tratamiento y análisis estadístico de los datos.

Cuando los datos para cada variable se ajustaron a la normalidad, dichos datos (x) se compararon con el test de Tukey, y cuando no, se transformaron en $\log_{10}(x)$, \sqrt{x} o $\arcseno[\sqrt{(p/100)}]$ cuando se trataba de porcentajes (p). En el caso de que siguiera sin cumplirse la condición de normalidad se realizaba la comparación de los datos mediante un test no paramétrico. En los resultados

correspondientes al objetivo 1 (influencia del desarrollo vegetal en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*) y al objetivo 2 (participación del ácido salicílico en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*) se empleó como test no paramétrico el de Mann-Whitney. En los resultados del objetivo 3 (implicación del gen *Hsp90* en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*) se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunn ya que se comparan más de 2 grupos entre sí.

El análisis estadístico empleado en el objetivo 4 (análisis transcriptómico de la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*) se especifica en la metodología específica.

La tasa intrínseca media de crecimiento (r_m), que se utilizó para el estudio del efecto del desarrollo de la planta en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci* (objetivo 1), se calculó mediante la expresión $r_m = (\ln(N_t/N_0))/t$ (Birch, 1948), siendo N_t el número de adultos obtenidos al cabo de t días tras la infestación con un número de hembras N_0 .

2. Metodología específica del estudio sobre el efecto del desarrollo de la planta en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*.

A continuación se detalla la metodología específica relativa a este capítulo en el que se realizaron ensayos con plantas de diferente edad y diferente tamaño.

2.1. Crecimiento diferencial de plantas.

Para la realización de estos estudios se emplearon las variedades Motelle (*Mi-1/Mi-1*) y Moneymaker (*mi-1/mi-1*). En el de edades se sembraron las semillas de ambas variedades en tiempos distintos para obtener plantas de 3, 5 y 8 semanas de edad. Las plantas fueron crecidas en cámaras de crecimiento en condiciones controladas 24°C:20°C, L16:O8, 70% H.R. Por otro lado, para el estudio de tamaños, se emplearon plantas de 8 semanas, pero la mitad fueron crecidas a menor temperatura (19°C constantes) con el fin de obtener dos tamaños diferentes de plantas (Figura ME-2.1).



Figura ME-2.1. Plantas de tomate de las variedades Moneymaker y Motelle de 8, 5 y 3 semanas de edad (A), y plantas de 8 semanas de edad crecidas a diferente temperatura (B).

2.2. Diseños experimentales.

Para la realización de este capítulo se llevaron a cabo ensayo de libre elección y de no elección.

2.2.1. Ensayos de libre elección

Todas las plantas utilizadas en estos ensayos fueron crecidas en cámaras de crecimiento controlado y posteriormente trasladadas a un invernadero libre

de insectos. La disposición de las plantas e infestación se detalla en la Metodología general.

Para el ensayo de edades se emplearon 20 plantas de cada cultivar y edad (120 plantas) mientras que para el ensayo de tamaños se utilizaron 18 plantas de cada cultivar y tamaño (72 plantas). Debido al volumen de plantas, la contabilización de adultos de *B. tabaci* podía extenderse alrededor de tres horas, por lo que cada día se comenzó el recuento desde un punto distinto del invernadero para evitar el sesgo en el cómputo del número de adultos en cada planta. Se giraban las hojas de cada planta con cuidado y, a contraluz, se observaba y anotaba el número de adultos en la misma. A partir del primer día de recuento, el número total de adultos iba descendiendo progresivamente, debido a la mortalidad de los insectos. Cuando el número total de adultos aumentaba por la emergencia de los adultos de la siguiente generación, se realizaba un recuento más al día siguiente para confirmar la tendencia y dar por finalizados los recuentos diarios.

2.2.2. Ensayos de no elección

El crecimiento de las plantas y posterior desarrollo de los ensayos se llevó a cabo en cámaras de crecimiento controlado.

En el ensayo de edades se emplearon 16 plantas de cada variedad y edad (96 plantas) mientras en el ensayo de tamaños se utilizaron 14 plantas de cada variedad y tamaño (56 plantas). Para el desarrollo de estos ensayos se emplearon cajas-pinza. Cada caja-pinza contenía 5 hembras adultas y se colocó una caja-pinza en cada planta. En la Metodología general se describe este tipo de ensayos, las cajas-pinza y la selección de hembras.

Las cajas-pinza conteniendo las hembras adultas se mantuvieron durante 6 días en las plantas, momento en el que se retiraron y se realizó el recuento del número de huevos presente en cada foliolo. A los 21 días se realizó un recuento del número de individuos presentes en estos foliolos, teniendo en cuenta para ello únicamente los individuos que se encontraban en las fases N3, N4 y nuevos adultos (contados como sacos pupales vacíos).

3. Metodología específica del estudio sobre el papel del SA en las interacciones tomate-*B. tabaci*.

Con el fin de determinar la posible implicación de la ruta del ácido salicílico (SA) en la resistencia basal del tomate a *B. tabaci* así como en la resistencia mediada por el gen *Mi-1*, se llevaron a cabo bioensayos de no elección en los que se analizó el desarrollo del insecto en plantas transgénicas de tomate que tenían alterada la ruta del SA, comparándolo con otras plantas no modificadas. Además, para determinar la integridad y eficacia de la transformación en las plantas genéticamente modificadas, se llevó a cabo la cuantificación de los niveles foliares de los ácidos salicílico y jasmónico en todos los genotipos utilizados, lo que requirió de bioensayos específicos para la obtención del material vegetal.

3.1. Genotipos de tomate y condiciones de crecimiento.

Para la realización de este estudio se emplearon los genotipos de tomate MoneyMaker (*mi-1/mi-1*), NahG (*mi-1/mi-1*), VFN (*Mi-1/Mi-1*) y VFNxNahG (*Mi-1/Mi-1*). Las plantas transgénicas NahG se obtuvieron al introducir el gen bacteriano *NahG*, que codifica una enzima que degrada el SA convirtiéndolo a catecol, en las plantas MoneyMaker (Brading *et al.*, 2000). Estas plantas se han utilizado para conocer la implicación del SA en diversas interacciones (Audenaert *et al.*, 2002; Achuo *et al.*, 2004; Thaler *et al.*, 2010) así como en la resistencia mediada por genes *R* (Gaffney *et al.*, 1993; Delaney *et al.*, 1994; Brading *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006; Bhattarai *et al.*, 2008). Para poder estudiar el papel del SA en la resistencia mediada por *Mi-1*, se utilizaron las plantas que denominamos VFNxNahG, obtenidas del cruzamiento de plantas NahG y VFN, que contenían el gen *Mi-1* y el gen bacteriano *NahG* (Li *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en estas plantas tras la infestación de *B. tabaci* fueron comparados con los observados en plantas VFN cuya ruta del SA no está alterada.

Las semillas de las plantas NahG se sembraron tres días antes que el resto, ya que su germinación es algo más lenta. Las plantas que expresan el gen *NahG*, incluidas las del cruzamiento VFNxNahG, son sensibles a la luz, apareciendo manchas necróticas en hojas y tallos cuando están sometidas a la intensa iluminación habitual de las cámaras de crecimiento. Se ha observado que las plantas con estos síntomas son rechazadas por áfidos (Li *et al.*, 2006).

Con objeto de evitar la aparición de estas lesiones necróticas, las semillas se hicieron germinar en oscuridad y, una vez germinadas, se redujo la luminosidad de la cámara a 41-42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para evitar diferencias entre los distintos genotipos del estudio, todos se sometieron a los mismo procesos y condiciones ambientales, tanto durante el crecimiento de las plantas como, posteriormente, durante la realización de los ensayos.

3.2. Cuantificación de los ácidos salicílico y jasmónico

En primer lugar se describe el bioensayo diseñado específicamente para la recogida del material vegetal que se utilizó para cuantificar los niveles foliares de los ácidos salicílico (SA) y jasmónico (JA) en los genotipos de tomate comparados y, a continuación, se detalla el proceso de extracción de dichas hormonas.

3.2.1. Diseño experimental y recogida de muestras

Este ensayo de no-elección se llevó a cabo en condiciones controladas, con un 70% H.R. y un fotoperiodo de 16:8 h (L:O). La cámara se mantuvo a una temperatura constante de 25°C para ajustar el desarrollo de los individuos de *B. tabaci* al esquema temporal descrito por Bonato *et al.* (2007). En este caso se utilizaron 3 plantas por genotipo para obtener el material vegetal en distintos momento del ensayo y, paralelamente, se emplearon otras plantas en las que recontar el número de individuos presentes y determinar estadísticamente la existencia, o no, de diferencias significativas entre las variedades. En el momento de la infestación, en cada planta de 8 semanas de edad, se colocaron 3 tubos tipo Falcon de 50ml modificados (ver metodología general) conteniendo, cada uno, veinte hembras adultas de *B. tabaci*, que habían sido seleccionadas utilizando el método de la bomba de vacío. Cada tubo se colocó en un foliolo bien desarrollado de una hoja localizada en la zona media-alta de la planta. En otras plantas se colocaron tubos similares pero vacíos de insectos. Todos los tubos (con y sin hembras) se dejaron durante dos días para que las condiciones fuesen las mismas que en las plantas infestadas.

En base a la velocidad del desarrollo del insecto prevista para la temperatura del ensayo (Bonato *et al.*, 2007), se realizaron tres tomas de muestras:

- Odpi: a los 2 días de la colocación de los tubos vacíos. Por tanto, estas muestras corresponderían a plantas sin infestar.

- 2dpi (a los 2 días post-infestación): a los dos días de la introducción de las hembras en los tubos, cuando encontraríamos huevos y, por tanto, se podría valorar el efecto de la alimentación y oviposición de las hembras.

- 12dpi (a los 12 días post-infestación): a los doce días de la infestación con las hembras de *B. tabaci*, cuando la mayor parte de los individuos presentes se encontraban en fase N1, única fase ninfal móvil y la más activa, en la que la ninfa va inyectando el estilete en distintos puntos de la hoja hasta encontrar el lugar adecuado para fijarse y continuar su desarrollo.

Las plantas utilizadas en cada uno de los momentos de toma de muestras no se emplearon para los siguientes. Cada muestra de cada genotipo consistía en 3 folíolos, uno de cada una de 3 plantas. Las muestras recogidas se almacenaron en paquetes perfectamente etiquetados fabricados con papel de aluminio y se congelaron con nitrógeno líquido para mantener el material vegetal a -80°C hasta el momento de realizar la extracción y la cuantificación de SA y JA.

3.2.2. Extracción de hormonas

En primer lugar se procedió a liofilizar las muestras que estaban conservadas a -80°C mediante un liofilizador (Heto FD 1.0) con objeto de facilitar su traslado. La extracción de SA y JA y el posterior análisis de HPLC acoplado a masas (HPLC-MS) se realizó en el laboratorio de Ecofisiología y Biotecnología del Departamento de Ciències Agraries i del Medi Natural (UJI, Universitat Jaume I, Castelló) dirigido por el Dr. Aurelio Gómez Cadenas. Bajo la supervisión de la Dra. María F. López Climent, se siguió este protocolo, adaptado a partir de Durgbanshi *et al.* (2005):

Se preparó una mezcla estándar interno que contenía DHJA y SAd6 a una concentración de 2 ppm, cada uno. En tubos de centrifuga de 15 ml se introdujeron 50 mg de tejido seco y se añadieron 50 µl del estándar interno preparado previamente. Posteriormente se añadieron 5 ml de agua destilada. Se homogenizó con un Ultra-Turrax, realizando pulsos de 20 segundos durante 1 minuto 40 segundos (20 segundos triturando y 20 segundos de reposo). A continuación, se centrifugó a 4.000 rpm durante 45 minutos y se

recogió el sobrenadante en un tubo nuevo. Éste se acidificó con ayuda de una sonda fina, añadiendo ácido acético al 30% hasta alcanzar valores de pH entre 2,8 y 3,2; se trata de un paso crítico por lo que es importante controlar los valores de pH. Se añadieron 3 ml de dietil éter a la muestra acidificada para hacer la partición líquido-líquido. Se homogenizó con el vórtex para mezclar las dos fases que se forman. Se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo realizando una nueva partición; es importante no arrastrar residuos al recuperar el sobrenadante. Al final se recuperaron aproximadamente 4 ml de fase orgánica. Por último, se desecó la fase orgánica en el SpeedVac durante 90 minutos aproximadamente, con un programa que no proporcionaba calor y que permitía la entrada de aire.

El pellet obtenido se resuspendió con 100 µl de metanol y se trató mediante ultrasonidos durante 5-10 minutos. A continuación, se le añadieron 900 µl de agua bidestilada. El volumen total se homogenizó mediante vórtex y se filtró. Para ello se empleó un filtro de acetato de 0,22 µm de tamaño de poro. El filtro se acondicionó pasándole agua tres veces y posteriormente aire hasta secarlo totalmente. Los filtros se reutilizaron pasando 1 ml de metanol y 3 ml de agua (cada uno por separado) tras filtrar cada muestra. La muestra filtrada se montó en un vial y quedó lista para pinchar en el equipo de HPLC (Alliance 2695, Waters Corp, Milford, MA). La separación cromatográfica se realizó con una columna C18 (Kromasil 100, 5 µm particle size, 100×2,1 mm, Scharlab, Barcelona, Spain) usando un gradiente lineal de metanol y agua suplementada con un 0,01% de ácido acético aplicando un flujo de 300 µl min⁻¹. Ambas hormonas, JA y SA, fueron detectadas mediante sus transiciones específicas en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Quattro LC, Micromass Ltd., Manchester, UK).

3.3. Diseño experimental para conocer la posible implicación del SA en la resistencia basal a *B. tabaci* y en la resistencia mediada por *Mi-1*.

Se realizaron bioensayos de no-elección en cámara climática, en las mismas condiciones ambientales mantenidas en los bioensayos de cuantificación hormonal: 25°C, 70% H.R. y fotoperiodo de 16:8 h (L:O). Se utilizaron 15 plantas de cada uno de los 4 genotipos de tomate anteriormente descritos (60 plantas en total). Todas estas plantas habían alcanzado las 8 semanas de edad en el momento de la infestación con los insectos. Para dicha

infestación se emplearon cajas-pinza (ver Figura M3b de la Metodología General) conteniendo 5 hembras adultas de *B. tabaci* procedentes de la cría en nuestro laboratorio. Se colocó una caja-pinza en un foliolo bien desarrollado de cada planta. Las cajas-pinza se mantuvieron durante 6 días, momento en el que se retiraron y se realizó el recuento del número de huevos presentes en los foliolos. Estos mismos foliolos fueron observados de nuevo 21 días después y se recontó el número de individuos presente en cada uno de ellos que hubieran alcanzado, como mínimo, la fase N3.

Los parámetros analizados en este estudio fueron la fecundidad y desarrollo de *B. tabaci* así como su crecimiento poblacional, el porcentaje de individuos en cada fase de desarrollo y la tasa de crecimiento. El papel del SA en la resistencia basal se determinó en la comparación entre las plantas carentes del gen *Mi-1* Moneymaker y NahG pues, como se explicó al principio, esta última tiene alterada la ruta del SA. Para dilucidar la participación de esta hormona en la resistencia mediada por *Mi-1* se compararon las plantas portadoras de este gen VFN y VFNxNahG, ya que la segunda expresa también el gen *NahG*.

4. Metodología específica del estudio sobre la implicación de *Hsp90* en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*.

Se explica, a continuación, la metodología específica empleada en este capítulo en el que se ha utilizado la técnica del Silenciamiento Génico Inducido por Virus (VIGS) para conocer la posible implicación del gen *Hsp90* en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* frente a *B. tabaci*. Las actividades de este estudio se desarrollaron en dos fases consecutivas: primero, el silenciamiento génico en las plantas, propiamente dicho y, a continuación, los bioensayos para evaluar la respuesta de las plantas silenciadas frente a la infestación por *B. tabaci*.

4.1. Condiciones de cultivo y esquema temporal del proceso de silenciamiento génico.

Se empleó la variedad de tomate susceptible Moneymaker (*mi-1/mi-1*) y la variedad resistente Motelle (*Mi-1/Mi-1*), cuyas semillas se sembraron en condiciones controladas a 24°C:20°C, L16:O8 y 70% H.R. Aproximadamente 10 días después de la germinación, cuando empezaron a emerger las primeras hojas verdaderas, se comenzó el cultivo de los agroclones en condiciones de esterilidad, según se describe más adelante (ver apartado 3).

Alrededor de 15 días tras la germinación, generalmente ya se habían desarrollado las primeras dos hojas verdaderas, realizándose entonces la agroinfiltración de las mismas y de los cotiledones. Este es un punto crítico, ya que las hojas deben tener el desarrollo adecuado para la infiltración y éxito del silenciamiento (Figura ME-4.1).



Figura ME-4.1. Plántulas de tomate crecidas a 24°C:20°C (L:O) con las dos primeras hojas verdaderas listas para la

Al cabo de unas 8 semanas tras la infiltración se llevaron a cabo los bioensayos infestando las plantas con las moscas blancas.

4.2. Construcciones empleadas para VIGS

El vector utilizado para el silenciamiento fue el *Tobacco Rattle Virus* (TRV), compuesto por pTRV1 (TRV1), que contiene la parte replicativa del virus, y pTRV2 (TRV2), en el que se introduce el gen a silenciar. Este vector ha sido ampliamente descrito por Liu *et al.* (2002).

En este estudio se ha empleado pTRV2-*Mi-1*, pTRV2-*PDS*, pTRV2-*SlHsp90-1* para silenciar los genes *Mi-1*, *PDS* y *Hsp90-1*, respectivamente, además de pTRV2-‘vacío’ (en el que no se ha introducido material genético de la planta). La infiltración con el vector vacío (pTRV2-‘vacío’) se lleva a cabo para analizar si la infiltración en sí misma produce alguna alteración en el comportamiento de *B. tabaci*. Aunque el objetivo de este estudio era silenciar el gen *Hsp90-1* para conocer su posible implicación en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a *B. tabaci*, se silenciaron de forma paralela los genes *Mi-1* y *PDS*. El silenciamiento de *Mi-1* se ha realizado con éxito anteriormente (Li *et al.*, 2006), sin embargo, hasta el momento no se había comprobado su efecto sobre la resistencia a moscas blancas.

El silenciamiento del gen *PDS* tuvo como objetivo evaluar la eficacia del silenciamiento en nuestras plantas, puesto que al silenciar la expresión de este gen se produce un fenotipo visible de fotoblanqueo en las hojas debido a



Figura ME-4.2. Silenciamiento del gen *PDS* en hojas de tomate. Algunos folíolos muestran el fenotipo de fotoblanqueo en prácticamente la totalidad de su superficie foliar mientras que en otros se observan algunas zonas de color verde. Este silenciamiento irregular es típico en plantas de tomate.

la supresión de la actividad de la *Fitoeno desaturasa* endógena, enzima que participa en la biosíntesis de carotenoides (Liu *et al.*, 2002b; Li *et al.*, 2006). Aunque se sabe que el silenciamiento en tomate presenta menor eficiencia y es más irregular que en *Nicotiana benthamiana* (Liu *et al.*, 2002a), el silenciamiento del gen *PDS* se mantuvo durante toda la duración de cada bioensayo (Fig. ME-4.2), observándose folíolos jóvenes silenciados incluso 10 semanas

después de la infiltración, lo que nos permitió inferir que el silenciamiento de los demás genes en nuestras plantas continuaba efectivo a pesar del tiempo transcurrido.

Las construcciones pTRV1:pTRV2-*PDS* (TRV-*PDS*) y pTRV1:pTRV2-*SlHsp90-1* (TRV-*SlHsp90-1*) se obtuvieron del Dr. S. Dinesh Kumar (Yale University, New Have, CT, U.S.A.) (Liu *et al.*, 2002, 2004). La construcción pTRV1:pTRV2-*Mi-1* (TRV-*Mi-1*) se realizó en el laboratorio de la Dra. I. Kaloshian (Li *et al.*, 2006), clonando un fragmento de 300pb del cDNA de *Mi-1* y utilizando los cebadores C1/2Do and C2S4 (Martínez de Ilarduya and Kaloshian, 2001) para su amplificación. El fragmento amplificado se clonó en un vector pGEM T-Easy y se restringió utilizando *SphI* tratándose, a continuación, con la polimerasa T4 DNA. El fragmento resultante fue digerido con *SacI* y se introdujo en el pTRV2. El plásmido formado se transformó en un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Cada uno de los agroclones (TRV1 y TRV2) así obtenidos procedían de una colonia aislada y se conservaron en glicerol a -80°C.

4.3. Crecimiento de agroclones y agroinfiltración

Los agroclones mantenidos en glicerol se hicieron crecer primero en placa y seguidamente en medio líquido. Como ya se ha mencionado más arriba, el crecimiento de los agroclones se comenzaba aproximadamente 10 días tras la germinación de las plántulas. Esto es debido a que el proceso completo de crecimiento podía llevar entre 5 y 6 días, y la infiltración de las primeras hojas verdaderas y los cotiledones de las plantas crecidas en condiciones controladas se realizaba a los 15 días, aproximadamente, tras su germinación.

4.3.1. Crecimiento en placa

Se trabajó en campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Se prepararon placas Petri estériles con agar al 1,5% en medio LB suplementado con los antibióticos Kanamicina y Rifampicina (50 mg/L y 25 mg/L de concentración final, respectivamente). Se dejaron enfriar y se sembraron cada uno de los agroclones en una placa (Figura ME-4.3) que se selló con parafilm y se colocaron boca abajo en la estufa a 28°C durante 24-48 h. Pasado este tiempo, se verificó el crecimiento de las colonias en las placas y se trasladaron

éstas al frigorífico, donde se podían mantener hasta 15 días, aproximadamente.



Figura ME-4.3. Siembra de TRV2-PDS en placa en agar al 1,5% en medio LB suplementado con Kanamicina (50 mg/L) y Rifampicina

4.3.2. Crecimiento en medio líquido

Dos días antes de la infiltración de las primeras hojas verdaderas, y en condiciones de esterilidad, se introdujeron 2 ml de medio LB suplementado con Kanamicina (50 mg/L) y Rifampicina (25 mg/L) en tubo de vidrio. Con un asa de siembra se recogió una colonia aislada de un agroclon y se introdujo en el tubo. Cada agroclon se hizo crecer en un tubo independiente, excepto TRV1 que se hacía crecer en 2 tubos porque se necesitaba en mayor cantidad. Los tubos cerrados se colocaron en una estufa a 28°C con agitación horizontal (200-250 rpm) durante toda la noche.

Al día siguiente, en un vaso Erlenmeyer de 125 ml se introdujeron 25 ml de medio LB, suplementado con Kanamicina (concentración final: 50 mg/L), Rifampicina (25 mg/L), Acetosiringona (20µM) y MES (10mM). A esta mezcla se le añadieron los 2 ml del cultivo del día anterior. Los Erlenmeyer tapados con parafilm se colocaron de nuevo en la estufa a 28°C y agitación horizontal de 200-250 rpm durante toda la noche.

4.3.3. Agroinfiltración

Como se detalla más arriba, la agroinfiltración de las plantas se realizaba cuando habían transcurrido aproximadamente 15 días desde su germinación y, en cualquier caso, cuando ya habían desarrollado sus primeras dos hojas verdaderas. El día de la infiltración, se vertió la mezcla del Erlenmeyer en un tubo de plástico de fondo cónico y se centrifugó a 2.800 rpm a temperatura

ambiente (TA) durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en un tampón de infiltración (10mM MgCl₂, 10mM MES y 200μM Acetosyringona) que se preparó ese mismo día. Se midió la concentración en un espectrofotómetro a DO_{600nm} y se ajustaron las concentraciones de los agroclones a un valor de absorbancia de 2, utilizando para ello el tampón de infiltración. Una vez ajustadas las concentraciones, se mantuvieron los agroclones en agitación suave durante 3-5 horas en oscuridad, ya que la Acetosyringona es fotosensible. Tras este periodo de incubación se procedió a la infiltración de las hojas:

En primer lugar, se mezcló TRV1 con cada TRV2 (‘vacío’ o con el gen de interés a silenciar). Para ello, se añadieron TRV1 y TRV2 a partes iguales (1:1) en un tubo de plástico o Erlenmeyer pequeño esterilizado; de forma general, con 4 ml de cada TRV (8 ml en total) se podían infiltrar 10 plantas. Se mezclaron bien por inversión y se aspiró el líquido con una jeringa desprovista de aguja. La infiltración de las hojas y cotiledones se realizó presionando con la jeringa sobre el envés de las hojas pero sin ejercer demasiada fuerza para que no hubiese daño mecánico debido a la jeringa (Figura ME-4.4).



Figura ME-4.4. Agroinfiltración de plántulas de tomate en el envés de las hojas utilizando una jeringa desprovista de aguja para el Silenciamiento Génico Inducido por Virus.

Durante la infiltración, y posteriormente, se tenía siempre la precaución de mantener las plantas en bandejas separadas para cada genotipo y tratamiento, con objeto de evitar la posible transmisión accidental del virus por contacto o durante los riegos.

Las plantas infiltradas se mantuvieron a 19°C (para retardar el desarrollo de las plantas y así favorecer la distribución del virus) hasta alcanzar un grado de desarrollo similar al de plantas de 8 semanas de edad que hubieran crecido a 24°C:20°C (L:O). Esto generalmente se alcanzaba a las 8 semanas tras la infiltración, por lo que las plantas tenían aproximadamente 10 semanas de edad y estaban listas para los bioensayos de infestación con hembras adultas de *B. tabaci*.

4.4. Diseño experimental de los bioensayos con plantas infestadas por *B. tabaci*

Para este estudio se utilizaron las plantas Moneymaker y Motelle sin infiltrar y ambas variedades infiltradas con pTRV1:pTRV2-‘vacío’ (TRV). Por otro lado, se emplearon plantas Motelle infiltradas con pTRV1:pTRV2-*Mi-1* (TRV-*Mi-1*) y con pTRV1:pTRV2-*SlHsp90-1* (TRV-*SlHsp90-1*). Estos 6 tipos de plantas fueron infestados con hembras adultas de *B. tabaci* en bioensayo de no elección, realizados en cámara climática bajo condiciones controladas:

A las 8 semanas desde la infiltración, se subió la temperatura a 24°C:20°C (L:O) y se colocaron 3 tubos Falcon modificados (ver Metodología general) en cada planta, introduciendo un foliolo de una hoja en cada tubo Falcon. Para este estudio se emplearon 4 réplicas por cada genotipo de planta y tratamiento, y se realizaron 3 ensayos independientes. Se seleccionaron 20 hembras utilizando la bomba de vacío (ver Metodología general) que se introdujeron en cada uno de los tubos Falcon. Al cabo de dos días, se retiraron los tubos junto con las hembras y se realizó un recuento del número de huevos presente en los foliolos. El análisis estadístico de los datos obtenidos en este recuento se describe en el punto 5 de la Metodología General.

Tras finalizar el recuento de huevos, estos mismos foliolos infestados se separaron de la planta mediante un bisturí e inmediatamente se fueron introduciendo individualmente en tubos Eppendorf que contenían bolitas de vidrio, todo ello esterilizado, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta el momento de extraer el RNA para los análisis de expresión génica (apartado 6).

Además se recogieron otros foliolos no infestados de las mismas plantas, que se introdujeron individualmente en bolsas de plástico con cierre hermético y se conservaron en hielo hasta que se utilizaron para extraer el DNA genómico con objeto de confirmar el genotipo de dichas plantas, en cuanto a la presencia/ausencia del gen *Mi-1* (apartado 5). La primera actividad a realizar fue el análisis genómico de las plantas para asegurarse de que las plantas etiquetadas “Motelle” contenían el gen *Mi-1* mientras que en las plantas etiquetadas “Moneymaker” se confirmaba la ausencia del gen y, entonces, poder proceder al análisis de expresión de los foliolos recogidos.

4.5. Análisis genómico de plantas de tomate para confirmar la presencia/ausencia del gen *Mi-1*

Para confirmar el genotipo (presencia/ausencia del gen *Mi-1*) de las plantas utilizadas en los bioensayos, se llevó a cabo una extracción del DNA genómico (gDNA).

En primer lugar se detalla el proceso realizado para la extracción de gDNA y, a continuación, la cuantificación y determinación de pureza de la extracción, y la amplificación del gDNA mediante PCR. Por último, se describen las condiciones de electroforesis, revelado de geles y fotografías así como la estimación de los fragmentos amplificados.

4.5.1. Extracción de DNA genómico (gDNA)

Se siguió el protocolo de N. Miller and I. Kaloshian del laboratorio de la Dra. Valerie Williamson, modificado a partir del de Peterson *et al.* (1997).

Para el genotipado de cada planta, en una bolsa de plástico se introdujeron 3 folíolos jóvenes, de aproximadamente 2 cm, que se habían recogido previamente de la misma planta y que se mantuvieron en hielo hasta el inicio del protocolo. Se añadió 1 ml del Tampón de extracción pH 7,5 (0,35M Sorbitol, 0,1M Tris pH 7,5, 0,005M EDTA pH8 y 0,02M Bisulfito sódico) y se hizo rodar repetidamente una pipeta de vidrio de 25 ml sobre la bolsa, aplastando bien las hojas hasta que se deshicieron. El líquido resultante se extrajo mediante una pipeta y se depositó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml intentando arrastrar la menor cantidad posible de residuo, manteniéndolo en hielo mientras se repetía el mismo proceso con todas las muestras. A continuación, se centrifugaron durante 1 minuto a 13.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 µl del Tampón de lisis (0,2M Tris, 0,05M EDTA, 2M NaCl y 2% CTAB) y 40 µl de Sarcosil al 5%. Se mezcló por inversión y se incubó a 65°C durante 10 minutos.

Tras la incubación, se añadieron 250 µl de cloroformo mezclando bien por inversión. Se centrifugaron durante 5 minutos a 13.000 rpm. La capa acuosa (superior) se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf y se repitió este proceso desde la adición de cloroformo. A la nueva capa acuosa se añadió un volumen igual de Isopropanol (4°C) y se mezcló suavemente por inversión. Cuando hay gran cantidad de DNA se observa la madeja de DNA tras 10

inversiones. Las muestras se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 13.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 400 µl de Etanol frío al 70%. Se centrifugaron durante 2 minutos a 13.000 rpm, eliminando el sobrenadante. Se hizo una centrifugación rápida para eliminar el resto de Etanol.

Las muestras se dejaron secar con el tubo Eppendorf abierto durante 15-30 minutos. Se resuspendió el pellet con 30-50 µl de TE 1X y se almacenaron las muestras a 4°C, si se utilizaban en un periodo corto de tiempo, o a -20°C para almacenaje. En general, se utilizó 1 µl para una PCR de 25 µl.

4.5.2. Cuantificación y determinación de pureza de gDNA

El DNA genómico extraído se cuantificó mediante medidas de absorbancia en un *Nanodrop 1000* (Thermo Fisher Scientific; Wilmington, USA) utilizando como blanco la solución en la que se resuspendió el DNA, en este caso, TE 1X. Para realizar la cuantificación se depositó 1 µl de muestra sobre la lente y se llevó a cabo un registro de la absorbancia en función de la longitud de onda. Se midió la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm, estimándose el grado de contaminación con proteínas, fenoles y otros compuestos mediante el ratio 260/280. Si éste era superior a 1,8 y próximo a 2, se consideraban muestras con contaminación baja. Este rango es aceptado de forma general aunque se sabe que existen causas que pueden hacer variar este rango y que se detallan en el manual del *Nanodrop* (V3.7 User's Manual- Section 17- Troubleshooting).

4.5.3. Amplificación de gDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar el gen *Mi-1* a partir de los fragmentos de gDNA previamente extraídos, se utilizó la técnica de PCR. Para comenzar, se preparó una mezcla de reacción con MgCl₂ 25mM, dNTPs 10mM, Tampón de PCR 10x, 0,5 µl Taq polimerasa (Applied Biosystems), 10µM de cada cebador y 50-100 ng de DNA en un volumen final de 25 µl.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Programmable Thermal Blok II® (Lab-Line Instruments®) empleando un programa consistente en un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de tres pasos cada uno: desnaturalización (94°C, 30 segundos), unión al

cebador (64°C, 30 segundos) y extensión (72°C, 30 segundos). Finalmente un último ciclo de extensión a 72°C durante 5 minutos.

La amplificación de *Mi-1* a partir de gDNA se realizó utilizando los cebadores PMiF3 y PMiR3, diseñados por El Mehrach *et al.*, (2005). En la tabla ME-1, se muestra la secuencia de los cebadores para la amplificación de *Mi-1*.

Tabla ME-4.1. Cebadores utilizados para la ampliación de *Mi-1* (El Mehrach *et al.*, 2005).

Gen	Nombre del cebador	Secuencia
<i>Mi-1</i>	PMiF3	5'-GGTATGAGCATGCTTAATCAGAGCTCTC-3'
	PMiR3	5'-CCTACAAGAAATTATTGTGCGTGTGAATG-3'

4.5.4. Electroforesis

Los fragmentos de DNA se separaron mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1-1,5% (p/v) sumergidos en Tampón de electroforesis TAE 1X (Tris básico, Ácido acético glacial y 0,5 M EDTA pH 8). Las muestras se mezclaron con un tampón de carga [azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilano cianol FF 0,25% (p/v) y sacarosa en H₂O_{ad} 40% (p/v)]. Se utilizó un voltaje de 60 V en cubetas de electroforesis Sub-Cell® GT o Mini-Sub® Cell GT (BioRad), en función del número de muestras a analizar.

4.5.4.1. Revelado de geles y fotografías

Los geles de agarosa se revelaron utilizando un baño de agua al que previamente se añadieron unas gotas de una solución concentrada de bromuro de etidio (1 mg/ml). Se mantuvieron durante 15-20 minutos y se lavaron en un baño de agua durante 5 minutos antes del revelado. Las fotografías de los geles se realizaron utilizando una videocámara acoplada al transiluminador (E-Box-1000/20M) y empleando el software E-Capt (incluido en el sistema E-Box).

4.5.4.2. Estimación de los fragmentos amplificados

En los geles de DNA se empleó un patrón de bandas de marcadores moleculares (GeneRuler™ 100bp DNA ladder plus, ready-to-use, Fermentas) a una concentración final de 200 ng.

En plantas susceptibles, sin el gen *Mi-1*, se espera observar una banda de aproximadamente 350 pb, mientras que en plantas resistentes, que contienen dicho gen, se espera observar una banda de alrededor de 550 pb. En plantas heterocigóticas para este gen, se espera observar ambas bandas (Figura ME-5).

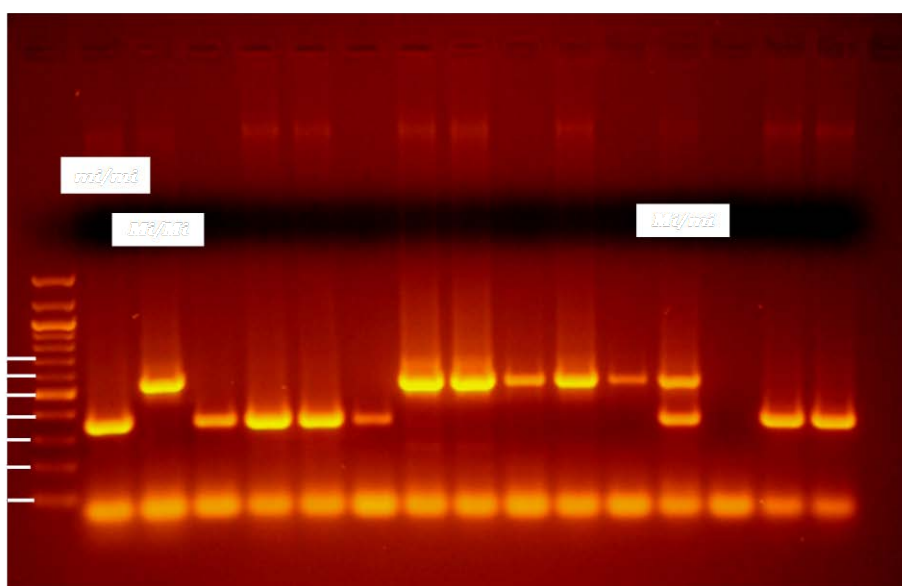


Figura ME-4.5. Genotipado del locus *Mi* en una población seleccionada por el gen *Mi-1* utilizando PCR y los cebadores PMiF3 y PMiR3.

4.6. Análisis de la expresión génica

Con el fin de evaluar los cambios en la expresión génica (es decir, el silenciamiento, en su caso) de las plantas utilizadas en este estudio, se realizó la extracción de RNA total de los folíolos que se habían recogido individualmente en los bioensayos de infestación con *B. tabaci*. Estos folíolos conservados a -80°C fueron triturados utilizando el sistema Silamat® S6 (Ivoclar Vivadent) cuya agitación permite a las bolitas de vidrio, introducidas en los tubos Eppendorf, triturar el material vegetal hasta quedar un fino polvo. Las muestras trituradas se sumergieron en nitrógeno líquido hasta el momento de comenzar la extracción.

A continuación se describe el proceso de extracción de RNA total, la síntesis de cDNA a partir del RNA extraído de las muestras y la amplificación de dicho cDNA.

4.6.1. Extracción de RNA total

La extracción del RNA total de las hojas se realizó utilizando Trizol (Invitrogen), según protocolo del fabricante que consta de tres fases: una primera fase compuesta por 5 pasos (homogeneización, separación, precipitación, lavado y disolución); una segunda fase durante la cual se realizó un tratamiento con DNAsas para eliminar cualquier rastro que pudiese degradar el RNA, y la última fase en la que se llevó a cabo la reextracción del RNA empleando fenol/cloroformo.

4.6.1.1. Primera fase de extracción del RNA total

Homogeneización

Se añadió 1 ml de Trizol a cada tubo conteniendo una muestra triturada, mezclando bien por vórtex y manteniendo los tubos en hielo. Se centrifugaron a 12.000 rpm a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 2 ml utilizando pipeta.

Separación

El sobrenadante se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente (15-30°C) para permitir la completa disociación del complejo nucleoproteico. A continuación, se añadieron 200 µl de cloroformo y se agitaron los tubos enérgicamente con la mano durante 15 segundos. Se incubaron durante 5 minutos en hielo y seguidamente se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm a 4°C durante 15 minutos. La capa superior se transfirió a un nuevo tubo de 2 ml utilizando pipeta y se añadió un volumen de cloroformo (~0,5 ml). Se agitó manualmente y centrifugó a 12.000 rpm a 4°C durante 15 minutos.

Precipitación

La capa superior se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml y se añadió un volumen (0,5 ml aprox.) de Isopropanol frío para favorecer la precipitación. Se incubaron las muestras durante 20 minutos a 4°C, en hielo. A continuación, se centrifugaron a 12.000 rpm a 4°C durante 20 minutos.

Lavado

El sobrenadante se eliminó utilizando una pipeta y se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 70% mezclando suavemente por inversión. Se añadió un volumen 1/10 de Sodio acetato (NaOAc) para retener el RNA y se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C durante 5 minutos. Se eliminó el etanol y se secó el pellet durante 10-15 minutos manteniendo los tubos en hielo con la tapa abierta.

Disolución

El pellet se resuspendió en 35 µl de H₂O_{dd}-DEPC y se dejó enfriar en hielo durante 15-30 minutos. Posteriormente, se incubó durante 10 minutos a 55-60°C en un baño de agua para ayudar a disolver el pellet. Por último, se mantuvo en hielo durante 10 minutos como mínimo.

4.6.1.2. Tratamiento con DNAsas

En primer lugar se midió la concentración del RNA extraído en un *Nanodrop 1000* (Thermo Fisher Scientific; Wilmington, USA) (ver apartado 5.2) empleando como blanco la solución en la que se habían resuspendido las muestras, en este caso, H₂O_{dd}-DEPC.

Se trataron 20 µg del RNA extraído con 2 µl DNasa RQI (Promega) y 20 µl tampón 10X en un volumen final de 200 µl. Se incubó la mezcla durante 30 minutos a 37°C y, a continuación, se mantuvo en hielo durante al menos 5 minutos.

4.6.1.3. Reextracción de RNA con Fenol/Cloroformo

Al RNA tratado con DNAsas se añadió un volumen igual al que había en el tubo Eppendorf (aproximadamente 200 µl) de una mezcla 25/24/1 de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y se mezcló utilizando vórtex. Se mantuvieron los tubos durante 5 minutos en hielo y se centrifugaron a 14.000 rpm a 4°C durante 15 minutos. La fase superior se transfirió a un nuevo tubo y se volvió a repetir el proceso anterior desde la adición de la mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. El sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo, se le añadió un volumen igual al que había en el tubo Eppendorf (aproximadamente 200 µl) de una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24/1) y se centrifugaron los tubos a 14.000 rpm a 4°C durante 15 minutos.

De nuevo, la fase superior se transfirió a otro tubo Eppendorf de 1,5 ml y se le añadió una décima parte de su volumen de NaOAc 3M pH5.2 y dos volúmenes de etanol al 100%. Se mantuvieron los tubos durante una hora a -20°C. A continuación, se centrifugaron a 14.000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Se eliminaron los restos de etanol utilizando una pipeta. Se lavó una vez más el pellet con etanol al 70% mezclando por inversión los tubos y se eliminó nuevamente el etanol. El pellet se secó durante aproximadamente 15 minutos en hielo con el tubo abierto y se resuspendió en 10-20 μ l de H₂O-DEPC.

Se midió de nuevo la concentración de RNA total de las muestras en el *Nanodrop* y solamente se utilizaron 5 μ g del RNA total extraído para sintetizar el cDNA. El resto del RNA total se almacenó a -80°C.

4.6.2. Síntesis de cDNA

En un tubo Eppendorf de 0,5 ml se depositaron 5 μ g del RNA total extraído. Se añadió 1 μ l de dNTP y 1 μ l de poly dT (12-18) y se llevó hasta un volumen final de 20 μ l. Se calentó la mezcla durante 5 minutos a 65°C en el termociclador y luego se incubó en hielo durante al menos 1 minuto. Los tubos se centrifugaron durante aproximadamente 5 segundos en una microcentrífuga y se añadió a cada tubo 4 μ l de tampón 5X, 1 μ l de DTT 0,1M y 1 μ l de enzima transcriptasa inversa (Superscript II, Invitrogen). Se mezcló suavemente con la pipeta y se realizó una segunda centrifugación corta, como la anterior.

Las muestras se incubaron durante 60 minutos a 50°C en el termociclador y, posteriormente, a 70°C durante 15 minutos para inactivar la reacción. El cDNA obtenido se conservó a una temperatura de -20°C hasta el momento de su amplificación.

4.6.3. Amplificación de cDNA

El cDNA sintetizado fue amplificado mediante PCR para el análisis semi-cuantitativo y aquellas muestras con mayor interés fueron amplificadas posteriormente mediante qRT-PCR (qPCR) que ofrece un análisis de la expresión relativa de los genes estudiados.

4.6.3.1. Amplificación de cDNA mediante PCR semi-cuantitativa

En este trabajo se programó el termociclador con un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de un número variable de ciclos de tres pasos: desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, unión al cebador a 60°C durante 45 segundos, y extensión a 72°C durante 1 minuto. Para la amplificación de *Mi-1* se realizaron 35, 40, 45 y 50 ciclos (Li *et al.*, 2006) mientras que para la amplificación de *Hsp90-1* se utilizaron 21, 24, 27, 30 y 35 ciclos (Bhattacharai *et al.*, 2007). Se empleó como control la expresión del gen endógeno *Ubi3* que ya había sido utilizado en trabajos anteriores de VIGS (Li *et al.*, 2006; Bhattacharai *et al.*, 2007).

Mediante esta PCR semicuantitativa se amplificó el cDNA extraído de folíolos de plantas Moneymaker y Motelle infiltradas con el vector vacío (pTRV2-‘vacío’), así como de plantas Motelle silenciadas para el gen *Mi-1* o para el gen *Hsp90*, seleccionando aquellos folíolos en los que el número de huevos de *B. tabaci* fue superior al observado en plantas Motelle no silenciadas pero infiltradas con el vector vacío.

Los cebadores empleados para cada gen se detallan en la Tabla ME-2.

Tabla ME-4.2.- Cebadores utilizados para la amplificación de los distintos fragmentos.

Gen	Nombre del cebador	Secuencia	Referencia
<i>Mi-1</i>	VIGS-F	5'-CTTGCGTCTACTGACTCTTTCC-3'	Li et al. (2006)
	C2S4	5'-CTAAGAGGAATCTCATCACAGG-3'	
<i>Hsp90-1</i>	HSP90-F	5'-TTGAGGAGACTGAAGATGAGAAG-3'	Bhattacharai et al. (2007)
	HSP90-R	5'-CATGTCCAGATGGTGGAGCTGAG-3'	
<i>Ubi3</i>	Ubi3-dir	5'-GAAAACCCTAACGGGGAAG-3'	Li et al. (2006)
	Ubi3-rev	5'-GCCTCCAGCCTTGTGTAAA-3'	

Las correspondientes electroforesis y revelado de geles se realizaron como se detalla en otro apartado anterior (5.4).

4.6.3.2. Amplificación de cDNA mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR o qPCR)

Las muestras previamente amplificadas por PCR semi-cuantitativa, con mayor interés y que confirmaron el silenciamiento de los genes empleados en el estudio, se cuantificaron utilizando qPCR. Este procedimiento permite la cuantificación de la concentración de cDNA presente en una muestra, empleando una sonda que emite fluorescencia (SYBR Green®) cuando está unida al ácido nucleico.

La cuantificación de las muestras se llevó a cabo en el sistema 7900HT Fast Real Time PCR (Applied Biosystems) del Servicio de Genómica del Instituto “Albert Sols” (<http://www.iib.uam.es/portal/web/genomica>) y se utilizó la *Ubiquitina* como gen endógeno control de la cuantificación. Se emplearon dos muestras biológicas (foliolos) por tipo de planta y cada una de las reacciones de qPCR se realizó por triplicado para cada muestra biológica. Se analizaron aquellos foliolos de plantas Motelle silenciadas para el gen *Mi-1* o el gen *Hsp90* en los que el número de huevos de *B. tabaci* fue superior a lo observado en foliolos de plantas Motelle no silenciadas pero infiltradas con el vector vacío (pTRV2-‘vacío’). También se analizaron foliolos de plantas Moneymaker como control. Las condiciones de la qPCR fueron de 10 minutos a 95°C seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Por último se realiza la curva de disociación durante 15 segundos a 95°C seguidos de 15 segundos a 60°C y, finalmente, 15 segundos a 95°C.

Los cebadores empleados en este estudio se diseñaron específicamente utilizando el programa *Primer Express*® (Applied Biosystems) y la especificidad de éstos se comprobó en las bases de datos SGN y NCBI. Los cebadores se detallan en la Tabla ME-3.

Tabla ME-4.3.- Cebadores diseñados y utilizados para la cuantificación por qRT-PCR de los distintos fragmentos.

Gen	Nombre del cebador	Secuencia
Mi-1	Mi-RT-F	5'-AGAGGAGGGAACGATCTTCAGA-3'
	Mi-RT-R	5'-AAGCAAAGTTCAACCAAAATGCT-3'
Hsp90-1	HSP90-RT-F	5'-TAGCCTTGATGAGCCAAACACA-3'
	HSP90-RT-R	5'-CGATACTCAGACCAAGCTTCAGC-3'
Ubi3	Ubi3-RT-F	5'-TGTGGGCTCACCTACGTTTACA-3'
	Ubi3-RT-R	5'-CTGATAGAGCATTGCTAAACATTAATC-3'

A partir de los datos obtenidos se calculó la expresión relativa de cada gen empleando el método $\Delta\Delta C_T$ comparando los datos con el gen de referencia (*Ubi3*). Por último, se calculó la media de los triplicados y el error asociado. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el test de Tukey para comparar todas las muestras entre sí.

5. Metodología específica del análisis del transcriptoma de plantas de tomate.

Se procede a la descripción de la metodología específica empleada en este capítulo en el que se ha analizado el transcriptoma del tomate mediante microarrays con el fin de profundizar en el conocimiento de la reprogramación transcriptional ocurrida durante la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*.

5.1. Condiciones de cultivo.

Se empleó la variedad susceptible Moneymaker (*mi-1/mi-1*) y la variedad resistente Motelle (*Mi-1/Mi-1*). Se utilizaron plantas de 8 semanas de edad crecidas en condiciones controladas a 25°C constantes, 16:8 (L:O), 70% H.R.

5.2. Diseño experimental.

Se colocaron 3 tubos tipo Falcon modificados (ver Metodología general) en cada planta, siempre en folíolos bien desarrollados que estuviesen en hojas de la zona media-alta de la planta (Figura ME-5.1).



Figura ME-5.1. Plantas de tomate de 8 semanas de edad crecidas a 25°C constantes, 16:8 (L:O), conteniendo 3 tubos tipo Falcon modificados para la infestación con hembras adultas de *B. tabaci* en ensayo de no elección.

Basándose en la duración de las distintas fases del desarrollo de *B. tabaci* a 25°C según Bonato et al. (2007), se establecieron dos tomas de muestras:

- 2 dpi: a los dos días de la introducción de las hembras en los tubos, cuando encontraríamos huevos y, por tanto, se podría valorar el efecto de la alimentación de las hembras y su oviposición.

- 12 dpi: a los doce días post-infestación, cuando la mayor parte de los individuos presentes estarían en fase N1, única fase móvil, en la que el insecto va inyectando el estilete en distintos puntos de la hoja hasta encontrar el lugar adecuado para fijarse y continuar su desarrollo.

Para el análisis a los 2 dpi, se utilizaron 12 plantas de la variedad Motelle de las cuales 6 fueron infestadas y 6 permanecieron como controles (sin infestar). Por otro lado, se emplearon 18 plantas de la variedad Moneymaker de las cuales 6 fueron infestadas con hembras adultas de *B. tabaci* y 6 no fueron infestadas para utilizarse como controles. Otras 6 fueron tratadas con Bion® (Syngenta Agro S.A.), una solución que contiene el 50% de su ingrediente activo, benzo[1,2,3]thiadiazole-7-carbothioic acid-S-methyl ester (BTH). Se trataron tres folíolos bien desarrollados, de cada planta, con seis gotas de 10 µl de 0.2 g/L de BION (0.1 g/L de BTH) por folíolo. Tras la absorción del producto por los folíolos, se colocaron los tubos tipo Falcon y 3 de ellas fueron infestadas con las hembras adultas de *B. tabaci* y las otras 3 se utilizaron como controles del BTH. Para el análisis a los 12 dpi, se emplearon 12 plantas de cada variedad, de las cuales 6 plantas de cada variedad fueron infestadas mientras que las otras 6 fueron utilizadas como controles.

Para que las condiciones fuesen las mismas se colocaron tubos tipo Falcon en todas las plantas, aunque no todas fueron infestadas. Las plantas controles (no infestadas) permanecieron con los tubos tipo Falcon durante 2 días. Los tubos conteniendo 30 hembras adultas seleccionadas utilizando el método de bomba de vacío (ver Metodología general) se mantuvieron también durante 2 días, incluyendo las plantas a analizar a los 12 dpi. Paralelamente, se infestaron otras plantas para verificar la eficacia de las infestaciones y controlar el desarrollo de *B. tabaci* para asegurarse de que las tomas de muestra coincidiesen con los estados de desarrollo establecidos para este trabajo, y se comprobó estadísticamente la existencia de diferencias significativas en el número de individuos entre ambas variedades.

A los 2 dpi se retiraron todos los tubos tipo Falcon, conteniendo o no a las hembras de *B. tabaci*. Se observaron detenidamente todas las hojas de cada planta para asegurar que se quedaban libres de hembras adultas. Se recogieron 3 réplicas biológicas conteniendo 6 folíolos infestados de diferentes plantas de la misma variedad y 3 réplicas biológicas de folíolos no infestados

(controles) de diferentes plantas de la misma variedad. En el caso de las plantas Moneymaker tratadas con BTH se obtuvieron 3 réplicas biológicas compuestas por 3 folíolos infestados de plantas tratadas y 3 réplicas de folíolos de plantas tratadas pero no infestadas. Las plantas utilizadas a los 2 dpi fueron eliminadas tras la recogida del material. A los 12 dpi, se procedió a la recogida del material de ambas variedades de igual forma que a los 2 dpi. Se recogieron 3 réplicas biológicas conteniendo 6 folíolos infestados de plantas diferentes y 3 réplicas biológicas de folíolos no infestados (controles) para cada variedad.

El material recogido a los 2 y 12 dpi fue congelado rápidamente en nitrógeno líquido y conservado a -80°C hasta el momento de realizar la extracción de RNA y análisis de microarrays.

5.3. Procesamiento de las muestras y adquisición de los datos

La extracción de RNA y el análisis de microarrays fueron encargados a la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) del CSIC. La extracción de RNA se realizó utilizando Trizol y se trituraron las muestras utilizando mortero. La integridad del RNA extraído se determinó por medio del Bioanalyzer 2100.

Tras esta comprobación, se llevó a cabo la hibridación y análisis de los GeneChips® de análisis de expresión génica usando los chips con sondas 3'. Se utilizaron los microarrays de Affymetrix que se obtienen mediante la síntesis de oligonucleótidos de 25 bases de longitud utilizando la técnica de fotolitografía sobre una superficie de cuarzo. Las muestras de RNA se marcaron con biotina y cada muestra se hibridó en un array independiente. Para su procesamiento en la Unidad de Genómica (CNB-CSIC) se utilizó la Plataforma GeneChip® Scanner 3000 7G System de Affymetrix® que incluye la Estación de fluidos modelo 450, así como el escáner GeneChip® modelo "3000 7G" para la captura de la imagen ([Genómica CNB-CSIC](#)). Estos microarrays se emplean para determinar qué genes se expresan en una muestra por la detección de fragmentos específicos de mRNA. Este análisis permite la selección de genes que se expresan diferencialmente por comparación entre distintas condiciones, por ejemplo en nuestro caso, entre plantas con y sin el gen *Mi-1*, infestadas y no infestadas con *B. tabaci*, tratadas y no tratadas con

BTH. Tras el análisis, los datos fueron enviados a nuestro laboratorio para su interpretación y validación.

5.4. Métodos bioinformáticos y estadísticos para la interpretación de datos obtenidos por microarrays

El análisis bioinformático de los datos obtenidos por microarrays se llevó a cabo a través de BABELOMICS (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>) (Medina et al., 2010). Se aplicó la corrección RMA (Irizarry et al., 2003) para eliminar ruido de fondo de las imágenes obtenidas por los escáneres, se normalizó el nivel de expresión por cuantiles y se transformaron los datos de expresión a una escala log₂. A través de este programa, se seleccionaron los genes diferencialmente expresados con cambios de, al menos, el doble o la mitad en su nivel de expresión (Expresión Relativa o $ER \geq 2$ ó ≤ -2 para genes sobreexpresados o reprimidos, respectivamente). Además, entre estos genes sólo se consideraron aquellos con una reducida Tasa de Falsos Descubrimientos (False Discovery Rate o FDR) representada por un nivel de significación corregido $p < 0,05$.

Para comparar las listas de genes previamente seleccionados y determinar los genes comunes entre ellas, se utilizó el programa VENNY ([VENNY CNB-CSIC](#)) (Oliveros, 2007).

La anotación de los identificadores de Affymetrix se realizó a través de TFGD (Tomato Functional Genomics Database, <http://ted.bti.cornell.edu/>) (Fei et al., 2006) empleando el GenBank como base de datos.

El análisis funcional de los genes diferencialmente expresados se realizó mediante el programa MAPMAN, que ha desarrollado su propia anotación funcional (BIN) y que clasifica los genes por rutas metabólicas y mapas generales (Thimm et al., 2004) empleando la ontología de solanáceas incluida en el programa (Urbanczyk-Wochniak et al., 2006). Con el fin de facilitar la interpretación de los estudios de interacciones bióticas, Mapman fue actualizado para implementar un nuevo mapa que muestre las respuestas de la planta al estrés biótico (Rotter et al., 2007). Estos términos están redactados en inglés por lo que, para evitar posibles confusiones por la traducción al español, en este trabajo se ha mantenido la nomenclatura original en inglés. A través de Mapman se identifican todos los procesos biológicos que se encuentran representados en una lista de genes; aquellos

que no pueden ser identificados el programa los agrupa en la categoría *unknown* (desconocida). En cambio, si identifica la función de un gen pero no la puede asignar a una categoría concreta, lo incluye en la categoría *miscellaneous* (miscelánea).

5.5. Validación de datos

El análisis de microarray, aún con todo su poder analítico, presenta ciertas limitaciones. Este es el motivo de utilizar un método alternativo de estudio de la expresión génica para confirmar los resultados obtenidos por microarray. Para validar los resultados obtenidos en el análisis del microarray se comprobó la expresión de 12 genes diferencialmente expresados a los 12 dpi con distinto nivel de expresión en la interacción incompatible (Motelle) y la interacción compatible (Moneymaker). La validación se llevó a cabo mediante la qRT-PCR. De igual modo que otras técnicas, la qRT-PCR requiere de normalización de la expresión génica a partir de la expresión estable (constante) de genes endógenos (Yan and Liou, 2006; Paolacci et al., 2009). En este estudio se empleó como gen endógeno el que codifica la Ubiquitina.

A continuación se detallan las secuencias de los cebadores especialmente diseñados para este análisis (Tabla ME-5.1).

Tabla ME-5.1. Cebadores empleados para la validación de genes mediante qRT-PCR diferencialmente expresados en microarrays. Se empleó el gen de la Ubiquitina como gen endógeno.

Identificador Affymetrix	Nombre del cebador	Secuencia
Les.2325.1.S1_at	2325-RT-F	5'-TGTGGCGTGGGCCTTAAT-3'
	2325-RT-R	5'-ATTTGAAACGAAACGAGATGAAACA-3'
Les.2591.1.S1_at	2591-RT-F	5'-GGACATTACTAATAGCACTGCTTCTTCA-3'
	2591-RT-R	5'-ACGAATTTATTTGGTGTTCATACA-3'
Les.2121.1.A1_at	2121-RT-F	5'-GCCTCTTCAAGCTTCCTATTAAGC-3'
	2121-RT-R	5'-AACTCATCAAGTGAACATAAAACCAGATT-3'
Les.4008.1.S1_at	4008-RT-F	5'-ACCACCAGCACAAAGACGAATC-3'
	4008-RT-R	5'-TTATACAATGCAAGACTGAACTCCAA-3'
Les.4026.1.S1_at	4026-RT-F	5'-AGCATCAAGATTGGGATTCACA-3'
	4026-RT-R	5'-AACTTATGTCCACACTACCTAATCAATTG-3'
Les.4150.1.S1_at	4150-RT-F	5'-AGGCGGAGATGAAGAATGGA-3'
	4150-RT-R	5'-AAAACATCCTTCCTTTCTTCTTGCT-3'
Les.45.1.S1_at	45-RT-F	5'-GGTTGTTTTTGTCCATGTTGTT-3'
	45-RT-R	5'-TCTCATCACTTGAGGGCATCTC-3'
LesAffx.286.2.S1_a_at	286-RT-F	5'-TGCTGAATTTTTATCAACTCGTTGT-3'
	286-RT-R	5'-CAAAAGCCGTCCGAATAAACA-3'
Les.3739.1.S1_at	3739-RT-F	5'-GGTCCTAAAGTTGTGTCTATTGAGAGTAAA-3'
	3739-RT-R	5'-TCATACACATACCACAGAGAGAAACAGA-3'
Les.3581.1.S1_at	3581-RT-F	5'-CCCAAAACAATTGAGGTGAAAGT-3'
	3581-RT-R	5'-TTCTACTACATCATACCACAAACCATCA-3'
Les.3677.1.S1_at	3677-RT-F	5'-TGGTCAGCTAAGAGCTATGGAAAAT-3'
	3677-RT-R	5'-TAACCTCAGCCTTAATCTTTTCAAAGT-3'
Les.12.1.S1_at	12-RT-F	5'-ACTGAGTTTTTGCAGTGATGTGTAGTT-3'
	12-RT-R	5'-AAAACACCAACCAGAACAAAACG-3'
Gen endógeno (Ubi3)	Ubi3-RT-F	5'-TGTGGGCTCACCTACGTTTACA-3'
	Ubi3-RT-R	5'-CTGATAGAGCATTGCTAAACATTAATAATC-3'

Para establecer la posible correlación entre los datos obtenidos por ambos métodos de cuantificación se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) mediante el programa GraphPad Prism (version 4,00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Este coeficiente establece una medida del grado de asociación lineal entre las dos variables. Los valores de (r) oscilan entre -1 y +1 siendo $r = 1$ una correlación perfecta positiva entre ambas variables y $r = -1$ una correlación perfecta negativa. Para poder comparar ambos grupos de datos se transformaron a una escala logarítmica los obtenidos mediante qRT-PCR puesto que los datos del microarray estaban expresados en escala \log_2 . El programa calcula además el coeficiente de determinación (r^2), que establece una proporción de variabilidad compartida o explicada para ambas variables, y el p-valor para establecer si la correlación entre ambas variables es estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Efecto del desarrollo de la planta en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a *B. tabaci*.

En primer lugar, se presentan los resultados obtenidos en el estudio realizado con diferentes edades de plantas para demostrar si existe una relación entre la edad de la planta y la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*. En segundo lugar, se exponen los resultados relativos al estudio realizado con plantas de la misma edad pero diferente tamaño con el fin de mostrar si la resistencia mediada por *Mi-1* es dependiente del tamaño de las plantas.

1. Influencia de la edad de la planta en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* frente a *B. tabaci*

Se exponen en primer lugar los resultados obtenidos en el bioensayo de libre elección y, a continuación, los relativos al bioensayo de no elección.

1.1. Bioensayos de libre elección

1.1.1. Infestación diaria

El primer día de recuento se contabilizaron un total de 4149 adultos de *B. tabaci* distribuidos en las plantas, disminuyendo hasta 1471 el día 19. El día 20 aumentó el total de adultos contabilizándose 1713 individuos y esta tendencia se confirmó al día siguiente (día 21) con el recuento de 2916 adultos.

Tal y como se puede observar en la Figura R1.1, el número medio diario de adultos de *B. tabaci* en las plantas de 8 semanas de edad fue claramente superior en las plantas susceptibles, Moneymaker, que en las resistentes, Motelle. En las plantas de 5 semanas de edad se observó que el número medio de adultos fue superior en Moneymaker, aunque las diferencias entre ambos cultivares no eran muy pronunciadas. En las de 3 semanas de edad ese número fue similar durante la mayor parte de los 21 días de recuento e, incluso en algunos días, era superior en Motelle que en Moneymaker.

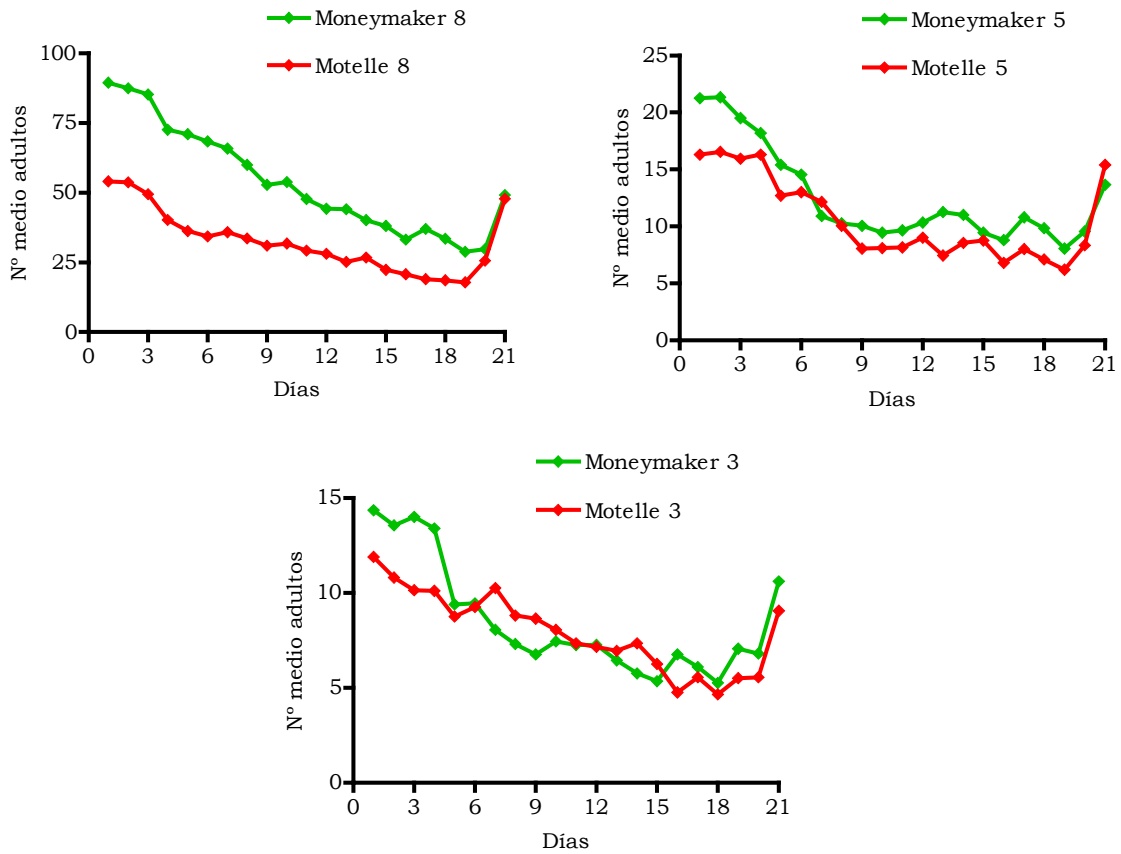


Figura R1.1. Número medio diario de adultos de *B. tabaci* en plantas de 8, 5 y 3 semanas de edad de las variedades Moneymaker y Motelle. Se emplearon 20 plantas de cada edad y variedad.

A partir de estos datos, se calculó la media diaria del número de adultos en plantas de cada variedad por edades (Figura R1.2).

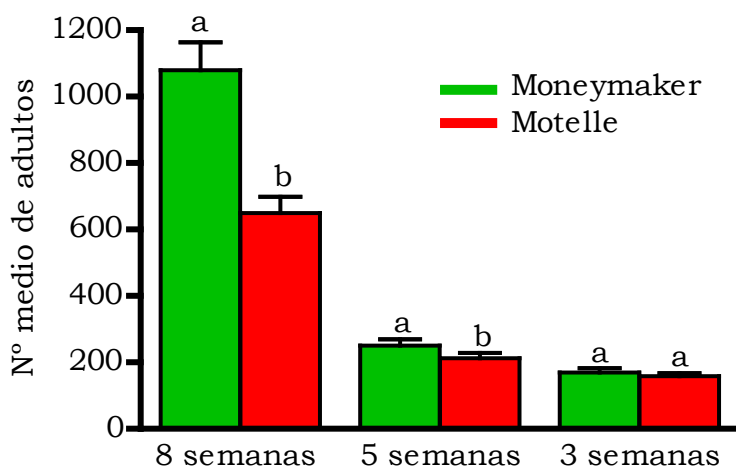


Figura R1.2. Número medio diario de adultos de *B. tabaci* presentes en plantas de 8, 5 y 3 semanas de edad en las variedades Moneymaker y Motelle. Letras distintas en plantas de la misma edad indican que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Para el cálculo se tuvieron en cuenta los 21 días de recuento.

El número de adultos en las plantas de mayor edad (8 semanas) fue significativamente mayor ($p=0,000$) en Moneymaker que en Motelle. En las plantas de 5 semanas de edad se obtuvo un resultado similar pero con un nivel de significación menor ($p=0,046$) y en las de 3 semanas de edad no se encontraron diferencias significativas ($p=0,907$) entre ambas variedades de tomate.

1.1.2. Porcentaje de plantas infestadas

Debido a que todas las plantas fueron infestadas, se decidió calcular, para cada día, el porcentaje de plantas de cada edad y cultivar infestadas con un número de adultos igual o superior a la media obtenida en todas las plantas ($n=120$) en ese día (Figura R1.3).

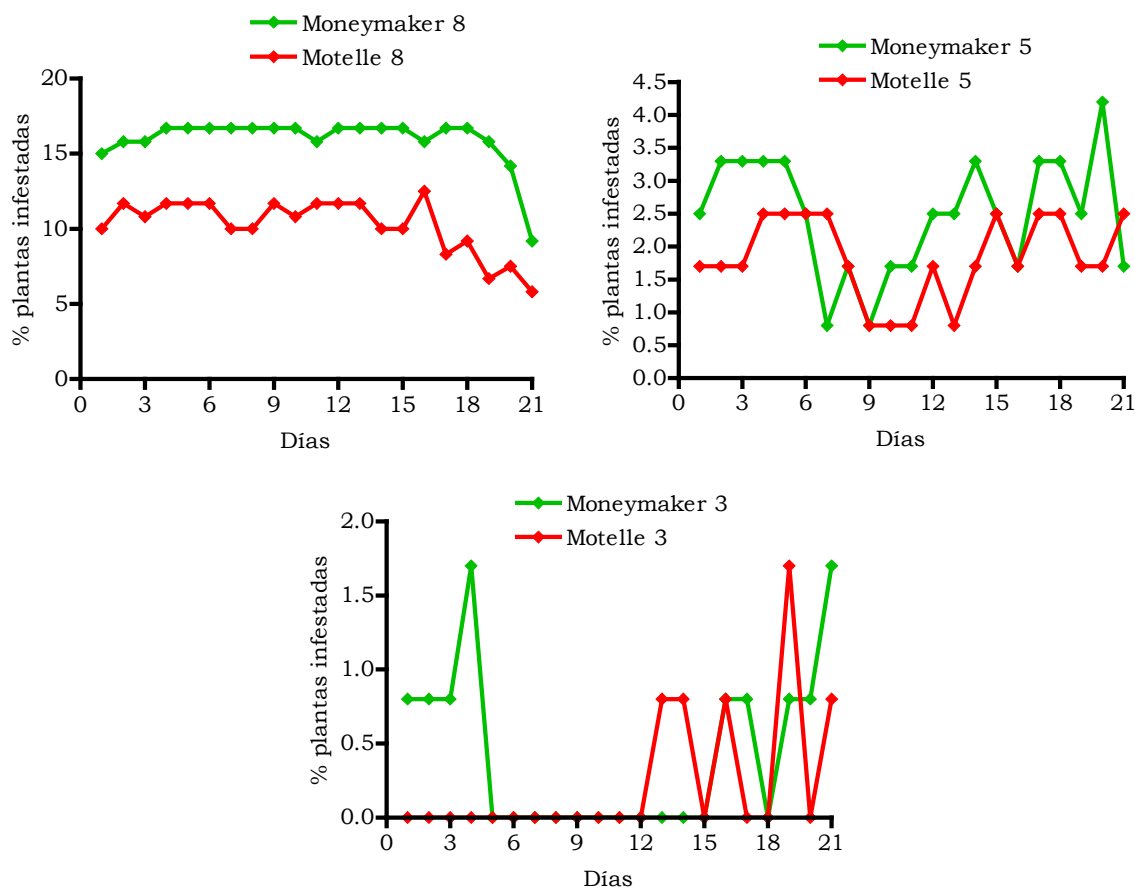


Figura R1.3. Porcentaje diario de plantas de 8, 5 y 3 semanas de edad infestadas con un número de adultos de *B. tabaci* igual o superior a la media diaria de adultos por planta.

Como se aprecia en la Figura R1.3, en las plantas de 8 semanas se observó siempre un mayor porcentaje de infestación en Moneymaker que en

Motelle. Estos porcentajes fueron prácticamente constantes a lo largo del tiempo en ambas variedades, disminuyendo durante los últimos días de recuento. En las de 5 semanas se obtuvieron valores ligeramente más elevados en Moneymaker que en Motelle. No obstante, los porcentajes de infestación fueron muy irregulares en el tiempo cuando las plantas tenían 5 y 3 semanas de edad, de forma más acusada en estas últimas.

En la Figura R1.4 se muestran los valores medios del porcentaje de plantas infestadas, calculados a partir de los datos anteriores.

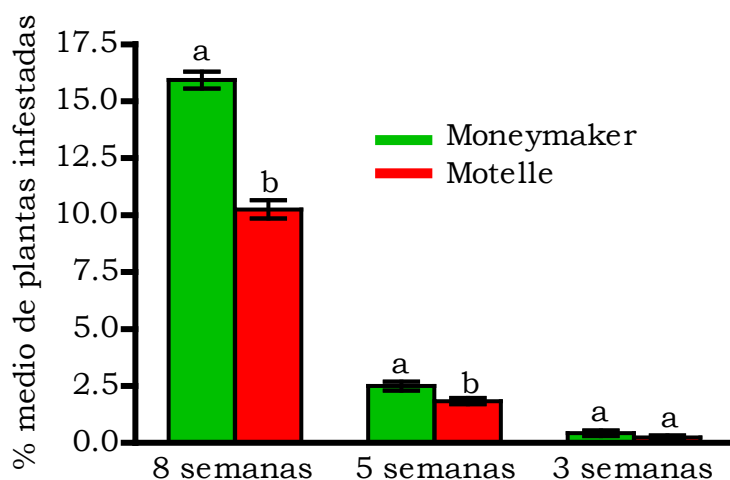


Figura R1.4. Porcentaje medio de plantas infestadas con un número de adultos de *B. tabaci* igual o superior a la media diaria de adultos por planta. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) mediante el test de Tukey.

Al comparar las medias en Moneymaker y Motelle para plantas de 8 semanas, se hallaron diferencias altamente significativas ($p=0,000$). Sin embargo, en plantas de 3 y 5 semanas, las diferencias entre ambas variedades no fueron estadísticamente significativas ($p=0,764$ y $p=0,306$, respectivamente).

1.1.3. Niveles finales de infestación

En la Tabla R1.1 se presentan los resultados del recuento realizado al final del experimento, cuando ya habían emergido los adultos de la siguiente generación.

Tabla R1.1. Número medio (\pm error estándar) de pupas y nuevos adultos (sacos pupales vacíos) de *B. tabaci* presentes en plantas de 8, 5 y 3 semanas de edad de las variedades de tomate MoneyMaker y Motelle ($n=20$ para cada edad y variedad). Letras distintas dentro de la misma edad indican diferencias significativas ($p<0,05$) mediante el test de Tukey.

Edad (semanas)	Genotipo	
	MoneyMaker	Motelle
8	1958,40 \pm 347,25 a	1158,60 \pm 245,93 b
5	432,50 \pm 81,07 a	333,00 \pm 71,30 a
3	226,00 \pm 19,86 a	209,80 \pm 32,47 a

Se constata que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el número de pupas y nuevos adultos entre ambas variedades en las plantas de 3 y 5 semanas ($p=0,940$ y $p=0,698$, respectivamente). En plantas de mayor edad (8 semanas), se observó una evidente superioridad estadísticamente significativa ($p=0,015$) en las plantas susceptibles (MoneyMaker) en relación al número contabilizado en las resistentes (Motelle).

1.2. Bioensayos de no elección

1.2.1. Infestación inicial

En la Figura R1.5 se observa que la media de huevos presente en MoneyMaker es siempre superior a la media de huevos en Motelle, para las tres edades.

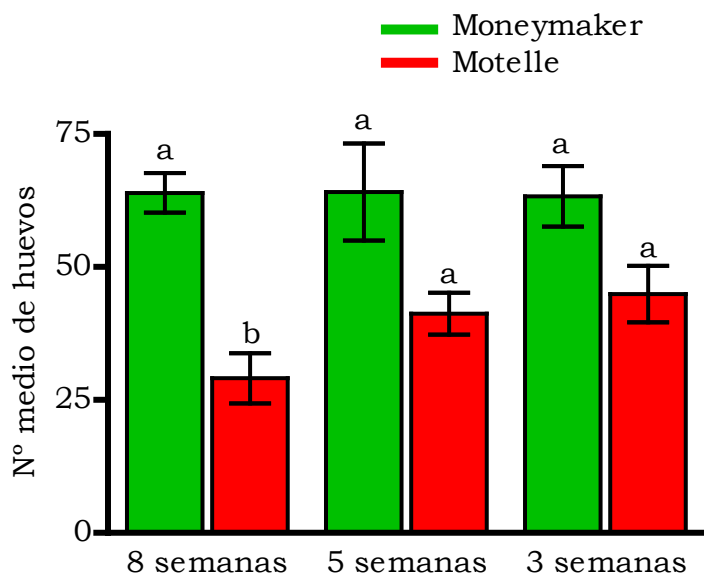


Figura R1.5. Número medio de huevos de *B. tabaci* en plantas de tomate de 8, 5 y 3 semanas de edad de las variedades Moneymaker y Motelle. Letras distintas dentro de la misma edad indican que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) mediante el test de Tukey.

Además, esta media es constante en la variedad Moneymaker, contrariamente a lo que sucede en el cultivar Motelle, en la que la media del número de huevos disminuye a medida que aumenta la edad de la planta. Por lo tanto, la diferencia en las medias entre ambos cultivares se incrementa al aumentar la edad de la planta. Al comparar estadísticamente las medias del número de huevos entre ambas variedades no se obtuvieron diferencias significativas para las plantas de 3 semanas ($p=0,245$) ni para las de 5 semanas ($p=0,077$) pero sí se encontraron diferencias claramente significativas entre ambos cultivares en plantas de 8 semanas ($p=0,001$) para el número medio de huevos.

1.2.2. Infestación final y supervivencia

En la Tabla R1.2 se presentan los resultados del recuento de individuos en fase N3, N4 y adultos (sacos pupales vacíos) realizado a los 27 días de iniciado el experimento. En todos los casos se observó un mayor número de individuos en las plantas de la variedad Moneymaker que en las plantas Motelle. Sin embargo, en plantas de 3 y 5 semanas, la media de individuos en fase N3 fue similar para ambas variedades.

Tabla R1.2. Número medio (\pm error estándar) de individuos N3 y N4 de *B. tabaci*, nuevos adultos y totales (N3+N4+adultos) en plantas de 8, 5 y 3 semanas de edad de las variedades Moneymaker y Motelle. Letras distintas dentro de cada fase de desarrollo y edad de la planta, indican diferencias significativas ($p < 0,05$) mediante el test de Tukey para los parámetros analizados entre ambas variedades de tomate.

Edad (semanas)	Fase de desarrollo	Genotipo	
		Moneymaker	Motelle
8	N3	10,09 \pm 0,93 a	4,69 \pm 0,96 b
	N4	31,55 \pm 1,99 a	9,36 \pm 1,86 b
	Adultos	13,09 \pm 1,50 a	3,77 \pm 0,75 b
	Totales	54,73 \pm 3,70 a	17,21 \pm 3,00 b
5	N3	6,20 \pm 1,03 a	5,80 \pm 0,73 a
	N4	33,50 \pm 4,95 a	16,47 \pm 2,24 b
	Adultos	14,40 \pm 1,57 a	5,43 \pm 0,44 b
	Totales	54,10 \pm 6,99 a	28,33 \pm 3,23 b
3	N3	6,27 \pm 1,04 a	6,70 \pm 1,17 a
	N4	30,55 \pm 2,91 a	19,50 \pm 2,66 a
	Adultos	16,91 \pm 2,66 a	6,90 \pm 0,96b
	Totales	53,73 \pm 5,32 a	33,10 \pm 4,00 b

Únicamente en plantas de 8 semanas de edad se observaron diferencias estadísticamente significativas en todos los estados de desarrollo de *B. tabaci* considerados, N3, N4, adultos y totales ($p=0,002$, $p=0,000$, $p=0,000$ y $p=0,000$, respectivamente) siendo el número de individuos muy superior en Moneymaker que en Motelle. Aunque en plantas de 5 semanas no existieron diferencias significativas en el número de N3 ($p=1,000$), sí hubo significación estadística en N4 ($p=0,002$), adultos ($p=0,001$) y totales ($p=0,003$). En las plantas de menor edad (3 semanas), se encontraron diferencias significativas entre Moneymaker y Motelle en el número medio de adultos ($p=0,000$) y en el número medio de individuos totales ($p=0,032$) pero no en los estadios previos, N3 ($p=1,000$) y N4 ($p=0,094$).

A partir del número total de individuos contabilizados al final del ensayo, se obtuvo la supervivencia de huevos, calculada como el cociente entre el número inicial de éstos y el final de individuos que alcanzaron las últimas fases del desarrollo (N3+N4+adultos). Estos resultados se presentan en la Figura R1.6.

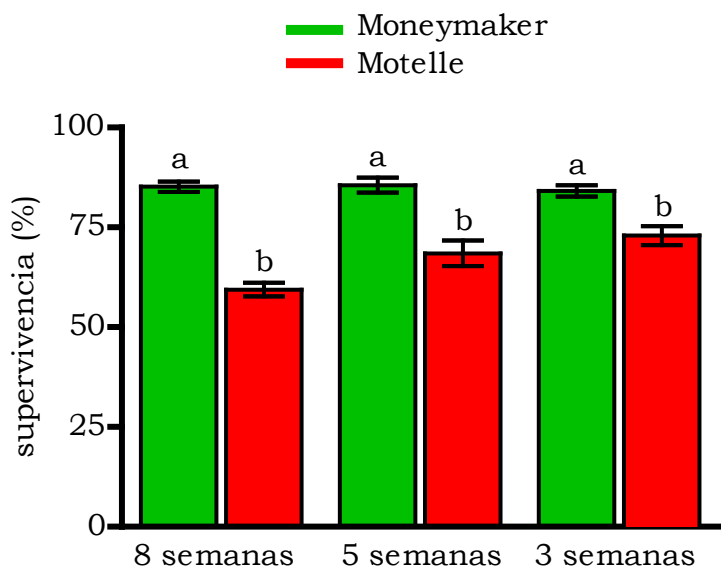


Figura R1.6. Supervivencia (P) de huevos de *B. tabaci* en las variedades Moneymaker y Motelle de plantas de 8, 5 y 3 semanas de edad. Letras distintas para cada edad indican diferencias significativas ($p < 0,05$) mediante el test de Tukey.

El porcentaje de individuos que llegan a las fases N3, N4 y adultos se mantuvo constante en el caso de Moneymaker, independientemente de su edad, mientras que en Motelle este porcentaje disminuía a medida que aumentaba la edad de la planta. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ambas variedades en las plantas de 8, 5 y 3 semanas de edad ($p=0,013$, $p=0,000$ y $p=0,000$, respectivamente).

1.2.3. Crecimiento poblacional

En la Figura R1.7 se presenta el crecimiento poblacional de *B. tabaci* expresado como la tasa intrínseca de crecimiento (r_m) en Moneymaker y Motelle de las tres edades consideradas.

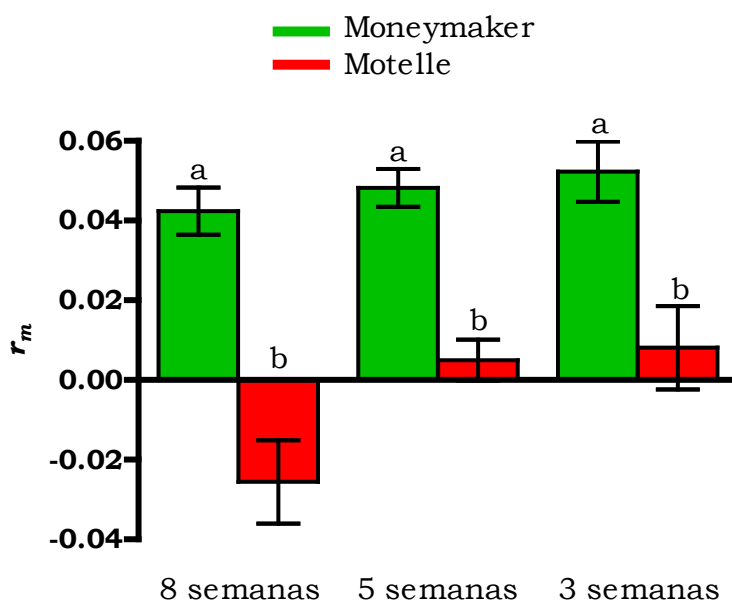


Figura R1.7. Tasa intrínseca media de crecimiento (r_m) de *B. tabaci* en plantas de 8, 5 y 3 semanas de edad en las variedades Moneymaker y Motelle. Letras distintas para cada edad indican diferencias significativas ($p < 0,05$) mediante el test de Tukey.

Se puede observar que los valores medios obtenidos en Moneymaker fueron significativamente mayores que en Motelle, en plantas de 8, 5 y 3 semanas ($p=0,000$, $p=0,003$, $p=0,002$, respectivamente). Al mismo tiempo, en Motelle se observó un incremento de la mortalidad a medida que aumentaba la edad de la planta, alcanzando a las 8 semanas un valor del 42,46%, obteniéndose una tasa de crecimiento negativa muy elevada, indicando un notable decrecimiento de la población en plantas Motelle de mayor edad.

2. Influencia del tamaño de plantas de la misma edad en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* frente a *B. tabaci*

Se presentan en primer lugar los resultados obtenidos en el bioensayo de libre elección y, seguidamente, los correspondientes al bioensayo de no elección.

2.1. Bioensayos de libre elección

2.1.1. Infestación diaria

El primer día de recuento se contabilizaron un total de 4456 adultos de *B. tabaci*, disminuyendo hasta 1132 el día 17. El día 18 aumentó el total de adultos hasta 1391 individuos y esta tendencia se confirmó al día siguiente con un recuento de 2092 adultos.

Como se puede observar en la Figura R1.8, el número medio diario de adultos de *B. tabaci* fue siempre superior en las plantas de la variedad Moneymaker que en las de Motelle aunque las diferencias entre ambos cultivares fueron mayores en las plantas grandes que en las pequeñas.

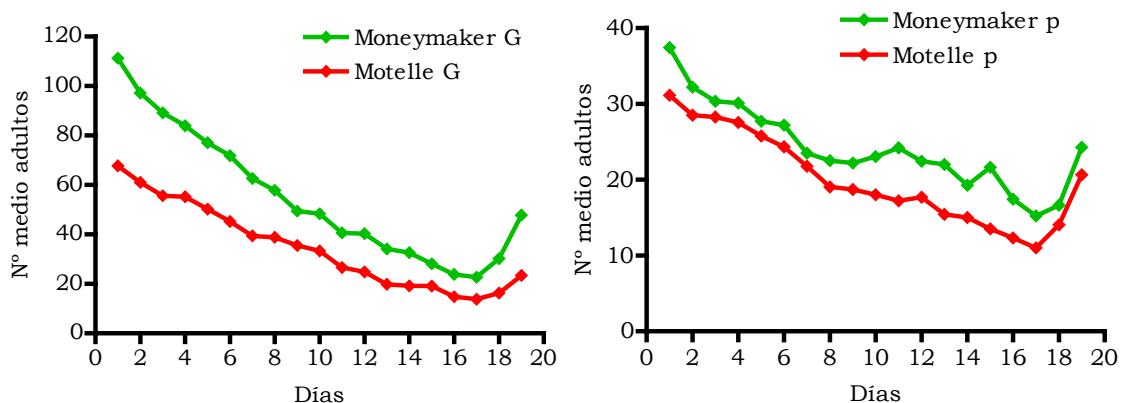


Figura R1.8. Número medio diario de adultos de *B. tabaci* presentes en plantas de 8 semanas grandes (G) y pequeñas (p) de las variedades de tomate Moneymaker y Motelle.

A partir de estos datos, se estimó la media para el número de adultos en plantas de cada tamaño y variedad (Figura R1.9). El número medio de adultos de *B. tabaci* fue significativamente superior ($p=0,003$) en plantas grandes de Moneymaker que en las del mismo tamaño de Motelle. Sin embargo, en plantas de menor tamaño la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,874$).

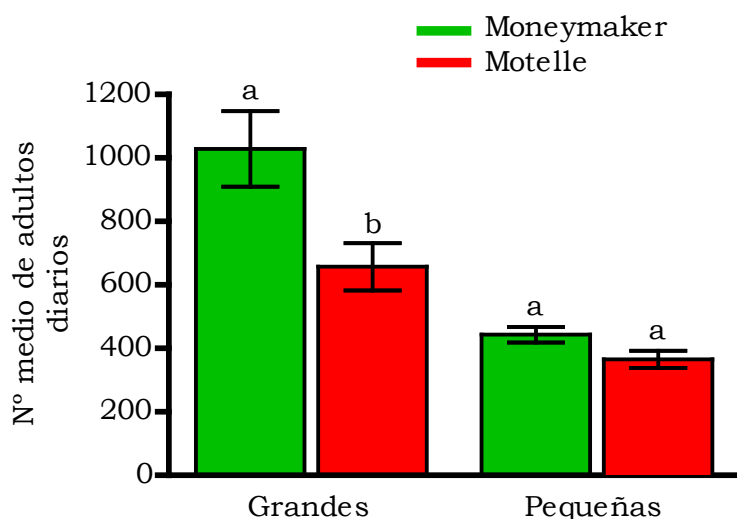


Figura R1.9. Número medio de adultos de *B. tabaci* presentes en plantas de 8 semanas, grandes y pequeñas, de las variedades de tomate Moneymaker y Motelle. Letras distintas en plantas del mismo tamaño indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre cultivares mediante el test de Tukey.

2.1.2. Porcentaje de plantas infestadas

Del mismo modo que sucedió en el apartado de edades, en el presente ensayo todas las plantas aparecieron infestadas con adultos de *B. tabaci*, por lo que se determinó, para cada tamaño, el porcentaje de plantas infestadas con un número igual o superior a la media diaria de adultos por planta ($n=72$), representándose los resultados en la Figura R1.10.

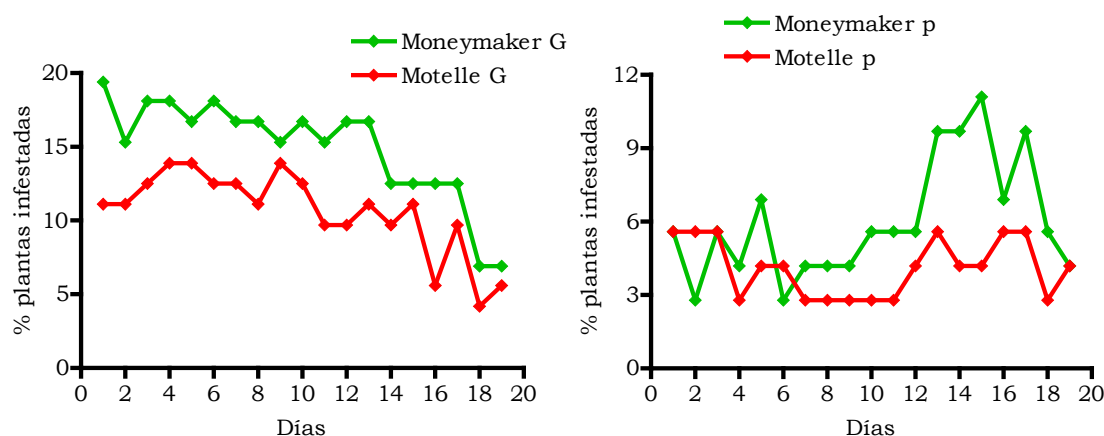


Figura R1.10. Porcentaje diario de plantas grandes y pequeñas de Moneymaker y Motelle infestadas con un número de adultos de *B. tabaci* igual o superior a la media de adultos diarios por planta.

Durante todos los días del ensayo se observó un mayor porcentaje diario de plantas infestadas con un número superior a la media de adultos diarios por planta en Moneymaker que en Motelle en las plantas grandes, mientras que ocurrió al contrario en algunos días del recuento para las plantas pequeñas (Fig. R1.13). Consecuentemente se observó que, aunque en los dos tamaños se obtuvieron diferencias significativas entre las medias de estos porcentajes para ambas variedades, la significación estadística fue sensiblemente superior en Moneymaker que en Motelle tanto en las plantas grandes ($p=0,000$) como en las pequeñas ($p=0,012$) como se puede verse en la Figura R1.11.

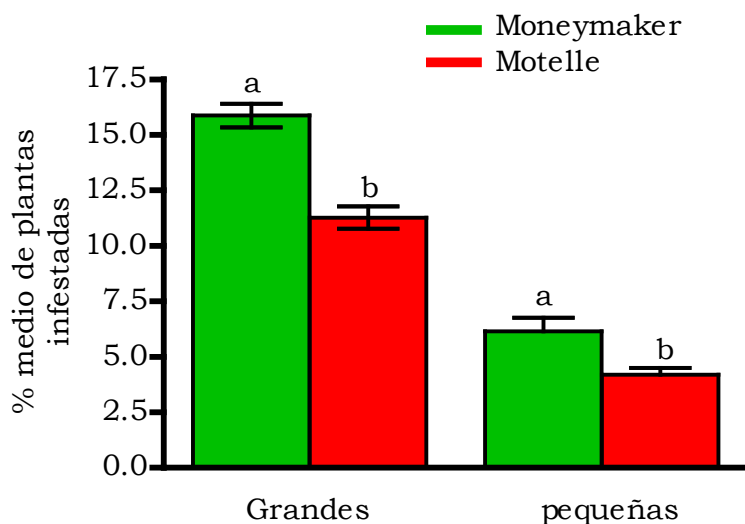


Figura R1.11. Porcentaje medio diario de plantas grandes y pequeñas de MoneyMaker y Motelle infestadas con un número de adultos de *B. tabaci* igual o superior a la media de adultos diarios por planta. Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) mediante el test de Tukey.

2.1.3. Niveles finales de infestación

En la Tabla R1.3 se presentan los resultados del recuento realizado al final del experimento, cuando ya habían emergido los adultos de la siguiente generación.

Tabla R1.3. Número medio (\pm error estándar) de pupas y adultos de *B. tabaci* presentes en plantas grandes y pequeñas de Moneymaker y Motelle ($n=18$ para cada tamaño y variedad). Letras iguales dentro del mismo tamaño de planta indican que no existen diferencias significativas ($p<0,05$) mediante el test de Tukey.

Tamaño	Genotipo	
	Moneymaker	Motelle
Grandes	1809,67 \pm 461,36 a	1097,00 \pm 253,38 a
Pequeñas	772,17 \pm 233,57 a	612,61 \pm 182,23 a

Se puede observar que en plantas grandes la media de pupas y adultos fue claramente superior en Moneymaker, que en Motelle, mientras que en las pequeñas, dichas diferencias fueron menores. Aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los dos casos, el nivel de significación fue superior en las grandes ($p=0,308$) que en las pequeñas ($p=0,563$). Dado que, como es sabido, el éxito de la supervivencia de la fase de pupa es próximo al 100%, se pudo inferir una tendencia a que la diferencia entre el incremento poblacional en Moneymaker y Motelle en la siguiente generación fuera mayor en las plantas grandes que en las pequeñas.

2.2. Bioensayos de no elección

2.2.1. Infestación inicial

En la Figura R1.12 se observa que, para las plantas grandes, la media de huevos en Moneymaker fue significativamente superior ($p=0,003$) a la obtenida en Motelle, mientras que en las pequeñas no se obtuvieron diferencias significativas ($p=0,741$).

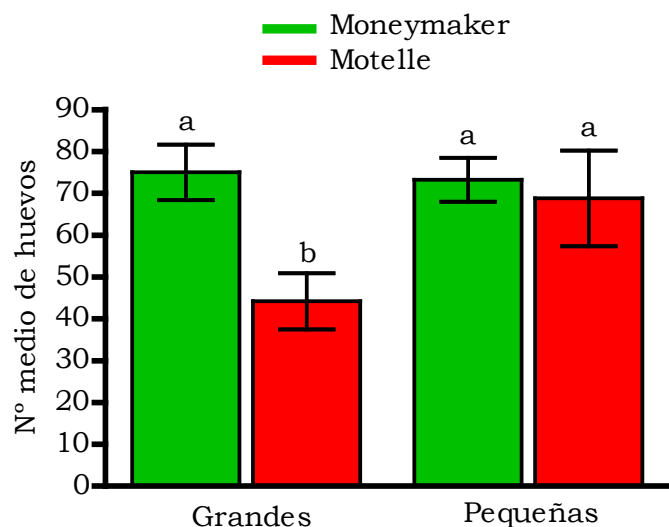


Figura R1.12. Número medio de huevos de *B. tabaci* en plantas grandes y pequeñas de las variedades MoneyMaker y Motelle. Letras distintas dentro del mismo tamaño de planta indican diferencias significativas ($p < 0,05$) mediante el test de Tukey.

2.2.2. Infestación final y supervivencia

En la Tabla R1.4 se representan los resultados del recuento realizado al final del ensayo, en el que se consideraron los individuos que se encontraban en los estadios N3, N4, adultos (sacos pupales vacíos).

En plantas grandes se observó un mayor número de individuos en MoneyMaker que en Motelle, para todos los parámetros analizados, siendo esta diferencia más acusada en las fases más avanzadas del desarrollo (N4 y adultos) y en los totales. Aunque las diferencias en N3 ($p=0,550$) y N4 ($p=0,178$) no alcanzaron el nivel de significación estadística habitual ($p < 0,05$), en el caso de los adultos y del total de individuos sí estuvieron muy próximos al mismo ($p=0,073$, $p=0,053$, respectivamente). En cambio, en las plantas de menor tamaño se observó que las diferencias entre Motelle y MoneyMaker para N3, N4, adultos y totales, no solo no fueron estadísticamente significativas ($p=0,707$, $p=0,977$, $p=0,107$, $p=0,790$, respectivamente), sino que los valores medios de prácticamente todas estas fases fueron ligeramente más altos en Motelle.

Tabla R1.4. Número medio (\pm error estándar) de individuos de *B. tabaci* en fase N3, N4, adultos y totales (N3+N4+adultos) en plantas grandes y pequeñas de las variedades Moneymaker y Motelle. Letras iguales dentro de cada fase de desarrollo y tamaño de la planta, indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) mediante el test de Tukey para los parámetros N4 y totales y mediante el test de Mann-Whitney para N3 y adultos. (*) Diferencias en adultos y totales con niveles de significación próximos al 93 y 95%, respectivamente.

Tamaño	Fase de desarrollo	Genotipo	
		Moneymaker	Motelle
Grandes	N3	17,07 \pm 2,98 a	13,86 \pm 2,81 a
	N4	24,64 \pm 3,59 a	16,13 \pm 5,09 a
	Adultos	8,30 \pm 2,26 a	3,00 \pm 0,63 a
	Totales	47,64 \pm 5,87 a	30,50 \pm 7,99 a
Pequeñas	N3	11,58 \pm 2,40 a	12,92 \pm 2,68 a
	N4	26,25 \pm 3,14 a	26,08 \pm 4,83 a
	Adultos	7,30 \pm 1,98 a	12,75 \pm 2,43 a
	Totales	43,92 \pm 3,73 a	49,77 \pm 7,53 a

A partir del número total de individuos contabilizados al final del ensayo, se obtuvo la supervivencia de huevos (Figura R1.13), calculada como el cociente entre el número inicial de éstos y el final de individuos que alcanzaron las últimas fases del desarrollo (N3+N4+adultos).

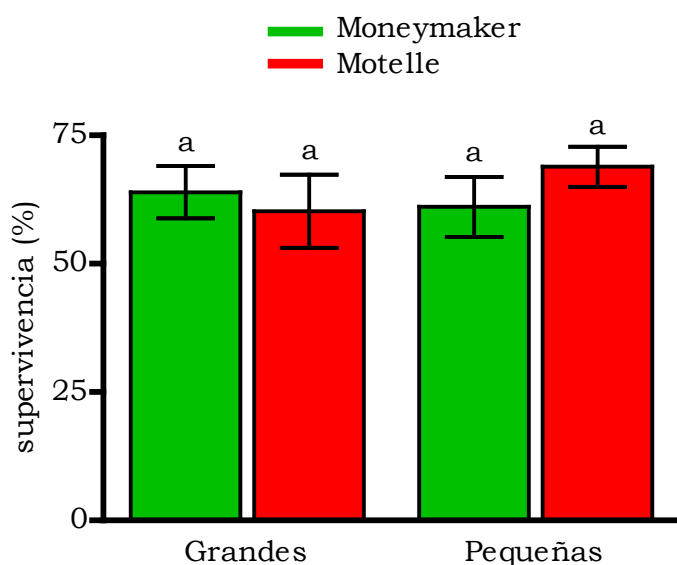


Figura R1.13. Supervivencia de huevos de *B. tabaci* en las variedades Moneymaker y Motelle de plantas grandes y pequeñas. Letras iguales para cada tamaño indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) mediante el test de Tukey.

En plantas grandes, el porcentaje de individuos que alcanzaron las fases N3, N4 y adultos fue ligeramente superior en Moneymaker que en Motelle mientras que en las de menor tamaño este porcentaje fue ligeramente superior en Motelle que en Moneymaker. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ni en las plantas grandes ni en las pequeñas ($p=0,671$ y $p=0,270$, respectivamente).

2.2.3. Crecimiento poblacional

En la Figura R1.14 se presenta el crecimiento poblacional de *B. tabaci* expresado como la tasa intrínseca de crecimiento (r_m) en Moneymaker y Motelle de los dos tamaños considerados.

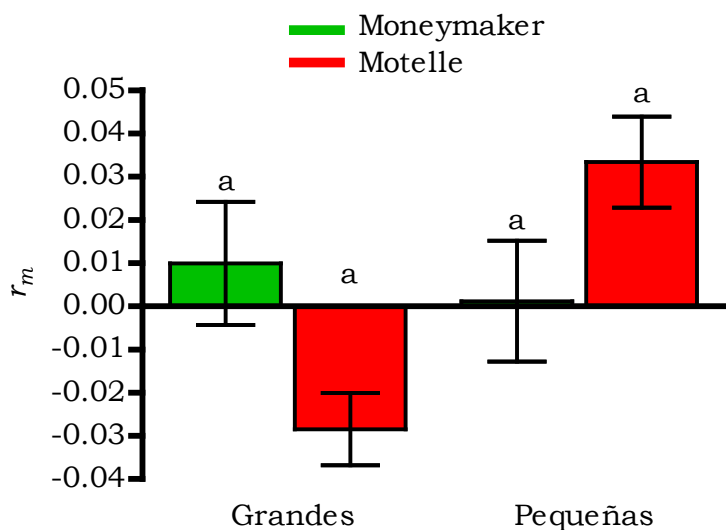


Figura R1.14. Tasa intrínseca media de crecimiento de *B. tabaci* en plantas grandes y pequeñas de las variedades Moneymaker y Motelle. Letras iguales para cada tamaño indican que no existen diferencias significativas ($p<0,05$) mediante el test de Mann-Whitney.

Como puede observarse en las plantas grandes, el valor medio de la tasa intrínseca de crecimiento en las plantas de Moneymaker fue mucho mayor que en las de Motelle. Aunque la diferencia observada no fue estadísticamente significativa ($p=0,073$), dicha tasa en Motelle fue negativa, lo que indica que se produciría una disminución del tamaño poblacional en la siguiente generación. En cuanto a las plantas pequeñas la tasa media de crecimiento fue positiva en ambos cultivares, obteniéndose un mayor crecimiento, no significativo estadísticamente ($p=0,076$), en las plantas Motelle que en Moneymaker.

Papel del ácido salicílico en la defensa basal y la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*.

Se presentan los resultados de la cuantificación del ácido salicílico (SA) y jasmónico (JA) en plantas de tomate de 8 semanas de edad, sin infestar e infestadas por moscas blancas y alteradas o no en la ruta del SA. A continuación, se muestran los resultados obtenidos en los bioensayos de no elección con los mismos genotipos para determinar el posible papel del SA en la respuesta basal del tomate a *B. tabaci* y en la resistencia mediada por el gen *Mi-1*.

1. Determinación analítica mediante HPLC-MS del contenido foliar de ácido salicílico y jasmónico, antes y después de la infestación con *B. tabaci*.

La cuantificación del SA en hojas de tomate sin infestar por mosca blanca se muestra en la Figura R2.1, donde se observa que las variedades MoneyMaker y VFN poseen una cantidad de SA similar en sus hojas al inicio del ensayo. Por otro lado, las plantas que poseen el gen *NahG* presentan un nivel basal de esta hormona significativamente inferior al de las otras variedades.

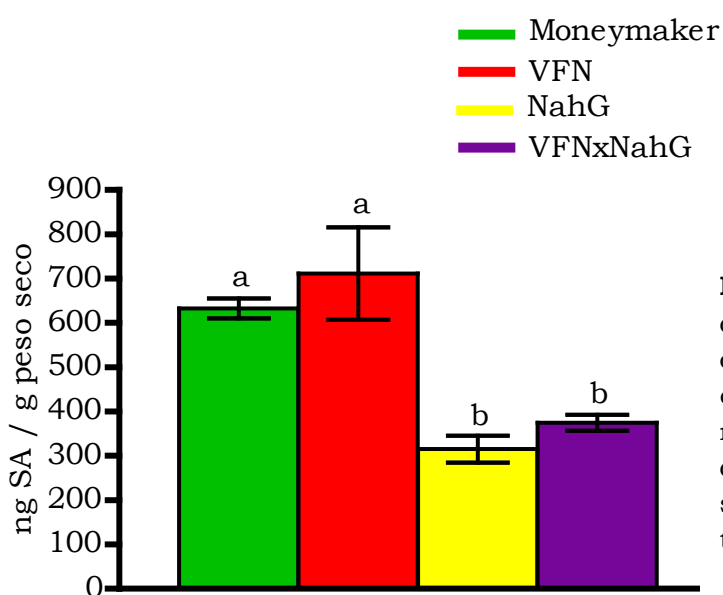


Figura R2.1. Cuantificación de ácido salicílico (SA) obtenida mediante HPLC-MS en hojas de tomate (plantas no infestadas). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) por el test de Tukey.

A continuación, en la Figura R2.2 se presenta la evolución del contenido de SA en las hojas para cada uno de los 4 genotipos de tomate analizados, desde los valores correspondientes a las plantas no infestadas (0dpi) hasta los obtenidos a los dos y doce días tras la infestación con hembras de *B. tabaci* (2dpi y 12dpi, respectivamente).

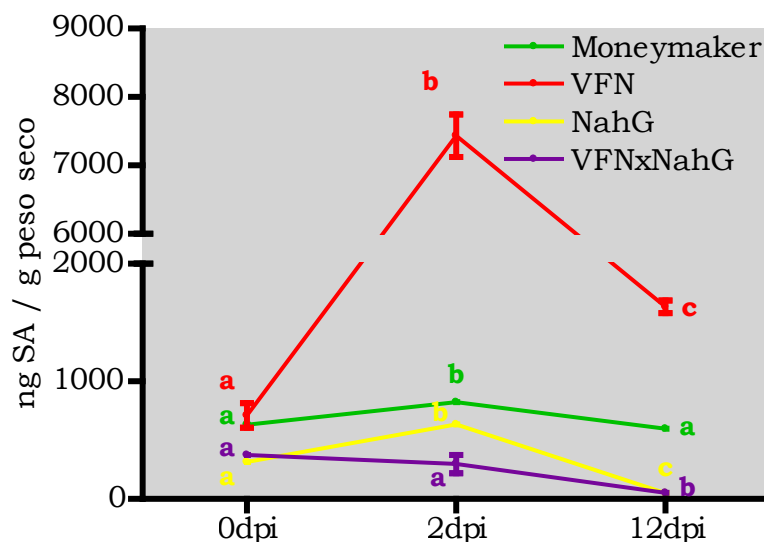


Figura R2.2. Contenido en ácido salicílico (SA) de las hojas de tomate antes de la infestación (0dpi) y, a los dos y doce días tras la infestación (2dpi y 12dpi, respectivamente). Letras distintas dentro de cada genotipo indican diferencias significativas ($p < 0,05$) por el test de Tukey.

Se detectó un aumento drástico en los niveles de SA en las plantas resistentes (VFN) a los 2 días de la infestación (2dpi). Al mismo tiempo, también en las plantas sin el gen *Mi-1* (Moneymaker y NahG) se detectó un incremento significativo, aunque menos acusado, en los niveles de SA. A los 12dpi, se observó una disminución significativa en todas las plantas. En las variedades que contienen el gen *NahG* se obtuvieron niveles de SA inferiores a los niveles basales encontrados en las plantas sin infestar (0dpi), y en las plantas VFN se observó la disminución más acusada aunque los niveles de SA a los 12 dpi fueron superiores a los registrados a los 0dpi.

Para conocer los niveles de jasmónico en estos mismos genotipos antes y tras la infestación de *B. tabaci*, se cuantificaron los niveles de esta hormona en las mismas hojas y en los mismos tiempos que los escogidos para la cuantificación del SA. En la Figura R2.3 se presenta la evolución del contenido de JA desde los valores correspondientes a las plantas no infestadas (0dpi) hasta los obtenidos a los 2 y 12 dpi con hembras de *B. tabaci*.

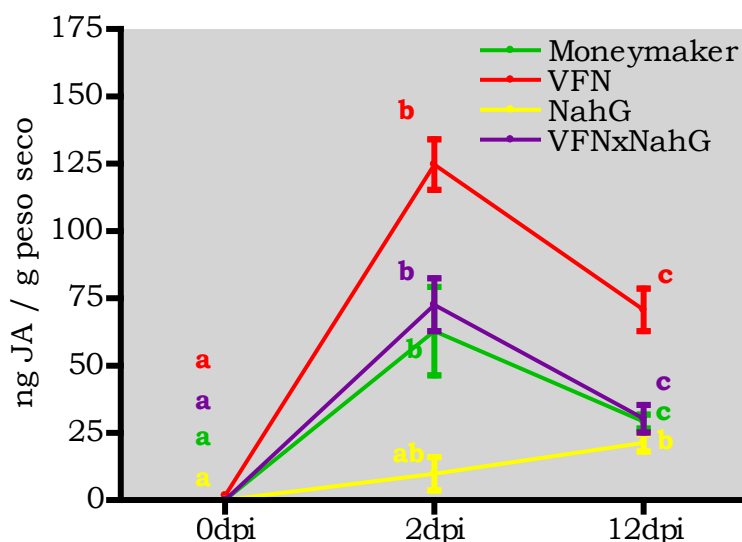


Figura R2.3. Contenido en ácido jasmónico (JA) de las hojas de tomate antes de la infestación (0dpi) y, a los dos y doce días tras la infestación (2dpi y 12dpi, respectivamente). Letras distintas dentro de cada genotipo indican diferencias significativas ($p < 0,05$) por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

En las hojas no infestadas (0dpi) de todos los genotipos apenas se detectó JA. Sin embargo, a los 2dpi los niveles de esta hormona aumentaron en los 4 genotipos siendo este incremento más pronunciado en las plantas que poseen el gen *Mi-1* (VFN y VFNxNahG) y, a continuación, las plantas MoneyMaker. En estos tres genotipos se registró una disminución en los niveles de JA a los 12dpi aunque estos niveles finales fueron superiores a los observados antes de la infestación de *B. tabaci*. Por otro lado, las plantas NahG proporcionaron los aumentos en los niveles de JA más moderados tras la infestación, si bien siguieron incrementando ligeramente dicho niveles hasta los 12dpi, cuando alcanzaron valores próximos a los de MoneyMaker y VFNxNahG. Es también destacable que los contenidos de JA medidos tras la infestación por moscas blancas no llegaron en ningún caso a concentraciones tan elevadas como las obtenidas para el SA.

2. Papel del SA en la resistencia basal a *B. tabaci*.

En primer lugar se muestran los resultados obtenidos en el análisis de la fecundidad de *B. tabaci* en las plantas MoneyMaker y NahG. En segundo lugar, se presenta el número de individuos de cada fase de desarrollo al final del ensayo, así como el porcentaje de individuos en cada una de las fases. Por último, se compara el crecimiento poblacional de *B. tabaci* en los 2 genotipos empleados en este estudio, MoneyMaker y NahG.

No se observaron diferencias significativas entre las plantas Moneymaker y NahG en la fecundidad de *B. tabaci*, medida como el número medio de huevos por planta a los 6 días (Figura R2.4).

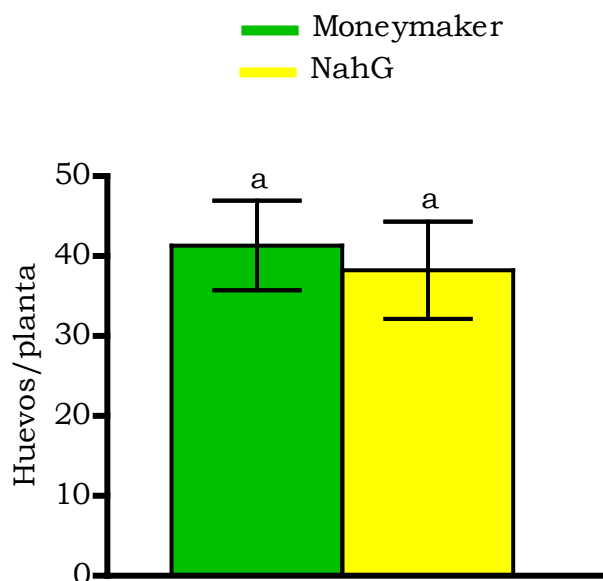


Figura R2.4. Bioensayo de no elección en plantas de tomate Moneymaker y NahG. Se representa el número medio (\pm error estándar) de huevos por planta, recontados a los 6 días tras la infestación con hembras de *B. tabaci*. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) por el test de Tukey.

A los 27 días de la infestación se dio por finalizado el ensayo y se realizó el recuento de todos los individuos presentes sobre las plantas y que se encontraban en las últimas fases del desarrollo del insecto (N3 + N4 + nuevos adultos), observándose un número total de individuos menor en NahG que en Moneymaker, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura R2.5).

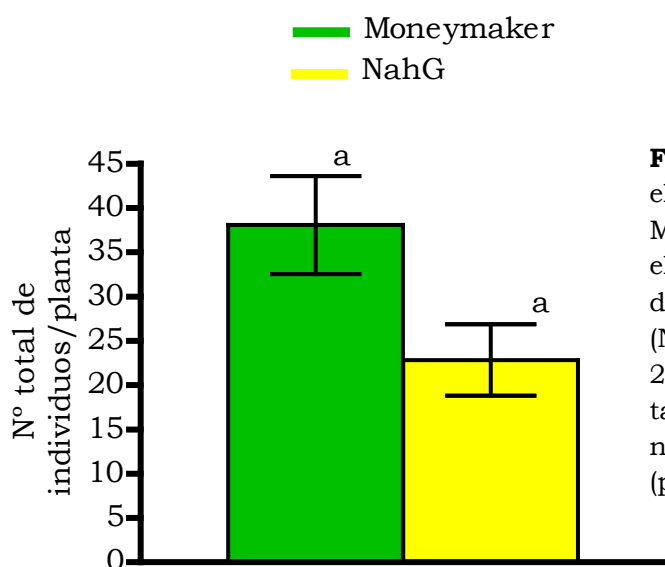


Figura R2.5. Bioensayo de no elección en plantas de tomate Moneymaker y NahG. Se representa el número medio (\pm error estándar) de individuos por planta (N3+N4+adultos), recontados a los 27 días tras la infestación con *B. tabaci*. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) por el test de Tukey.

En la Tabla R2.1 estos totales se desglosan en cada una de las fases de desarrollo del insecto observadas al finalizar el ensayo: N3, N4 y nuevos adultos.

Tabla R2.1. Media (\pm error estándar) de los individuos pertenecientes a cada una de las fases de desarrollo N3, N4 y nuevos adultos (sacos pupales vacíos) a los 27 días de la infestación con *B. tabaci*. Letras iguales dentro de cada fase de desarrollo indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre genotipos por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Genotipo	N3	N4	Adultos
Moneymaker	2,57 \pm 0,45 a	8,14 \pm 1,25 a	27,36 \pm 4,06 a
NahG	2,09 \pm 0,61 a	6,00 \pm 2,34 a	14,18 \pm 2,67 a

Como se puede observar, aunque el número de individuos de cada fase fue siempre menor en NahG que en Moneymaker, las diferencias no fueron estadísticamente significativas para ninguna de las fases del desarrollo del insecto.

A partir de estos datos, se calculó el porcentaje representado por cada fase de desarrollo (N3, N4 y nuevos adultos) sobre el total de individuos recontados al final del ensayo, para tener una idea del tiempo de desarrollo de *B. tabaci* en cada genotipo (Figura R2.6).

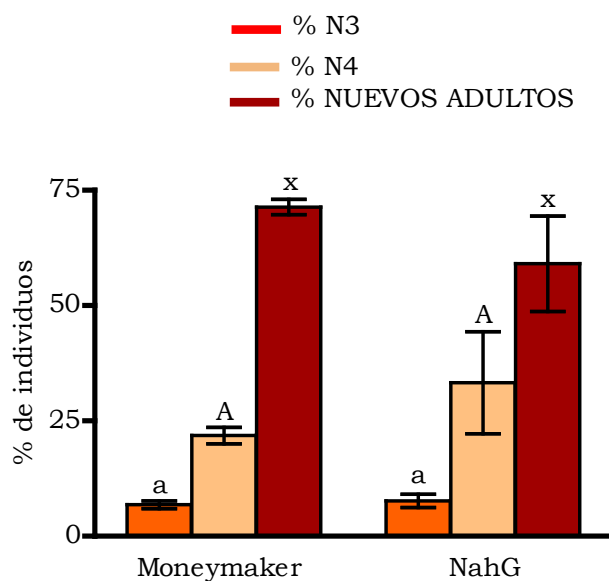


Figura R2.6. Media (\pm error estándar) del porcentaje de los individuos pertenecientes a cada una de las fases de desarrollo N3, N4 y nuevos adultos (sacos pupales vacíos) a los 27 días de la infestación con *B. tabaci*. Letras iguales dentro de una misma fase de desarrollo de *B. tabaci* indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre genotipos por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

No se encontraron diferencias significativas entre Moneymaker y NahG en el porcentaje de individuos presente en cada fase de desarrollo. Sin embargo, se puede observar que casi el 75% de los individuos en plantas Moneymaker fueron nuevos adultos frente al 60% en plantas NahG. Consecuentemente, en estas plantas se observó un porcentaje de individuos en fase N4 mayor que en las plantas Moneymaker. Todo esto indica un ligero retraso, aunque no significativo, en el desarrollo del insecto sobre las plantas que expresaban el gen *NahG*.

Al analizar el crecimiento poblacional de *B. tabaci* (Figura R2.7) al final del ensayo, tampoco se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,062$) entre las plantas Moneymaker y NahG. No obstante, se puede apreciar que el crecimiento en plantas NahG fue ligeramente menor al observado en plantas Moneymaker.

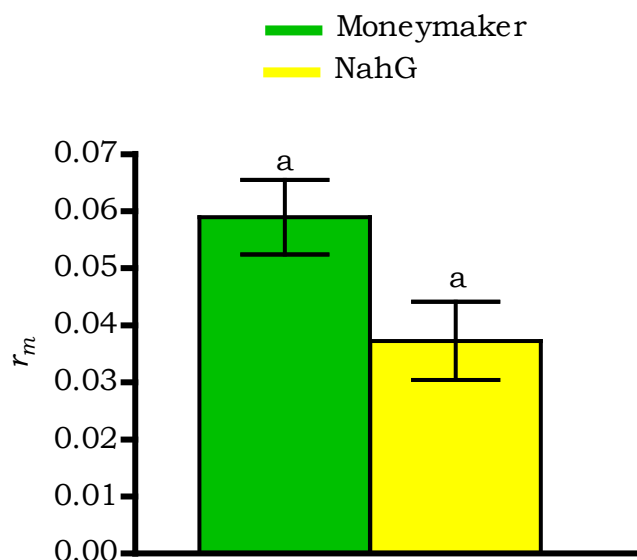
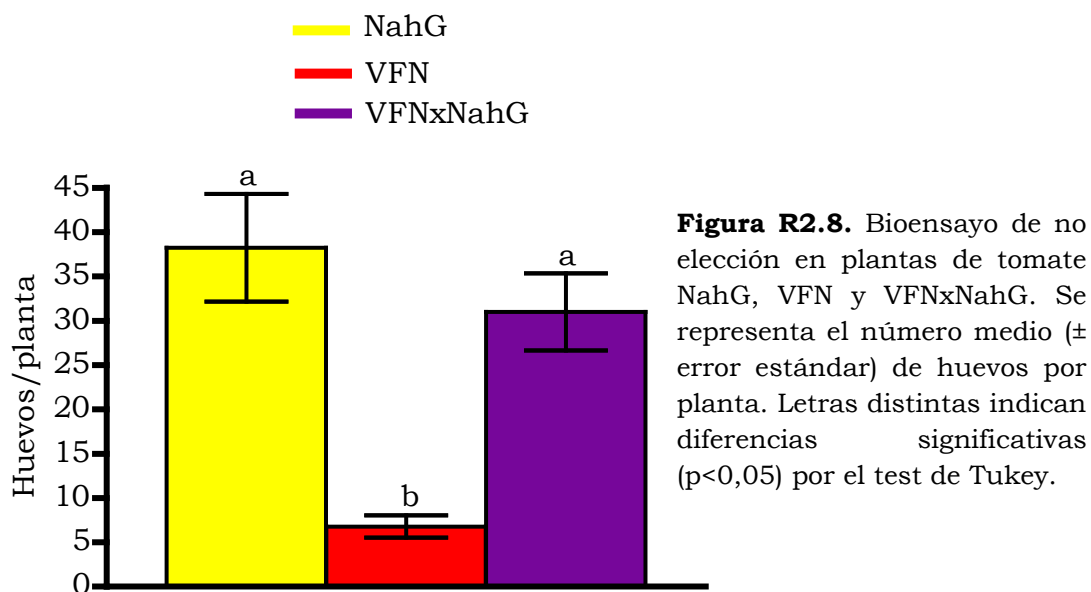


Figura R2.7. Tasa intrínseca media de crecimiento (r_m) de *B. tabaci* en plantas MoneyMaker y NahG. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) mediante el test de Tukey.

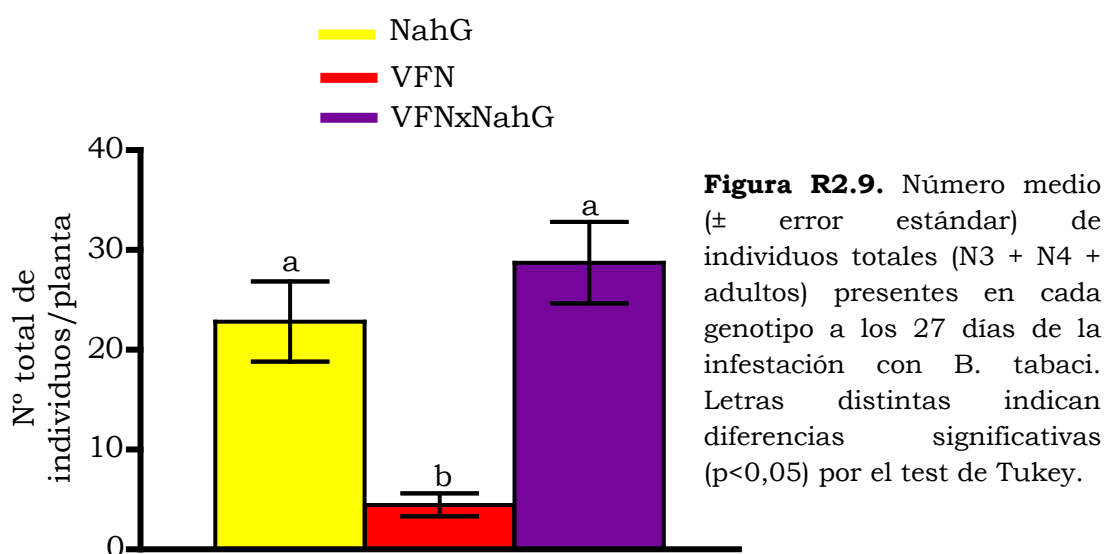
3. Implicación del SA en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el análisis de la fecundidad de *B. tabaci* en plantas NahG, VFN y VFNxNahG. Seguidamente, se presenta el número de individuos observado en cada fase de desarrollo al final del ensayo así como el porcentaje de individuos en cada una de las fases. Por último, se compara el crecimiento poblacional de *B. tabaci* en los 3 genotipos empleados en este estudio.

Como era de esperar, el número medio de huevos en el cultivar resistente VFN fue significativamente inferior al de las plantas NahG, que no contienen el gen de resistencia *Mi-1* (Figura R2.8). En las plantas VFNxNahG, que son portadoras del gen *Mi-1* pero tienen alterada la ruta del SA, se registró un número medio de huevos similar al obtenido en las plantas sin el gen *Mi-1* (NahG).



A los 27 días de la infestación se realizó el recuento de todos los individuos presentes en los 3 genotipos (Figura R2.9). En las plantas resistentes VFN se encontró un número medio de individuos totales significativamente inferior al registrado en las plantas que no expresan *Mi-1* (NahG) y en las plantas que, conteniendo el gen *Mi-1*, degradan el SA (VFNxNahG). Estas plantas VFNxNahG presentaron, en cambio, un número similar o, incluso, ligeramente superior al obtenido en las plantas NahG, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.



En la Tabla R2.2 se presentan los resultados totales desglosados en cada una de las fases de desarrollo del insecto observadas al finalizar el ensayo: N3, N4 y nuevos adultos.

Tabla R2.2. Media (\pm error estándar) de los individuos pertenecientes a cada una de las fases de desarrollo N3, N4 y nuevos adultos (sacos pupales vacíos) a los 27 días de la infestación con *B. tabaci*. Letras distintas dentro de cada fase de desarrollo indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre genotipos por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Genotipo	N3	N4	Adultos
NahG	2,09 \pm 0,61 a	6,00 \pm 2,34 a	14,18 \pm 2,67 a
VFN	0,85 \pm 0,32 a	2,00 \pm 0,52 a	1,62 \pm 0,46 b
VFNxNahG	3,82 \pm 0,66 b	9,91 \pm 1,14 b	15,00 \pm 2,98 a

Las plantas que no contienen el gen *Mi-1* (NahG) presentaron significativamente muchos menos adultos con respecto a la variedad resistente VFN, mientras el número de individuos N3 y N4 fue superior en las plantas NahG que en VFN, pero sin diferencias significativas. Aunque se detectaron diferencias significativas en el número de individuos en fase N3 y N4 entre plantas NahG y VFNxNahG, se puede apreciar que son pequeñas diferencias que desaparecen en la fase de nuevos adultos. Al comparar los dos genotipos que contienen el gen *Mi-1* (VFN y VFNxNahG) se observaron diferencias significativas en todas las fases del desarrollo de *B. tabaci*, siendo el número medio de individuos de cada fase muy superior en las plantas VFNxNahG que, además de contener el gen *Mi-1*, degradan el SA.

Para comparar la velocidad de desarrollo de *B. tabaci* en los genotipos analizados, a partir de los datos anteriores se calculó el porcentaje de cada fase de desarrollo (N3, N4 y nuevos adultos) (Figura R2.10). No se encontraron diferencias significativas entre genotipos en las últimas fases del desarrollo (porcentajes de N4 y nuevos adultos). En la fase N3 sólo se obtuvo una pequeña diferencia significativa entre las plantas que tienen alterada la ruta del SA (NahG y VFNxNahG). Aunque no existen diferencias significativas, se

puede observar que, en las plantas NahG, aproximadamente el 60% de los individuos fueron nuevos adultos y aproximadamente un 7% se encontraban todavía en fase N3, mientras que en las plantas que contienen el gen *Mi-1* (VFN y VFNxNahG) el 50% de los individuos fueron nuevos adultos frente al casi 15% de individuos en fase N3. Estos datos podrían indicar un ligero retraso en el desarrollo de *B. tabaci* en las plantas que contienen el gen *Mi-1*, independientemente de si tienen alterada, o no, la ruta del SA.

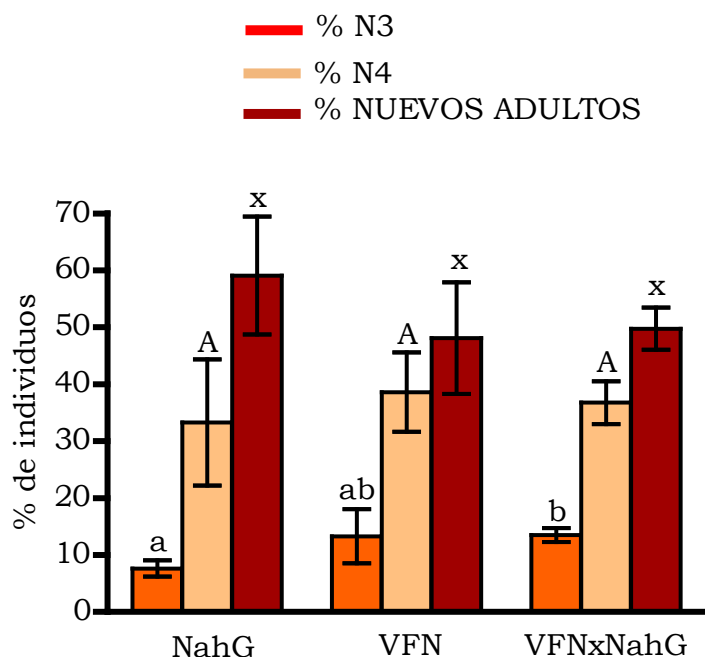


Figura R2.10. Se representa la media (\pm error estándar) del porcentaje de individuos en fase N3, N4 y nuevos adultos de *B. tabaci* para cada genotipo. Letras distintas dentro de una misma fase de desarrollo de *B. tabaci* indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre genotipos por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Al analizar el crecimiento poblacional de *B. tabaci* (Figura R2.11) al final del ensayo, se observaron valores del índice r_m similares entre las plantas que no contienen el gen *Mi-1* (NahG) y plantas que, conteniendo el gen *Mi-1*, degradan el SA (VFNxNahG). Las plantas VFN, que contienen el gen *Mi-1* y no tienen alterada la ruta del SA, presentaron un crecimiento medio significativamente inferior al de los otros genotipos, obteniéndose, de hecho, una tasa negativa que confirmaba una importante mortalidad de la población de *B. tabaci*.

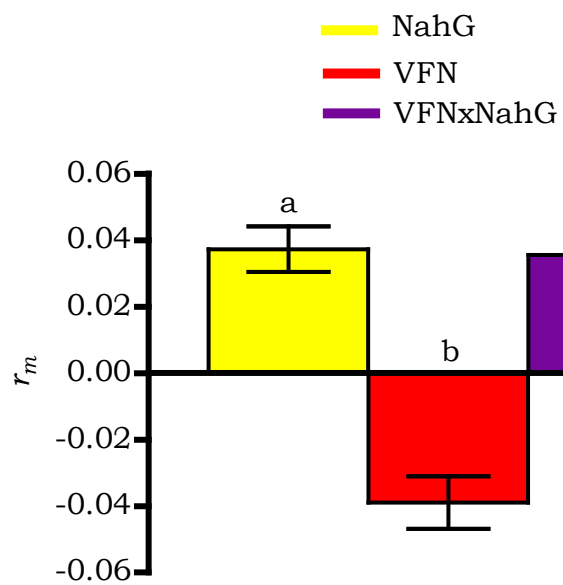


Figura R2.11. Tasa intrínseca media de crecimiento (r_m) de *B. tabaci* en plantas NahG, VFN y VFNxNahG. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Implicación de *Hsp90* en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*.

Se presentan, en primer lugar, los resultados obtenidos tras la evaluación de los efectos de la agroinfiltración con el vector TRV en plantas de tomate, con y sin el gen *Mi-1*, e infestadas con *B. tabaci*. Seguidamente, se muestra el efecto que se produce en la infestación con *B. tabaci* en plantas en las que se ha silenciado el gen *Mi-1* o el gen *Hsp90-1*.

1. Evaluación de los efectos de la Agroinfiltración con el vector TRV

Para comprobar si el proceso de infiltración por sí mismo afecta o no a la infestación por *B. tabaci*, en ensayos de no-elección se comparó la oviposición del insecto en plantas de las variedades resistente (Motelle) y susceptible (Moneymaker) sin infiltrar y en plantas de ambas variedades infiltradas con el vector pTRV1:pTRV2 “vacío” (TRV). El número de huevos contado en cada foliolo se presenta en la Figura R3.1.

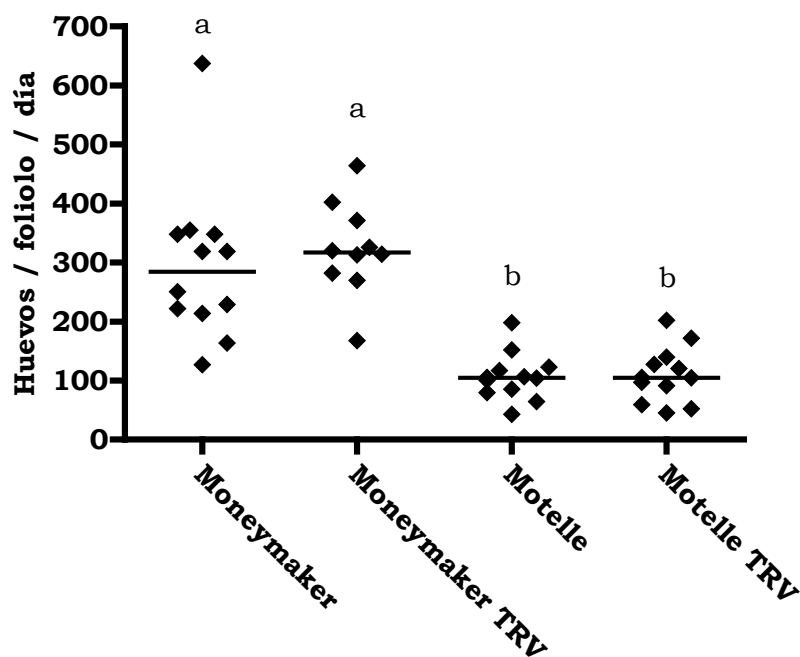


Figura R3.1. Número de huevos presentes en foliolos de las variedades Moneymaker (*mi-1/mi-1*) y Motelle (*Mi-1/Mi-1*), sin infiltrar e infiltradas con el vector pTRV1:pTRV2 “vacío” (TRV) crecido en un cultivo de la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*. Cada rombo representa el número de huevos recontados en un foliolo. Las líneas corresponden al valor de la mediana. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) por el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn.

En la Figura R3.1 se puede observar que el número de huevos encontrado en los folíolos de plantas de la misma variedad, independientemente de la infiltración con TRV, se encuentra dentro de un mismo rango. No existen diferencias estadísticamente significativas debidas a la infiltración con TRV para Moneymaker ($p > 0,05$) ni para Motelle ($p > 0,05$). Por el contrario, se obtuvieron diferencias significativas en el número de huevos entre las variedades Moneymaker y Motelle no infiltradas ($p < 0,001$) e infiltradas con TRV ($p < 0,001$).

Para comprobar si la expresión del gen *Mi-1* se detectaba tras la infestación por *B. tabaci* en plantas Motelle infiltradas con el vector TRV vacío pero no en Moneymaker igualmente infiltradas (como ocurre con las plantas no infiltradas según Martínez de Ilarduya and Kaloshian, 2001), se sintetizó cDNA a partir del RNA aislado de hojas de tomate infestadas y recolectadas a los 2 días de la infestación, y se realizó un análisis semi-cuantitativo de la expresión relativa del gen *Mi-1* utilizando cebadores específicos para el mismo (ver metodología específica). Se empleó como gen endógeno el gen de la ubiquitina (*Ubi3*) (Figura R3.2).

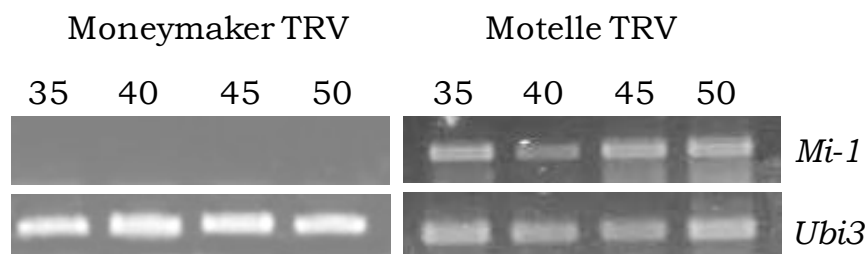


Figura R3.2. Nivel de expresión relativa del gen *Mi-1* obtenido por PCR semi-cuantitativa en plantas infestadas con *B. tabaci*, de las variedades Moneymaker y Motelle, infiltradas con el vector pTRV1:pTRV2 vacío (TRV). Se fijaron 35, 40, 45 y 50 ciclos de PCR para la expresión del gen.

En las plantas Moneymaker, que no contienen el gen *Mi-1*, no se obtuvo ninguna banda de expresión. En plantas Motelle, la expresión del gen *Mi-1* se observó claramente a partir del ciclo 35 de PCR aumentando esta expresión ligeramente hasta el ciclo 50.

Como el análisis por PCR semi-cuantitativa muestra claramente las diferencias de expresión del gen *Mi-1* entre los cultivares Motelle y Moneymaker, no se hizo necesario realizar una cuantificación de dicha expresión mediante qPCR.

2. Silenciamiento del gen *Mi-1* en plantas de tomate

En el silenciamiento génico inducido por virus se requiere de varios controles. En nuestro trabajo un control es el silenciamiento de la expresión de *Mi-1* pues hasta el momento no se habían realizado estudios con moscas blancas en plantas silenciadas para *Mi-1*.

Se infiltraron plantas Motelle y Moneymaker con el vector “vacío” pTRV1:pTRV2 (TRV) y plantas Motelle con el vector pTRV1:pTRV2-*Mi-1* (TRV-*Mi-1*). Se infestaron con hembras de *B. tabaci* y se realizó un recuento del número de huevos presente en los folíolos de cada planta (Figura R3.3).

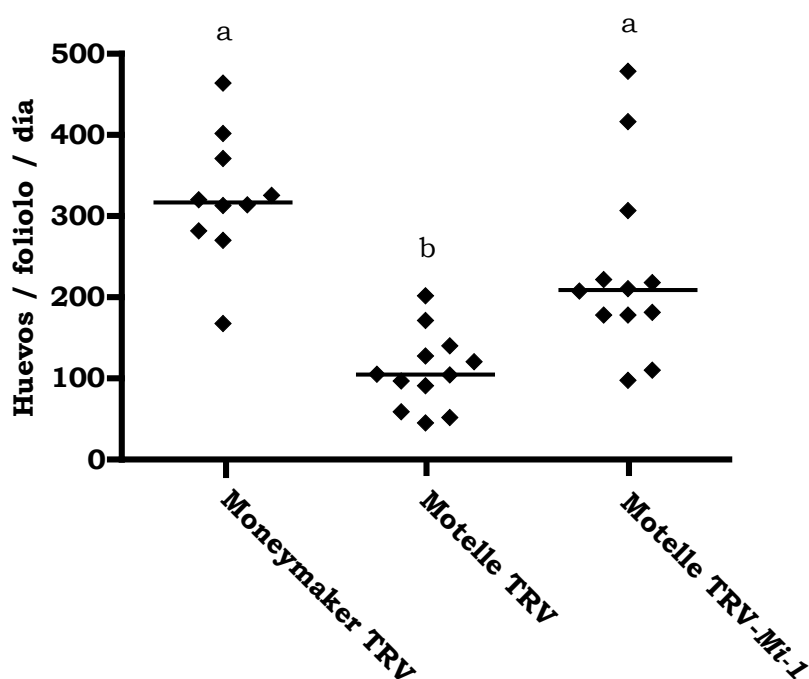


Figura R3.3. Número de huevos presentes en folíolos de las variedades Moneymaker y Motelle infiltradas con el vector pTRV1:pTRV2 “vacío” (TRV) y plantas Motelle infiltradas con el vector pTRV1:pTRV2-*Mi-1* (Motelle TRV-*Mi-1*) crecido en un cultivo de la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*. Cada rombo representa el número de huevos recontados en un foliolo. Las líneas corresponden al valor de la mediana. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) por el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn.

Se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre plantas Motelle infiltradas con el vector “vacío” (TRV) y plantas Motelle infiltradas con el vector TRV-*Mi-1* demostrando que el silenciamiento del gen *Mi-1* disminuye la resistencia frente a moscas blancas.

Para confirmar a nivel molecular el silenciamiento del gen *Mi-1* en las plantas de estos ensayos, se analizó su expresión empleando dos métodos

distintos de amplificación por PCR (semi-cuantitativa y cuantitativa en tiempo real) a partir del RNA total extraído de folíolos infestados a los 2 días de la infestación. En el análisis semi-cuantitativo se analizaron únicamente las plantas Motelle, ya que en el análisis previo de las plantas Moneymaker no se había obtenido expresión del gen (Fig. R3.2). En la Figura R3.4 se observa que en los folíolos de plantas Motelle TRV-*Mi-1* en los que se había encontrado un elevado número de huevos, la expresión del gen *Mi-1* no se detecta claramente hasta el ciclo 45, mientras que en las plantas Motelle infiltradas con el vector vacío (Motelle TRV) la expresión del gen fue detectada desde el ciclo 35. Este resultado indicaba un silenciamiento parcial de la expresión de *Mi-1*. Es decir, que los valores de expresión de *Mi-1* no llegan a ser cero debido a que su silenciamiento se produce sólo en parte de las células del tejido analizado.

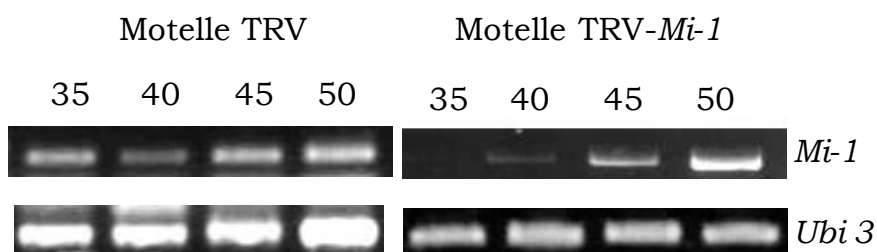


Figura R3.4. Niveles de expresión mediante PCR semi-cuantitativa del gen *Mi-1* en folíolos de plantas Motelle infiltradas con el vector “vacío” (Motelle TRV) y folíolos de plantas en las que se silenció *Mi-1* (Motelle TRV-*Mi-1*), infestadas con hembras de *B. tabaci*. Se empleó el gen de la ubiquitina (*Ubi3*) como control endógeno. Los ciclos de PCR utilizados (35, 40, 45, 50) para el estudio de la expresión de *Mi-1* se indican en la parte superior.

A continuación se comparó mediante qRT-PCR la expresión del gen *Mi-1* en folíolos de las mismas plantas (Figura R3.5). Dado que hasta ahora no se había utilizado esta técnica para cuantificar la expresión de *Mi-1*, se incluyeron también las plantas Moneymaker TRV como un control.

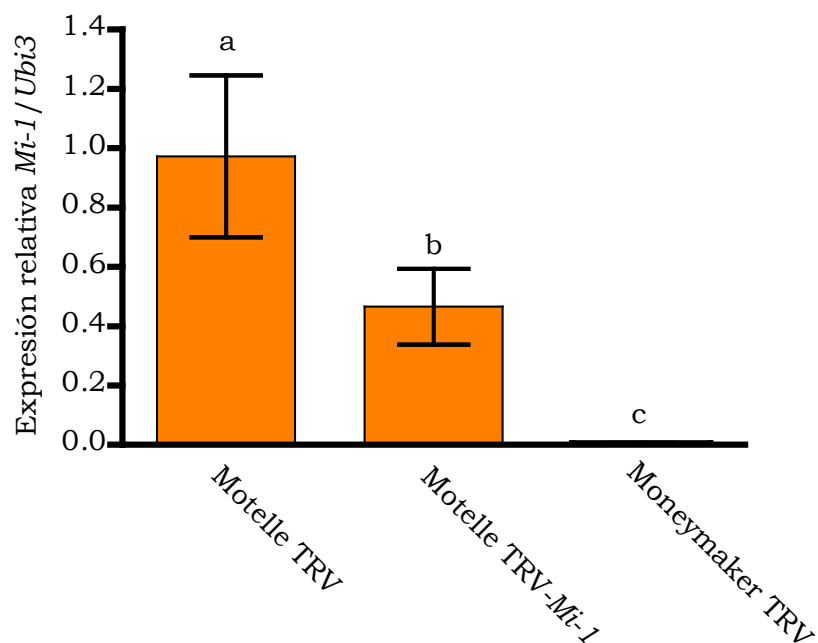


Figura R3.5. Análisis por qRT-PCR de la expresión del gen *Mi-1* en plantas silenciadas. Se analizó la expresión del gen *Mi-1*, en foliolos de plantas Motelle y Moneymaker infiltradas con el vector “vacío” pTRV1:pTRV2 (TRV) y en foliolos de plantas Motelle en las que se silenció el gen *Mi-1* (Motelle TRV-*Mi-1*), a los dos días de haber sido infestadas con hembras de *B. tabaci*. En cada barra se representa la media \pm error estándar de la expresión de *Mi-1* en 2 muestras biológicas y 3 réplicas técnicas, normalizadas con la expresión del gen endógeno de la ubiquitina (*Ubi3*). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,01$) por el test de Tukey.

En los foliolos analizados de plantas Motelle en los que se silenció el gen *Mi-1* (Motelle TRV-*Mi-1*), se obtuvieron unos niveles de expresión para este gen significativamente inferiores ($p = 0,001$) a los obtenidos en plantas Motelle TRV. También se obtuvieron diferencias significativas ($p = 0,002$) en la comparación entre plantas Motelle TRV-*Mi-1* y las plantas Moneymaker TRV: aunque en las plantas en las que se silenció *Mi-1* la expresión del gen se ve reducida, estos niveles no llegan en ningún caso al cero de las plantas Moneymaker TRV, lo que indica un silenciamiento parcial del gen *Mi-1*, que también habíamos observado en los análisis por PCR semi-cuantitativa.

3. Silenciamiento del gen *Hsp90-1* en plantas de tomate

Para evaluar la posible implicación del gen *Hsp90-1* en la resistencia mediada por *Mi-1* se infiltraron plantas Motelle con el vector pTRV1:pTRV2-*Hsp90-1* (Motelle TRV-SI*Hsp90-1*). Se utilizaron como controles plantas Motelle y Moneymaker infiltradas con pTRV1:pTRV2 “vacío” (TRV) y plantas Motelle

infiltradas con el vector pTRV1:pTRV2-*Mi-1* (Motelle TRV-*Mi-1*). Las plantas fueron infestadas con hembras de *B. tabaci* y a los dos días se recontó el número de huevos presente en cada foliolo (Figura R3.6).

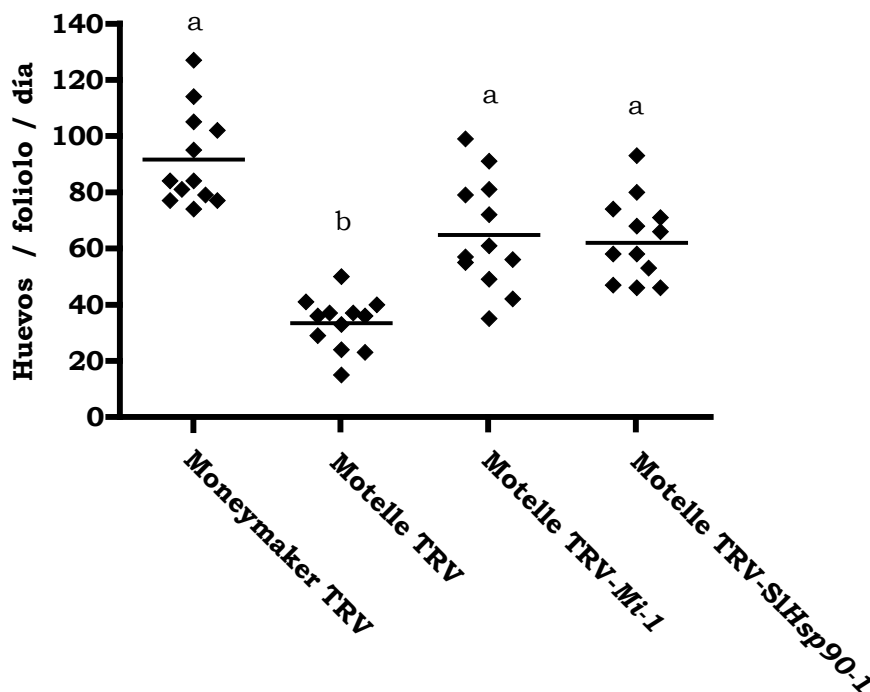


Figura R3.6. Número de huevos presentes en foliolos de las variedades MoneyMaker y Motelle infiltradas con el vector pTRV1:pTRV2 “vacío” (TRV), plantas Motelle infiltradas con el vector pTRV1:pTRV2-*Mi-1* (Motelle TRV-*Mi-1*) y plantas Motelle infiltradas con el vector pTRV1:pTRV2-*Hsp90-1* (Motelle TRV-SiHsp90-1) crecidos en un cultivo de la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*. Cada rombo representa el número de huevos recontados en un foliolo. Las líneas corresponden al valor de la mediana. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) por el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn.

El número de huevos observado en las plantas silenciadas para *Hsp90-1* fue significativamente mayor ($p < 0,05$) al número registrado en las plantas Motelle TRV y similar al obtenido en plantas en las que se silenció el gen *Mi-1* ($p > 0,05$). Las plantas Motelle TRV-*Mi-1* y Motelle TRV-SiHsp90-1 no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto al número de huevos encontrado en las plantas MoneyMaker TRV. Sin embargo, el número de huevos fue ligeramente superior en las plantas susceptibles que en las plantas resistentes silenciadas para *Mi-1* o *Hsp90-1*.

De nuevo, para confirmar el silenciamiento del gen *Hsp90-1*, mediante PCR semi-cuantitativa y cuantitativa en tiempo real se amplificó el cDNA sintetizado a partir del RNA extraído de los foliolos en los que se había

obtenido un elevado número de huevos. En la Figura R3.7 se presentan los resultados de la PCR semi-cuantitativa.

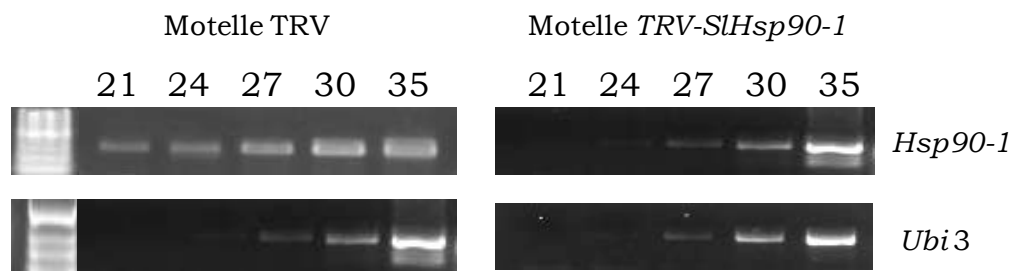


Figura R3.7. Niveles de expresión del gen *Hsp90-1* obtenidos mediante PCR semi-cuantitativa en folíolos de plantas Motelle infiltradas con pTRV1:pTRV2 “vacío” (Motelle TRV) y folíolos de plantas en las que se silenció el gen *Hsp90-1* (Motelle TRV-Sl*Hsp90-1*), infestadas con hembras de *B. tabaci*. Se empleó el gen de la ubiquitina (*Ubi3*) como control endógeno. Los ciclos de PCR utilizados (21, 24, 27, 30, 35) para el estudio de la expresión de *Hsp90-1* se indican en la parte superior.

En las plantas no silenciadas (Motelle TRV) la expresión de *Hsp90-1* se observa desde el ciclo 21 de la PCR mientras que en las plantas en las que se silenció este gen, se necesitaron 27 ciclos de PCR para obtener una ligera banda correspondiente a la expresión de *Hsp90-1*.

Para confirmar estos resultados se realizó un análisis cuantitativo de la expresión de *Hsp90-1*, en las mismas muestras, mediante qPCR (Figura R3.8). Además, se llevó a cabo el análisis en folíolos de plantas Moneymaker TRV y plantas Motelle en los que se había silenciado el gen *Mi-1* y cuyo número de huevos había sido significativamente superior al de las plantas Motelle TRV.

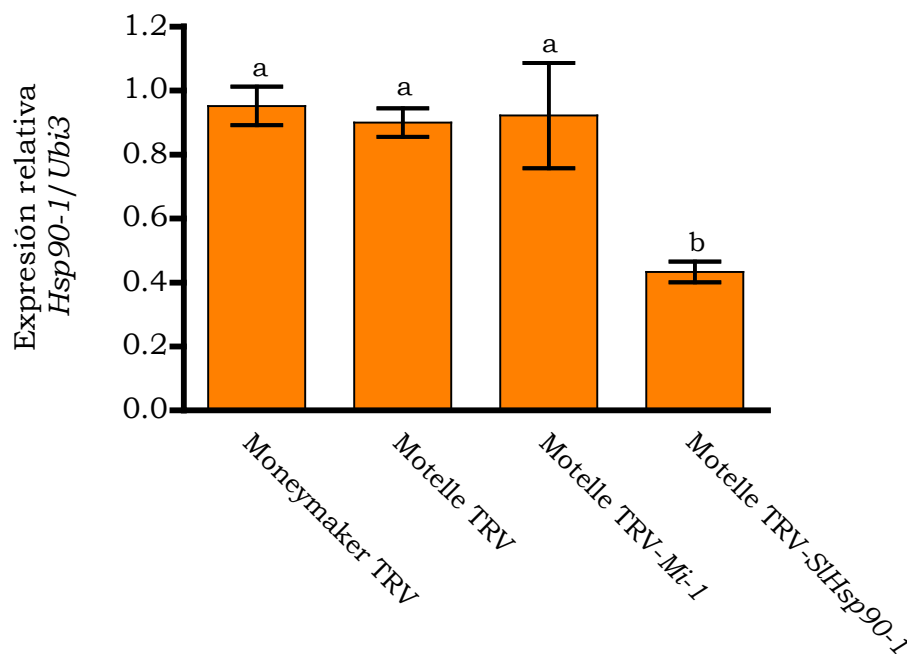


Figura R3.8. Análisis por qRT-PCR de la expresión del gen *Hsp90-1*. Se analizó la expresión del gen *Hsp90-1*, en folíolos de plantas Motelle y MoneyMaker infiltradas con pTRV1:pTRV2 “vacío” (TRV) y en folíolos de plantas Motelle en las que se silenció el gen *Mi-1* (Motelle TRV-*Mi*) y el gen *Hsp90-1* (Motelle TRV-*SIHsp90-1*), a los dos días de haber sido infestadas con hembras de *B. tabaci*. Se representa la media \pm error estándar de la expresión de *Hsp90-1* en 2 muestras biológicas y 3 réplicas técnicas, normalizadas con la expresión del gen endógeno de la ubiquitina (*Ubi3*). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) por el test de Tukey.

En los folíolos analizados de las plantas Motelle TRV-*SIHsp90-1* se obtuvieron unos niveles de expresión de *Hsp90-1* significativamente inferiores ($p < 0,01$) a los observados en el resto de plantas. Los niveles de expresión de este gen fueron similares en las plantas MoneyMaker y Motelle infiltradas con el vector vacío (TRV) así como en las plantas Motelle en las que se silenció el gen *Mi-1* (TRV-*Mi-1*). Las plantas silenciadas para *Hsp90-1* mostraron una reducción pero no una supresión total de la expresión del gen por lo que, del mismo modo que para el gen *Mi-1*, el silenciamiento de *Hsp90-1* se produce de forma parcial. Como ocurría con *Mi-1*, esta disminución parcial en el nivel de expresión de *Hsp90-1* es debida a que se empleó el folíolo completo para la extracción de RNA y no únicamente las zonas del folíolo en las que se encontraron huevos de *B. tabaci*.

Mediante los análisis de microarrays se obtuvo un gran volumen de resultados sobre la expresión génica global en las hojas de plantas adultas de tomate, antes y después de su infestación con *B. tabaci*. Los listados completos con todos los datos obtenidos se presentan como Información Adicional para su consulta en una tabla Excel incluida en el CD (Anexo CD). Entre todos ellos se han seleccionado los resultados más relevantes, y se presentan aquí ordenados en dos grandes apartados que corresponden, respectivamente, a la resistencia mediada por el gen *Mi-1* del tomate y a la resistencia inducida por BTH en plantas carentes de dicho gen.

1. Análisis de la expresión génica global del tomate en la interacción compatible con *B. tabaci* y en la incompatible (resistencia) mediada por el gen *Mi-1*.

Se presentan, en primer lugar, los resultados obtenidos en relación con el efecto que ejerce la presencia/ausencia del gen *Mi-1* sobre el transcriptoma del tomate, en un estudio comparativo, mediante análisis de microarrays, de dos variedades, una portadora (Motelle) y otra carente (Moneymaker) del gen *Mi-1*, obteniendo las diferencias basales entre plantas sin infestar de dichas variedades.

A continuación, se detallan los cambios detectados en el transcriptoma del tomate, distinguiendo entre dos momentos concretos de la infestación por *B. tabaci*: a los 2 y 12 días de dicha infestación (dpi), que representan, respectivamente, el efecto de la alimentación y oviposición de las hembras de *B. tabaci* en la fase temprana de la infestación, y el establecimiento y alimentación de la fase móvil N1. En cada una de estas fases se compararon los resultados de las interacciones compatible (susceptibilidad) e incompatible (resistencia) desencadenadas por la ausencia o presencia del gen *Mi-1*.

Posteriormente se presentan los resultados de un análisis comparativo de las fases temprana y tardía de la infestación, considerando separadamente la interacción compatible y la incompatible.

Por último, se muestra la validación de los datos de microarrays mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

1.1. Efecto de la presencia/ausencia del gen *Mi-1* sobre el transcriptoma del tomate.

Como ya se explicó en la Introducción, Motelle y Moneymaker son líneas quasi-isogénicas que difieren solamente por la presencia en el cromosoma 6 de Motelle de una región de 650kb que contiene el gen *Mi-1*. Debido a que esta diferencia entre ambos cultivares podría determinar perfiles de transcripción diferentes, se compararon sus transcriptomas, en primer lugar, en ausencia de infestación por *B. tabaci* para obtener las diferencias basales entre ambas variedades y, en segundo lugar, se volvieron a comparar tras la infestación por *B. tabaci* para mostrar cómo dicha infestación modifica las diferencias basales detectadas previamente.

1.1.1. Comparación del transcriptoma de las variedades Moneymaker y Motelle en ausencia de infestación.

Se presenta el número de transcritos diferencialmente expresados en plantas no infestadas de Motelle por comparación con Moneymaker describiendo los procesos biológicos en los que están implicados estos transcritos.

En primer lugar, se seleccionaron los genes expresados diferencialmente entre las 2 variedades ajustados a un $FDR < 0,05$. Posteriormente esta selección se hizo más restrictiva para incluir sólo aquellos genes cuya expresión fuera al menos el doble en Motelle que en Moneymaker (expresión relativa, $E.R. \geq 2$) y los que, por el contrario, reprimieran su expresión al menos dos veces en Motelle con respecto a Moneymaker ($E.R. \leq -2$).

En la comparación entre ambas variedades se obtuvieron 18 genes diferencialmente expresados, 10 de los cuales se expresaron significativamente más en Motelle que en Moneymaker mientras que 8 genes se expresaron menos en Motelle con respecto a Moneymaker. Además, aproximadamente la mitad de estos genes presentaron unas diferencias de expresión de más de 5 veces en una variedad que en la otra.

En la Tabla R4.1 se presentan en detalle los 10 genes sobreexpresados en Motelle por comparación con Moneymaker.

Tabla R4.1. Transcritos sobreexpresados al menos el doble (Expresión Relativa ≥ 2) en la variedad de tomate Motelle con respecto a la variedad Moneymaker, en ausencia de infestación y considerando sólo los valores de FDR significativos (FDR $< 0,05$).

ID Affymetrix ¹	ID GenBank ²	Descripción ³	E.R. ⁴	FDR ⁵
Les.1842.1.S1_at	BT012811.1	NTGP4 [Nicotiana tabacum]	80,19	1,11E-08
Les.5230.1.S1_at	BT013535.1	Unknown [Solanum tuberosum]	28,42	1,01E-08
Les.3272.1.S1_at	BT012750.1	Moderately similar to diaminopimelate epimerase family protein At3g53580 gene [Arabidopsis thaliana]	11,30	9,57E-08
Les.74.1.S1_at	AF039682.1	Root-knot nematode resistance protein Mi-1.2	7,84	5,92E-08
Les.75.1.S1_at	AF039681.1	Plant resistance protein Mi-1.1	6,91	1,01E-08
Les.75.1.S1_s_at	AF039681.1	Plant resistance protein /// root-knot nematode resistance protein Mi-1.1 /// Mi-1.2	6,79	6,49E-08
Les.4037.1.S1_at	AY178911.1	Vacuolar H ⁺ -ATPase A2 subunit isoform [Solanum lycopersicum]	4,42	2,02E-06
Les.1942.1.S1_at	AW033120	RecName: Full=Mitochondrial outer membrane protein porin of 36 kDa; AltName: Full=Voltage-dependent anion-selective channel protein [Solanum tuberosum]	2,50	6,17E-06
LesAffx.54123.1.S1_at	BE450055	Glycogenin glucosyltransferase (glycogenin)-related	2,08	1,45E-04
Les.2332.1.A1_at	BG734892	No hits found	2,04	3,01E-02

¹ Identificador del transcrito presente en el Genechip® de Affymetrix

² Identificador del transcrito según la base de datos del GenBank (NCBI) proporcionado por la plataforma Affymetrix utilizado para el diseño del array

³ Descripción del identificador de Affymetrix según la base de datos de GenBank obtenido a través de TFGD

⁴ Expresión Relativa de la comparación entre Motelle y Moneymaker

⁵ Valor del FDR (valor de p corregido) de la expresión relativa de la comparación

Entre estos 10 genes sobreexpresados destaca un transcrito con similitud de secuencia al gen *NTGP4* de *Nicotiana tabacum*, que participa en procesos de respuesta a estímulos bióticos y cuyo nivel de expresión fue de 80,19 veces superior en Motelle que en Moneymaker. El siguiente transcrito, con una expresión 28,42 veces superior en Motelle que en Moneymaker, corresponde a un gen desconocido, aunque el análisis de la secuencia sugirió su participación en procesos de elongación. El transcrito Les.3272.1.S1_at,

con similitud a un gen de *Arabidopsis thaliana*, está implicado en procesos de biosíntesis de aminoácidos, expresándose 11,30 veces más en Motelle que en Moneymaker. Igualmente hay que mencionar 3 transcritos correspondientes a los genes homólogos *Mi-1.1* y *Mi-1.2* con valores de expresión 7 veces superiores, aproximadamente, en Motelle que en Moneymaker. También cabe destacar la sobreexpresión del gen que codifica la subunidad H⁺-ATPasa vacuolar que está involucrada en el transporte y unión a ATP (4,42) y el gen VDAC relacionado con la respuesta a estímulos bióticos (2,50). Finalmente, un transcrito relacionado con la glicogenina glucosiltransferasa (2,08) y otro (2,04) cuya secuencia no produjo ninguna coincidencia con las bases de datos.

Los valores de expresión de los 8 genes reprimidos en Motelle por comparación con Moneymaker se incluyen en un rango de 2,13 a 9,62 (en valor absoluto). En la Tabla R4.2 se muestran los valores para estos transcritos. Aproximadamente la mitad de ellos se seleccionaron con un FDR muy significativo ($p < 0,0001$).

Tabla R4.2. Genes reprimidos al menos a la mitad (Expresión Relativa ≤ -2) en la variedad de tomate Motelle con respecto a la variedad Moneymaker, en ausencia de infestación y considerando sólo los valores de FDR significativos (FDR $< 0,05$).

ID Affymetrix ¹	ID GenBank ²	Descripción ³	E.R. ⁴	FDR ⁵
Les.4311.1.S1_at	AY269087.1	DELLA protein GAI (Gibberellic acid-insensitive mutant protein)	-9,62	4,10E-07
Les.44.1.S1_at	BF097567	Mutant phytoene synthase [<i>Solanum lycopersicum</i>]	-8,77	1,45E-08
Les.4957.1.S1_at	BT012983.1	Adenosine kinase isoform 1T-like protein [<i>Solanum tuberosum</i>]	-8,64	2,34E-02
Les.5432.1.S1_at	BT013906.1	Hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	-5,65	2,89E-09
LesAffx.4763.3.S1_at	BG123322	MADS-box protein 15 [<i>Petunia x hybrida</i>]	-3,15	2,15E-02
Les.2638.1.A1_at	BG628467	No hits found	-2,60	2,03E-02
Les.3828.1.S1_at	X92855.1	Probable cinnamyl-alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.195) - tomato	-2,39	3,52E-03
Les.4899.1.S1_a_at	BT012863.1	Glutaredoxin, grx, putative [<i>Ricinus communis</i>]	-2,13	5,14E-03

¹ Identificador del transcrito presente en el Genechip® de Affymetrix

² Identificador del transcrito según la base de datos del GenBank (NCBI) proporcionado por la plataforma Affymetrix utilizado para el diseño del array

³ Descripción del identificador de Affymetrix según la base de datos de GenBank obtenido a través de TFGD

⁴ Expresión Relativa de la comparación entre Motelle y Moneymaker

⁵ Valor del FDR (valor de p corregido) de la expresión relativa de la comparación

Entre estos genes, el que codifica la proteína DELLA GAI, que reprime el crecimiento promovido por giberelinas, fue el más reprimido (-9,62) en Motelle por comparación con Moneymaker, seguido del gen *Pys* (-8,77) implicado en el metabolismo secundario y el gen *ADK* (-8,64) que cataliza la síntesis de AMP a partir de adenosina y ATP. También se vio reprimida la expresión de proteínas MADS-box (-3,15), que son factores de transcripción implicados en diferentes procesos del desarrollo de la planta, y la enzima CAD (-2,39), clave en la síntesis de lignina. Entre las dos proteínas (-5,65 y -2,13) que intervienen en reacciones redox se encuentra una Glutaredoxina cuya función consiste en proteger a las células contra el estrés oxidativo manteniendo la homeostasis celular. La secuencia del transcrito Les.2638.1.A1_at (-2,60) no produjo ninguna coincidencia con las bases de datos.

1.1.2. Comparación del transcriptoma de las variedades Moneymaker y Motelle tras la infestación por *B. tabaci*.

Se presenta en primer lugar el número de transcritos diferencialmente expresados en plantas Motelle a los dos días de ser infestadas por *B. tabaci* en comparación con plantas Moneymaker también infestadas y, posteriormente se ofrecen los resultados de la comparación de estos datos con los obtenidos previamente en plantas no infestadas.

En la comparación entre ambas variedades infestadas se obtuvieron 28 transcritos diferencialmente expresados, de los cuales, 14 se expresaron significativamente más en Motelle que en Moneymaker (Tabla R4.3) mientras que 14 transcritos se expresaron menos en Motelle con respecto a Moneymaker (Tabla R4.4). El rango de expresión en los transcritos sobreexpresados fue de 2 a 38 veces mayor en Motelle que en Moneymaker. Los transcritos reprimidos tuvieron un rango de expresión inferior, de 2 a 9 veces menor en Motelle que en Moneymaker.

La comparación de estos resultados con los obtenidos previamente a partir de plantas sin infestar de estas mismas variedades indican si la infestación con *B. tabaci* altera de algún modo las diferencias basales que se habían detectado entre ellas y que eran debidas a la presencia/ausencia del gen *Mi-1*. Esta comparación se representa mediante diagramas de Venn con los transcritos diferenciales sobreexpresados y reprimidos, distinguiendo los

comunes a las plantas infestadas y sin infestar de los específicos de cada uno de los dos casos (Figura R4.1).



Figura R4.1. Diagrama de Venn con los transcritos diferenciales sobreexpresados y reprimidos, de la comparación entre las variedades Motelle y Moneymaker de plantas sin infestar e infestadas con un valor de $FDR < 0,05$ y Expresión relativa ($E.R \geq 2$ (sobreexpresados) y ≤ -2 (reprimidos)).

De los 14 transcritos más expresados en Motelle que en Moneymaker tras la infestación de *B. tabaci*, 7 ya se sobreexpresaban de igual modo en Motelle antes de la infestación (marcados con un asterisco en la Tabla R4.3). Entre los 14 transcritos menos expresados en Motelle que en Moneymaker tras la infestación, 7 habían resultado igualmente reprimidos en Motelle en ausencia de infestación (marcados con un asterisco en la Tabla R4.4). Todos estos transcritos comunes a plantas infestadas y no infestadas, ya fueron descritos en el apartado anterior (1.1.1).

Tabla R4.3. Transcritos sobreexpresados al menos el doble (Expresión Relativa ≥ 2) en la variedad de tomate Motelle infestada por *B. tabaci* con respecto a la variedad MoneyMaker infestada y considerando sólo los valores de FDR significativos (FDR $< 0,05$).

ID Affymetrix ¹	ID GenBank ²	Descripción ³	E.R. ⁴	FDR ⁵
Les.1842.1.S1_at *	BT012811.1	NTGP4 [Nicotiana tabacum]	37,59	3,48E-07
Les.5230.1.S1_at *	BT013535.1	unknown [Solanum tuberosum]	26,22	2,45E-08
LesAffx.66316.1.S1_at	BI921484	predicted protein [Populus trichocarpa]	12,16	4,04E-04
Les.3272.1.S1_at *	BT012750.1	Moderately similar to diaminopimelate epimerase family protein At3g53580 gene [Arabidopsis thaliana]	10,49	3,46E-07
Les.75.1.S1_at *	AF039681.1	Plant resistance protein Mi-1.1	5,77	5,93E-08
Les.74.1.S1_at *	AF039682.1	Root-knot nematode resistance protein Mi-1.2	4,89	6,45E-06
Les.75.1.S1_s_at *	AF039681.1	Plant resistance protein /// root-knot nematode resistance protein Mi-1.1 /// Mi-1.2	4,39	6,69E-06
Les.4037.1.S1_at *	AY178911.1	vacuolar H ⁺ -ATPase A2 subunit isoform [Solanum lycopersicum]	3,99	7,90E-06
Les.5012.1.S1_at	BT013103.1	Acid phosphatase 1 precursor, putative [Ricinus communis]	3,57	3,13E-03
LesAffx.51045.1.S1_at	AI897693	RecName: Full=Isoflavone reductase homolog; AltName: Full=CP100	3,39	4,02E-03
Les.2899.1.S1_at	BG628131	RecName: Full=Peptide methionine sulfoxide reductase	2,89	3,13E-02
LesAffx.25451.1.S1_at	BE450073	sulfate adenylyltransferase [Solanum tuberosum]	2,53	4,84E-02
LesAffx.61110.1.S1_at	BF098450	21 kDa protein precursor, putative [Ricinus communis]	2,11	3,08E-02
LesAffx.11839.1.S1_at	BI208864	NADH dehydrogenase subunit 3 [Nicotiana tabacum]	2,00	4,84E-02

¹ Identificador del transcrito presente en el Genechip® de Affymetrix

² Identificador del transcrito según la base de datos del GenBank (NCBI) proporcionado por la plataforma Affymetrix utilizado para el diseño del array

³ Descripción del identificador de Affymetrix según la base de datos de GenBank obtenido a través de TFGD

⁴ Expresión Relativa de la comparación entre Motelle y MoneyMaker

⁵ Valor del FDR (valor de p corregido) de la expresión relativa de la comparación

* Transcritos comunes a la comparación Motelle y MoneyMaker en ausencia de infestación (Tabla R4.1).

Como se pudo comprobar, las diferencias basales entre ambos cultivares variaron ligeramente tras la infestación de *B. tabaci* obteniéndose 7 transcritos sobreexpresados en Motelle (respecto a MoneyMaker) que no habían destacado en la comparación de los cultivares en ausencia de infestación (Tabla R4.3).

Entre estos transcritos, cabe mencionar en primer lugar a Les.5012.1.S1_at, que se corresponde con un producto proteico desconocido pero que participa en procesos de respuesta defensiva, en concreto de defensa a insectos. En segundo lugar, la isoflavona reductasa que participa en procesos de respuesta a estrés oxidativo, que se produce tras la detección del insecto y la enzima metionina sulfóxido reductasa (MsrA) que desempeña un papel importante en la protección de las células frente al estrés oxidativo. Por último, la enzima NADH deshidrogenasa que es la primera enzima del Complejo I de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria; se sabe que este Complejo está correlacionado con la muerte celular programada. La enzima sulfato adeniltransferasa interviene en procesos de asimilación de azufre catalizando la activación de iones sulfato por el ATP para formar adenosina-5'-fosfosulfato (APS) y pirofosfato; esta reacción es el primer paso enzimático en la utilización de sulfato tras su captación. La proteína de 21kDa podría corresponder a un inhibidor de la pectina metilesterasa inhibidora, enzima implicada en procesos de reorganización de la pared celular. Sobre la proteína que se expresa 12,16 veces más en Motelle que en Moneymaker no se obtuvo ninguna información.

Tabla R4.4. Genes reprimidos al menos a la mitad (Expresión Relativa -2) en la variedad de tomate Motelle con respecto a la variedad Moneymaker, tras la infestación con *B. tabaci* y considerando sólo los valores de FDR significativos (FDR < 0,05).

ID Affymetrix ¹	ID GenBank ²	Descripción ³	E.R. ⁴	FDR ⁵
Les.5432.1.S1_at *	BT013906.1	Hypothetical protein [Vitis vinifera]	-8,58	3,35E-11
Les.4957.1.S1_at *	BT012983.1	Adenosine kinase isoform 1T-like protein [Solanum tuberosum]	-6,09	4,88E-02
Les.3741.1.S1_at	AF146691.1	ELI3 [Lycopersicon esculentum]	-5,79	1,54E-05
Les.4311.1.S1_at *	AY269087.1	DELLA protein GAI (Gibberellic acid-insensitive mutant protein)	-5,74	3,11E-05
Les.44.1.S1_at *	BF097567	Mutant phytoene synthase [Solanum lycopersicum]	-5,47	1,30E-06
Les.2638.1.A1_at *	BG628467	No hits found	-4,83	2,26E-05
LesAffx.4763.3.S1_at *	BG123322	MADS-box protein 15 [Petunia x hybrida]	-4,07	1,81E-03
LesAffx.21605.1.S1_at	AW621713	Hypothetical protein [Vitis vinifera]	-4,03	7,96E-05
Les.94.1.S1_at	AJ002140.1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase [Solanum lycopersicum]	-2,57	7,43E-03
LesAffx.10016.1.A1_at	CK715733	Unnamed protein product [Vitis vinifera]	-2,54	4,62E-02
Les.4899.1.S1_a_at *	BT012863.1	Glutaredoxin, grx, putative [Ricinus communis]	-2,34	1,12E-03
Les.5732.1.S1_at	BT014465.1	Predicted protein [Populus trichocarpa]	-2,13	4,02E-03
Les.3530.1.S1_at	AF258808.1	Aldehyde oxidase [Lycopersicon esculentum]	-2,08	2,08E-02
LesAffx.14736.1.S1_at	AW622136	Putative UDP-glucuronate decarboxylase 2 [Nicotiana tabacum]	-2,05	1,51E-02

¹ Identificador del transcrito presente en el Genechip® de Affymetrix

² Identificador del transcrito según la base de datos del GenBank (NCBI) proporcionado por la plataforma Affymetrix utilizado para el diseño del array

³ Descripción del identificador de Affymetrix según la base de datos de GenBank obtenido a través de TFGD

⁴ Expresión Relativa de la comparación entre Motelle y Moneymaker tras la infestación de *B. tabaci*

⁵ Valor del FDR (valor de p corregido) de la expresión relativa de la comparación

* Transcritos comunes a la comparación Motelle y Moneymaker en ausencia de infestación (Tabla R4.2).

Entre los 7 transcritos exclusivos de la comparación entre ambas variedades tras la infestación, cabe destacar la proteína ELI3 relacionada con procesos de defensa, la enzima UDP-glucuronato decarboxilasa implicada en procesos metabólicos asociados a membrana y la enzima aldehído oxidasa

implicada en procesos de biosíntesis de hormonas. El resto de genes están implicados en procesos de transcripción.

1.2. Expresión génica en la fase temprana de la infestación (2dpi): Alimentación y oviposición de las hembras adultas de *B. tabaci*.

En la Tabla R4.5 se muestra el número de genes diferenciales en la interacción compatible del tomate con *B. tabaci* (obtenidos al comparar plantas Moneymaker infestadas con este insecto frente a plantas Moneymaker no infestadas) y en la interacción incompatible (obtenidos de la comparación entre plantas Motelle infestadas con *B. tabaci* y plantas Motelle no infestadas). En ambos casos estos datos proceden de muestras recogidas a los dos días de la infestación, por lo que se corresponden con las actividades de alimentación y puesta de huevos por parte de las hembras del insecto.

Tabla R4.5. Número de genes diferencialmente expresados en las interacciones compatible e incompatible a los 2 dpi.

2 dpi	Sobreexpresados	Reprimidos	Total
Compatible	32	47	79
Incompatible	159	189	348

Genes seleccionados cuyo p-valor corregido (FDR) fue menor a 0,05 y, además, presentaban una diferencia de expresión de al menos 2 veces en la comparación entre plantas infestadas y plantas no infestadas.

Existe un mayor número de genes diferencialmente expresados en la interacción incompatible que en la interacción compatible. En ambas interacciones se obtuvieron más genes reprimidos que sobreexpresados.

Con el fin de conocer si la reprogramación transcripcional provocada tras la infestación con *B. tabaci* era similar en las interacciones compatible e incompatible, se presentan sendos diagramas de Venn con los transcritos sobreexpresados o reprimidos a los 2 dpi (Figura R4.2), diferenciando los transcritos comunes a ambas interacciones y los específicos de cada una de ellas.

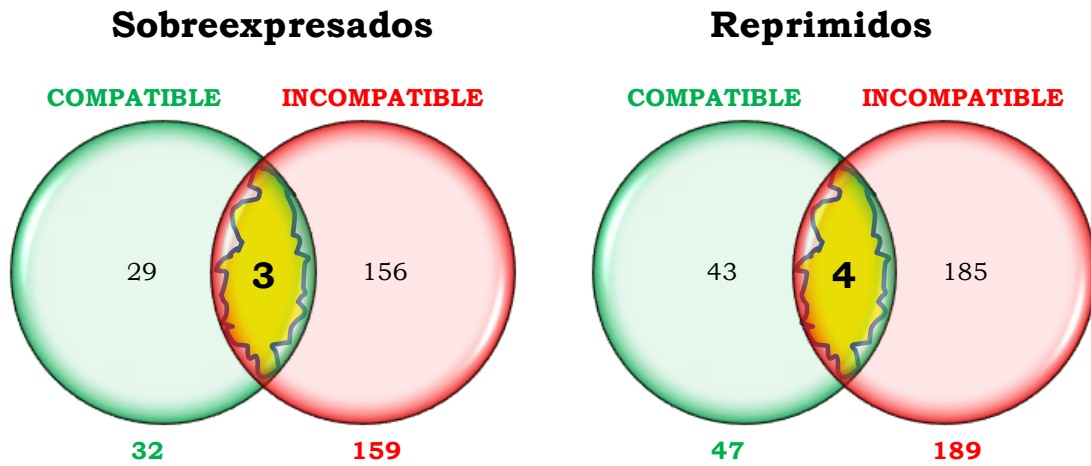


Figura R4.2. Diagrama de Venn del número de transcritos diferencialmente expresados en las interacciones compatible e incompatible a los 2 dpi con un valor de $FDR < 0,05$ y Expresión relativa (E.R.) ≥ 2 (sobreexpresados) y ≤ -2 (reprimidos).

En primer lugar es destacable que únicamente 7 transcritos de los que se expresaron diferencialmente a los 2 días de la infestación con *B. tabaci*, lo hicieron tanto en la interacción compatible como en la incompatible. Por el contrario, la gran mayoría resultaron ser exclusivos de una u otra interacción.

A continuación, se presenta una gráfica (Figura R4.3) con la clasificación de los transcritos diferenciales exclusivos de la interacción compatible y los exclusivos de la interacción incompatible, agrupados en función de los procesos biológicos en los que intervienen. En esta gráfica no se incluyeron los genes comunes a ambas interacciones porque, como vimos, su número era muy pequeño y se prefirió describirlos individualmente más adelante.

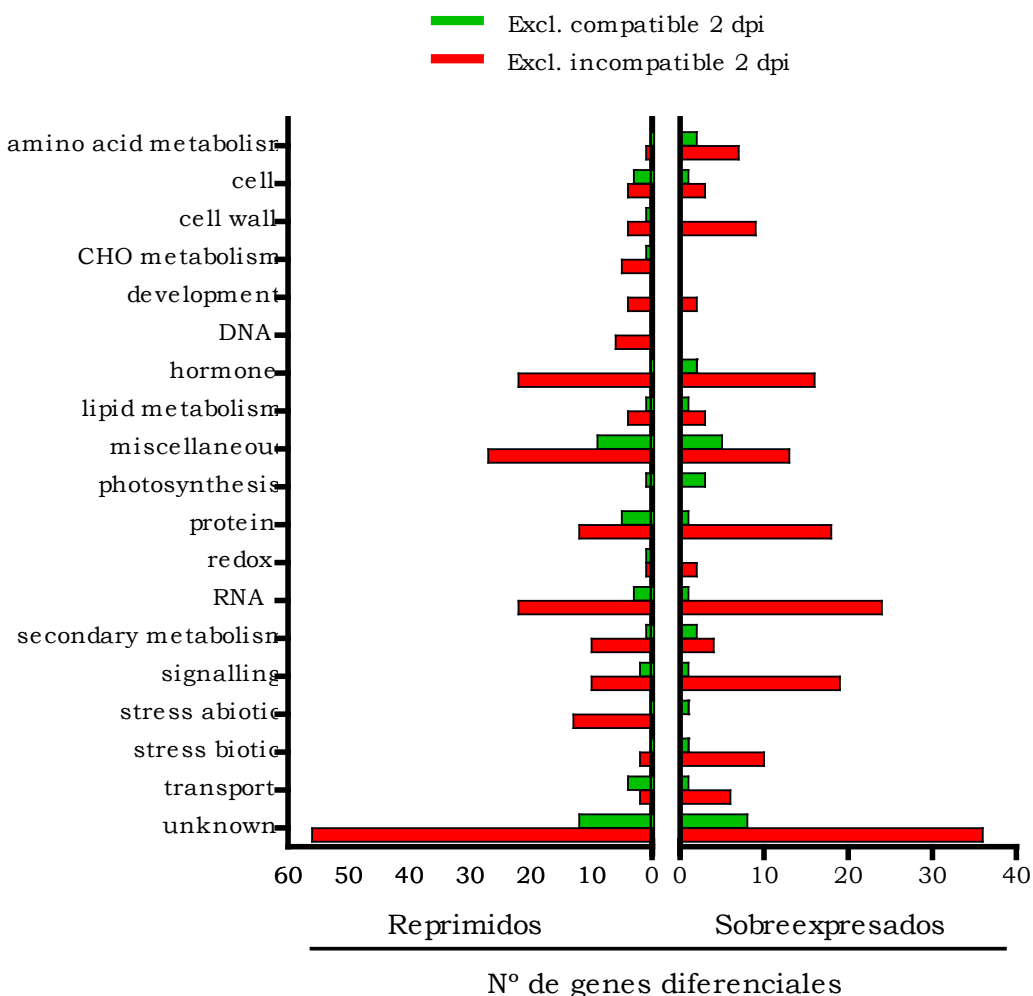


Figura R4.3. Clasificación de los transcritos diferenciales exclusivos de la interacción compatible (verde) y los exclusivos de la interacción incompatible (rojo), en función de los procesos biológicos en los que intervienen identificados por Mapman.

El grupo con mayor representación en ambas interacciones fue el compuesto por genes de los que se desconoce los procesos biológicos en los que participan. En los siguientes apartados se explican con mayor detalle los resultados obtenidos, comenzando con los genes comunes y siguiendo, a continuación, con los genes exclusivos de cada interacción.

1.2.1. Genes diferenciales comunes en las interacciones compatible e incompatible del tomate con *B. tabaci* a los 2 dpi.

Se obtuvieron únicamente 3 genes sobreexpresados comunes a ambas interacciones, que suponen aproximadamente el 2% de los genes sobreexpresados en la interacción incompatible y algo menos del 9,5% en la compatible. Con los 4 genes reprimidos comunes ocurría algo similar:

representaban el 2% de los genes reprimidos en la incompatible y el 8,5% en la compatible.

Entre los 3 genes comunes sobreexpresados se encontró el que codifica a una Glucano endo-1,3- β -glucosidasa implicada en procesos de defensa en plantas frente a patógenos, el gen *PGPS/D12* relacionado con la respuesta oxidativa y el que corresponde a una proteína transmembrana. Entre los 4 genes reprimidos comunes, se halló un factor de transcripción, una fosfolipasa PLDb2 involucrada en procesos metabólicos y de respuesta a estrés y dos transcritos relacionados con la respuesta hipersensible y la muerte celular.

1.2.2. Genes diferenciales exclusivos de la interacción compatible MoneyMaker-*B. tabaci* a los 2 dpi.

En la Figura R4.2 se muestra el número de transcritos diferencialmente expresados exclusivamente en la interacción compatible: 29 y 43 transcritos sobreexpresados y reprimidos, respectivamente. El nivel de expresión de los 29 transcritos sobreexpresados osciló en un rango entre 2 y 4 veces mayor en las plantas MoneyMaker infestadas que en las plantas sin infestar de la misma variedad. El nivel de expresión de los 43 transcritos reprimidos exclusivamente durante la interacción compatible a los 2 dpi, fue de 2 a 9 veces menor en las plantas infestadas que en las plantas sin infestación (Anexo CD).

El análisis de los procesos biológicos en Mapman (Figura R4.3) indicó que no se conoce la función de la mayoría de los genes expresados diferencialmente durante la interacción compatible, mientras que el resto de procesos biológicos agruparon pocos genes diferenciales. Se encontraron más genes sobreexpresados que reprimidos en procesos relacionados con el metabolismo secundario y la fotosíntesis, en el que se incluyó el gen que codifica la proteína Snakin-2, generalmente sobreexpresada en respuesta a herida o tras la infección de ciertos patógenos. Respecto a los procesos relacionados con el estrés biótico y abiótico, únicamente se obtuvo representación de genes sobreexpresados, entre los que cabe destacar varios genes relacionados con la respuesta a estrés, como el que codifica a la chaperona Hsp70 o genes relacionados con la respuesta defensiva, como la PR-1a.

Por el contrario, más genes reprimidos que sobreexpresados se asociaron a procesos relacionados con el transporte, en la categoría de proteínas (incluyendo la síntesis, modificación o degradación de proteínas) y la categoría RNA que incluye la regulación de la transcripción. Entre los genes reprimidos se encontraron varios que codifican proteínas relacionadas con la pared celular como XTH (xiloglucanos endotransglucosilasas-hidrolasas), pectinasas y glucanasas.

1.2.3. Genes diferenciales exclusivos de la interacción incompatible *Motelle-B. tabaci* a los 2 dpi.

Se obtuvieron 156 transcritos sobreexpresados y 185 transcritos reprimidos, únicamente en la interacción incompatible a los 2 dpi (Figura R4.2). El nivel de expresión de los 156 transcritos sobreexpresados fue de entre 2 y 24 veces mayor en las plantas *Motelle* infestadas que en las plantas sin infestación de la misma variedad. Los 185 transcritos reprimidos exclusivamente en la interacción incompatible se expresaron entre 2 y 14 veces menos en las plantas infestadas que en las plantas sin infestar (Anexo CD).

Como ya se mencionaba más arriba, la categoría funcional con mayor representación obtenida en Mapman incluía genes con función desconocida (Figura R4.3). Además de esta categoría, se obtuvieron otras con un alto porcentaje de genes diferenciales entre las que destacan la categoría RNA (que incluye procesamiento, unión y regulación de la transcripción) y representada por diversos factores de transcripción entre los que se encuentra la familia WRKY, conocida por su implicación en procesos de defensa; también se agruparon numerosos transcritos en procesos relacionados con el metabolismo de hormonas entre las que cabe destacar la proteína quinasa ACIK1, procesos de señalización como el Ca^{+2} llevado a cabo por la calmodulina, y la categoría proteína (que incluye síntesis, modificación y degradación). Un grupo con una representación de genes diferenciales similar a la de las categorías anteriores, fue el misceláneo que agrupa aquellos genes con funciones conocidas pero que Mapman no puede separar en otras categorías concretas. La categoría de estrés biótico estaba representada, en su mayoría, por genes sobreexpresados entre los que destacan aquellos que codifican a las proteínas PR (*pathogenesis-related*). Curiosamente, Mapman no

incluyó en esta categoría enzimas como la endo-1,3- β -glucosidasa que, según la clasificación de van Loon *et al.* (2006) pertenecen a la clase PR-2. La enzima NADPH oxidasa (*gp91^{phox}* homolog), que se incluyó también en la categoría de estrés biótico, se encontró reprimida tras la infestación con *B. tabaci*. La categoría de pared celular agrupó mayor número de transcritos sobreexpresados, entre los que se encontraron las XTH, que transcritos reprimidos.

Por el contrario, la categoría metabolismo secundario estaba formada por un mayor número de genes reprimidos que sobreexpresados destacando genes implicados en el metabolismo de flavonoides. Finalmente, la categoría de estrés abiótico tuvo representación únicamente de genes reprimidos entre los que destacaron aquellos que codifican pequeñas chaperonas (sHSP).

1.3. Expresión génica en la fase tardía de la infestación (12 dpi): Establecimiento y alimentación de la fase móvil N1 de *B. tabaci*.

Seguidamente se muestran (Tabla R4.6) los resultados del análisis de microarrays en la interacción compatible del tomate con *B. tabaci* y los genes seleccionados en la interacción incompatible a los 12 dpi que, por tanto, se corresponden mayoritariamente con las actividades de alimentación y establecimiento de la fase móvil N1 de *B. tabaci*.

Tabla R4.6. Número de genes diferencialmente expresados en las interacciones compatible e incompatible a los 12 dpi.

12 dpi	Sobreexpresados	Reprimidos	Total
Compatible	71	52	123
Incompatible	595	437	1032

Genes seleccionados cuyo p-valor corregido (FDR) fue menor a 0,05 y, además, presentaban una diferencia de expresión de al menos 2 veces en la comparación entre plantas infestadas y plantas no infestadas.

Existe un mayor número de genes diferencialmente expresados en la interacción incompatible que en la interacción compatible. En ambas

interacciones se obtuvieron más genes sobreexpresados que reprimidos, contrariamente a lo que sucedía a los 2 dpi.

Para conocer qué cambios transcriptómicos son comunes a las interacciones compatible e incompatible a los 12 dpi, se realizaron unos diagramas de Venn con los transcritos sobreexpresados o reprimidos, destacando los transcritos comunes a ambas interacciones (Figura R4.4).

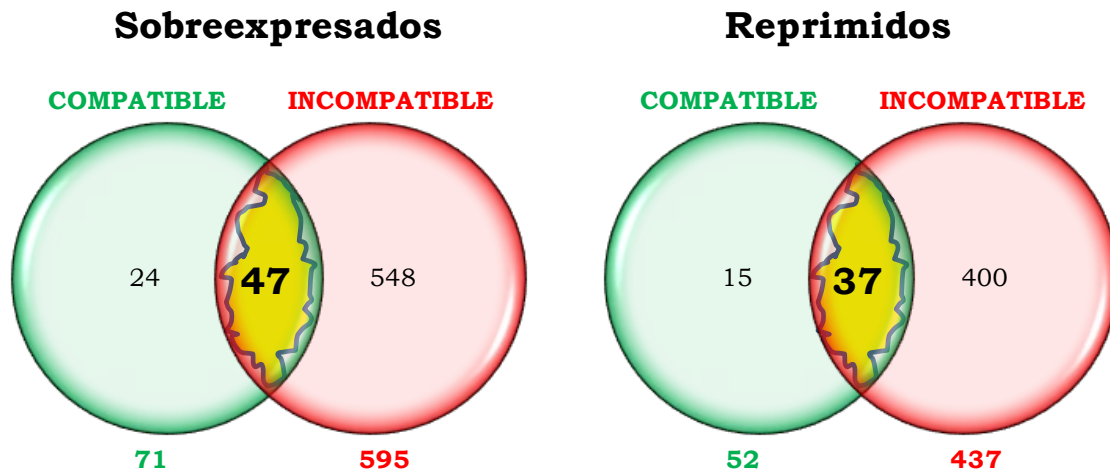


Figura R4.4. Diagrama de Venn del número de transcritos diferencialmente expresados en las interacciones compatible e incompatible a los 12 dpi con un valor de $FDR < 0,05$ y Expresión relativa (E.R.) ≥ 2 (sobreexpresados) y ≤ -2 (reprimidos).

A continuación, se presenta una gráfica (Figura R4.5.) con la clasificación de los genes diferenciales exclusivos de la interacción compatible, los exclusivos de la interacción incompatible y los comunes a ambas interacciones, agrupados en función de los procesos biológicos en los que intervienen.

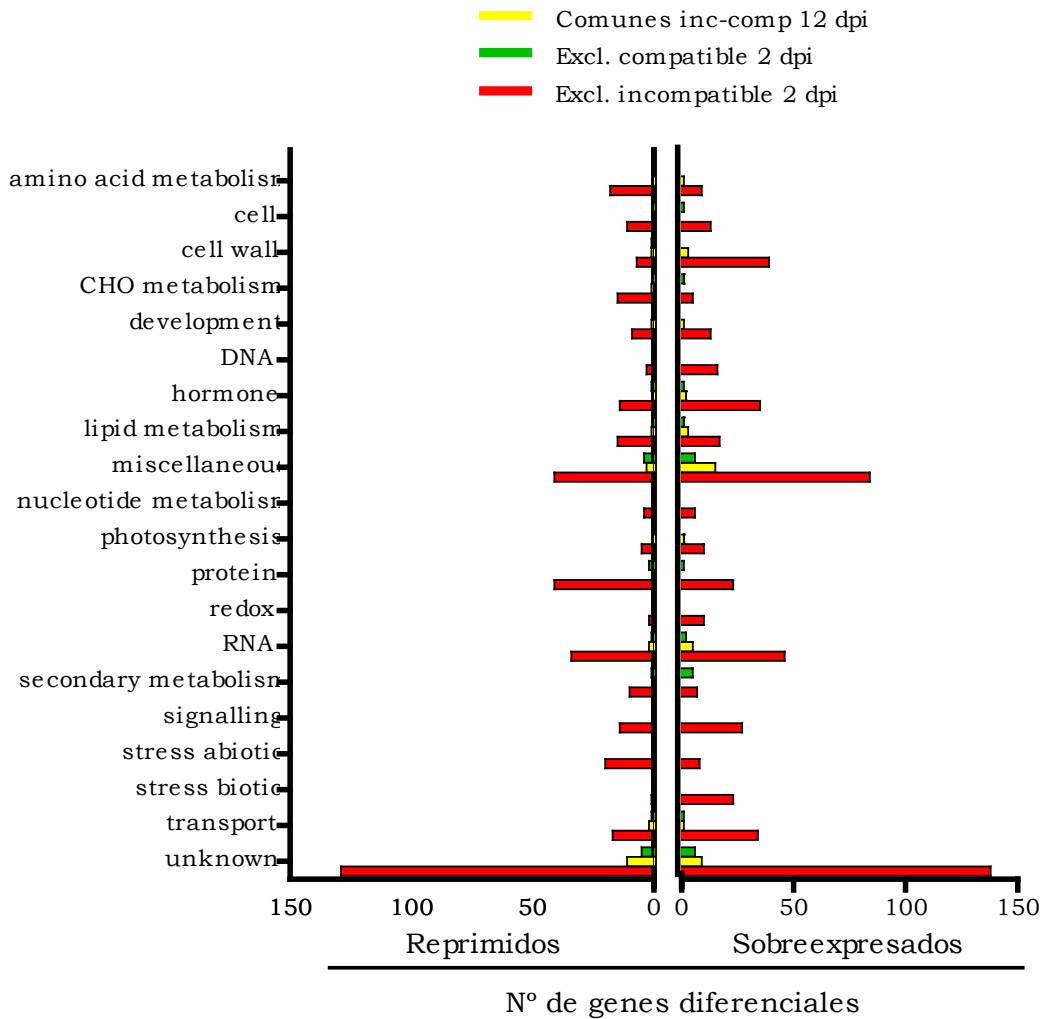


Figura R4.5. Clasificación de los transcritos diferenciales exclusivos de la interacción compatible (verde), los exclusivos de la interacción incompatible (rojo) y los comunes a ambas interacciones (amarillo), en función de los procesos biológicos en los que intervienen identificados por Mapman.

El grupo con mayor representación fue el compuesto por genes de los que se desconoce los procesos biológicos en los que participan así como el grupo misceláneo. En los siguientes apartados se explican con mayor detalle los resultados de esta clasificación, comenzando con los genes comunes y siguiendo, a continuación, con los genes exclusivos de cada interacción.

1.3.1. Genes diferenciales comunes en las interacciones compatible e incompatible del tomate con *B. tabaci* a los 12 dpi.

Como se ve en la Figura R4.4, se obtuvieron 47 genes sobreexpresados comunes a ambas interacciones, que suponen aproximadamente el 8% de los genes sobreexpresados en la interacción incompatible y el 66% en la compatible. Los porcentajes de los 37 genes reprimidos fueron similares: el 8,5% de los genes reprimidos en la interacción incompatible y el 71% en la compatible.

Entre los 47 genes sobreexpresados comunes a ambas interacciones se encontraron genes relacionados con la pared celular, la respuesta defensiva y el metabolismo secundario. De los 37 genes reprimidos comunes cabe destacar varios genes relacionados con la respuesta a estrés que codifican pequeñas chaperonas (sHSP) (Anexo CD).

1.3.2. Genes diferenciales exclusivos de la interacción compatible MoneyMaker-*B. tabaci* a los 12 dpi.

En la Figura R4.4 se muestra el número de transcritos diferencialmente expresados exclusivamente en la interacción compatible: 24 y 15 transcritos sobreexpresados y reprimidos, respectivamente. El nivel de expresión de los 24 transcritos sobreexpresados osciló en un rango entre 2 y 5 veces mayor en las plantas MoneyMaker infestadas que en las plantas sin infestar de la misma variedad. El nivel de expresión de los 15 transcritos reprimidos exclusivamente durante la interacción compatible a los 12 dpi, fue de 2 a 4 veces menor en las plantas infestadas que en las plantas sin infestación. (Anexo CD).

Según el análisis de los procesos biológicos en Mapman (Figura R4.5), algunos de los 24 transcritos que se sobreexpresaban únicamente en la interacción compatible fueron clasificados en procesos relacionados con el metabolismo secundario y, más en concreto, con el metabolismo de flavonoides, como la enzima flavanona 3-hidroxilasa. Entre los 15 transcritos reprimidos exclusivamente en la interacción compatible, se encontró el gen de la enzima celulosa sintasa 3, implicada en la biosíntesis de celulosa.

1.3.3. Genes diferenciales exclusivos de la interacción incompatible Motelle-*B. tabaci* a los 12 dpi.

Se obtuvieron 548 transcritos sobreexpresados y 400 transcritos reprimidos, únicamente en la interacción incompatible a los 12 dpi (Figura R4.4). El nivel de expresión de los 548 transcritos sobreexpresados fue de entre 2 y 50 veces mayor en las plantas Motelle infestadas que en las plantas sin infestación de la misma variedad. Los 400 transcritos reprimidos exclusivamente en la interacción incompatible se expresaron entre 2 y 86 veces menos en las plantas infestadas que en las plantas sin infestar. (Anexo CD).

La categoría RNA estaba formada por un número similar de transcritos sobreexpresados, entre los que destaca la familia WRKY y la proteína CONSTANS, y de transcritos reprimidos, entre los que se encuentra el factor de transcripción MADS-box. Otras categorías agruparon mayor cantidad de transcritos sobreexpresados que reprimidos, por ejemplo, la categoría pared celular entre los que destacan los genes que codifican las expansinas y las XTH, la categoría metabolismo de hormonas que incluyó el gen que codifica la proteína DELLA, la categoría señalización que incluyó la calmodulina y la MAPK3 y la categoría DNA que agrupó genes codificadores de histonas, cuya expresión parece estar inducida tras la infección con patógenos. También se encontró sobreexpresado el gen *Snakin-2* incluido en la categoría de procesos fotosintéticos.

Las categorías que incluyen genes implicados en el metabolismo de aminoácidos, metabolismo de carbohidratos y el metabolismo secundario agruparon un mayor número de transcritos reprimidos que sobreexpresados, destacando la represión de la proteína ELI3, incluida en la categoría de metabolismo secundario. La categoría proteína también agrupó mayor número de transcritos reprimidos que sobreexpresados pero, entre estos últimos cabe destacar los genes que codifican los inhibidores de proteasas. También en la categoría de estrés abiótico se obtuvo mayor representación de genes reprimidos que sobreexpresados destacando la presencia de varias chaperonas relacionadas con la respuesta a estrés mientras que en la categoría de estrés biótico, en la que se encontraron PRs y las proteínas codificadas por los genes *Ve1* y *Ve2*, responsables de la resistencia a *Verticillium dahliae* en tomate, se

clasificaron más genes sobreexpresados que reprimidos. Entre los reprimidos agrupados en procesos de estrés biótico cabe destacar la enzima NADPH oxidasa (*gp91^{phox} homolog*).

1.4. Comparación de la expresión génica de la planta en las dos fases de la infestación por *B. tabaci* (2 y 12 dpi) durante la interacción compatible.

A partir de los transcritos diferenciales obtenidos para la interacción compatible a los 2 y 12 dpi (Tablas R4.5 y R4.6) se realizó una comparación de los mismos. En primer lugar se muestran los genes que sufren la misma alteración en las dos fases (temprana y tardía) de la infestación (genes comunes) y, a continuación, los genes cuya expresión varía diferencial y exclusivamente en cada fase correspondiendo con una etapa distinta del desarrollo del insecto.

El rango de expresión de los transcritos sobreexpresados (Anexo CD) durante la interacción compatible fue similar a los 12 dpi (de 2 a 6 veces mayor en las plantas infestadas que en las plantas sin infestar) que a los 2 dpi (de 2 a 4 veces mayor en las plantas infestadas frente a las plantas sin infestar) mientras que para los transcritos reprimidos, el rango de expresión fue mayor a los 2 dpi (de 2 a 9 veces menor en las plantas infestadas respecto a las no infestadas) que a los 12 dpi (sólo de 2 a 4 veces menor en las plantas infestadas que en las plantas sin infestar). La comparación del número de transcritos diferencialmente expresados a los 2 y 12 dpi, se representó mediante diagramas de Venn con los transcritos sobreexpresados o reprimidos por separado (Figura R4.6).

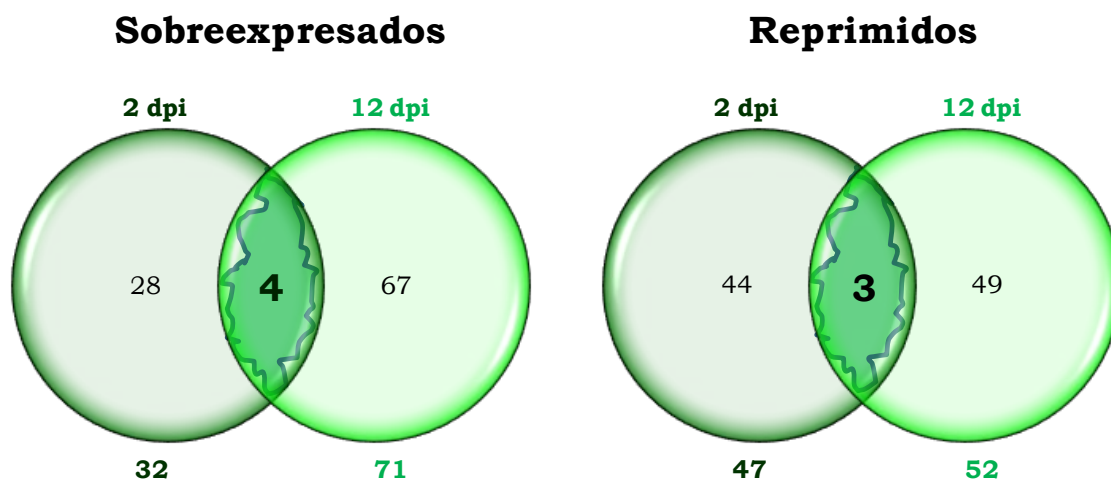


Figura R4.6. Diagrama de Venn del número de transcritos diferencialmente expresados en la interacción compatible a los 2 y 12 dpi con un valor de FDR<0,05 y Expresión relativa (E.R.) ≥ 2 (sobrexpresados) y ≤ -2 (reprimidos).

Como se puede observar, sólo 7 transcritos de los que se expresaban diferencialmente en la interacción compatible MoneyMaker-*B. tabaci*, lo hicieron tanto a los 2 como a los 12 dpi. Por el contrario, la gran mayoría resultaron ser exclusivos de una u otra de estas dos fases de la infestación.

A continuación, se presenta la gráfica (Figura R4.7.) con la clasificación de los transcritos diferenciales exclusivos de la interacción compatible a los 2 dpi o a los 12 dpi, agrupados en función de los procesos biológicos en los que intervienen. En esta gráfica no se incluyeron los genes comunes a ambas fases de la infestación porque su número era muy pequeño y se describen individualmente más adelante.

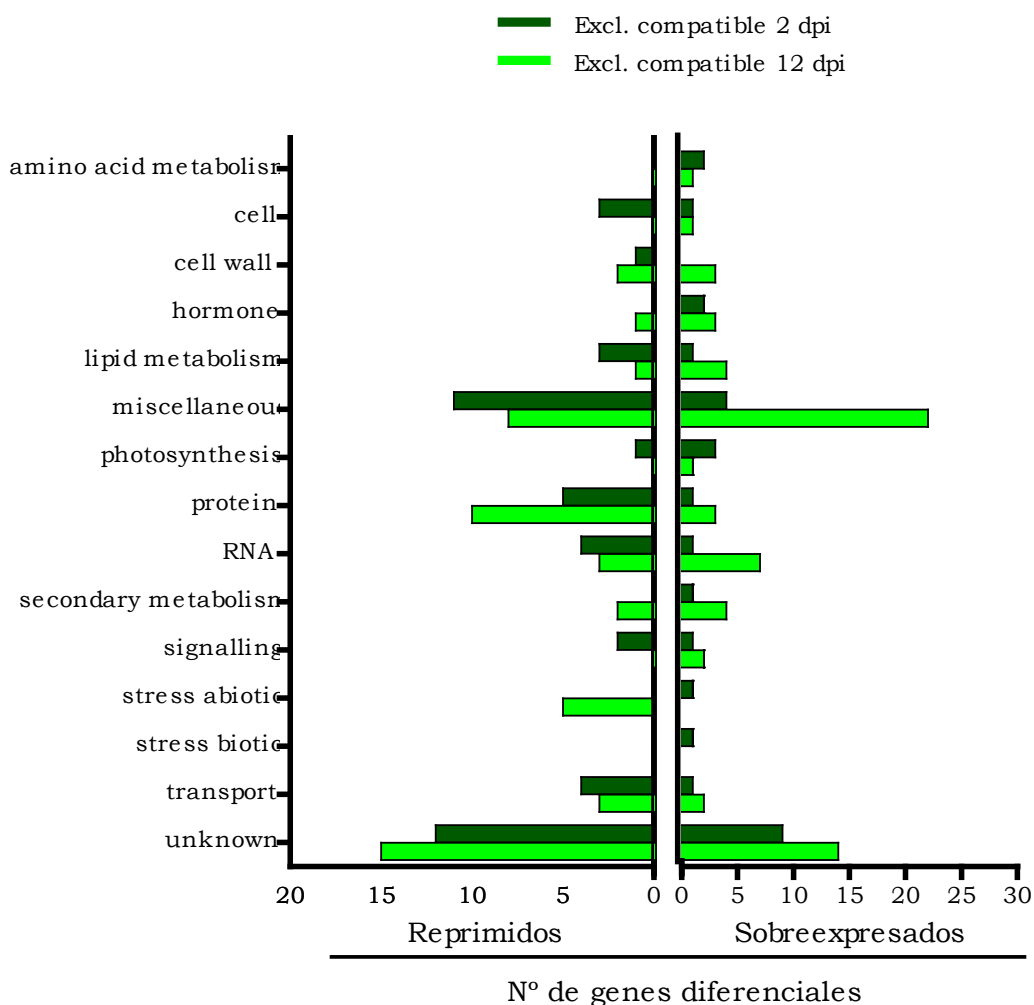


Figura R4.7. Clasificación de los transcritos diferenciales exclusivos de la interacción compatible a los 2 dpi (verde oscuro) y los exclusivos a los 12 dpi (verde claro), en función de los procesos biológicos en los que intervienen identificados por Mapman.

Las categorías con mayor representación son las que incluyen genes con función desconocida o cuya función es conocida pero Mapman no las separa en categorías individuales (grupo misceláneo). En los siguientes apartados se explica con mayor detalle los resultados obtenidos, comenzando con los genes comunes y siguiendo, a continuación, con los genes exclusivos de cada fase de la infestación.

1.4.1. Genes diferenciales de la interacción compatible comunes a las dos fases de la infestación.

En la interacción compatible se obtuvieron únicamente 4 genes sobreexpresados comunes a los 2 y 12 dpi, que suponen aproximadamente el 12% de los genes sobreexpresados a los 2 dpi y el 5,6% del número de transcritos obtenido a los 12 dpi. El porcentaje representado por los 3 genes reprimidos que se obtuvieron fue algo más del 6% de los transcritos diferencialmente expresados a los 2 dpi y casi el 6% de los transcritos obtenidos a los 12 dpi.

Entre los 4 genes sobreexpresados se encontraron dos implicados en procesos de respuesta a estrés, un gen que codifica a una proteína PR relacionada con procesos de defensa y un gen que codifica a una proteína asociada a la membrana del peroxisoma cuya función no ha sido dilucidada.

De los 3 transcritos reprimidos, de uno de ellos no se obtuvo ninguna información y de otro no se encontró ninguna función asociada. El tercer gen corresponde a una enzima reductasa asociada a la síntesis de fenilpropanoides en células lignificantes.

1.4.2. Genes diferenciales de la interacción compatible exclusivos de la fase temprana de la infestación (2 dpi).

En la Figura R4.6 se muestra el número de transcritos diferencialmente expresados en la interacción compatible, exclusivamente a los 2 dpi: 28 y 44 transcritos sobreexpresados y reprimidos, respectivamente. El nivel de expresión de los transcritos sobreexpresados exclusivamente a los 2 dpi osciló

en un rango entre 2 y 4 veces mayor en las plantas Moneymaker infestadas que en las plantas sin infestar de la misma variedad. El nivel de expresión de los 44 transcritos reprimidos exclusivamente a los 2 dpi, fue de 2 a 9 veces menor en las plantas infestadas que en las plantas sin infestación. (Anexo CD).

En la clasificación funcional en Mapman (Fig. R4.7) se observó una mayor representación de genes sobreexpresados que de reprimidos en las categorías del metabolismo de aminoácidos, metabolismo de hormonas (que incluyó genes implicados en el metabolismo del etileno), metabolismo secundario y fotosíntesis (en la que destacó la proteína Snakin-2). Entre los genes sobreexpresados son destacables la chaperona Hsp70, incluida en la categoría de estrés abiótico, y la proteína PR-1, agrupada en la categoría de estrés biótico.

En cambio, se obtuvo mayor representación de genes reprimidos que de sobreexpresados en las categorías de procesos celulares, pared celular (en la que destacan las enzimas XTH y endo- β -1,4-D-glucanasa), metabolismo de lípidos (en la que destaca la fosfolipasa PLDb2, descrita en respuesta a estrés), proteína, RNA (que estaba representada por varias familias de factores de transcripción), señalización y transporte. Aunque englobada en el grupo misceláneo cabe destacar la represión de la enzima NADPH: protoclorofila oxidorreductasa que participa en los últimos pasos de la biosíntesis de clorofila cuyo papel es de vital importancia en la fotosíntesis.

1.4.3. Genes diferenciales de la interacción compatible exclusivos de la fase tardía de la infestación (12 dpi).

Se obtuvieron 67 transcritos sobreexpresados y 49 transcritos reprimidos, únicamente a los 12 dpi (Figura R4.5). El nivel de expresión de los 67 transcritos sobreexpresados fue de entre 2 y 6 veces mayor en las plantas infestadas que en las plantas sin infestación. Los 49 transcritos reprimidos exclusivamente a los 12 dpi durante la interacción compatible, se expresaron entre 2 y 4 veces menos en las plantas infestadas que en las plantas sin infestar. (Anexo CD).

En general, se obtuvo mayor representación de genes sobreexpresados que de reprimidos en la mayoría de las categorías, entre las que destaca la

categoría RNA (que incluyó los factores de transcripción WRKY y MYB) y la categoría de metabolismo de hormonas (en concreto del metabolismo del etileno). También hay que mencionar la categoría pared celular (que incluyó varias enzimas XTH) y, finalmente, la categoría metabolismo secundario que agrupó genes sobreexpresados relacionados con el metabolismo de flavonoides, entre los que se encuentra el gen que codifica la enzima calcona sintasa. Además, aunque se trataba de una interacción compatible, se detectó la sobreexpresión de un inhibidor de metalo-carboxipeptidasas que podría estar relacionado con procesos defensivos, aunque Mapman no lo asignó a ninguna categoría conocida.

Las categorías con mayor número de transcritos reprimidos fueron las de transporte, proteínas y estrés abiótico. De hecho, esta última agrupó únicamente genes reprimidos, algunos de los cuales codificaban diferentes clases de pequeñas chaperonas. Finalmente es destacable la represión de un gen implicado en procesos de defensa que codifica la enzima inhibidora de endoglucanasas patogénicas, que Mapman no pudo asignar a ninguna categoría conocida.

1.5. Comparación de la expresión génica de la planta en las dos fases de la infestación por *B. tabaci* (2 y 12 dpi) durante la interacción incompatible.

A partir de los transcritos diferenciales obtenidos para la interacción incompatible a los 2 y 12 dpi (Tablas R4.5 y R4.6) se realizó una comparación de los mismos. A continuación se muestran los genes que varían su expresión de forma similar en las dos fases (temprana y tardía) de la infestación (genes comunes) y, seguidamente, los genes cuya expresión varía exclusivamente en cada fase correspondiendo con una etapa distinta del desarrollo del insecto. El rango de expresión de los transcritos sobreexpresados y reprimidos durante la interacción incompatible fue mucho mayor a los 12 que a los 2 dpi: a los 2 dpi los transcritos se sobreexpresaron de 2 a 24 veces más en las plantas infestadas que en las no infestadas y se reprimieron de 2 a 14 veces menos en las plantas infestadas frente a las no infestadas. En cambio, a los 12 dpi los transcritos se sobreexpresaron de 2 a 51 veces más en las plantas infestadas respecto a las plantas no infestadas y se reprimieron de 2 a 87 veces menos en las plantas infestadas que en las no infestadas (Anexo CD).

La comparación del número de transcritos diferencialmente expresados a los 2 y 12 dpi, se representó mediante diagramas de Venn con los transcritos sobreexpresados o reprimidos por separado (Figura R4.8).

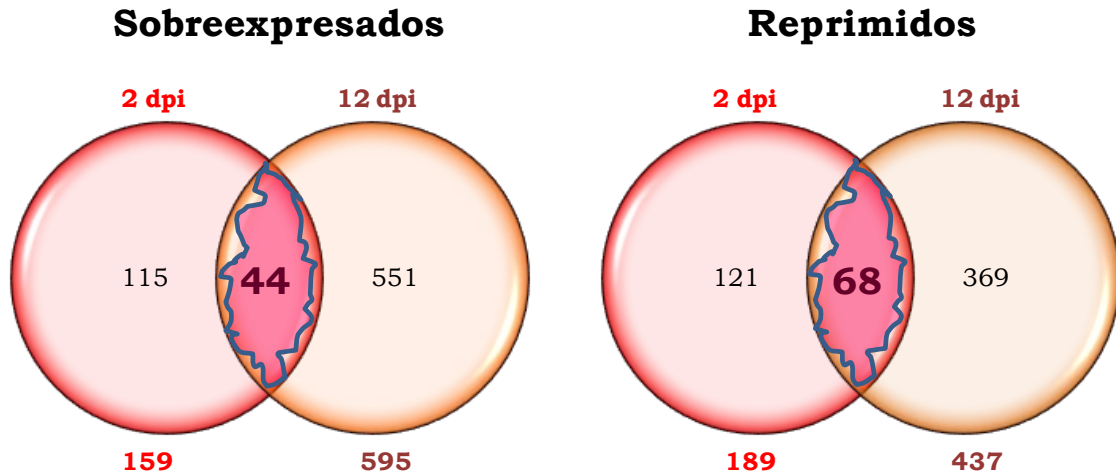


Figura R4.8. Diagrama de Venn del número de transcritos diferencialmente expresados en la interacción incompatible a los 2 y 12 dpi con un valor de $FDR < 0,05$ y Expresión relativa (E.R.) ≥ 2 (sobreexpresados) y ≤ -2 (reprimidos).

A continuación, se presenta la gráfica (Figura R4.9.) con la clasificación de los transcritos diferenciales exclusivos de la interacción incompatible a los 2 dpi o a los 12 dpi así como los comunes a ambas fases, agrupados en función de los procesos biológicos en los que intervienen.

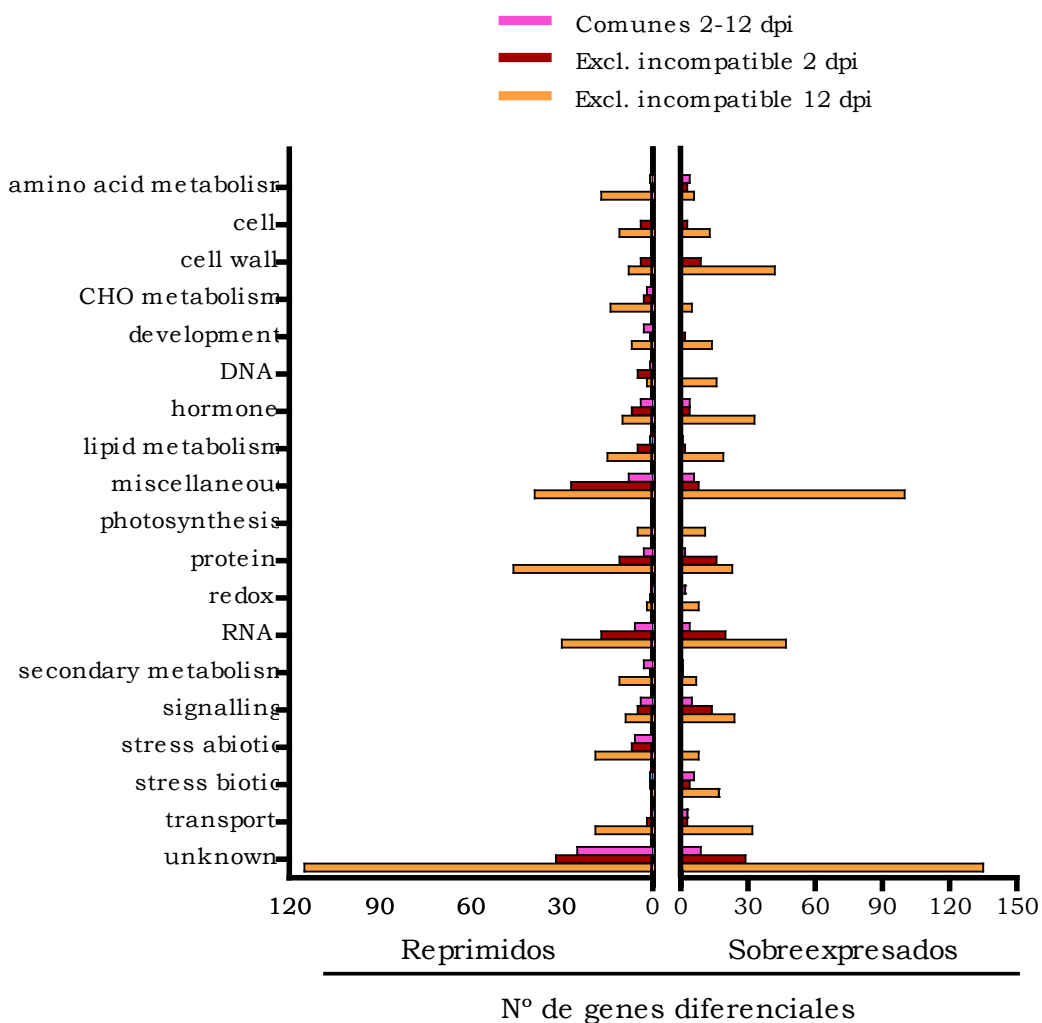


Figura R4.9. Clasificación de los transcritos diferenciales exclusivos de la interacción incompatible a los 2 dpi (rojo oscuro), los exclusivos a los 12 dpi (naranja) y los comunes (rosa), en función de los procesos biológicos en los que intervienen identificados por Mapman.

Las categorías con mayor representación son las que incluyen genes con función desconocida o cuya función es conocida pero Mapman no las separa en categorías individuales (grupo misceláneo). En los siguientes apartados se explica con mayor detalle esta clasificación para los genes comunes y exclusivos a los 2 y 12 dpi.

1.5.1. Genes diferenciales en la interacción incompatible, comunes a las dos fases de la infestación.

En la interacción incompatible se obtuvieron 44 genes sobreexpresados y 68 genes reprimidos, comunes a los 2 y 12 dpi, que suponen aproximadamente el 28% de los genes sobreexpresados a los 2 dpi y el 7% del

número de transcritos obtenido a los 12 dpi. El porcentaje en los genes reprimidos fue del 36% de los transcritos reprimidos a los 2 dpi y del 16% de los transcritos obtenidos a los 12 dpi.

En la clasificación de Mapman (Fig. R4.9) se observó mayor representación de genes sobreexpresados en la categoría señalización en la que destaca la calmodulina y la MAPK3, y la categoría estrés biótico destacando PRs y el gen *Ve*. Además, en la categoría RNA cabe destacar la sobreexpresión de los factores de transcripción de las familias MYB y WRKY, y, en concreto WRKY30, si bien esta categoría incluyó un mayor número de transcritos reprimidos que sobreexpresados.

Únicamente se asignó un gen reprimido a la categoría estrés biótico: *gp91^{phox}*, implicado en procesos de estrés oxidativo. En la categoría estrés abiótico únicamente se agruparon genes cuya expresión se reprimía, incluyendo genes que codifican diferentes clases de pequeñas chaperonas. El resto de categorías estuvieron representadas por un mayor número de genes reprimidos que sobreexpresados. Por otro lado, se encontró reprimido el gen que codifica la proteína ELI3, incluido en la categoría metabolismo secundario.

1.5.2. Genes diferenciales en la interacción incompatible exclusivos de la fase temprana de la infestación (2 dpi).

En la Figura R4.8 se muestra el número de transcritos diferencialmente expresados exclusivamente en la interacción incompatible a los 2 dpi: 115 y 121 transcritos sobreexpresados y reprimidos, respectivamente. El nivel de expresión de los 115 transcritos sobreexpresados fue de entre 2 y 24 veces mayor en las plantas Motelle infestadas que en las plantas sin infestar de la misma variedad. El nivel de expresión de los 121 transcritos reprimidos exclusivamente durante la interacción incompatible a los 2 dpi, era de 2 a 14 veces menor en las plantas infestadas que en las plantas sin infestación. (Anexo CD).

Las categorías de Mapman con mayor representación fueron las de RNA y proteína, destacando en la primera la sobreexpresión de factores de transcripción WRKY y ERF. Se encontraron más genes sobreexpresados que reprimidos en la categoría señalización, destacando la presencia de calmodulinas y la proteína phi-1 cuya expresión se ve inducida en respuesta a

estrés y en la categoría pared celular que incluye las enzimas XTH, endo-1,4-glucanasa y pectinesterasas. En la categoría de estrés biótico también se agrupó una mayor cantidad de genes sobreexpresados, algunos de ellos codificadores de PRs distintas a las proteínas comunes a ambas fases de la infestación (comunes).

Respecto a los genes reprimidos sólo en la fase temprana, en la categoría de estrés abiótico se agruparon únicamente genes reprimidos entre los que se encontraban genes codificadores de chaperonas, como la Hsp70. En la categoría proteína se incluyó el gen que codifica la proteína copine, una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca^{+2} . En la categoría metabolismo de hormonas se agrupó un mayor número de genes reprimidos, que estaban relacionados con procesos de síntesis o degradación de diferentes hormonas, frente a un menor número de genes sobreexpresados pero que estaban relacionados con la transducción de la señal del etileno. La categoría metabolismo de lípidos estaba formada por una mayor cantidad de genes reprimidos entre los que destaca la fosfolipasa PLDb2. Entre los genes reprimidos se encontró la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) que participa en la ruta de la pentosa fosfato, íntimamente relacionada con la glucólisis, y que fue asignada a la categoría miscelánea.

1.5.3. Genes diferenciales en la interacción incompatible exclusivos de la fase tardía de la infestación (12 dpi).

Se obtuvieron 551 transcritos sobreexpresados y 369 transcritos reprimidos, únicamente a los 12 dpi de la interacción incompatible (Figura R4.8). El nivel de expresión de los 551 transcritos sobreexpresados fue de entre 2 y 51 veces mayor en las plantas infestadas que en las plantas sin infestación. Los 369 transcritos reprimidos se expresaron entre 2 y 87 veces menos en las plantas infestadas que en las plantas sin infestar (Anexo CD).

Una de las categorías con mayor representación de genes diferenciales fue la categoría RNA, que incluyó un número similar de genes sobreexpresados y reprimidos: en el grupo de los sobreexpresados destacaban los que codifican diferentes familias de factores de transcripción, entre los que se encontraron WRKYs diferentes a los obtenidos en ambas fases de la infestación (comunes) como WRKY6 y la proteína CONSTANS. Entre los genes

reprimidos de esta misma categoría RNA se incluían algunos que codifican otros factores de transcripción, destacando los de la familia MADS-box.

El análisis de los procesos biológicos en Mapman mostró que la mayoría de los restantes genes sobreexpresados se agruparon en las categorías de pared celular, en la que cabe resaltar la presencia de diversas enzimas XTH, expansinas, extensinas y pectinesterasas y la categoría metabolismo de hormonas, que incluyó numerosos genes implicados en diferentes rutas de señalización entre las que cabe destacar la ruta del ácido salicílico, la del etileno y la de las giberelinas resaltando, de esta última, la sobreexpresión de la proteína DELLA. La categoría señalización también albergó mayor número de genes sobreexpresados que reprimidos, encontrándose proteínas de señalización de Ca^{+2} diferentes a la calmodulina. La categoría estrés biótico estuvo representada únicamente por genes sobreexpresados entre los que se encontraron genes codificadores de PRs e inhibidores de proteasas *Pin1* y *Pin2*. Por último, entre los transcritos sobreexpresados cabe destacar el gen que codifica la fosfatasa ácida 1, ligado al gen *Mi*, pero que Mapman no pudo asignar a una categoría concreta e incluyó en la categoría miscelánea.

Las categorías que agruparon mayor cantidad de transcritos reprimidos fueron la de proteína y la categoría estrés abiótico en la que se incluyeron genes que codifican pequeñas chaperonas. Entre los genes reprimidos, destaca el gen que codifica la proteína Snakin-2, incluida en la categoría fotosíntesis y un gen implicado en procesos de defensa que codifica la enzima inhibidora de endoglucanasas patogénicas pero que Mapman no pudo asignar a ninguna categoría conocida.

1.6. Validación de los resultados obtenidos en los análisis de microarrays mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

Para realizar la validación por qRT-PCR, se eligieron al azar 12 transcritos con diferente grado de expresión diferencial: altamente sobreexpresados, altamente reprimidos y baja expresión diferencial. En la Tabla R4.7 se muestran, para cada transcrito, el identificador de Affymetrix, la descripción del GenBank y los valores obtenidos en el análisis de microarrays y mediante qRT-PCR.

Tabla R4.7. Valores de expresión relativa obtenidos mediante microarray y qRT-PCR de los transcritos seleccionados en la interacción incompatible y la interacción compatible.

Id. Affymetrix	Descripción GenBank	Valores de expresión relativa			
		Incompatible		Compatible	
		qRT-PCR	Microarray	qRT-PCR	Microarray
Les.2325.1.S1_at	Alcohol dehydrogenase homolog	42,90	61,76	5,06	5,78
Les.2591.1.S1_at	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase B	16,21	17,04	2,18	2,21
Les.4008.1.S1_a_at	Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase 16 protein	5,96	4,44	2,48	2,15
Les.45.1.S1_at	Osmotin-like protein	4,88	8,26	1,44	1,60
LesAffx.286.2.S1_a_at	Similar to aquaporin	2,07	2,82	1,31	1,33
Les.2121.1.A1_at	Hydroxyproline-rich systemin	1,98	2,16	2,23	2,18
Les.4150.1.S1_at	Mitochondrial small heat shock protein	-3,65	-6,56	-3,03	-3,32
Les.4026.1.S1_at	Xyloglucan-specific fungal endoglucanase inhibitor protein precursor	-4,81	-5,67	-3,73	-4,06
Les.3677.1.S1_at	Small heat shock protein	-10,82	-46,28	-1,63	-2,49
Les.3581.1.S1_at	Class II small heat shock protein Le-HSP17.6	-18,41	-31,40	-2,88	-3,68
Les.12.1.S1_at	SNF4	-22,62	-64,34	-2,22	-3,33
Les.3739.1.S1_at	Small heat shock protein	-24,09	-91,79	-4,48	-6,67

En la Figura R4.10 se muestra la expresión relativa, obtenida mediante qRT-PCR, de los 12 transcritos diferencialmente expresados en las interacciones incompatible y compatible a los 12 dpi. En la figura se indica el identificador de Affymetrix para cada transcrito.

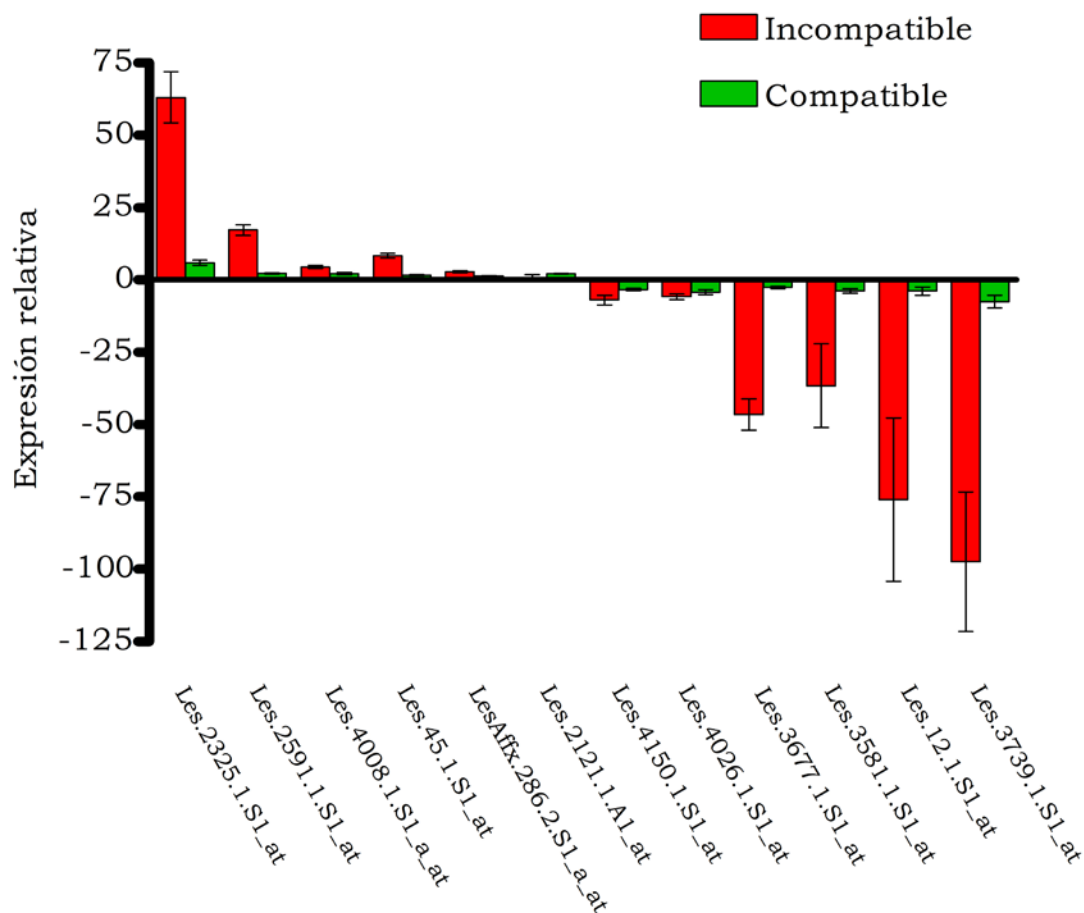


Figura R4.10. Valores de expresión relativa obtenidos mediante qRT-PCR de 12 transcritos seleccionados en el análisis de microarray a los 12 dpi en la interacción incompatible y la interacción compatible. En la interacción incompatible se estimó el valor para cada gen comparando el dato de plantas Motelle infestadas con *B. tabaci* frente a plantas Motelle no infestadas. En la interacción compatible se estimó el valor para cada gen del mismo modo pero utilizando las plantas Moneymaker infestadas y no infestadas. Los niveles de expresión se calcularon en relación al gen endógeno de la Ubiquitina (*Ubi3*).

A continuación se presentan los resultados del análisis realizado para establecer la posible correlación entre ambos grupos de datos. Los datos obtenidos mediante qRT-PCR se transformaron a una escala logarítmica, para facilitar la comparación, dado que los datos del microarray están expresados en escala log2 (Figura R4.11).

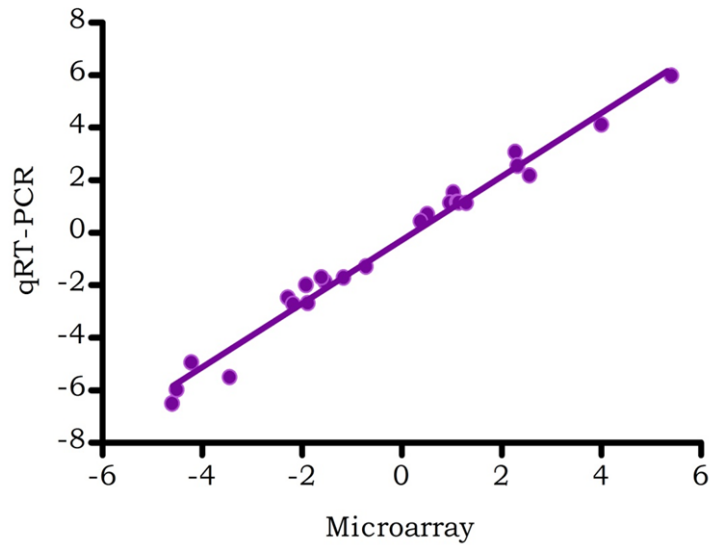


Figura R4.11. Correlación positiva entre la expresión génica obtenida en el análisis de microarray (eje X) y la expresión génica obtenida mediante qRT-PCR (eje Y).

A pesar de las diferencias existentes entre los dos métodos de cuantificación, se obtuvo un valor del coeficiente de correlación de Pearson (r) de 0,9907 (Fig. R4.11), lo que indica una elevada correlación positiva entre los datos obtenidos por ambos métodos y, por tanto, valida los resultados obtenidos mediante el análisis de microarrays.

2. Análisis de la expresión génica global del tomate carente del gen *Mi-1* en la resistencia inducida por BTH a *B. tabaci*.

Se presentan, en primer lugar, los cambios en la expresión génica ocasionados exclusivamente por el tratamiento con BTH de plantas no infestadas Moneymaker (carentes del gen *Mi-1*), y el efecto que una posterior infestación con *B. tabaci* ejerce sobre las diferencias basales de expresión entre plantas tratadas y no tratadas con BTH. También se comparan los efectos sobre la expresión génica del tomate ocasionados por el tratamiento con BTH, con los causados por una infestación de *B. tabaci*. A continuación se presentan los resultados obtenidos en la interacción incompatible tomate-*B. tabaci* inducida por BTH, es decir, los cambios de expresión que se producen en las plantas Moneymaker tratadas con BTH, causados por la posterior infestación con *B. tabaci*. Finalmente, la resistencia a *B. tabaci* inducida por BTH en Moneymaker se compara con la interacción compatible de las mismas plantas sin tratamiento y con la resistencia mediada por *Mi-1* en Motelle.

2.1. Efecto del tratamiento con BTH sobre el transcriptoma del tomate Moneymaker.

En primer lugar, se presentan las diferencias basales de expresión ocasionadas exclusivamente por el tratamiento con BTH en plantas Moneymaker no infestadas. En segundo lugar, se muestra el efecto que una posterior infestación con *B. tabaci* ejerce sobre dichas diferencias de expresión.

2.1.1. Comparación de plantas Moneymaker tratadas y no tratadas con BTH, en ausencia de infestación.

Para conocer el efecto basal del BTH en plantas de la variedad Moneymaker de 8 semanas de edad, se compararon plantas tratadas con BTH (ver Metodología específica) con otras no tratadas, en ausencia de infestación. Se obtuvieron 1280 genes diferencialmente expresados tras el tratamiento con BTH, de los cuales 502 genes se sobreexpresaban y 778 se reprimían en las plantas tratadas en relación a las plantas no tratadas (Anexo CD).

A continuación, se presenta una gráfica (Figura R4.12) con la clasificación de los transcritos diferenciales obtenida en Mapman.

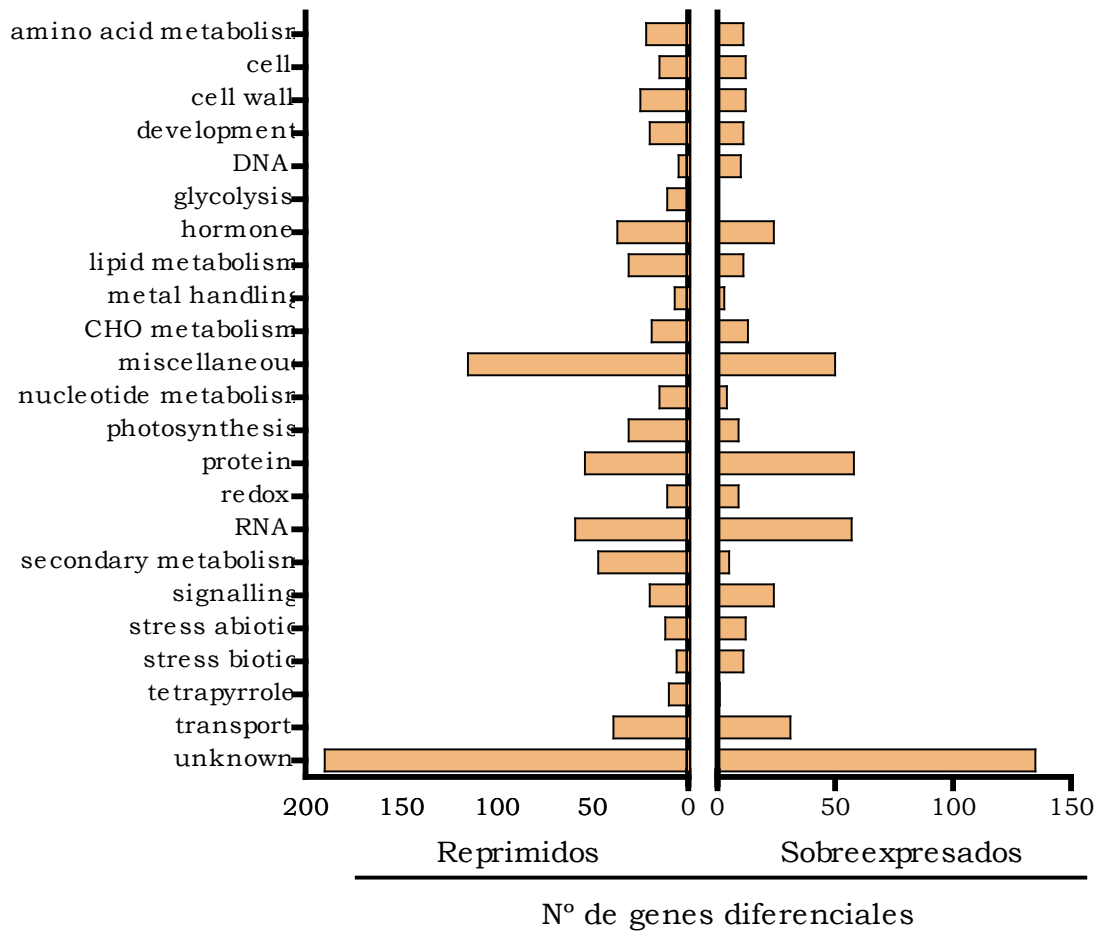


Figura R4.12. Clasificación de los transcritos diferenciales de las plantas tratadas con BTH por comparación con las plantas no tratadas, en ausencia de infestación, en función de los procesos biológicos en los que intervienen, identificados en Mapman.

En el análisis funcional en Mapman, además de las categorías desconocida y miscelánea, se agruparon un gran número de genes diferenciales en la categoría proteína, en la que destaca la sobreexpresión de genes codificadores de proteínas Avr9/Cf-9 y la represión del gen que codifica el inhibidor de proteasas 1 (*Pin1*) y de proteínas inducidas por herida (*win*), y la categoría RNA, en la que se encontraron genes sobreexpresados que codifican diferentes factores de transcripción entre los que destaca las familias MYB y WRKY y la proteína CIP2a (CONSTANS interacting protein 2a) y genes reprimidos que codificaban otras proteínas CONSTANS (*COL1*, *STO* y *CONSTANS-like protein*). La categoría estrés abiótico agrupó el mismo número de genes sobreexpresados y reprimidos aunque la mayoría de los sobreexpresados codificaban proteínas no identificadas mientras que los genes reprimidos codificaban, en su mayoría, chaperonas. La categoría metabolismo de hormonas, que incluyó genes implicados en la ruta de señalización de ABA, auxinas, brasinosteroides, etileno, giberelinas, ácido jasmónico y ácido

salicílico, agrupó un número similar de genes sobreexpresados y reprimidos mostrando la interacción existente entre las diferentes rutas. Se agruparon un mayor número de genes sobreexpresados que reprimidos en la categoría señalización, en la que cabe destacar la calmodulina, una MAPK y la proteína phi-1. También se sobreexpresaron la proteína phi-2, que se incluyó en la categoría de hormonas, y diversas PRs y el gen *Ve*, incluidas en la categoría estrés biótico.

En esta categoría de estrés biótico se incluyó también el gen *gp91^{phox}* (NADPH oxidasas) cuya expresión se reprimía por efecto del tratamiento con BTH. El resto de categorías agrupó una mayor cantidad de genes reprimidos que sobreexpresados. Algunas de estas categorías son: pared celular (destacando expansinas, poligalacturonasas, la enzima celulosa sintasa y varias XTH), la categoría fotosíntesis en la que cabe resaltar la represión de la enzima Rubisco y la sobreexpresión de la proteína Snakin-2, y la categoría metabolismo secundario en la que destacaría la represión del gen que codifica la proteína ELI3 y diversas enzimas relacionadas con el metabolismo de flavonoides como la calcona sintasa.

2.1.2. Comparación de plantas Moneymaker tratadas y no tratadas con BTH, tras la infestación con *B. tabaci*.

En la comparación entre plantas tratadas y no tratadas con BTH, que posteriormente fueron todas infestadas con *B. tabaci*, se obtuvieron 1179 transcritos diferencialmente expresados, de los cuales 561 se sobreexpresaban y 618 se reprimían. El rango de expresión en los transcritos sobreexpresados fue de 2 a 41 veces mayor en las plantas tratadas con BTH y posteriormente infestadas que en las plantas que únicamente fueron infestadas. Los transcritos reprimidos tuvieron un rango de expresión de mayor amplitud: su expresión era de 2 a 138 veces menor en las plantas tratadas con BTH e infestadas que en las plantas no tratadas pero sí infestadas. (Anexo CD).

La comparación de estos resultados con los obtenidos previamente a partir de plantas tratadas y no tratadas con BTH, en ausencia de infestación (2.1.1.) indican si la infestación con *B. tabaci* altera de algún modo las diferencias basales que se habían detectado entre ellas y que eran debidas al tratamiento con BTH. Esta comparación se representa mediante diagramas de Venn con los transcritos diferenciales sobreexpresados y reprimidos,

distinguiendo los comunes y los específicos para cada uno de los dos casos (Figura R4.13).

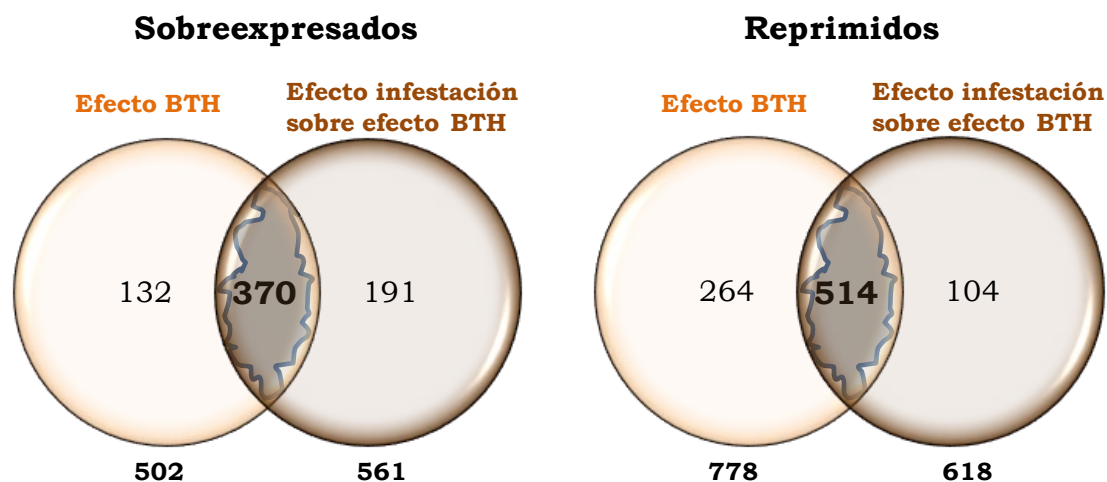


Figura R4.13. Diagrama de Venn con los transcritos diferenciales sobreexpresados y reprimidos, de la comparación entre plantas Moneymaker tratadas con BTH y no tratadas, en ausencia de infestación y a los 2 días de la infestación con *B. tabaci* con un valor de $FDR < 0,05$ y Expresión relativa (E.R.) ≥ 2 (sobreexpresados) y ≤ -2 (reprimidos).

La infestación con *B. tabaci* altera ligeramente las diferencias basales debidas al tratamiento con BTH, ya que la mayoría de los transcritos obtenidos tras la infestación con *B. tabaci* (el 67% de los sobreexpresados y el 83% de los reprimidos), son los mismos que también variaban su expresión por efecto del BTH en ausencia de infestación.

A continuación, se presenta una gráfica (Figura R4.14) con la clasificación de los transcritos diferenciales exclusivos para cada caso así como los genes comunes, agrupados en función de los procesos biológicos en los que intervienen.

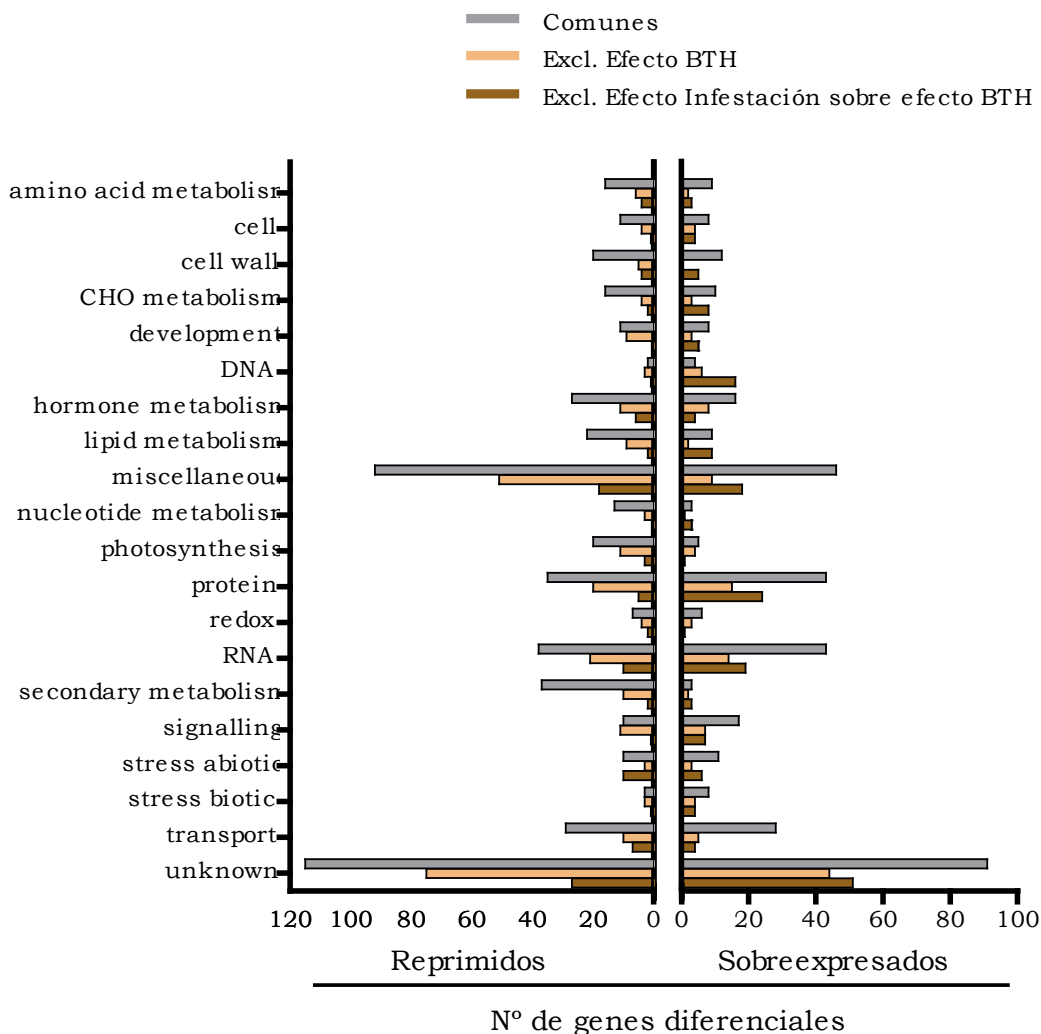


Figura R4.14. Clasificación de los transcritos diferenciales exclusivos del efecto del BTH en las plantas no infestadas (marrón claro), exclusivos del efecto de la infestación sobre las diferencias debidas al BTH (marrón oscuro) y los comunes a ambos casos (gris) en función de los procesos biológicos en los que intervienen, identificados en Mapman.

Como sucedía en comparaciones anteriores, el análisis de Mapman agrupó la mayoría de los genes diferenciales (comunes y exclusivos) en las categorías desconocida y miscelánea.

Entre los transcritos comunes a plantas con y sin infestación, se observó que las categorías con mayor número de genes sobreexpresados fueron la categoría proteína (destacando la enzima cisteína proteasa que parece estar implicada en procesos de defensa) y la categoría RNA, que incluyó factores de transcripción sobreexpresados de la familia WRKY y la proteína CIP2a. Por último, la categoría señalización en la que se sobreexpresaron calmodulinas y la proteína phi-1, así como la categoría estrés biótico en la que se incluyó el gen *Ve*.

En cambio, las categorías que agruparon mayor número de genes comunes reprimidos fueron: metabolismo de hormonas, que agrupó genes implicados en diferentes rutas de señalización entre las que se encuentra el ácido salicílico; la categoría metabolismo secundario, resaltando la proteína ELI3 y la enzima calcona sintasa; la categoría pared celular, en la que destacan varias enzimas XTH, celulosa sintasa y poligalacturonasas; la categoría metabolismo de lípidos que incluyó las enzimas FAD3 y FAD6 y, por último, la categoría fotosíntesis en la que se encuentra reprimida la enzima Rubisco y una inhibidora de proteasas. En la categoría estrés abiótico se encontraron pequeñas chaperonas y en la categoría estrés biótico se incluyó el gen *gp91^{phox}* (NADPH oxidasa). Por último, cabe destacar la represión de proteínas CONSTANS incluidas en la categoría RNA y el inhibidor de proteasas (*Pin1*) englobado en la categoría proteína.

Los transcritos sobreexpresados en las plantas tratadas con BTH pero exclusivamente tras la infestación con *B. tabaci*, se distribuyeron mayoritariamente en la categoría DNA que agrupó varias histonas, la categoría proteína en la que destaca una MAPKK, la categoría RNA representada por diferentes factores de transcripción y la categoría estrés biótico en la que se agruparon varias PRs y el gen *Wfi* (*Whitefly-induced*).

En cambio, los transcritos reprimidos por el tratamiento con BTH, pero exclusivos de las plantas infestadas, se agruparon principalmente en las categorías metabolismo de hormonas representada principalmente por la ruta de señalización del etileno y estrés abiótico que agrupó diferentes chaperonas y una proteína inducida por herida (*win*).

2.2. Comparación de los cambios en la expresión génica de Moneymaker producidos por el tratamiento con BTH y por la infestación con *B. tabaci*.

La comparación de los resultados obtenidos por efecto del BTH en plantas Moneymaker no infestadas (2.1.1.) y por efecto de la infestación de *B. tabaci* durante la interacción compatible a los 2 dpi (Tabla R4.5.) pretende resaltar las similitudes y disimilitudes entre el efecto que el tratamiento exógeno con un análogo del SA puede provocar en plantas carentes del gen *Mi-1* respecto al efecto que desencadena la infestación con *B. tabaci* sobre esas mismas plantas. Esta comparación se representa mediante diagramas de Venn con los

transcritos diferenciales (sobreexpresados y reprimidos), distinguiendo los comunes y los específicos para cada uno de los dos casos (Figura R4.15).

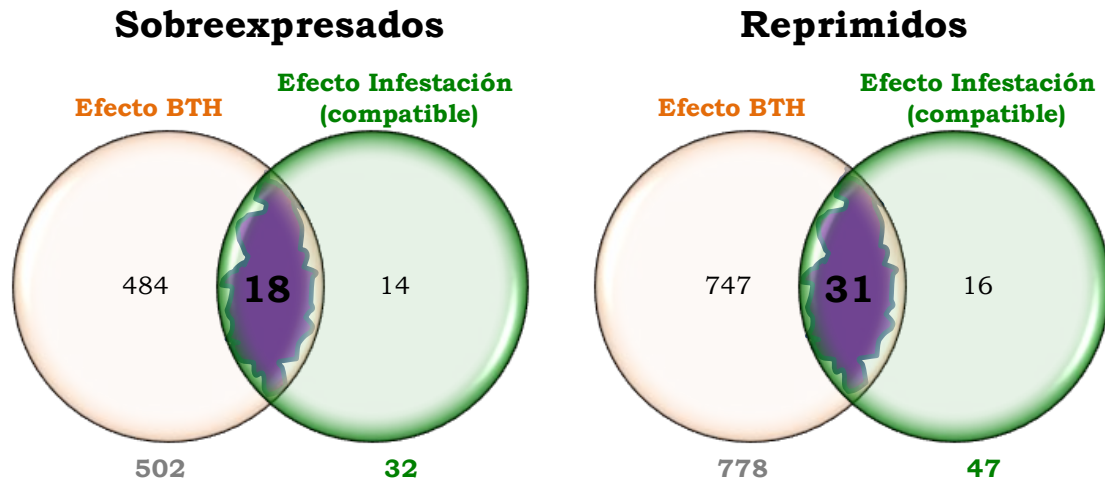


Figura R4.15. Diagrama de Venn con los transcritos diferenciales sobreexpresados y reprimidos, del efecto del BTH y de la infestación por *B. tabaci*, con un valor de $FDR < 0,05$ y Expresión relativa (E.R.) ≥ 2 (sobreexpresados) y ≤ -2 (reprimidos).

Se encontraron 18 transcritos sobreexpresados comunes al efecto del tratamiento con BTH y de la infestación por *B. tabaci* a los 2 dpi. Por otro lado, se obtuvieron 31 genes reprimidos comunes a ambos casos. (Anexo CD).

A continuación, se presenta una gráfica (Figura R4.16) con la clasificación de los transcritos diferenciales exclusivos para cada caso así como de los comunes, agrupados en función de los procesos biológicos en los que intervienen.

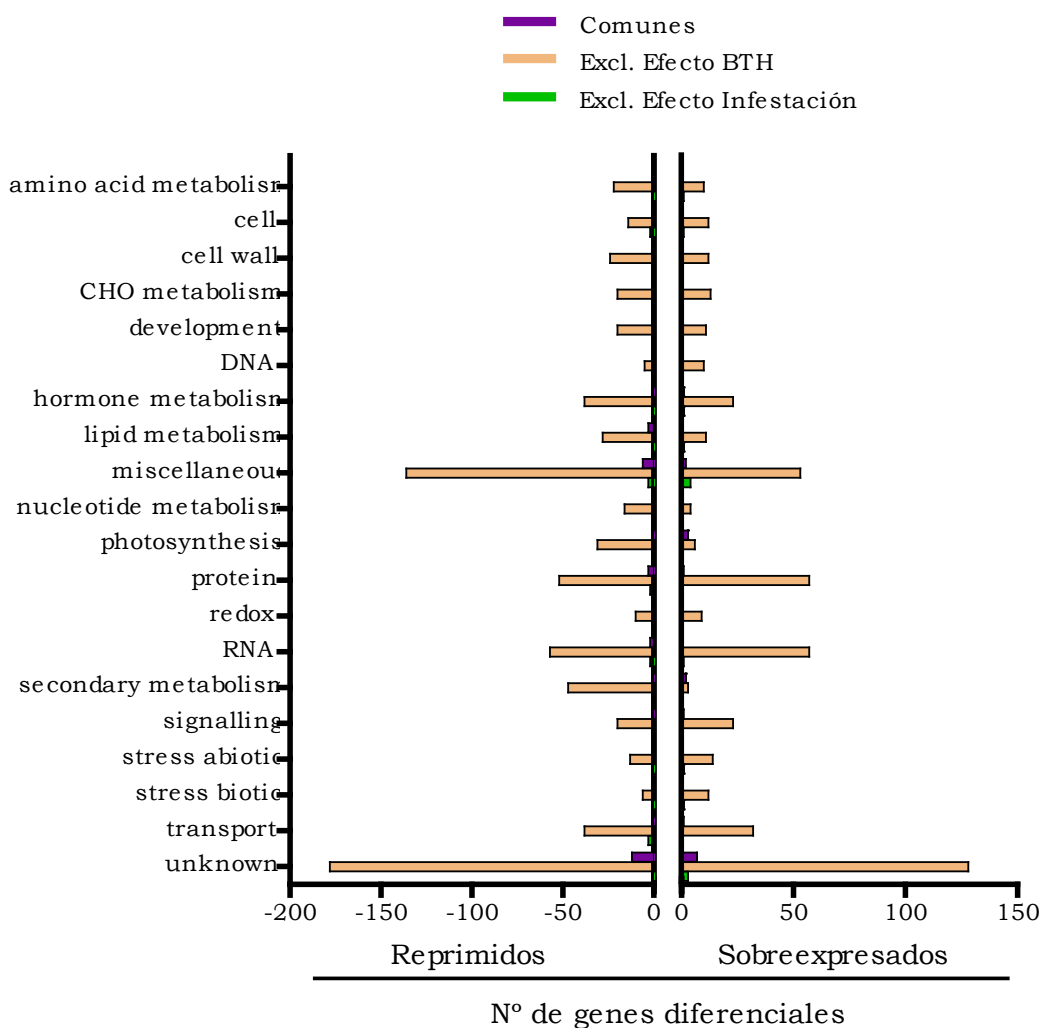


Figura R4.16. Clasificación de los transcritos diferenciales exclusivos del efecto del tratamiento con BTH (marrón claro), los exclusivos del efecto de la infestación a los 2 dpi (verde) y los comunes a ambos casos (morado) en función de los procesos biológicos en los que intervienen, identificados en Mapman.

La mayor parte de los genes diferenciales se agruparon, como en otras comparaciones, en las categorías desconocidos y miscelánea.

Entre los 18 transcritos sobreexpresados comunes, cabe destacar la proteína Snakin-2, incluida en la categoría fotosíntesis, y una endoglucosidasa. De los 31 genes reprimidos comunes, cabe resaltar una endoglucanasa y la fosfolipasa PLDb2, asignada a la categoría metabolismo de lípidos. Por último, resaltar la represión de una proteína de respuesta hipersensible (HRAP).

Los genes sobreexpresados exclusivos del efecto del BTH se distribuyeron principalmente en la categoría proteína, en la que se encontraron proteínas Avr9/Cf-9, la categoría RNA destacando los factores de transcripción de la familia WRKY, la categoría señalización en la que se agruparon calmodulina,

MAPK y la proteína phi-1 y, por último, la categoría estrés biótico en la que se incluyeron varias PRs y el gen *Ve*.

Por otro lado, los genes reprimidos se agruparon mayoritariamente en la categoría metabolismo secundario, en la que destacaron enzimas CYP450 implicadas en mecanismos de defensa, y en la categoría metabolismo de hormonas, que incluyó la proteína ELI3 y genes relacionados con el metabolismo de flavonoides. También la categoría pared celular en la que se encontraron enzimas XTH y, finalmente, la categoría fotosíntesis en la que destacaría la represión de la enzima Rubisco. Por último, resaltar la represión del inhibidor de proteasas 1 que se incluyó en la categoría proteína.

Entre los transcritos diferenciales exclusivos del efecto de la infestación con *B. tabaci* a los 2 dpi destaca la sobreexpresión de dos PR y una proteína chaperona relacionada con procesos de estrés.

Entre los genes reprimidos hay varios factores de transcripción que Mapman asignó a la categoría RNA y varias proteínas implicadas en procesos de desarrollo.

2.3. Expresión génica en la interacción incompatible (resistencia) inducida por BTH en Moneymaker. Comparación con la interacción compatible en plantas no tratadas.

Para conocer la expresión génica del tomate en la interacción incompatible con *B. tabaci* (resistencia) inducida por BTH en plantas que no son portadoras del gen *Mi-1*, se compararon plantas Moneymaker tratadas con BTH y posteriormente infestadas con *B. tabaci* con plantas igualmente tratadas pero sin infestar, seleccionando aquellos genes regulados diferencialmente tras la infestación (Tabla R4.8). Estos resultados se obtuvieron en la fase temprana de la infestación (2 dpi).

Tabla R4.8. Genes diferencialmente expresados en plantas tratadas con BTH infestadas por *B. tabaci* frente a plantas tratadas pero no infestadas.

ID Affymetrix ¹	ID GenBank ²	Descripción ³	E.R. ⁴	FDR ⁵
LesAffx.41518.1.S1_at	AW930080	ZIP transporter [Populus trichocarpa]	1,92*	2,38E-02
LesAffx.64357.1.S1_at	AI773419	unnamed protein product [Vitis vinifera]	-2,18	1,36E-02
Les.4026.1.S1_at	AY155579.1	xyloglucan-specific fungal endoglucanase inhibitor protein precursor [Lycopersicon esculentum]	-2,66	1,36E-02

¹ Identificador del transcrito presente en el Genechip® de Affymetrix

² Identificador del transcrito según la base de datos del GenBank (NCBI) proporcionado por la plataforma Affymetrix utilizado para el diseño del array

³ Descripción del identificador de Affymetrix según la base de datos de GenBank obtenido a través de TFGD (<http://ted.bti.cornell.edu/>)

⁴ Expresión relativa de la comparación entre plantas MoneyMaker tratadas con BTH e infestadas por *B. tabaci* frente a plantas MoneyMaker tratadas con BTH pero no infestadas.

⁵ Valor del FDR (p-valor corregido) de la expresión relativa de la comparación

* Valor no significativo según los parámetros utilizados para seleccionar los genes diferenciales

Se encontraron 3 genes diferencialmente expresados con un FDR < 0,05 pero únicamente dos de ellos se expresaron al menos dos veces menos en las plantas tratadas e infestadas frente a las plantas tratadas pero no infestadas. El transcrito LesAffx.41518.1.S1_at (proteína transportadora ZIP) se sobreexpresó 1,92 veces más en las plantas tratadas e infestadas que en las plantas tratadas pero no infestadas. El transcrito LesAffx.64357.1.S1_at corresponde a una proteína no conocida y el tercer gen, reprimido 2,66 veces, corresponde con una proteína inhibidora de endoglucanasas específicas de xiloglucanos que está implicada en procesos celulares y metabólicos. Permitiendo un FDR menos restrictivo (hasta un FDR <0,1) tampoco se encontraron más genes diferenciales (Anexo CD).

Estos 3 transcritos no coincidían con ninguno de los 79 transcritos diferencialmente expresados en la interacción compatible que se producía a los 2 dpi en plantas MoneyMaker no tratadas con BTH (Tabla R4.5).

2.4. Comparación de la expresión génica global del tomate en los dos tipos de resistencia a *B. tabaci*: inducida por BTH y mediada por *Mi-1*.

En primer lugar se compararon plantas MoneyMaker tratadas con BTH con plantas Motelle sin tratar, en ausencia de infestación. En segundo lugar,

se compararon las interacciones incompatible inducida por BTH y mediada por *Mi-1*.

2.4.1. Comparación de plantas Moneymaker tratadas con BTH y plantas Motelle, en ausencia de infestación.

Se compararon plantas Moneymaker tratadas con BTH con plantas Motelle no tratadas, todas en ausencia de infestación. Se obtuvieron 1241 genes diferencialmente expresados al menos dos veces (≥ 2 o ≤ -2) y con un FDR < 0,05 resultando 572 genes que se expresaron significativamente más en Moneymaker tratadas con BTH que en Motelle, y 669 genes que lo hicieron al contrario (Anexo CD).

A partir de los genes diferenciales obtenidos se realizó la clasificación de las categorías funcionales en Mapman (Figura R4.17).

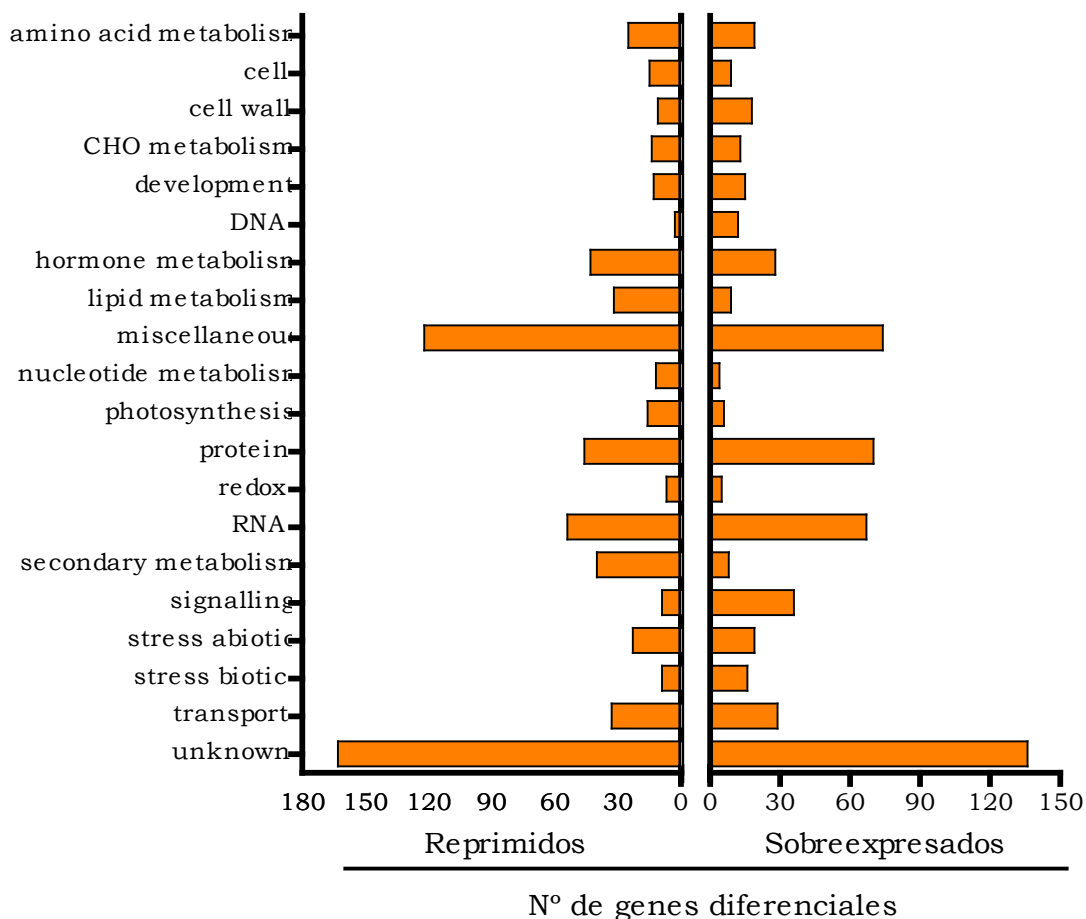


Figura R4.17. Clasificación de los transcritos diferenciales de la comparación de plantas Moneymaker tratadas con BTH respecto a plantas Motelle no tratadas, todas en ausencia de infestación, en función de los procesos biológicos en los que intervienen, identificados en Mapman.

Las categorías con mayor representación de transcritos diferenciales, además de las categorías desconocidos y miscelánea, fue la categoría proteína destacando la mayor expresión, en Moneymaker tratada con BTH, de varias proteínas ACIK (Avr9/Cf-9), la categoría RNA que incluyó factores de transcripción de las familias WRKY y MYB, la categoría pared celular que incluyó enzimas XTH, expansinas, poligalacturonasas y pectinesterasas, la categoría señalización que agrupó la proteína calmodulina, la MAPK3 y la proteína phi-1 y, por último, la categoría estrés biótico que incluyó PRs y los genes *Wfi* y *Ve*.

La mayoría de los genes con menor expresión en Moneymaker-BTH que en Motelle, se agruparon en la categoría metabolismo de hormonas que incluyó genes implicados en diferentes rutas de señalización aunque cabe destacar la sobreexpresión de la proteína DELLA, la categoría metabolismo de lípidos también agrupó mayor cantidad de genes reprimidos entre los que resaltaría la presencia de las enzimas FAD3 y FAD6, la categoría fotosíntesis que incluyó el gen que codifica la Rubisco y la categoría metabolismo secundario en la que se agrupó la proteína ELI3.

2.4.2. Comparación de la expresión génica, tras la infestación por *B. tabaci*, de las interacciones incompatible inducida por BTH y mediada por *Mi-1*.

Se compararon los 3 transcritos diferenciales obtenidos durante la interacción incompatible inducida por BTH en Moneymaker (Tabla R4.8) con los 348 transcritos diferenciales obtenidos durante la interacción incompatible mediada por el gen *Mi-1* en Motelle a los 2 dpi (Tabla R4.5). Sin embargo, no se encontraron genes comunes para estas dos interacciones incompatibles tomate-*B. tabaci*, indicando que la reprogramación transcripcional que se produce en cada uno de estos dos tipos de resistencia a este insecto es diferente.

DISCUSIÓN

1. Efecto del desarrollo de la planta en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a *B. tabaci*.

En estudios previos sobre defensa vegetal, se ha empleado comúnmente el término *desarrollo* para indicar que la resistencia mediada por el gen *Mi-1* estaba regulada diferencialmente por la edad de la planta. Mientras en la interacción con nematodos el gen es funcional desde edades muy tempranas de las plantas, la resistencia a áfidos requiere que éstas tengan de 6 a 7 semanas tras la germinación (Kaloshian *et al.*, 1995).

En cuanto a la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*, en un principio se demostró que era efectiva en plantas de 8 semanas de edad, aunque no se había podido observar en otros estudios en los que se analizaron plantas más jóvenes (Pascual *et al.*, 2000). Sin embargo, hasta el momento no se había realizado ningún estudio específicamente dirigido a determinar si es la edad o realmente el tamaño de la planta lo que influencia la resistencia mediada por *Mi-1*. Consecuentemente, en esta Tesis se ha llevado a cabo por primera vez un estudio comparativo con bioensayos de libre elección (antixenosis) y de no-elección (antibiosis) especialmente diseñados para demostrar si la resistencia *Mi-1* a *B. tabaci* está regulada por el desarrollo de la planta y, más concretamente, si es la edad de la planta o el tamaño de la misma el factor que condiciona la efectividad de dicha resistencia.

Efectos de la edad de la planta.

De los resultados obtenidos en este capítulo de mi trabajo de Tesis se deduce que, considerando los parámetros analizados, es la edad de las plantas el factor que más influye en la resistencia del tomate a *B. tabaci*. En efecto, para plantas de 8 y 5 semanas crecidas a temperaturas de 24°C:20°C (L:O), en bioensayos de libre elección se obtuvieron diferencias significativas en el número medio diario de adultos entre la variedad susceptible (Moneymaker) y la resistente (Motelle). La infestación diaria fue siempre más elevada para las plantas de 8 semanas mientras que en las de 5 semanas el recuento diario mostró fluctuaciones en la preferencia por plantas con y sin el gen *Mi-1*. Por otro lado, en las plantas de 3 semanas, en los mismos ensayos de libre

elección y con el mismo régimen de temperaturas, no se observaron diferencias entre las dos variedades. Además, el porcentaje de plantas infestadas con un número de adultos igual o superior a la media obtenida diariamente para cada variedad, así como los niveles finales de infestación, sólo fueron significativamente diferentes entre Moneymaker y Motelle en plantas de 8 semanas de edad. Esta tendencia se confirmó en los bioensayos de no elección donde únicamente en plantas de esta edad se obtuvieron diferencias significativas entre Moneymaker y Motelle en todos los parámetros analizados del desarrollo de *B. tabaci*: oviposición de las hembras, valores medios de N3, N4, nuevos adultos y número total de individuos al final del bioensayo. En cambio, en las plantas de 5 semanas de edad no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre Motelle y Moneymaker en los números medios de huevos ni de N3, mientras que las plantas de 3 semanas no difirieron tampoco en la oviposición ni en los números medios de N3 y N4. En otros estudios con áfidos, se ha observado que plantas entre 5 y 7 semanas de edad mostraron diferencias entre ambas variedades aunque fue en las de 6-7 semanas cuando las diferencias fueron más evidentes y constantes (Kaloshian *et al.*, 1995). En mi trabajo, aunque la infestación final en plantas Motelle de cualquier edad fue siempre superior que en Moneymaker, la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci* es más evidente en las plantas de 8 semanas. Estas diferencias debidas a la edad de la planta también se observaron en el estudio de la infestación con *Tuta absoluta* en variedades de tomate resistente y susceptible a este insecto (Leite *et al.*, 2001). En este caso, se observó un aumento en la densidad de tricomas con la edad de la planta que se relacionó con un desarrollo larvario más lento de este insecto en la variedad resistente comparado con la susceptible. Sin embargo, se ha demostrado que la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci* es independiente de la presencia de tricomas glandulares o sus exudados (Nombela *et al.*, 2000). El incremento de la resistencia a patógenos con la edad de la planta ha sido también observado en otras interacciones (revisado en Ebrahim *et al.*, 2011).

El análisis de la supervivencia de huevos reveló que en las plantas Moneymaker, independientemente de su edad, el porcentaje de huevos de *B. tabaci* que alcanzaron las últimas fases del desarrollo era de aproximadamente el 85%. Otros autores determinaron que la supervivencia de huevo a adulto del biotipo Q de *B. tabaci* sobre el cultivar de tomate Hilario, a 25°C, era del

85%, similar al resultado obtenido en esta Tesis de la supervivencia de huevo a las últimas fases del desarrollo con el mismo biotipo en el cultivar Moneymaker (Bonato *et al.*, 2007). En otros trabajos donde se ha estudiado el desarrollo de *B. tabaci* sobre un único estado de desarrollo de la planta se obtuvieron porcentajes variables de supervivencia (Nava-Camberos *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2003; Musa and Ren, 2005; Mansaray and Sundufu, 2009; Oriani *et al.*, 2011) debido, posiblemente, a diferencias en la planta huésped y el biotipo empleado en cada uno. En las plantas Motelle, el porcentaje de supervivencia de huevos disminuía a medida que aumentaba la edad de la planta (73%, 69% y 58% en plantas de 3, 5 y 8 semanas de edad, respectivamente). En las tres edades se obtuvieron diferencias significativas entre ambas variedades, pero es en plantas de 8 semanas de edad cuando las diferencias se hacen más evidentes. Otros autores han observado que, a esta edad, la supervivencia de áfidos es significativamente menor en Motelle que en Moneymaker (Kaloshian *et al.*, 1997) y menor que la supervivencia de *B. tabaci* en plantas Motelle. La disimilitud en la supervivencia de ambos insectos se debe a que la resistencia regulada por *Mi-1* provoca un mayor efecto de antibiosis en áfidos que en *B. tabaci*. Estudios que utilizaron la técnica de gráficos de penetración eléctrica (EPG) demostraron que los áfidos mueren de inanición sobre plantas resistentes (Kaloshian *et al.*, 2000). Sin embargo, en un estudio con esta misma técnica en moscas blancas se observó que, aunque estos insectos tienen dificultad para alcanzar el floema, una vez establecen su sitio de alimentación son capaces de alimentarse (Jiang *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos hasta el momento con *B. tabaci* concuerdan con la observación de que las diferencias entre Moneymaker y Motelle son más evidentes en áfidos que en moscas blancas.

La mayoría de los estudios sobre la biología de moscas blancas analizan parámetros del desarrollo del insecto sobre plantas susceptibles, entre los que se incluye la tasa intrínseca de crecimiento (r_m), que permiten determinar su adaptación a la planta huésped y proporciona una idea de cómo varía cuantitativamente la población del insecto (González-Zamora y Gallardo, 1999; Qiu *et al.*, 2003; Musa and Ren; 2005; Yang and Chi, 2006; Bonato *et al.*, 2007; Islam and Slunxiang, 2007; Mansaray and Sundufu, 2009). En Moneymaker y Motelle se observa una disminución en la tasa de crecimiento a medida que aumenta la edad de la planta. En las tres edades se obtuvieron

diferencias significativas entre ambos cultivares siendo esta diferencia más acusada en las plantas de 8 semanas, en las que la tasa de crecimiento en Motelle no solamente fue inferior a la obtenida en Moneymaker sino que tuvo un valor negativo, indicando que la población disminuiría en la siguiente generación. En áfidos, también se ha obtenido una diferencia significativa en la tasa de crecimiento entre ambos cultivares (Kaloshian *et al.*, 1997). Recientemente, se ha publicado un estudio en el que se consideran diferentes parámetros del desarrollo del biotipo B de *B. tabaci* sobre varios genotipos de tomate (Firdaus *et al.*, 2012) para determinar el nivel de resistencia de dichos genotipos. En ese trabajo no se incluyó la determinación de la tasa de crecimiento, pero teniendo en cuenta los datos de oviposición, supervivencia de huevos y periodo de desarrollo, se podría deducir que la tasa de crecimiento de *B. tabaci* sobre genotipos con niveles altos de resistencia a este insecto sería muy baja e incluso negativa, como sucede en el cultivar Motelle con el biotipo Q.

Efectos del tamaño de la planta.

Los resultados obtenidos en esta segunda parte del estudio ponen de manifiesto que también en este caso, el mayor tamaño de la planta afecta en gran medida a los parámetros analizados de la biología de este insecto. Así, en el ensayo de libre elección, el número medio diario de adultos de *B. tabaci* fue siempre superior en la variedad Moneymaker que en Motelle aunque las diferencias entre ambos cultivares fueron únicamente significativas en las plantas de mayor tamaño. En cuanto al porcentaje de plantas infestadas con un número de adultos igual o superior a la media obtenida diariamente para cada variedad, se observó que en plantas Moneymaker grandes era mayor que en las plantas Motelle del mismo tamaño, a lo largo de todo el experimento, confirmándose con un porcentaje medio estadísticamente superior en Moneymaker que en Motelle. Sin embargo, en las plantas de menor tamaño, se observó una fluctuación de este parámetro entre ambos cultivares durante los primeros días de la infestación. Curiosamente, a pesar de estas variaciones se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre Moneymaker y Motelle en el porcentaje medio diario de plantas infestadas con un número de adultos igual o superior a la media. En cuanto a los niveles de infestación, la media en Moneymaker fue casi el doble que en Motelle en las plantas grandes

mientras que la diferencia era mucho menor en las pequeñas, aunque sin significación estadística en ninguno de los dos casos. Teniendo en cuenta que la supervivencia en la fase de pupa es próximo al 100%, se puede deducir que existe una tendencia a que la diferencia entre ambos cultivares sea mayor en las plantas grandes que en las pequeñas.

El tamaño de la planta también influye en la actividad reproductora de este insecto. En los bioensayos de no elección, se obtuvieron diferencias significativas entre Moneymaker y Motelle en cuanto a la oviposición de *B. tabaci* únicamente en plantas grandes. En el recuento de las últimas fases del desarrollo se observó que los datos obtenidos en plantas Moneymaker grandes fueron siempre superiores a los registrados en plantas Motelle del mismo tamaño; incluso el número medio de nuevos adultos se reducía a menos de la mitad en Motelle. Estas diferencias alcanzaron niveles de significación próximos al 93% y al 95% en el caso de los nuevos adultos y del total de individuos, respectivamente. En cambio, en las plantas pequeñas todos los valores fueron muy similares entre ambos cultivares e incluso, en muchos casos, ligeramente superiores en Motelle que en Moneymaker.

El tamaño de la planta no parece afectar a la supervivencia de huevos, ya que fue muy similar en todas las plantas, aunque en las pequeñas se observó una ligera superioridad en Motelle respecto a Moneymaker. Recientemente se ha publicado un trabajo en el que se emplearon dos especies de moscas blancas, el biotipo B de *B. tabaci* y *T. vaporariorum*, comparando diferentes parámetros del desarrollo de estos insectos en hojas con diferente grado de desarrollo de plantas de tomate susceptibles (Zhang and Wang, 2012). Los resultados obtenidos mostraron un porcentaje de supervivencia aproximado del 58% para ambos insectos en hojas completamente desarrolladas. Sin embargo, en hojas en desarrollo, el porcentaje de supervivencia disminuyó significativamente en *B. tabaci* pero no en *T. vaporariorum*. El porcentaje obtenido en ese estudio fue similar al registrado en las plantas Moneymaker, tanto grandes como pequeñas (aproximadamente el 60%), utilizadas en el trabajo que se presenta en esta Tesis. Sin embargo, estos resultados no son contradictorios puesto que, en nuestro trabajo, incluso en las plantas de menor tamaño, se utilizaron siempre hojas completamente desarrolladas.

A pesar de que la tasa intrínseca de crecimiento de *B. tabaci* fue similar en ambos cultivares para los dos tamaños, se observó una clara diferencia en el comportamiento de *B. tabaci*, ya que en plantas grandes el valor de este parámetro no sólo fue menor en Motelle que en Moneymaker sino que, además, fue negativo mientras que en las pequeñas fue muy superior en Motelle que en Moneymaker. Estos datos sugieren que, a pesar de que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos cultivares, en la siguiente generación se produciría una reducción en la población de *B. tabaci* en la siguiente generación sólo en las plantas grandes mientras que en las pequeñas aumentaría la población. La tasa de crecimiento obtenida en plantas Moneymaker de ambos tamaños fue más baja que la que se obtuvo en el bioensayo con plantas de diferentes edades a 24-25°C. A pesar de que no se han encontrado hasta la fecha estudios en profundidad sobre el efecto del tamaño de la planta en la resistencia a insectos mediada por el gen *Mi-1*, existen algunos que han analizado la tasa intrínseca de crecimiento sobre plantas susceptibles en condiciones de temperatura relativamente baja (< 20°C) en los que se han obtenido valores muy inferiores a los registrados a temperaturas óptimas para el desarrollo de *B. tabaci* (González-Zamora y Gallardo, 1999; Qiu *et al.*, 2003; Yang and Chi, 2006; Bonato *et al.*, 2007).

El análisis conjunto de los datos de ambos estudios: edades y tamaños, sugiere que la resistencia mediada por el gen *Mi-1* del tomate a *B. tabaci* está regulada por el desarrollo de la planta, considerando no sólo su edad sino también su tamaño. El gen *Mi-1* no es el único gen *R* que confiere resistencia regulada por el desarrollo de la planta. En tomate, el gen *Cf-9B*, que pertenece a la familia génica *Cf-9*, confiere resistencia a *Cladosporium fulvum* en plantas maduras (en floración) mientras que en plántulas no se producía este fenómeno de resistencia al patógeno (Panter *et al.*, 2002). Como se ha comentado anteriormente, en nuestro trabajo sucedía algo similar ya que las plantas Motelle de 8 semanas crecidas a 24-25°C (en estado de floración) presentaron una infestación por *B. tabaci* significativamente inferior que en plantas Moneymaker con el mismo desarrollo, mientras que en plantas de 3 semanas de edad no se obtuvieron diferencias significativas entre la variedad resistente y susceptible. Aunque en las plantas pequeñas (8 semanas de edad crecidas a 19°C) no se obtuvieron diferencias significativas entre Motelle y Moneymaker, no se podrían comparar con las plántulas utilizadas en el

trabajo de Panter *et al.* (2002) puesto que las plantas pequeñas empleadas en esta Tesis presentaban un grado de desarrollo similar al de plantas de 5 semanas de edad. Los resultados obtenidos en esta Tesis concuerdan también con otros trabajos previos en los que se observó que algunos genes *R* en arroz, conferían resistencia a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) únicamente en plantas adultas (Qi and Mew, 1985; Mew, 1987; Goel and Gupta, 1990; Ogawa, 1993). Estos estudios sugirieron que existía una relación entre la resistencia en la planta y el nivel de expresión del gen responsable de la defensa, como sucede con el gen *Xa3* del arroz (también conocido como *Xa26*) que aumenta su expresión en plantas de mayor edad, correlacionándose con una mayor resistencia al patógeno *Xoo* (Cao *et al.*, 2007). Sin embargo, existen ejemplos, además de *Mi-1*, que contradicen esta relación. Así, el gen *Xa21* del arroz se expresa en plantas susceptibles y resistentes lo que indica que la resistencia dependiente del desarrollo de la planta mediada por este gen no está relacionada con su expresión (Century *et al.*, 1999). La sobreexpresión de *Mi-1.2* en plantas transgénicas de tomate no aumentó la resistencia a áfidos ni provocó que esta resistencia se manifestase en plantas más jóvenes (Goggin *et al.*, 2004).

La resistencia regulada por el desarrollo de la planta puede limitar, en algunos casos, su utilidad como sistema de protección vegetal puesto que, por un lado, la planta es susceptible al ataque de patógenos y herbívoros durante un periodo de su desarrollo (Century *et al.*, 1999) y, por otro lado, todavía se desconocen los mecanismos que regulan este tipo de resistencia. Se han sugerido dos hipótesis que podrían explicar esta regulación dependiente del desarrollo en plantas que contienen el gen *Mi* (Martínez de Ilarduya and Kaloshian, 2001): 1) *Mi-1.2* está regulado post-transcripcionalmente diferente en raíces y hojas y 2) existe otro componente, regulado por el desarrollo de la planta, necesario para la resistencia frente a insectos y no para la resistencia a nematodos. En la primera hipótesis no se ha podido avanzar puesto que se necesita obtener el anticuerpo de la proteína *Mi-1.2* y, hasta el momento, no se ha podido conseguir (Goggin *et al.*, 2004) aunque sí se ha generado un anticuerpo policlonal (van Ooijen *et al.*, 2008) pero que no discrimina entre los genes homólogos y no permite detectar la expresión de *Mi-1* en niveles endógenos (*comunicación personal*). Respecto a la existencia de otro componente, se ha demostrado que el gen *Rme1* es necesario en la resistencia

mediada por *Mi-1* a nematodos, áfidos y moscas blancas (Martínez de Ilarduya *et al.*, 2001, 2004). Hasta el momento no se ha podido clonar el gen *Rme1* por lo que no se puede determinar si su función está regulada por el desarrollo de la planta como sucede con *Rcr3* en la resistencia mediada por *Cf-2* a *C. fulvum* (Dixon *et al.*, 2000). Se hace necesario continuar investigando sobre los mecanismos que regulan esta resistencia para poder emplearla de forma efectiva como parte del sistema de protección vegetal a plagas y enfermedades.

2. Papel del ácido salicílico en las interacciones tomate-*B. tabaci*.

A partir de los resultados obtenidos sobre la cuantificación de SA y JA en distintos genotipos de tomate, el efecto que la infestación de este insecto podía provocar en la acumulación de ambas hormonas en esas plantas y el comportamiento reproductivo de *B. tabaci* en los distintos genotipos, se ha obtenido información sobre el papel que el ácido salicílico (SA) podía desempeñar en tomate frente al ataque de *B. tabaci*.

Niveles basales del ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA), y eficacia del gen *NahG* en las plantas adultas de tomate.

La cuantificación de SA en hojas no infestadas mostró niveles altos y similares de esta hormona en las plantas Moneymaker (-*Mi-1*) y VFN (+*Mi-1*), y significativamente inferiores en las plantas NahG (-*Mi-1*) y VFNxNahG (+*Mi-1*). Estos resultados demostraron la eficiencia de la enzima bacteriana, codificada por el gen *NahG* que degrada el SA a catecol (Gaffney *et al.*, 1993), en plantas de tomate totalmente desarrolladas (8 semanas de edad), con una reducción directa de un 50%, aproximadamente, respecto a los niveles basales de SA en los genotipos Moneymaker y VFN de los que proceden. Concretamente, la diferencia entre NahG y Moneymaker coincide con la obtenida por Thaler *et al.* (2010) al comparar plantas bastante más jóvenes (sólo dos hojas verdaderas) pero, según nuestra información, esta es la primera vez que se cuantifica en plantas de 8 semanas de edad. En un trabajo previo de Li *et al.* (2006), también con plantas jóvenes (3 semanas de edad) de varios genotipos, no se presentaban datos sobre el contenido de SA en Moneymaker ni se cuantificaba, por tanto, la disminución directa de dicho contenido en las plantas NahG con respecto al cultivar Moneymaker. En cambio, esta cuantificación sí se realizó en un estudio en raíces de plantas de tomate de 5 semanas de edad, observándose una reducción significativa, aproximadamente del 70%, de los niveles de SA en las plantas que contenían el gen bacteriano *NahG* (NahG y VFNxNahG) en comparación con los genotipos Moneymaker y Motelle (Bhattarai *et al.*, 2008). Estos resultados en raíz fueron similares a los obtenidos en un trabajo previo realizado en cultivo monoxénico de tomate (Branch *et al.*, 2004) aunque con diferencias, ya que la reducción en los niveles de SA en las plantas que contenían el gen *NahG* fue superior al 90%.

En cuanto al contenido foliar de JA antes de la infestación con *B. tabaci* fue extremadamente bajo, incluso con valores cercanos a 0, en todas las plantas del presente estudio, confirmando los resultados obtenidos por Thaler *et al.* (2010) en plantas jóvenes no infectadas de Moneymaker y NahG, así como en plantas Moneymaker de 5 semanas de edad antes de ser infectadas por *Botrytis cinerea* (El Oirdi *et al.*, 2011). Estos resultados también fueron observados antes de la infestación por *Manduca sexta* y en ausencia de daño mecánico en plantas de 3 semanas de edad de otra variedad de tomate susceptible, Castlemart (Li *et al.*, 2005).

Efecto de la infestación por *B. tabaci* sobre los niveles basales de SA y JA.

La infestación del tomate susceptible por hembras adultas de *B. tabaci* provocó la activación de la ruta del ácido salicílico en Moneymaker y en NahG, aunque con distintos grados de intensidad. A los 2 días de la infestación, el incremento de SA era relativamente más acusado en NahG, aunque en ningún momento llegó hasta el contenido en SA registrado en Moneymaker. Este resultado con mosca blanca es contrario a lo que ocurre en las infecciones por patógenos como el virus del mosaico del tabaco (TMV) o *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, que incrementan notablemente los niveles de SA en Moneymaker pero no en las plantas deficientes NahG (Thaler *et al.*, 2010). Previamente, Li *et al.* (2006) no habían incluido a Moneymaker entre los genotipos de tomate en los que cuantificaron el contenido foliar de SA tras la inoculación con *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, con lo que no pudieron establecer una comparación entre NahG y Moneymaker en cuanto al incremento de los niveles de SA ocasionado por dicha infección, pero sí se pudo observar que dichos niveles de SA en las plantas NahG aumentaron ligeramente, aunque no de forma significativa, tras la infección con el patógeno.

Al contrario de lo que ocurrió con el SA, el aumento en los niveles de JA a los 2 días de la infestación con *B. tabaci*, desde los valores cercanos a 0 de las plantas no infestadas, fue muy elevado en Moneymaker pero mucho más moderado y no significativo estadísticamente en las plantas NahG. Previamente se había demostrado que la infección con *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 también ocasiona un aumento en los niveles de JA en plantas jóvenes

de ambos genotipos, aunque de modo menos acusado en NahG que en Moneymaker (Thaler *et al.*, 2010), como ocurre con *B. tabaci* en las plantas adultas. En cambio, la infección con virus (TMV) no incrementa el contenido de JA en ninguno de estos dos genotipos de tomate (Thaler *et al.*, 2010).

En plantas de tomate susceptibles, tras la alimentación de moscas blancas se produjo una acumulación de proteínas PR reguladas por JA pero no de genes de respuesta a herida dependientes de esta ruta (Puthoff *et al.*, 2010). Estos datos sugieren que el estilete de las moscas blancas no es detectado en la planta como un estrés mecánico que active las respuestas defensivas dependientes de JA (Walling, 2008). Esto contrasta con las respuestas desencadenadas tras el ataque de herbívoros masticadores (Pautot *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2002; Ament *et al.*, 2004) y de algunos áfidos (Martínez de Ilarduya *et al.*, 2003), en las que los genes regulados por esta hormona son inducidos a niveles altos en las plantas susceptibles y resistentes.

No obstante, en el presente trabajo, los mayores incrementos en los contenidos de SA y JA ocasionados por la alimentación y oviposición de las hembras de *B. tabaci* se detectaron en las plantas resistentes VFN. En concreto, para el contenido de SA a los 2 días de la infestación se obtuvo un valor medio más de 10 veces superior al de las plantas VFN no infestadas. El máximo aumento de los niveles de SA en VFN también había sido observado en plantas más jóvenes tras la infección con *P. syringae* pv. *syringae* (Li *et al.*, 2006). Otros trabajos que habían cuantificado los niveles de esta fitohormona en plantas resistentes no analizaron los cambios que se producían tras el ataque de un organismo (Branch *et al.*, 2004; Bhattarai *et al.*, 2008) o emplearon únicamente plantas infestadas susceptibles (O'Donnell *et al.*, 2003; Thaler *et al.*, 2010). El incremento proporcional en los niveles de JA en las plantas VFN, empleadas en esta Tesis, fue similar al observado para el SA. En un estudio previo realizado en raíces de plantas de tomate del mismo genotipo se analizaron los cambios que se producían tras el ataque de áfidos (Bhattarai *et al.*, 2007) pero ese trabajo no cuantificó los niveles de JA sino que analizó la expresión de genes conocidos por su inducción en respuesta a áfidos (Martínez de Ilarduya *et al.*, 2003) y, por otro lado, no compararon los niveles de expresión con raíces de plantas no infestadas.

Al contrario de lo que ocurría en VFN, a los 2 días de la infestación por *B. tabaci* no se detectó un aumento de la actividad de la ruta del SA en las plantas VFNxNahG debida a dicha infestación; de hecho, su concentración de SA fue ligeramente inferior a la registrada antes de la infestación. Esto es similar a lo que ocurre con patógenos, pues tampoco la infección de plantas VFNxNahG con *P. syringae* incrementaba su contenido en SA respecto al de las plantas no infectadas (Li *et al.*, 2006). En cambio, la activación de la ruta del JA a los 2 días de la infestación por *B. tabaci* fue muy acusada en las plantas VFNxNahG, aunque en menor medida que en las VFN. En la literatura no se han encontrado otros trabajos en los que hayan cuantificado los niveles de ácido jasmónico en plantas VFNxNahG.

La activación de la ruta del SA debida a la infestación por *B. tabaci* tuvo un carácter transitorio, ya que los niveles de SA de los 2dpi disminuyeron en todos los genotipos de tomate a los 12 días de la infestación, llegando a ser cercanos a 0 en las plantas transgénicas NahG y VFNxNahG, incluso por debajo de los registrados en las plantas no infestadas. Aunque en hojas de judía se produjo una respuesta diferente a la de tomate (disminución en los niveles de SA tres días después de la infestación con *B. tabaci*), el efecto también resultó ser transitorio ya que dichos niveles volvieron a aumentar a los 7 dpi, si bien no se realizó ningún análisis posterior a este último (Zhang *et al.*, 2009). Es posible que estas diferencias sean debidas a la planta empleada para cada trabajo.

También resultó ser transitoria la activación de la ruta del JA en tomate pues disminuyó a los 12 dpi por *B. tabaci* en casi todos los genotipos, excepto en las plantas NahG que continuaron con un ligero incremento del contenido de JA respecto a los 2dpi. Este carácter transitorio del aumento de los niveles de JA había sido observado también en plantas susceptibles en respuesta a herida registrándose los niveles máximos de JA en la primera hora tras el daño producido por herida y disminuyendo entre las 6-8 horas posteriores (Strassner *et al.*, 2002; Suza *et al.*, 2010). En un estudio reciente realizado con plantas susceptibles de tomate en el que se analizaron los niveles de JA a las 12 y 24 hpi con el patógeno *B. cinerea* no se observó este efecto transitorio aumentando progresivamente los niveles de esta hormona (El Oirdi *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos a los 2 y 12dpi demuestran, en su conjunto, que la actividad de la alimentación y oviposición de hembras adultas causan en casi todos los genotipos de tomate empleados en este trabajo, una mayor acumulación de SA y JA que la actividad de las N1. Trabajos previos con moscas blancas se habían centrado en el efecto de la alimentación de adultos en tomate (Puthoff *et al.*, 2010) o en la actividad de las ninfas N2-N3 en *Arabidopsis* (Zarate *et al.*, 2007) sobre la expresión de genes de las rutas del SA y JA, pero no compararon, en un mismo estudio, los niveles hormonales cuantificados en ambas fases de la infestación del insecto.

El incremento de los niveles de SA y de JA observado en esta Tesis tras la infestación por *B. tabaci*, nos conduce a hipotetizar que quizá dicho incremento pudiera ser el principal factor responsable de la inducción de resistencia a áfidos anteriormente demostrada en plantas susceptibles de tomate tras una infestación previa por *B. tabaci* (Nombela *et al.*, 2008). Curiosamente, en ese mismo trabajo se había demostrado que, a la inversa, una primera infestación de áfidos incrementaba la susceptibilidad a *B. tabaci* o no alteraba la respuesta de la planta a la mosca blanca, dependiendo del clon de áfidos de que se tratase (Nombela *et al.*, 2008). A pesar de que áfidos y moscas blancas provocan en las plantas respuestas algo similares a las desencadenadas por la infección de patógenos (van Loon *et al.*, 2006; Walling, 2008), existen algunas diferencias entre estos dos tipos de insectos-plaga que pueden radicar en su modo de alimentación y que explicarían las diferencias en las respuestas cruzadas entre ellos: aunque ambos insectos poseen un aparato perforador-succionador, los áfidos se alimentan desde puntos diferentes de las plantas mientras que las moscas blancas, una vez se establece la fase N1 en el envés de la hoja, se alimenta en el mismo punto de forma continua hasta la emergencia del nuevo adulto (entre 20 y 30 días, dependiendo de la temperatura y de la planta huésped) (revisado en Walling, 2008). Además, diferentes elicitores en la saliva de ambos insectos pueden provocar diferentes respuestas en la planta (Walling, 2000).

De forma general, se sabe que las rutas de señalización del JA y ET suelen funcionar sinérgicamente mientras que la ruta del SA y la del JA/ET son antagonistas y existe una comunicación negativa entre ellas (Kunkel and Brooks, 2002; Spoel *et al.*, 2003) aunque, a veces, existe coordinación entre

las rutas e interacciones positivas entre ellas (Schenk *et al.*, 2000; Rojo *et al.*, 2003; Bostock, 2005; Mur *et al.*, 2006). La mayoría de los estudios realizados con insectos picadores-succionadores se han centrado hasta el momento en las interacciones con áfidos (Thompson and Goggin, 2006; Walling, 2008). En tomate se ha observado que, aunque la infestación por áfidos activa respuestas reguladas por SA y JA (Martínez de Ilarduya *et al.*, 2003), no existe comunicación entre las rutas de señalización de ambas fitohormonas (Li *et al.*, 2006; Bhattarai *et al.*, 2007). En cuanto a las moscas blancas, en esta Tesis se ha demostrado que la infestación con *B. tabaci* provoca en las plantas susceptibles de tomate una acumulación de SA y JA, con un incremento relativo más acusado en el caso del JA, aunque esto no nos permite concluir si la relación entre ambas hormonas es positiva o negativa. No obstante, un estudio reciente sugiere que la infestación de tomate susceptible por mosca blanca podría provocar una represión de ciertos genes implicados en la ruta de señalización de JA y ET y, simultáneamente, una inducción de genes relacionados con la ruta del SA (Estrada-Hernández *et al.*, 2009). En concordancia con esto, la relación antagonista entre la ruta del SA y la del JA ya había quedado demostrada hace tiempo en la interacción *Arabidopsis-Bemisia*, observándose la inducción de genes relacionados con el SA y la represión de los genes implicados en la señalización de JA y ET (Zarate *et al.*, 2007; Kempema *et al.*, 2007).

Parece evidente que las diferencias y similitudes entre las respuestas provocadas por áfidos y moscas blancas, unido a las debidas a las plantas huésped, ponen de relieve la necesidad de continuar profundizando en el estudio de las rutas de señalización de la defensa y de las relaciones entre ellas.

Implicación de la ruta del SA en la defensa basal del tomate frente a *B. tabaci*.

Los valores de oviposición y el número de individuos que alcanzaron las últimas fases del desarrollo del insecto en tomate no mostraron diferencias significativas entre Moneymaker y NahG, a pesar del reducido contenido inicial en SA en estas últimas. Esto sugiere que la ruta del SA no juega un papel importante en la defensa basal a *B. tabaci* en tomate. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en *Arabidopsis*, donde la infestación con moscas

blancas en plantas NahG demostró que el SA no estaba asociado a la defensa basal a este insecto, aunque podría tener algún papel en otros aspectos de la interacción, como la elección del hospedador, la fecundidad o la longevidad (Zarate *et al.*, 2007). En el mismo trabajo, estos autores también demostraron, con mutantes alterados en la ruta del JA, que es la ruta de esta hormona la que está implicada en la defensa basal de *Arabidopsis* a *B. tabaci*. Nuestros resultados de *B. tabaci* en tomate concuerdan igualmente con un estudio previo realizado con nematodos en el que demostraron que el SA no participaba en la defensa basal a estos organismos (Bhattarai *et al.*, 2008). Además, en ese trabajo se observó que, aunque no existían diferencias significativas entre las plantas NahG y Moneymaker en el número de masas de huevos de nematodos, éste era ligeramente inferior en las plantas que presentan un menor contenido de SA. Lo mismo sucedía en la infestación con *B. tabaci*, registrándose un número de huevos levemente inferior en las plantas NahG respecto al encontrado en las plantas Moneymaker. En cambio, los resultados de *B. tabaci* en tomate presentados en esta Tesis contrastan con los obtenidos previamente con áfidos en la misma especie vegetal, donde se sugirió un papel para el SA en la defensa basal del tomate frente a estos insectos, ya que las plantas Moneymaker se volvían más susceptibles a los áfidos cuando la expresión del gen *NahG* ocasionaba una disminución en la acumulación de SA (Li *et al.*, 2006). Mientras el SA es necesario para la defensa basal a este insecto (Li *et al.*, 2006) la alteración en la ruta del JA no provoca ningún cambio en la defensa basal del tomate a áfidos (Bhattarai *et al.*, 2007).

Aunque, como se ha dicho, la ruta del SA no tiene un papel destacado en la defensa basal del tomate a *B. tabaci*, nuestro equipo había demostrado anteriormente que la aplicación exógena de BTH, un análogo del SA, induce resistencia a *B. tabaci* en plantas susceptibles de tomate (Nombela *et al.*, 2005) o, dicho de otro modo, que la resistencia basal se incrementa con este tratamiento. Es un hecho conocido que el SA es una señal endógena para la activación de la resistencia adquirida o SAR (revisado en Durner *et al.*, 1997) y, aunque el tratamiento con BTH no provoca un aumento en los niveles de SA, sí induce la activación de respuestas defensivas de la ruta del SA entre las que se encuentra la acumulación de PR-1, entre otras PRs (Friedrich *et al.*, 1996). Esta activación de genes defensivos podría ser la razón de la inducción

de resistencia a *B. tabaci* en plantas de tomate carentes de *Mi-1* pero tratadas con BTH.

Por otra parte, Zarate *et al.* (2007) observaron un retraso significativo en el desarrollo del insecto en plantas NahG de *Arabidopsis*, ya que la mayoría de los individuos presentes al finalizar el ensayo se encontraban en estado ninfal 3 (N3), mientras en el parental el estado de desarrollo con mayor porcentaje fue el de N4. En el presente estudio, también se pudo observar un leve retraso en el desarrollo de *B. tabaci* en el tomate NahG, manifestado por una ligera disminución (aunque no estadísticamente significativa) en los valores medios de nuevos adultos y total de individuos obtenidos en las plantas NahG respecto a los registrados en Moneymaker, que no puede ser explicada únicamente por la pequeñísima diferencia inicial en la oviposición de las hembras. Lo mismo sucedía al comparar los porcentajes de individuos en las últimas fases del desarrollo y el crecimiento poblacional de *B. tabaci* en ambos genotipos de tomate. Esto parece sugerir, en principio, que la disminución de la acumulación de SA en plantas susceptibles de tomate podría ocasionar una ligera reducción de la población de *B. tabaci*, así como un cierto retraso en el desarrollo del insecto. Sin embargo, el conjunto de los resultados previos con mutantes de *Arabidopsis* alterados en las rutas de SA y JA había demostrado que el incremento del nivel de expresión de genes dependientes de JA, y no la disminución en la expresión de genes dependientes de SA, eran los responsables del retraso del desarrollo de *B. tabaci*, sugiriendo que las moscas blancas son capaces de evadir las defensas dependientes de JA para poder completar su desarrollo (Zarate *et al.*, 2007). Aunque los niveles de SA de los genotipos de tomate utilizados en esta Tesis fueron siempre superiores a los niveles de JA, durante la actividad de las N1 (12 dpi) se observó en las plantas NahG una disminución en la acumulación de SA (incluso por debajo de la observada antes de la infestación) mientras se producía un aumento continuo en el nivel de JA. Es posible que todo esto contribuyese al ligero aumento de la diferencia (no significativa) entre Moneymaker y NahG al final del bioensayo.

Las pequeñas diferencias en las respuestas de tomate y *Arabidopsis* podrían deberse a ligeras variaciones metodológicas entre ambos trabajos, el biotipo del insecto empleado en cada uno o las especies vegetales estudiadas. Respecto a la metodología, en tomate se realizó un primer recuento del

número de huevos a los 6 dpi y un último recuento, a los 27 dpi, en los que se tuvo en cuenta únicamente a aquellos individuos que se hubieran desarrollado como mínimo hasta el estado N3, pues podía considerarse despreciable el número de los que se encontraron en fases anteriores. El recuento único realizado por Zarate *et al.* (2007) en *Arabidopsis* se llevó a cabo registrando todos los estados de desarrollo presentes en las hojas a los 24 dpi, momento en que ningún individuo había alcanzado aún la fase adulta. En relación al biotipo de *B. tabaci* empleado, en el trabajo con tomate se empleó el biotipo Q mientras que en *Arabidopsis* se empleó el biotipo B (Zarate *et al.*, 2007). Se ha demostrado que las plantas son capaces de discriminar entre biotipos de algunos insectos, entre los que se encuentran las moscas blancas (van de Ven *et al.*, 2000). De hecho, aunque se ha demostrado que el gen *Mi-1* es responsable de la resistencia a los biotipos B y Q (Nombela *et al.*, 2003) existen diferencias significativas en la resistencia a cada uno de ellos (Nombela *et al.*, 2001) y, en general, en el comportamiento de estos dos biotipos en una misma especie vegetal (Muñiz and Nombela, 2001; Muñiz *et al.*, 2002). Respecto a las especies vegetales empleadas en cada estudio, existen diferencias entre *Arabidopsis* y tomate en los cambios de expresión de genes relacionados con las rutas de señalización del SA y JA observados tras la infestación por el biotipo B de *B. tabaci* (Puthoff *et al.*, 2010). Por lo tanto, si la infestación con un mismo biotipo provoca una respuesta diferente en tomate y *Arabidopsis*, es más probable que las pequeñísimas diferencias entre el trabajo de Zarate *et al.* (2007) y el que se presenta en esta Tesis sean debidas al sistema defensivo propio de cada planta, esto es, a diferencias debidas a la especie empleada, tomate o *Arabidopsis*. Estas diferencias entre tomate y *Arabidopsis* han sido también observadas tras la infestación con áfidos (Thompson and Goggin, 2006).

Implicación de la ruta del SA en la resistencia del tomate mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren la participación del SA en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a *B. tabaci*, puesto que la resistencia del tomate VFN se pierde al disminuir significativamente el contenido de SA en sus hojas. Esto se demostró en las plantas VFNxNahG, que contienen el gen *Mi-1* pero que, debido a la expresión del gen *NahG*, acumularon sólo un 50% del contenido normal de SA, resultando susceptibles

a *B. tabaci* con un comportamiento similar a las plantas NahG (carentes de *Mi-1*) y con unos valores medios de oviposición e infestación final superiores a los observados en plantas resistentes VFN. Estos resultados concuerdan con un estudio anterior en el que se indicaba la participación del SA en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a áfidos (Li *et al.*, 2006) puesto que las plantas que contenían el gen *Mi-1* pero presentaban un reducido contenido de SA (VFNxNahG) habían perdido su resistencia a áfidos conferida por *Mi-1*. Un trabajo anterior, también en tomate, determinó que el SA cumplía un importante papel también en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a nematodos, al observarse desarrollo de *M. javanica* en raíces de plantas VFNxNahG (Branch *et al.*, 2004). Sin embargo, en un estudio posterior apenas se observó desarrollo de estos organismos en el mismo genotipo, lo que les llevó a concluir que la expresión del gen *NahG* no afectaba a la resistencia *Mi-1* a estos nematodos (Bhattarai *et al.*, 2008). En este último trabajo se argumentó que las diferencias entre ambos estudios con nematodos podían ser debidas a la metodología empleada en cada caso: cultivo monoxénico con plántulas recién germinadas (Branch *et al.*, 2004) y crecimiento en macetas de plantas de 5 semanas de edad (Bhattarai *et al.*, 2008). La otra posible razón esgrimida para justificar aquellas diferencias fue que el sistema utilizado por Branch *et al.* (2004) era más eficiente en la degradación del SA y que, por tanto, los bajos niveles residuales presentes en las plantas empleadas por Bhattarai *et al.* (2008) fueran suficientes para mantener la resistencia mediada por *Mi-1* a nematodos. La metodología utilizada en el presente trabajo con *B. tabaci* tuvo mayor similitud con la empleada por Bhattarai *et al.* (2008), pues se analizaron plantas de tomate de 8 semanas de edad crecidas en macetas con sustrato inerte. Por otro lado, la reducción en el contenido de SA en las hojas de plantas de tomate que contenían el gen *NahG*, con respecto a las plantas que no contenían este gen, fue inferior a la disminución observada en raíces de plantas crecidas en maceta (Bhattarai *et al.*, 2008) y muy inferior a la registrada en raíces en cultivo monoxénico (Branch *et al.*, 2004).

Además, en el presente trabajo, los bajísimos niveles de SA observados en las plantas VFN que contienen el gen *NahG* (VFNxNahG) se asociaron con un crecimiento poblacional de *B. tabaci* similar al obtenido en plantas susceptibles NahG, que no contienen el gen *Mi-1* y presentan también niveles reducidos de SA. Esto contrasta con la tasa negativa de crecimiento en la

variedad resistente VFN (cuyo contenido en SA se multiplicaba por 10, aproximadamente, tras la infestación) indicando una reducción significativa de la población del insecto en la próxima generación. No obstante, las diferencias en el contenido de SA de las plantas portadoras del gen *Mi-1*, VFN y VFNxNahG, no parecen alterar la velocidad de desarrollo de *B. tabaci*, pues no se obtuvieron diferencias significativas al final del experimento en este aspecto concreto de la resistencia. Mientras en las plantas susceptibles NahG el 60% de los individuos totales correspondía a nuevos adultos y sólo un 7% se encontraban en fase N3, en las plantas que contenían el gen *Mi-1* (VFN y VFNxNahG) se obtuvo un 50% de individuos recién emergidos (nuevos adultos) y un 14% todavía se encontraban en fase N3. Estos datos sugieren que este ligero retraso (no significativo) en el desarrollo de *B. tabaci* era debido únicamente a la presencia del gen *Mi-1*, independientemente de las diferencias en los niveles de SA ocasionadas por la expresión del gen *NahG* antes y después de la infestación. En el trabajo realizado con áfidos y en los que se llevaron a cabo con nematodos sobre estas mismas plantas (Branch *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Bhattarai *et al.*, 2008), únicamente se estimó el número medio de individuos presente en cada genotipo y no se analizó el efecto que se producía sobre el crecimiento poblacional de estos organismos.

Además del papel del SA en la resistencia a *B. tabaci* mediada por el gen *Mi-1*, como se ha demostrado en esta tesis, esta fitohormona desempeña un importante papel en respuestas resistentes mediadas por otros genes *R* en diferentes especies vegetales (Hammond-Kosack and Parker 2003; Shah, 2003). Como se ha hecho en el presente estudio, para identificar este papel se han empleado diversos mutantes en la ruta del SA (Brading *et al.*, 2000; Glazebrook, 2001; Hammond-Kosack and Parker 2003). En *Arabidopsis*, mediante el uso de plantas NahG se demostró que la resistencia mediada por genes *R* a *P. syringae* pv. *tomato* (Rairdan and Delaney, 2002) o a *Erysiphe cichoracearum* UCSC1 (Xiao *et al.*, 2003) requiere la acumulación de SA. Sin embargo, no siempre se ha establecido un papel para esta ruta de señalización en la resistencia a patógenos, como en el caso de la resistencia en tomate al patógeno *Cladosporium fulvum* por los genes *Cf-2* y *Cf-9* para la que se han sugerido diferentes mecanismos de resistencia independientes del SA, puesto que la reducción en los niveles de SA en las plantas que contienen estos genes *R* no afectó la resistencia a *C. fulvum* (Brading *et al.*, 2000).

A la vista de los resultados obtenidos con el ácido salicílico, sería interesante realizar más estudios que mejoren el conocimiento sobre el posible papel de otras rutas de señalización que puedan estar implicadas en la resistencia basal y la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a *B. tabaci* en tomate, así como estudiar la comunicación entre las principales rutas del SA y JA/ET en esta interacción, como se ha realizado previamente en las interacciones de moscas blancas en *Arabidopsis* (Zarate *et al.*, 2007) y con áfidos en tomate (Li *et al.*, 2006; Bhattarai *et al.*, 2007).

3. Implicación del en *Hsp90* en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*.

El objetivo principal de este estudio era dilucidar la posible implicación del gen *Hsp90-1* en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a *B. tabaci*, comprobando si la infestación del insecto en plantas resistentes se ve alterada por el silenciamiento de *Hsp90-1*. Previamente fue necesario asegurarse de que la infiltración con el vector empleado para el silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) no modificaba la resistencia o susceptibilidad de las plantas infiltradas, y demostrar que el silenciamiento de *Mi-1* afecta a la resistencia del tomate a *B. tabaci*.

Efecto de la agroinfiltración del vector TRV ‘vacío’ sobre la defensa basal y la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*.

Lo primero que se pudo comprobar a partir de los resultados obtenidos fue que la infiltración del vector TRV ‘vacío’ (en el que no se había introducido material genético a silenciar) no produce, por sí solo, ninguna alteración apreciable en la defensa basal de Moneymaker (-*Mi-1*) a *B. tabaci*, ya que los valores de oviposición no se alteraban significativamente. La oviposición tampoco se vio alterada en plantas Motelle (+*Mi-1*) infiltradas con el vector ‘vacío’ TRV. Además, las diferencias observadas entre Moneymaker y Motelle se mantienen al agroinfiltrar las plantas con este vector. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en áfidos (Li *et al.*, 2006) y en nematodos (Bhattarai *et al.*, 2007), confirmándose que la infiltración de TRV ‘vacío’ no altera la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a insectos y nematodos. También se había demostrado anteriormente que la infiltración de TRV tampoco afecta a la resistencia mediada por otros genes *R* a patógenos en otras especies vegetales, como el gen *N* que confiere resistencia frente al virus del mosaico del tabaco, TMV (Liu *et al.*, 2002b).

Por otro lado, el análisis de expresión de *Mi-1* mediante PCR semi-cuantitativa de plantas Motelle y Moneymaker infiltradas con el vector ‘vacío’ TRV reflejaron el mismo patrón de expresión que el observado previamente (Li *et al.*, 2006) en plantas de menor edad de estos mismos cultivares: ninguna expresión de *Mi-1* en Moneymaker y evidente expresión de este gen en Motelle

a partir del ciclo 35 de PCR, aumentando ligeramente al incrementar el número de ciclos.

Efecto del silenciamiento del gen *Mi-1* sobre la resistencia a *B. tabaci*.

El silenciamiento del gen *Mi-1* en plantas de tomate Motelle ocasionó una pérdida parcial de la resistencia a *B. tabaci*. El mismo vector TRV había sido utilizado previamente para silenciar *Mi-1* en tomates resistentes y así concluir que la resistencia a áfidos y nematodos se pierde en las plantas silenciadas (Li *et al.*, 2006; Bhattarai *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta el momento no se había silenciado este gen para demostrar si, como era de esperar, su silenciamiento también alteraba la resistencia que confiere a *B. tabaci*. En las plantas Motelle en las que se había silenciado *Mi-1* se observó que la oviposición de las hembras no difería significativamente de la obtenida en el cultivar susceptible Moneymaker, pero era superior a la de las plantas Motelle no silenciadas. Esta pérdida parcial (no total) de resistencia también observada para áfidos y nematodos (Li *et al.*, 2006; Bhattarai *et al.*, 2007), es debida a que el silenciamiento mediante TRV en tomate no es completo en toda la superficie de la hoja infiltrada, contrastando con la eficiencia de VIGS en *N. benthamiana* donde el silenciamiento sí es más uniforme (Liu *et al.*, 2002a,b; Lu *et al.*, 2003). Mediante el silenciamiento del gen de la fitoeno desaturasa (*PDS*) que produce un fenotipo visible de fotoblanqueo en las hojas (Liu *et al.*, 2002a) pudimos comprobar que el silenciamiento génico en tomate se extiende de forma irregular por los tejidos foliares, apreciándose como manchas dispersas y discontinuas en la superficie de las hojas. Este hecho hace necesaria la utilización de más réplicas en tomate para el análisis de cualquier gen cuyo silenciamiento no produce un fenotipo visible en la planta. Los análisis semi-cuantitativo (RT-PCR) y cuantitativo (qRT-PCR) confirmaron el silenciamiento parcial de *Mi-1* en plantas agroinfiltradas con el vector TRV-*Mi-1*, reflejándose en una reducción significativa en el nivel de expresión del gen, comparado con la expresión de *Mi-1* en plantas Motelle no silenciadas pues habían sido agroinfiltradas con el vector TRV 'vacío'. Esta reducción en los niveles de expresión del gen *Mi-1* de plantas silenciadas estaba asociada a la pérdida parcial de resistencia a *B. tabaci* manifestada por un incremento en la oviposición de *B. tabaci* en esas mismas plantas.

El gen *Hsp90-1* en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*.

Mediante el silenciamiento del gen *Hsp90* se ha podido demostrar que la chaperona que codifica juega un papel importante en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*. Del mismo modo que en el silenciamiento de *Mi-1*, al silenciar el gen *Hsp90* en las plantas resistentes Motelle se produce una pérdida parcial de la resistencia a *B. tabaci*. Más concretamente, los valores de oviposición en plantas Motelle con *Hsp90* silenciado fueron muy similares a los registrados en las plantas en las que se había silenciado *Mi-1*. En ambos casos, estos valores fueron sólo ligeramente inferiores a los de las plantas susceptibles Moneymaker y significativamente superiores a los de aquellas plantas Motelle en las que no se había silenciado ninguno de estos genes. Anteriormente ya se conocía que la resistencia mediada por *Mi-1* a áfidos y nematodos en tomate requiere de la participación de *Hsp90* (Bhattarai *et al.*, 2007), pero esta es la primera vez que se demuestra la implicación de este gen en la resistencia mediada por *Mi-1* a moscas blancas.

En tomate se requiere la implicación de *Hsp90* también en la resistencia mediada por el gen *I-2* a *Fusarium oxysporum* aunque no pudieron identificar qué isoforma era la que interaccionaba con *I-2* (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005). En este estudio demostraron, mediante un análisis de interacción de proteínas, que la chaperona HSP90 y su co-chaperona PP5 interaccionaban con la proteína I-2 pero sólo HSP90 era necesaria para la resistencia mediada por *I-2*.

Además de su importancia en tomate, el papel de *Hsp90* ha sido también establecido en las resistencias de *N. benthamiana* mediadas por los genes *Pto*, *N* y *Rx* a *P. syringae*, al virus del mosaico del tabaco (TMV) y al virus X de la patata (PVX), respectivamente (Lu *et al.*, 2003). Trabajos posteriores en esa misma especie vegetal demostraron que las proteínas SGT1 y RAR1 acompañan a la chaperona HSP90 formando un complejo señalizador en la resistencia mediada por el gen *N* frente a TMV (Liu *et al.*, 2004) y en la resistencia mediada por el gen *Rx* al virus X de la patata (PVX) (Botër *et al.*, 2007). En *Arabidopsis*, las isoformas *Hsp90-1* y *Hsp90-2* participan en la resistencia mediada por los genes *RPS2* y *RPM1* al patógeno *P. syringae* y requieren de las co-chaperonas SGT1 y RAR 1 (Takahashi *et al.*, 2003; Hubert *et al.*, 2003).

Durante la realización de este trabajo se observó que las plantas en las que se había silenciado el gen *Hsp90* presentaban un tamaño ligeramente inferior al resto de plantas agroinfiltradas, aunque en ningún caso hubo inhibición completa del crecimiento o diferencias significativas con el resto de las plantas. Un fenómeno similar ya había sido observado previamente en el silenciamiento de *Hsp90* en *N. benthamiana* (Lu *et al.*, 2003) sugiriendo que la proteína HSP90 estaría implicada en rutas de señalización que afectan el crecimiento normal de la planta y en procesos de resistencia. En trigo el silenciamiento de este gen provocó una inhibición del desarrollo de las plantas e incluso la muerte de algunas de ellas alcanzándose un 35% de mortalidad a los 35 días de haberse realizado la infiltración en las plantas (Wang *et al.*, 2011).

En el presente trabajo, la reducción de la expresión del gen *Hsp90* en las plantas agroinfiltradas con el vector TRV-*SlHsp90-1* se comprobó mediante PCR semi-cuantitativa, advirtiendo que en las plantas silenciadas se requiere de un mayor número de ciclos de PCR para obtener una banda clara de expresión del gen, por comparación con las plantas Motelle sin silenciar (agroinfiltradas con el vector TRV 'vacío'). Esta reducción en la expresión de *Hsp90* se había observado previamente en un trabajo anterior en tomate en el que habían silenciado el mismo gen (Bhattarai *et al.*, 2007). Estos resultados se confirmaron también mediante qRT-PCR, observándose una disminución significativa de la expresión de *Hsp90* en las plantas Motelle que se habían agroinfiltrado con el vector TRV-*SlHsp90-1*, respecto a las plantas Motelle no silenciadas. Por tanto, esta reducción en los niveles de expresión de *Hsp90* se correlacionó con la pérdida parcial de la resistencia a *B. tabaci* previamente observada en esas mismas plantas. El análisis cuantitativo también se había utilizado anteriormente para confirmar el silenciamiento de *Hsp90* en trigo (Wang *et al.*, 2011).

En anteriores estudios se había determinado que algunas chaperonas se expresan constitutivamente mientras otras se ven inducidas en respuesta a estrés. Así, en *Arabidopsis*, *Hsp90.1* se induce por estrés mientras otras 3 isoformas citosólicas se expresan constitutivamente (Takahashi *et al.*, 2003). Sin embargo, en tomate, durante la interacción con *B. tabaci*, la expresión de *Hsp90.1* no varió en plantas Motelle o Moneymaker infiltradas con el vector

vacío ni en las que se silenció *Mi-1*, sugiriendo niveles constitutivos para *Hsp90.1* y una regulación independiente de *Mi-1*. Esta invariabilidad en los niveles de expresión de *Hsp90.1* ya había sido observada previamente en plantas Motelle (no infiltradas) al comparar la expresión del gen en plantas no infestadas con plantas infestadas con áfidos sugiriendo entonces que la infestación con áfidos no producía variación en los niveles de expresión de *Hsp90.1* (Bhattarai *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis proporcionan valiosa información sobre los niveles de expresión de *Hsp90* en otras condiciones diferentes a las analizadas en estudios anteriores. Aunque la expresión del gen es constante, los niveles de proteína HSP90 en tomate se reducen tras la infestación con moscas blancas (Gorovits *et al.*, 2007). En ese trabajo, el análisis de abundancia de la proteína HSP90 se llevó a cabo mediante el uso de anticuerpos policlonales que mostraron una disminución en los niveles de la proteína tanto tras la infestación con moscas blancas virulíferas (portadoras del TYLCV) como no virulíferas. En otras palabras, el estrés sufrido por la planta se traducía en un mayor consumo de la proteína HSP90, disminuyendo sus niveles, siendo esta reducción más acusada en las plantas resistentes a TYLCV (Gorovits *et al.*, 2007). Tomando todos estos datos en conjunto, se podría sugerir que el estrés biótico provocado por la infestación con insectos succionadores en plantas de tomate no altera la expresión del gen *Hsp90* pero sí provoca una respuesta de reducción de los niveles acumulados de esta proteína. De un modo similar, estudios previos habían demostrado que también la expresión de *Mi-1* es constitutiva, registrándose el mismo nivel de expresión en diferentes órganos de la planta, en diferentes grados de desarrollo y tras el ataque de nematodos y áfidos (Martínez de Ilarduya and Kaloshian, 2001; Goggin *et al.*, 2004). Sería interesante conocer si, en el caso de *Mi-1*, los niveles de su proteína también disminuyen en respuesta al ataque de mosca blanca, como ocurre con *Hsp90*.

Aunque se han descrito algunas interacciones directas entre un gen de resistencia en la planta y un gen de avirulencia en el patógeno, se cree que la mayoría de las proteínas R forman complejos con otras proteínas del huésped, como HSP90, a través de las cuales detectan indirectamente los efectores de organismos atacantes (revisado en Shirasu and Schulze-Lefert, 2003). Sin embargo, la proteína HSP90 no siempre interactúa con las mismas co-chaperonas. En la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a áfidos y nematodos,

HSP90 interacciona con SGT1 pero no con RAR1 (Bhattarai *et al.*, 2007). Por otro lado, la resistencia mediada por el gen *I-2* a *Fusarium oxysporum* requiere de la chaperona HSP90 y la proteína fosfatasa 5 (PP5) pero no necesita SGT1 o RAR1 (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005). En arroz y en soja, HSP90 interactúa con la co-chaperona Hop/Sti (Zhang *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2010). Hop/Sti es conocida por su participación, junto a HSP90, en el complejo que regula la maduración de hormonas esteroides en animales (Pratt and Toft, 2003). Algunos de estos complejos han sido descritos en animales y plantas sugiriendo una convergencia evolutiva (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005; Mayor *et al.*, 2007).

A partir de estudios realizados sobre el papel de *Hsp90* en la resistencia mediada por genes *R*, se han descrito varios modelos de activación en los que interviene la chaperona HSP90 (Sangster and Queitsch, 2005; Bhattarai *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010). En la resistencia mediada por *Mi-1*, el modelo basado en la “hipótesis del guardián” (van der Biezen and Jones, 1998) propone una interacción entre las proteínas *Mi-1*, HSP90 y SGT1 que “guardan” a la proteína RME1 (Bhattarai *et al.*, 2007). Trabajos previos ya habían demostrado que *Rme1* también es necesario para la resistencia mediada por *Mi-1* a nematodos, áfidos y moscas blancas (Martínez de Ilarduya *et al.*, 2001, 2004) pero no para la resistencia mediada por el gen *I-2* a *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Martínez de Ilarduya *et al.*, 2001) ni para la resistencia a *P. syringae* pv. *tomato* mediada por el gen *Pto* (Martínez de Ilarduya *et al.*, 2004). El modelo de Bhattarai *et al.* (2007) propone a RME1 como la proteína diana para las proteínas Avr de nematodos e insectos que modificarían RME1. Esta modificación provocaría un cambio conformacional de la proteína *Mi-1* que permitiría la unión de HSP90 y SGT1, para formar un señalosoma que activaría la ruta de señalización y la defensa en la planta. Los resultados obtenidos con *B. tabaci* refuerzan la hipótesis de un modelo común para nematodos e insectos en la interacción de las proteínas *Mi-1* y HSP90. No obstante, el papel de la proteína SGT1 todavía no ha sido estudiado en la resistencia mediada por *Mi-1* a moscas blancas por lo que, por el momento, no se puede concluir que exista un modelo común de activación de la resistencia mediada por *Mi-1* a nematodos, áfidos y moscas blancas.

4. Análisis transcriptómico del tomate en su interacción con *B. tabaci* y la resistencia inducida por BTH.

El análisis de microarrays proporciona un gran volumen de datos por lo que se hace necesario identificar la información más relevante en función del objetivo establecido. El objetivo más general de esta parte de la Tesis era conocer la reprogramación transcripcional en las interacciones tomate-*B. tabaci*. Para alcanzar este objetivo se plantearon estudios más concretos cuyos resultados se discuten a continuación.

Diferencias basales de los transcriptomas de Motelle y Moneymaker en ausencia de infestación y efectos de la infestación por *B. tabaci* sobre dichas diferencias basales.

El estudio comparativo de los transcriptomas de plantas no infestadas de los cultivares Motelle y Moneymaker reveló la presencia de 18 transcritos diferencialmente expresados de los cuales 10 se expresaban al menos el doble en Motelle que en Moneymaker, mientras que los otros 8 se expresaban la mitad o menos. Para simplificar, en adelante se denominan sobreexpresados y reprimidos, respectivamente. En principio, los genes representados por estos transcritos podrían ser considerados como buenos candidatos para intervenir de un modo u otro en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*, si bien la relevancia de cada uno de ellos en dicha resistencia debe ser analizada individualmente. Téngase en cuenta que Motelle y Moneymaker son cultivares quasi-isogénicos ya que sólo se diferencian en un fragmento de 650 kb del cromosoma 6 en el que se encuentra incluido *Mi-1* (Messeguer et al. 1991; Ho et al., 1992). No obstante, la presencia de *Mi-1* también parece ir asociada a diferencias en la expresión de otros genes no necesariamente localizados cerca de él.

Las diferencias basales entre los transcriptomas de Motelle y Moneymaker se vieron claramente alteradas por la infestación de *B. tabaci*: de los 18 transcritos que distinguían las plantas no infestadas de ambos cultivares, sólo 14 se mantenían como representantes de genes diferenciales tras la infestación. De estos 14 transcritos, 7 correspondían a genes sobreexpresados en Motelle con respecto a Moneymaker y 7 a genes

reprimidos. Además, las diferencias de expresión (nivel de expresión relativa) entre ambos cultivares en lo que se refiere a los 7 genes sobreexpresados en Motelle, se redujeron tras la infestación con *B. tabaci*. Por el contrario, en lo que respecta a cuatro de los 7 genes reprimidos en las plantas Motelle, la diferencia con Moneymaker se incrementaba tras la infestación por *B. tabaci* y los otros tres, en cambio, presentaron una expresión relativa menor tras la infestación que antes de la misma. Además, el análisis comparativo de las plantas infestadas seleccionó otros 14 transcritos adicionales diferencialmente expresados (7 sobreexpresados y 7 reprimidos en Motelle por comparación con Moneymaker) que no se habían detectado en la comparación de las plantas sin infestar. En conjunto, todos estos resultados indican que la infestación por moscas blancas produce cambios importantes en los transcriptomas de las plantas de tomate, que modifican sustancialmente las diferencias basales entre ambas variedades.

Entre los 10 transcritos sobreexpresados en las plantas no infestadas de Motelle con respecto a Moneymaker se obtuvieron 3 transcritos correspondientes a los genes homólogos *Mi-1.1* y *Mi-1.2*, lo que supone un resultado, no por esperado menos interesante, que refleja la principal diferencia basal de ambos cultivares en ausencia de cualquier tipo de infestación/infección. Hasta el momento sólo se había realizado una comparación similar entre Motelle y Moneymaker, en ausencia de cualquier infestación y utilizando la técnica de microarrays en un estudio previo pero en el que únicamente se analizó la expresión de 1547 genes expresados en raíces entre los que no se había incluido el gen *Mi-1* (Schaff et al., 2007), a diferencia de esta Tesis en la que se ha analizado la expresión de, aproximadamente, 9200 genes en tejido foliar para obtener una información global sobre las diferencias entre ambos cultivares debidas a la presencia/ausencia de este gen. La expresión individualizada de *Mi-1.2* mediante RT-PCR había sido analizada previamente en estos mismos genotipos de tomate en ausencia de cualquier organismo, observándose expresión de este gen únicamente en Motelle y, más concretamente, en diferentes órganos de las plantas (Martínez de Ilarduya and Kaloshian, 2001). Además, que el método de análisis de la expresión génica global empleado en esta Tesis haya detectado esta diferencia fundamental, puede ser considerado como una primera prueba de la validez del mismo. Las diferencias de expresión de los transcritos correspondientes a

Mi-1.1 y *Mi-1.2* entre Motelle y Monemaker también se mantuvieron tras la infestación por *B. tabaci*, con unos valores de expresión relativa solo ligeramente inferiores a los observados antes de la infestación. Si a esto unimos el hecho de que en la interacción incompatible no se obtuvo expresión diferencial de ninguno de estos transcritos, todo parece indicar que la infestación por *B. tabaci* no provoca cambios sustanciales en la expresión del gen *Mi-1* del tomate, aunque para asegurarlo sería necesario realizar posteriores análisis de expresión de este gen en particular. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente por otros autores tras el ataque de nematodos y áfidos (Martínez de Ilarduya and Kaloshian, 2001; Goggin et al., 2004).

Aunque la diferencia principal entre Motelle y Moneymaker se ha basado en la presencia del gen *Mi-1* en Motelle, el análisis comparativo de sus transcriptomas, en ausencia y tras la infestación por *B. tabaci*, ha revelado otras diferencias además de *Mi-1* que pueden ser relevantes para la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a moscas blancas.

El gen con mayor expresión en hojas no infestadas de Motelle por comparación con las de Moneymaker (más de 80 veces superior) fue el que codifica la proteína NtGP4 (Nicotiana tabacum geranylgeranylated protein 4), cuyo análisis de secuencia indicó que podría estar involucrado en procesos de respuesta a estímulos bióticos. Tras la infestación con *B. tabaci*, la diferencia de expresión de este gen entre ambos cultivares se redujo considerablemente, expresándose tan sólo 37,59 veces más en Motelle que en Moneymaker. Parece evidente que la infestación con moscas blancas afecta de algún modo la diferencia de expresión del gen NtGP4 entre ambos cultivares. Sería interesante realizar estudios adicionales con este gen ya que, a pesar de las diferencias observadas entre ambos cultivares, la infestación con *B. tabaci* no parecía alterar de forma detectable su expresión en cada uno de ellos por separado pues este gen no se vio diferencialmente expresado durante la interacción compatible ni durante la incompatible. En cambio, durante la interacción compatible en la raíz de tomate con nematodos sí se inducía la expresión de NtGP4 (Bhattarai et al., 2008), así como en hojas de tomate tolerantes a estrés salino comparadas con hojas de plantas sensibles a este tipo de estrés abiótico (Sun et al., 2010).

El siguiente gen con mayor expresión en hojas no infestadas de Motelle por comparación con las de Moneymaker es desconocido, pero el análisis funcional de su secuencia determinó que podría estar implicado en procesos de síntesis de proteínas. La diferencia de expresión de este gen entre ambos cultivares (E.R.= 28,42) se redujo sólo ligeramente tras la infestación con *B. tabaci*. Además, no se encontró este transcrito diferencialmente expresado ni en la interacción compatible ni en la incompatible con *B. tabaci*. En conjunto, todo indica que este gen desconocido se expresa mucho más en Motelle que en Moneymaker, pero su expresión en cada cultivar permanece bastante estable tras la infestación con mosca blanca.

El tercer gen con mayor expresión en Motelle respecto a Moneymaker (E.R.= 11,30) fue la enzima DAP epimerasa (Diaminopimelate epimerase) que cataliza la biosíntesis de lisina a partir de aspartato. Además, se cree que esta enzima podría ser utilizada como un componente en agentes antimicrobianos (Hor et al., 2013). La expresión diferencial de este gen entre Motelle y Moneymaker se redujo sólo muy ligeramente tras la infestación por *B. tabaci*. Por otro lado, durante las interacciones compatible e incompatible con moscas blancas no se expresó diferencialmente. Esto parece indicar que la infestación con este insecto no produce variaciones en la diferencia de expresión del gen que codifica esta enzima, igual que ocurría con el gen previamente descrito.

También un gen que codifica la subunidad vacuolar H⁺-ATPasa A2 mostró una expresión más de 4 veces superior en hojas de Motelle con respecto a las de Moneymaker, y la posterior infestación con *B. tabaci* casi no alteró esa diferencia de expresión. La actividad de esta subunidad fue descrita en la resistencia mediada por Cf-9 al patógeno *Cladosporium fulvum* que expresa el gen de avirulencia Avr9 (Piedras et al., 1998). Los cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática son de los primeros eventos que se producen en las respuestas defensivas de las plantas tras el reconocimiento de patógenos o elicitores. Estos cambios producen una despolarización debida a la entrada de Ca²⁺ y H⁺ y a la salida de K⁺ y Cl⁻ (Scheel, 1998). Estos flujos parecen ser necesarios para la inducción de expresión de genes defensivos frente al ataque de patógenos o a heridas (Fukuda 1996; Jabs et al. 1997; Schaller and Oecking 1999; Schaller and Frasson 2001). Durante las interacciones compatible e incompatible no se obtuvo expresión diferencial del

gen que codifica esta subunidad vacuolar H⁺-ATPasa A2, indicando que la actividad de *B. tabaci* no altera la expresión del gen en ninguno de los dos cultivares de tomate.

En la comparación entre Motelle y Moneymaker en ausencia de infestación, se encontró sobreexpresado en Motelle un gen que codifica canales selectivos para iones dependientes de voltaje (VDAC), o poros, formados a partir de proteínas canal transmembrana, llamadas porinas, presentes en la membrana externa de la mitocondria. Sin embargo, la expresión diferencial de este gen entre Motelle y Moneymaker no se observó tras la infestación con *B. tabaci*. A través de los canales se permite el paso de iones, metabolitos y polipéptidos. Estos canales han sido mejor estudiados en células animales que en vegetales pero, en ambos casos, están implicados en la apoptosis (Voehringer et al., 2000; Okada et al., 2004; Veenman et al., 2008; Kusano et al., 2009; Tateda et al., 2011). En Arabidopsis, recientemente se ha demostrado que la proteína VDAC es necesaria para el crecimiento normal de las plantas y para la defensa, regulando la generación de peróxido de hidrógeno (Tateda et al., 2011). La implicación del peróxido de hidrógeno en la ruta de VDAC fue observada previamente en la resistencia no específica de *N. benthamiana* a *Pseudomonas cichorii* (Tateda et al., 2009). VDAC ha sido utilizada como un marcador de la respuesta hipersensible (HR) en Arabidopsis (Lacomme and Roby, 1999; Swidzinski et al., 2004). En el trabajo que se presenta en esta Tesis no se ha observado expresión diferencial de VDAC ni en la interacción incompatible ni en la compatible con *B. tabaci*, lo que contribuye a sugerir que la infestación de este insecto no promueve la HR en tomate. Estos datos concuerdan con los obtenidos previamente en Arabidopsis con el biotipo B de *B. tabaci* donde análisis citológicos de las hojas mostraron que tras la alimentación de las ninfas de estas moscas blancas no se producía HR (Kempema et al., 2007). De igual modo, tampoco se había observado HR en tomate durante la interacción compatible e incompatible con áfidos (Martínez de Ilarduya et al., 2003).

Entre los 10 transcritos sobreexpresados en Motelle por comparación con Moneymaker, en ausencia de infestación, también se encontró una glucosiltransferasa que, sin embargo, no se detectó tras la infestación con *B. tabaci*. El análisis de secuencia de esta glucosiltransferasa indicó que se

trataba del mismo gen que codifica una glicogenina glicosil-transferasa detectada en un estudio previo de microarrays en raíces no infestadas de Motelle y Moneymaker (Schaff et al., 2007). En ese mismo trabajo, también detectaron la inducción de este gen durante la interacción incompatible con nematodos y demostraron su participación en la resistencia mediada por *Mi-1* a nematodos. Estudios previos han sugerido la implicación de glicosiltransferasas en procesos de respuesta a diferentes tipos de estrés, abiótico y biótico (Vogt and Jones, 2000; Dixon, 2001; Mazel and Levine, 2002; Qi et al., 2005; Langlois-Meurinne et al., 2005; Meissner et al., 2008; von Saint Paul et al., 2011) y síntesis de la pared celular (Lao et al., 2003; Egelund et al., 2004; Baumann et al., 2007). Sin embargo, en el trabajo presentado en esta Tesis no se obtuvo inducción de este gen durante la interacción incompatible sugiriendo que aunque este gen esté implicado en la resistencia mediada por *Mi-1* a nematodos, podría no participar en la resistencia a *B. tabaci*. Para confirmarlo, sería necesario realizar estudios complementarios, como el silenciamiento génico inducido por virus llevado a cabo en el trabajo de Schaff et al. (2007). Del último transcrito sobreexpresado en Motelle, por comparación con Moneymaker, en ausencia de infestación, no se obtuvo ningún tipo de información.

Entre los genes reprimidos en Motelle, por comparación con Moneymaker (en ausencia de infestación) destaca, principalmente por su nivel de expresión (9 veces menos expresado en Motelle que en Moneymaker), el gen que codifica la proteína GAI que pertenece a la familia GRAS cuyas proteínas cumplen funciones reguladoras en distintos aspectos de la señalización y el desarrollo de la planta (Bolle, 2004; Achard et al., 2006). La posterior infestación con *B. tabaci* redujo la diferencia de expresión del gen, que pasó a expresarse aproximadamente 5 veces menos en Motelle que en Moneymaker. La proteína GAI contiene un dominio N-terminal DELLA (Silverstone et al., 1998) y a las proteínas que comparten este motivo también se las conoce como proteínas DELLA (Eckardt, 2003). GAI fue la segunda proteína que se clonó de esta familia (Peng et al., 1997) después de clonar la proteína SCR (Di Laurenzio et al., 1996). Estas proteínas reprimen la acción de las giberelinas (GA), que promueven el crecimiento de la planta, restringiendo el crecimiento vegetal (Bolle, 2004). Las GAs regulan el crecimiento mediante la degradación de las proteínas DELLA (Harberd, 2003; Jiang and Fu, 2007; Wang et al., 2009). En

Arabidopsis y tomate, estas proteínas controlan las respuestas defensivas en la planta modulando las respuestas dependientes de SA y JA (Navarro et al., 2008; Bari and Jones, 2009; Ding et al., 2013). Que en la comparación entre Motelle y Moneymaker se obtenga menor represión del gen en Motelle puede que sea debido a que en esta planta existen otros mecanismos de resistencia que puedan permitir la promoción del crecimiento.

Otro gen reprimido en Motelle por comparación con Moneymaker (su expresión es 8 veces menor), fue la enzima Pys1 (fitoeno sintasa) implicada en el metabolismo secundario y relacionada con la maduración del fruto (Gady et al., 2012). La diferencia de expresión del gen entre ambos cultivares disminuyó tras la infestación con *B. tabaci*. La fitoeno sintasa regula la biosíntesis de carotenoides mediante factores de transcripción (Toledo-Ortiz et al., 2009) observándose una correlación entre la acumulación de carotenoides y la sobreexpresión de la enzima Pys1 (von Lintig et al., 1997). Esta enzima resulta inducida en respuesta a estrés salino en tomate (Zhou et al., 2007) pero no ha mostrado expresión diferencial en respuesta a moscas blancas en Arabidopsis (Kempema et al., 2007) ni a nematodos (Bhattarai et al., 2008) en interacción compatible e incompatible con tomate. En los datos obtenidos en esta Tesis, tampoco se obtuvo expresión diferencial de Pys1 durante la interacción compatible ni durante la incompatible del tomate con *B. tabaci*.

Por otro lado, la enzima ADK (adenosina quinasa) que cataliza la síntesis de AMP a partir de adenosina y ATP, se expresaba 8 veces menos en Motelle que en Moneymaker en ausencia de infestación, diferencia que se redujo a 6 veces tras la infestación de ambos cultivares con *B. tabaci*. La expresión del gen que codifica esta enzima no se vio regulada diferencialmente durante la interacción compatible o incompatible con moscas blancas, presentada en esta Tesis. En cambio, ya se conocía que esta enzima se induce en *N. benthamiana* tras la infección con virus (Wang et al., 2003) y también por estrés salino en *Beta vulgaris* y *Spinacia oleracea*, pero no en otras especies vegetales como *N. tabacum* y *Brassica napus* (Weretilnyk et al., 2001).

Los factores de transcripción MADS-box están implicados en la regulación de diferentes procesos del desarrollo de la planta entre los que se encuentran la floración, el desarrollo del fruto y la embriogénesis (Busi et al., 2003). Mediante los análisis de microarrays de este estudio se encontró

reprimida la expresión de MADS-box 15 en Motelle por comparación con Moneymaker en ausencia de moscas blancas (E.R.= -3,15) y esta diferencia se mantuvo e incluso se incrementó ligeramente (E.R.= -4,07) tras la infestación con *B. tabaci*. La expresión de MADS-box 15 se había visto incrementada en la interacción compatible e incompatible del tomate con nematodos (Bhattarai et al., 2008) pero no se detectó expresión diferencial del mismo durante las interacciones compatible e incompatible con *B. tabaci* estudiadas en esta Tesis. Durante la interacción incompatible tomate-*Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria se induce la expresión de varias proteínas MADS-box (Bonshtien et al., 2005) así como en respuesta a estrés salino (Zhou et al., 2007). Sin embargo, durante la interacción incompatible con el primer estado ninfal de *B. tabaci* (12 dpi), en las plantas infestadas se reprimían dos factores de transcripción MADS-box (FBP29 y 9). En definitiva, la expresión de las proteínas MADS-box 15 no parece cumplir un papel relevante en la interacción compatible e incompatible con moscas blancas en plantas de tomate pero sí en respuesta a nematodos, patógenos y estrés abiótico.

La expresión de una cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) era 2,39 veces menor en Motelle que en Moneymaker sin infestar pero, tras la infestación con *B. tabaci* esta expresión diferencial ya no se detectaba; únicamente la proteína ELI3, que es también un tipo de proteína CAD (Logemann et al., 1997) se expresaba 5,79 veces menos en Motelle que en Moneymaker infestadas. Las CAD son enzimas clave de la síntesis de lignina que pertenecen a la familia de enzimas oxidorreductasas, conociéndose también como NADP+-oxidorreductasas, y catalizan la conversión reversible de cinamil aldehído a los monolignoles que darán lugar a la lignina, por lo que se correlaciona la actividad CAD con la lignificación en tomate (Roth et al., 1997). Además de su papel en la lignificación, algunos genes que codifican enzimas CAD han sido asociados a numerosas respuestas defensivas frente a patógenos (Kiedrowski et al., 1992; Mitchel and Barber, 1994; Coelho et al., 2006). Así, en la interacción Arabidopsis-moscas blancas, aumentaba la expresión de dos isoformas CAD (Kempema et al., 2007) y los niveles de CAD se sobreexpresaban también tras la infección de perejil con hongos y bacterias (Somssich et al., 1989; Schmelzer et al., 1989; Van Gijsegem et al., 1995; Logemann et al., 1997). De igual modo, en la interacción del tomate con *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria se correlacionó positivamente el nivel

de resistencia en la planta al patógeno con los niveles de enzima CAD (Umesha and Kavitha, 2011). Sin embargo, durante la interacción compatible tomate-*B. tabaci* no se vio alterada la expresión de genes que codifican enzimas CAD indicando que estas enzimas no se ven afectadas tras la infestación de moscas blancas en plantas susceptibles. En cambio, durante la interacción incompatible con *B. tabaci* se reprimió la expresión de la proteína ELI3, como se explicará más adelante.

En la comparación entre Motelle y Moneymaker en ausencia de infestación, también se expresaba 2,13 veces menos en Motelle que en Moneymaker una glutarredoxina, enzimas antioxidantes que desempeñan un papel importante en el control del estrés oxidativo (Kalinina et al., 2008; Meyer et al., 2008). También tras la infestación con *B. tabaci* se mantenía una expresión diferencial similar (2,34 veces menos en Motelle que en Moneymaker).

Por último, entre los transcritos reprimidos en Motelle por comparación con Moneymaker (en ausencia de moscas blancas y tras la infestación con *B. tabaci*) se encontró también uno que codifica una proteína desconocida y otro cuyo análisis de secuencia no proporcionó ninguna información.

Entre los transcritos que se sobreexpresaron en Motelle, por comparación con Moneymaker, únicamente tras la infestación de *B. tabaci* (E.R.= 3,57) pero no antes de la misma, destaca la enzima fosfatasa ácida 1 (Aps-1). Esta enzima participa en procesos de respuesta defensiva, en concreto de defensa a insectos. El gen Aps-1, estrechamente ligado a *Mi-1*, fue clonado y ha sido empleado como marcador molecular de la presencia de *Mi-1* (Aarts et al. 1991; Williamson and Colwell, 1991). La actividad de la enzima aumentaba en raíces de plantas de tomate susceptibles y resistentes tras la infección con nematodos (Williamson and Colwell, 1991). Estos resultados fueron contrastados recientemente en estudios de microarrays (Bhattarai et al., 2008).

El resto de genes más expresados en Motelle que en Moneymaker, pero sólo tras la infestación con *B. tabaci*, estaban relacionados con la protección frente al estrés oxidativo. Por un lado el gen que codifica a la enzima isoflavona reductasa que es una de las enzimas clave en la biosíntesis de

isoflavonoides y cuya función antioxidante ha sido observada en *Arabidopsis* (Babiychuk et al., 1995) y arroz (Kim et al., 2010). Por otro lado, el gen que codifica a la enzima péptido metionina sulfóxido reductasa (PMSR), que puede desempeñar un papel importante en la protección de las células frente al estrés oxidativo, como se ha observado con la PMSR2 en *Arabidopsis* (Bechtold et al., 2004). Por último, destaca el gen que codifica a la subunidad 3 de la enzima NADH deshidrogenasa (nad3), subunidad presente en el Complejo I de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. El complejo I actúa como una bomba de protones hacia el espacio intermembrana de la mitocondria por lo que se evita la acidificación de la matriz que puede desembocar en estrés oxidativo y, en último lugar, en un daño celular que se manifiesta en una respuesta hipersensible. Que estos tres genes estén más expresados en Motelle que en Moneymaker puede ir en concordancia con un estudio previo realizado en estos mismos cultivares de tomate en el que no observaron respuesta hipersensible tras el ataque de áfidos (Martínez de Ilarduya et al., 2003). En *Arabidopsis* tampoco se ha observado este tipo de respuesta tras la infestación por moscas blancas (Kempema et al., 2007). Teniendo en cuenta todos estos datos en su conjunto, parece que la infestación por moscas blancas no provoca una respuesta hipersensible.

Por último, los últimos tres genes más expresados en Motelle que en Moneymaker, tras la infestación con *B. tabaci*, fueron el que codifica a una proteína que se expresaba 12,16 veces más en Motelle que en Moneymaker pero a la que Mapman no pudo asignar ninguna función, el gen que codifica a la enzima ATP sulforilasa 1 que pertenece a la familia de enzimas sulfato adenililtransferasas, implicadas en la ruta de asimilación de sulfato y que se expresaba 2,53 veces más en Motelle que en Moneymaker y, finalmente, una proteína no identificada en tomate que se expresaba 2,11 veces más en Motelle que en Moneymaker.

Entre los genes que se expresaron menos en Motelle que en Moneymaker tras la infestación con *B. tabaci*, pero sin expresión diferencial en las plantas no infestadas, destaca el que codifica la enzima ELI3, de la que ya se ha hablado más arriba. También se incluyen en este grupo 3 proteínas no determinadas que están implicadas en procesos de transcripción (que corresponden a los transcritos LesAffx.21605.1.S1_at, LesAffx.10016.1.A1_at y

Les.5732.1.S1_at), así como una metil-transferasa, implicada en diferentes procesos celulares entre los que se encuentra la regulación de la expresión génica durante el desarrollo (Finnegan et al., 1996). Por último, otras dos enzimas: una aldehído oxidasa (AO1) y la UDP-glucuronato decarboxilasa. La AO1 fue identificada en tomate junto con otras enzimas de la misma familia por Min et al. (2000) quienes sugirieron que cada AO podría jugar un papel diferente en el crecimiento y desarrollo de esta solanácea. Las AO están implicadas en procesos de biosíntesis de hormonas, en concreto catalizan el último paso de la biosíntesis de ABA (Min et al., 2000). La actividad de la enzima UDP-glucuronato decarboxilasa, implicada en procesos metabólicos asociados a membrana, ha sido detectada en varias plantas y se ha estudiado la expresión de genes que codifican estas enzimas en cebada (Zhang et al., 2005) . Esta enzima tiene un importante papel en la biosíntesis de la pared celular (Seifert, 2004).

Comparación entre la interacción compatible y la interacción incompatible en tomate a *B. tabaci*.

En el trabajo realizado en esta Tesis se han llevado a cabo análisis separados durante la interacción compatible y la incompatible del tomate a *B. tabaci* y se han comparado entre sí ambas interacciones. Anteriormente se habían realizado pocos estudios que analizasen los cambios de expresión génica durante las interacciones incompatibles planta-organismo (revisado en Thompson and Goggin, 2006). Más recientemente, se han llevado a cabo estudios durante las interacciones compatible e incompatible con áfidos (Li et al., 2008) y patógenos (Gutsche et al., 2009). En tomate, se han realizado análisis transcriptómicos durante la interacción compatible e incompatible a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Gibly et al., 2004; Bonshtien et al., 2005) y a nematodos (Bhattarai et al., 2008). Los trabajos realizados hasta el momento con moscas blancas se habían centrado únicamente en los cambios de expresión provocados durante la interacción compatible con *Arabidopsis* (Kempema et al., 2007) o con tomate (Estrada-Hernández et al., 2009).

En la interacción incompatible tomate-*B. tabaci* se obtuvo un mayor número de genes diferencialmente expresados que en la interacción compatible, tanto durante la alimentación y oviposición de hembras adultas

(159 y 32 genes, respectivamente) como durante la actividad de la primera fase ninfal (189 y 47 genes, respectivamente). Similares diferencias entre ambos tipos de interacción también había sido observada tras la infección con nematodos en plantas con y sin el gen *Mi-1* (Bhattarai et al., 2008). Además de que se produzcan más cambios durante la interacción incompatible que durante la compatible, el cambio de expresión en ambas interacciones es cuantitativamente muy diferente, tanto a los 2 como 12dpi, aunque es durante la actividad de la primera fase ninfal (12dpi) cuando la diferencia es más acusada. De hecho, mientras en la interacción incompatible a los 12dpi se obtuvieron genes sobreexpresados y reprimidos más de 50 y 80 veces, respectivamente, en la interacción compatible no se registraron cambios de expresión superiores a 6 entre plantas Moneymaker infestadas con *B. tabaci* y plantas Moneymaker no infestadas. Por tanto, no se trata únicamente del número de genes que se expresan diferencialmente en cada interacción sino también el valor de ese cambio.

Apenas existe solapamiento en las respuestas observadas durante las interacciones compatible e incompatible tomate-*B. tabaci*. Al comparar la respuesta provocada por *B. tabaci* en plantas resistentes (interacción incompatible) y en plantas susceptibles (interacción compatible) se observa que, durante la alimentación y oviposición de las hembras adultas (2dpi), menos de un 2% de los genes sobreexpresados son comunes a ambas interacciones. Lo mismo sucede al comparar los genes reprimidos. Posteriormente, durante la actividad del primer estado ninfal de *B. tabaci* (12dpi) se obtiene un porcentaje ligeramente mayor de genes comunes a ambas interacciones, aproximadamente el 8%, tanto en los genes sobreexpresados como en los reprimidos. Sin embargo, se había observado similitud en los cambios producidos en los transcriptomas de plantas susceptibles (compatible) y resistentes (incompatible) durante otras interacciones planta-patógeno/insecto, aunque la regulación de la expresión en cada interacción era diferente (Eulgem et al. 2004; Navarro et al. 2004; Tao et al. 2003; Thilmony et al. 2006; Bhattarai et al., 2008; van Esse et al., 2009).

Basándose en la hipótesis de que algunas respuestas observadas en la interacción incompatible durante los primeros momentos de la infección pueden ser similares a las observadas en la interacción compatible tras una

infección prolongada, Tao et al. (2003) compararon los cambios producidos en la interacción incompatible en *Arabidopsis* con *P. syringae* pv *maculicola* (Psm) a las 6 y 9 horas post infección (hpi), con los cambios desencadenados en la interacción compatible a las 30hpi, sugiriendo una similitud en las respuestas defensivas en ambas interacciones. No obstante, en la comparación entre la interacción incompatible en tomate con *B. tabaci* a los 2dpi y la interacción compatible a los 12dpi esta hipótesis no tiene cabida ya que tan sólo un 4% de los genes diferencialmente expresados en estas interacciones fue comunes a ambas. Es posible que plantas de tomate susceptibles requieran de un mayor tiempo de exposición a *B. tabaci* para desencadenar cambios similares a los producidos en plantas de tomate resistentes por hembras adultas de este insecto a los 2dpi.

Debido a que apenas existe solapamiento en las respuestas provocadas por *B. tabaci* durante sus interacciones compatible e incompatible con la planta de tomate, se hace necesaria una discusión individualizada de las respuestas desencadenadas en ambas fases de la infestación (temprana y tardía), comparando en cada fase las interacciones compatible e incompatible.

Efecto de la alimentación y oviposición de las hembras adultas de *B. tabaci* (2dpi) sobre el transcriptoma de tomate con y sin el gen *Mi-1*.

La alimentación y oviposición de las hembras adultas de *B. tabaci* indujo la expresión diferencial de 348 transcritos en la interacción incompatible y tan sólo 79 en la compatible. Esto indica que, la reprogramación transcripcional que se produce en las plantas portadoras del gen *Mi-1* es mucho mayor que la provocada en las plantas susceptibles.

Respuestas comunes a las interacciones compatible e incompatible

Durante la fase temprana de la infestación por *B. tabaci* únicamente se obtuvieron 7 genes comunes a las interacciones compatible e incompatible. Entre estos genes destaca la sobreexpresión, en las plantas infestadas, de la proteína PR-2, que es una glucano endo-1,3- β -glucosidasa identificada en procesos de defensa pero que Mapman incluyó en la categoría miscelánea. La expresión de esta PR-2 ya se había visto inducida anteriormente en la interacción incompatible del tomate con el patógeno *Pseudomonas syringae*

pv. tomato (Jia and Martin, 1999), durante las interacciones compatible e incompatible tomate-áfidos (Martínez de Ilarduya et al., 2003) y durante las interacciones compatibles del tomate con la mosca blanca *Bemisia argentifolii* (Mayer et al., 2002) y de *B. tabaci* con *Arabidopsis* (Kempema et al., 2007) y tomate (Estrada-Hernández et al., 2009). Por tanto, esta es la primera vez que se detecta la sobreexpresión de PR-2 en la interacción incompatible tomate-*B. tabaci* mediada por *Mi-1*, además de en la compatible. La expresión diferencial de PR-2 entre plantas infestadas por *B. tabaci* y plantas no infestadas fue similar en la interacción incompatible y compatible (2,61 y 2,16 respectivamente) indicando que la actividad de *B. tabaci* induce la expresión de estas proteínas al mismo nivel en plantas que contienen el gen *Mi-1* y en plantas que no lo contienen y que esta diferencia de expresión es suficiente en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*.

También el gen PGPS/D12 se vio inducido tras la alimentación y oviposición de *B. tabaci* en tomate en el presente trabajo. Anteriormente se había detectado la sobreexpresión de este mismo gen en *Arabidopsis* (Kempema et al., 2007) tras la infestación con la misma especie de mosca blanca pero en una fase más tardía, en respuesta a la actividad de los estados ninfales N2-N3. Sin embargo, este gen no se expresaba diferencialmente durante la interacción compatible ni la incompatible tomate-nematodos (Bhattacharai et al., 2008). PGPS/D12 no fue incluido en los análisis de Estrada-Hernández et al. (2009) en tomate, por lo que no podemos saber si la infestación con el biotipo A de *B. tabaci* afecta también la expresión de este gen pero, a partir de los resultados obtenidos hasta el momento y a falta de más información, parece que PGPS/D12 podría ser un gen de respuesta específica a la actividad de *B. tabaci*. Aunque la comparación de la secuencia de este gen en la base de datos del tomate mostró similitud con otras secuencias relacionadas con la respuesta oxidativa, Mapman no pudo asignarle ninguna función y la incluyó en el grupo desconocido (unknown).

El tercer gen con mayor expresión en plantas infestadas, tanto en la interacción compatible como la incompatible, fue la proteína transmembrana inhibidora Bax (BI-1). La proteína Bax, identificada originalmente como una proteína animal pro-apoptótica, puede provocar en plantas una muerte celular (Lacomme and Santa Cruz, 1999). La proteína BI-1 por su parte es un

regulador negativo de la muerte celular por estrés tanto en plantas como en animales (Hückelhoven, 2004). La infección con el patógeno *Pseudomonas syringae* en *Arabidopsis* provocó la sobreexpresión de esta proteína inhibidora (Sanchez et al., 2000). En otros estudios, transformaron plantas para que sobreexpresaran BI-1 y observaron que esta sobreexpresión originaba una reducción en la susceptibilidad de la cebada al patógeno *Fusarium graminearum* (Babaeizad et al., 2009) y que suprimía la muerte celular en arroz provocada por el patógeno *Magnaporthe grisea* (Matsumura et al., 2003). En *Arabidopsis*, además observaron que la BI-1 interaccionaba con la calmodulina (Ihara-Ohori et al., 2007). Sin embargo, de las interacciones en tomate con *B. tabaci* presentadas en este apartado de la Discusión, únicamente en la interacción incompatible mediada por *Mi-1* se encontró sobreexpresadas calmodulinas. Por lo tanto, en el caso del tomate sólo se establece una relación entre BI-1 y calmodulina en plantas portadoras del gen *Mi-1* tras la infestación temprana por *B. tabaci*. De hecho, durante la infestación tardía por el primer estadio ninfal de moscas blancas no se encontró esa relación debido a que la proteína inhibidora BI-1 no se vio expresada diferencialmente al menos dos veces más en plantas infestadas que en plantas sin infestar. Esto podría indicar que la proteína BI-1 aumenta rápidamente su expresión tras la infestación por *B. tabaci* pero no se requiere un aumento prolongado en la resistencia mediada por *Mi-1* a moscas blancas.

Entre los 4 genes reprimidos comunes a las interacciones compatible e incompatible en esta fase temprana de la infestación se encontró el gen que codifica a una deshidrogenasa de cadena corta que pertenece a la familia de genes *sad*. Estos genes se sobreexpresan en perejil por la luz UV-B pero se reprimen tras la infección con el patógeno *Phytophthora sojae* (Logemann and Halbrock, 2002). Aunque estos genes parecen responder de forma diferente al estrés abiótico y al biótico no se puede negar su implicación en las respuestas por estrés. Por último, se reprimió en plantas infestadas la subunidad A del factor de transcripción CCAAT cuyo dominio de unión comparte homología con el dominio CCT del factor de transcripción CONSTANS (CO) (Wenken et al., 2006; Distelfeld et al., 2009). Recientemente se ha publicado una revisión sobre los factores de transcripción CCAAT en plantas (Laloum et al., 2013). Mapman no pudo asignar ninguno de estos dos

genes a una función conocida por lo que los agrupó en la categoría desconocida.

Seguidamente, destacaría la represión, tanto en la interacción compatible como en la incompatible tomate-*B. tabaci*, del gen que codifica la enzima PLD β 2 que pertenece a la familia de fosfolipasas D (PLD) implicadas en diferentes procesos en la planta entre los que se incluye la señalización por respuesta a estrés y hormonas (Testerink and Munnik, 2005; Wang, 2005; Bargmann and Munnik, 2006; Wang et al., 2006) y que Mapman incluyó en la categoría de metabolismo de lípidos. Por el contrario, el ataque de araña roja en tomate produce sobreexpresión de PLD β 2 (Kant et al., 2004). En el estudio transcriptómico de la interacción tomate-nematodos (Bhattacharai et al., 2008) no se incluyó esta enzima por lo que no podemos saber cómo se ve afectada su expresión tras la infección con este organismo. Se ha observado que las PLD tienen patrones de expresión variados en tomate (Laxalt et al., 2001) por lo que es posible que la respuesta a cada organismo sea también diferente.

Por último, resaltaría la represión del gen que codifica una proteína de respuesta hipersensible (HRAP), cuya represión también fue detectada mediante análisis por SSH durante la interacción compatible tomate-*B. tabaci*, en el trabajo de Estrada-Hernández et al. (2009), realizado únicamente con plantas susceptibles. Estos datos concuerdan con los obtenidos previamente en *Arabidopsis* donde la infestación de *B. tabaci* no provocaba una respuesta hipersensible en la planta (Kempema et al., 2007). Esta HR tampoco ha sido observada en tomate tras la infestación con áfidos (Martínez de Ilarduya et al., 2003). Por el contrario, la resistencia mediada por *Mi-1* a nematodos va asociada a la inducción de la HR (Dropkin, 1969) induciéndose la proteína HRAP durante la interacción incompatible (Bhattacharai et al., 2008). Curiosamente Mapman no pudo asignar esta proteína a ninguna categoría incluyéndola en el grupo de genes desconocidos.

Respuestas exclusivas de la interacción compatible

Durante la fase temprana de la infestación por *B. tabaci*, un gran número de los 413 genes diferenciales, exclusivos de la interacción compatible o de la incompatible, no tenían asociado ningún proceso biológico, pudiendo

representar componentes de la defensa en tomate a *B. tabaci*, todavía sin identificar.

En la interacción compatible, se encontraron más genes sobreexpresados que reprimidos en los grupos funcionales relacionados con el metabolismo secundario y la fotosíntesis. El grupo con mayor representación de genes sobreexpresados estaba implicado en procesos fotosintéticos, destacando el gen Snakin-2 cuyo papel había sido demostrado anteriormente en la defensa basal en tomate al patógeno *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Balaji et al., 2011), así como en patata al patógeno *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* y en respuesta a herida (Berrocal-Lobo et al., 2002). Parece que este gen podría estar implicado en la defensa basal a *B. tabaci* en tomate compartiendo este tipo de respuesta con patógenos como *C. michiganensis* y con la respuesta a herida. En cambio, durante la interacción compatible tomate-nematodos no se había obtenido expresión diferencial de este gen (Bhattarai et al., 2008).

La actividad de las hembras de *B. tabaci* es detectada en plantas de tomate susceptibles reflejándose en una sobreexpresión de proteínas PR relacionadas con el estrés biótico, una proteína de respuesta a estrés (Hsp) asociadas al estrés abiótico y por la expresión inducida de glutatión S-transferasa, que regula la acumulación de ROS (Achard et al., 2008) y que Mapman agrupó en la categoría miscelánea. Por otro lado, dicha actividad provoca una represión de factores de transcripción (categoría RNA) implicados en el desarrollo de la planta entre los que se encuentra un factor de transcripción homeobox y uno AP2/EREBP, que se ha demostrado que controla la embriogénesis o la respuesta por estrés (Riechmann and Meyerowitz, 1998) así como de genes implicados en la organización celular (categoría cell en los Resultados). Un perfil similar se observó en estudios previos sobre las interacciones compatibles tomate-moscas blancas (Estrada-Hernández et al., 2009) y tomate-nematodos (Bhattarai et al., 2008). La infestación de *B. tabaci* en plantas de tomate susceptibles también indujo la expresión de varias proteínas PR implicadas en la ruta del ácido salicílico (SA) y que participan en respuesta a estrés biótico y la represión de genes asociados al ácido jasmónico (JA), como el factor de transcripción EREBP (Ethylene-responsive element binding protein family) con dominio AP2,

comentado anteriormente, cuya relación con el JA ha sido investigado por otros autores (Solano et al., 1998; Lorenzo et al., 2003). Esto concuerda con los resultados observados en otros trabajos con moscas blancas en *Arabidopsis* (Kempema et al., 2007) y tomate (Mayer et al., 2002; McKenzie et al., 2005; Sánchez-Hernández et al., 2006; Estrada-Hernández et al., 2009; Puthoff et al., 2010) en los que se encontraba comunicación antagonista entre estas rutas, si bien en los estudios previos realizados en tomate se emplearon plantas más pequeñas, cultivares susceptibles distintos de Moneymaker y distinta metodología de microarrays.

Las proteínas relacionadas con procesos de la pared celular se encontraron reprimidas, como una endo- β -1,4-D-glucanasa. Sin embargo, Estrada-Hernández et al. (2009) encontraron que en la variedad Río Fuego, también susceptible a *B. tabaci*, se sobreexpresaba el gen que codifica esta enzima durante la fase temprana de la infestación mientras que se reprimía su expresión durante la actividad de los estadios ninfales N2-N3 de *B. tabaci*, no estudiados en esta Tesis. Es posible que los diferentes biotipos empleados en ese trabajo y en esta Tesis sean la causa de estas diferencias. También se encontraron reprimidas una xiloglucano endotransglucosilasa-hidrolasa (XTH) y una pectinasa que están implicadas en procesos de fortificación de la pared celular. Posiblemente, *B. tabaci* al alimentarse del cultivar susceptible Moneymaker libera proteínas que degradan a las enzimas de la planta para evitar una modificación estructural de la pared celular que le dificulte su alimentación.

Respuestas exclusivas de la interacción incompatible

Uno de los grupos con mayor representación entre los 341 genes diferencialmente expresados exclusivamente en la interacción incompatible Motelle-*B. tabaci* fue el que Mapman denominó RNA y que incluye numerosos factores de transcripción. Entre los factores de transcripción sobreexpresados se encontraron algunos relacionados con procesos de desarrollo como es el caso de TCP, C2H2, Homeobox, AUX-IAA y GRAS (Cubas et al., 1999; Chrispeels et al., 2000; Riechmann and Ratcliffe, 2000; Reed, 2001; Bolle, 2004) y PHOR1, que es un componente de la ruta de señalización de las giberelinas (Amador et al., 2001). También un grupo relacionado con la señalización de estrés, que incluye AP2, HSF, MYB y WRKY (Chen et al. 2002;

Eulgem 2005; Bhattarai et al., 2008; Li et al., 2008). De entre estos factores de transcripción, los WRKYs desarrollan un importante papel en la reprogramación transcripcional asociada con la respuesta a diferentes tipos de estrés en la planta (Eulgem et al., 2000; Huang et al., 2012). Ya se conocía que, durante la actividad de las ninfas N2-N3 en *Arabidopsis* y en tomate susceptible se induce la expresión de WRKY (Kempema et al., 2007; Estrada-Hernández et al., 2009). Sin embargo, la alimentación y oviposición de las hembras adultas no indujo la expresión de WRKY en las plantas de tomate susceptibles empleadas en esta Tesis ni en el cultivar susceptible Río Fuego empleado en el trabajo de Estrada-Hernández et al. (2009). En la interacción tomate-nematodos se habían encontrado WRKY sobreexpresados durante la interacción compatible e incompatible mientras otros WRKY vieron inducida su expresión únicamente durante la interacción incompatible (Bhattarai et al., 2008), destacando entre ellos WRKY72 cuyo papel en la resistencia mediada por *Mi-1* a nematodos ya había quedado demostrada (Bhattarai et al., 2010). Aunque en la interacción incompatible tomate-*B. tabaci* se sobreexpresaron varios factores de transcripción de la familia WRKY, en concreto WRKY72 no estaba representado en el chip de Affymetrix que se ha utilizado en los análisis de esta Tesis, por lo que no hemos podido obtener información sobre este gen en particular. Por ello, sería interesante realizar un estudio posterior similar al realizado con nematodos (Bhattarai et al., 2010) para determinar si WRKY72 participa en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*.

Otro de los procesos altamente representado durante la primera fase de la interacción incompatible tomate-mosca blanca, pero no de la compatible, ha sido el de la señalización. Dentro de este grupo destaca principalmente, la señalización por calcio (Ca^{2+}). Más concretamente, la alimentación y oviposición de hembras adultas de *B. tabaci* indujo en plantas de tomate resistente Motelle la expresión de varias calmodulinas. Durante las interacciones de la planta con otros organismos se producen cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática debidas a la entrada de calcio (Ca^{2+}) y protones, y la salida de potasio y cloruro (Ebel and Scheel, 1997). La calmodulina es un sensor de Ca^{2+} implicado en la señalización de este mensajero secundario (Bouché et al., 2005) que interacciona con algunos factores de transcripción WRKY (Park et al., 2005). El papel de la calmodulina en procesos de defensa ha sido observado en otras interacciones (Bergey and

Ryan, 1999; Lee et al., 2004; Chiasson et al., 2005), incluida la resistencia mediada por *Mi-1* a nematodos (Bhattarai et al., 2008). Todo esto sugiere que la calmodulina podría cumplir un papel importante en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*.

También relacionadas con los procesos de señalización, en la interacción incompatible con *B. tabaci* se encontró sobreexpresada la MAPK3. Las MAPKs cumplen un importante papel en la resistencia mediada por genes R (Zhang and Klessig, 2001; Jin et al., 2003; Mayrose et al., 2004). En concreto, la MAPK3 también participa activamente en la resistencia mediada por el gen *Pto* a *P. syringae* pv. tomato (Ekengren et al., 2003) y en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a áfidos (Li et al., 2006). La sobreexpresión de la MAPK3 en plantas resistentes tras la infestación con *B. tabaci* concuerda con estos resultados previos y sugiere un papel de esta MAPK en la resistencia mediada por *Mi-1* a moscas blancas. En otros trabajos de microarrays realizados previamente con estos insectos, en *Arabidopsis* o plantas de tomate susceptibles, obtuvieron MAPKs diferencialmente expresadas pero, en ninguno de estos estudios se encontró regulada diferencialmente la MAPK3 (Kempema et al., 2007; Estrada-Hernández et al., 2009) aunque esto podría ser debido a que esta MAPK no estuviese incluida entre los genes presentes en los microarrays en cada uno de estos trabajos.

Durante la fase temprana de la interacción incompatible (pero no en la compatible) se encontraron sobreexpresados, en el grupo de hormonas, los genes de respuesta a etileno, mientras que se reprimieron aquellos implicados en la respuesta a auxinas y ácido abscísico. La inducción de etileno había sido también observada en resultados obtenidos en tomate durante la alimentación de áfidos (Mantelin et al., 2009) y nematodos (Bhattarai et al., 2008). Por otro lado, se observó la inducción de varias proteínas PR y MAPKs relacionadas con la respuesta a SA. Estos resultados confirman los presentados en otro estudio de esta Tesis en los que se sugiere la participación del SA en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*, como se había demostrado previamente para áfidos y nematodos (Branch et al., 2004; Li et al., 2006; Bhattarai et al., 2008).

También cabe destacar, en la primera fase de la interacción incompatible, el grupo de genes implicados en diferentes procesos de la pared celular cuya composición suele variar tras el ataque de un organismo (Kaloshian and

Walling, 2005; Thompson and Goggin, 2006). Entre los genes cuya expresión se vio inducida durante la alimentación y oviposición de hembras adultas en plantas resistentes, destacan las xiloglucanos endotransglucosilasas-hidrolasas (XTH) y las pectinesterasas cuya sobreexpresión ha sido observada anteriormente en otras interacciones, principalmente en las incompatibles, por ejemplo en cultivares de manzano y sorgo resistentes a áfidos (revisado en Thompson and Goggin, 2006), contribuyendo a la fortificación de la pared celular.

Por último, quisiera poner de relieve la sobreexpresión de genes implicados en procesos de respuesta a estrés biótico inducida en el tomate resistente por la alimentación/oviposición de *B. tabaci*, entre los que cabe destacar el gen Ve2. Este gen se encuentra en el locus Ve del cromosoma 9 del tomate que contiene, además, el gen Ve1. Estos genes confieren resistencia a algunas cepas del género *Verticillium* (Kawchuk et al. 2001; Fradin et al., 2009). Parece que podría existir alguna relación entre ambos tipos de resistencias, la mediada por el gen Ve2 y la mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*. Mientras que en la interacción incompatible tomate-*B. tabaci* se sobreexpresan, como hemos visto, los genes relacionados con estrés biótico, al mismo tiempo se ven reprimidos aquellos genes relacionados con la respuesta a estrés abiótico, entre los que se encuentran pequeñas chaperonas. No obstante, aunque nuestros resultados indican que el tomate portador del gen *Mi-1* responde a la actividad de los adultos de *B. tabaci* incrementando las respuestas íntimamente relacionadas con el estrés biótico, mientras que inhibe las específicamente relacionadas con el estrés abiótico, dado el limitado daño mecánico que dicha actividad ocasiona sobre los tejidos vegetales, hasta el punto que, como se había postulado anteriormente, las moscas blancas son percibidas por la planta de un modo más parecido a los patógenos que a los insectos masticadores (Kaloshian and Walling, 2005), existen procesos que son controlados por genes comunes a los estreses biótico y abiótico que codifican, por ejemplo, factores de transcripción o están implicados en rutas de señalización hormonal (Fujita et al., 2006; Walley et al., 2007).

Durante la interacción incompatible Motelle-*B. tabaci* se observó también la inducción de una glutarredoxina, lo que concuerda con la sobreexpresión de glutarredoxinas durante la interacción incompatible tomate-nematodos

(Bhattacharai et al., 2008). Este tipo de enzimas podrían estar actuando en el control del estrés oxidativo en la resistencia mediada por *Mi-1* a moscas blancas y nematodos, puesto que son enzimas antioxidantes que desempeñan un papel importante en el control del estrés oxidativo (Kalinina et al., 2008; Meyer et al., 2008), tal y como se comentó durante la comparación entre las variedades Motelle y Moneymaker. De hecho, durante la comparación de ambas variedades se había detectado otra glutarredoxina cuya expresión era menor en Motelle que en Moneymaker, tanto antes como tras la infestación por *B. tabaci*. Sin embargo, durante la interacción compatible no se vio expresada diferencialmente ninguna glutarredoxina. Aunque pueda parecer una contradicción, en realidad lo que significa es que en Moneymaker una glutarredoxina se expresa más que en Motelle pero la infestación por *B. tabaci* en las plantas Moneymaker no provoca cambios detectables en la expresión de los genes que codifican a estas glutarredoxinas. Por otro lado, a pesar de que en Motelle se expresa menos que en Moneymaker, en las plantas portadoras del gen *Mi-1* sí se obtiene diferencias entre plantas infestadas por *B. tabaci* y plantas no infestadas probablemente porque la acumulación de ROS es detectada por algún componente de la resistencia mediada por que activa las glutarredoxinas para reducir estos niveles y evitar el daño oxidativo.

Entre los 185 genes reprimidos en Motelle durante la fase más temprana de la interacción incompatible con *B. tabaci*, pero no en la compatible, destaca LeRboh1, un gen homólogo de gp91phox que pertenece al complejo enzimático NADPH oxidasa detectado en mamíferos y que está relacionado con procesos de estrés biótico. He considerado importante destacar este gen, no por su expresión diferencial (2,05 veces menos en plantas Motelle tras la infestación con *B. tabaci*) sino porque estos genes Rboh, que fueron secuenciados en Arabidopsis (Keller et al., 1998; Torres et al., 1998), son genes homólogos responsables de la explosión oxidativa en las planta. En la identificación de la enzima NAPDH oxidasa en plantas se asumió que ésta cumplía el mismo papel que en células animales, esto es, la generación de ROS durante la explosión oxidativa que tiene lugar en respuesta a diferentes tipos de estrés. El gen LeRboh1 (homólogo de gp91phox) ha sido identificado en tomate y se estudió su papel en respuesta a herida (Sagi et al., 2004). En ese trabajo observaron que la represión de este gen se traducía en una reducción en la acumulación de H₂O₂ en hojas. La acumulación de ROS en las plantas puede producir

daños celulares que podrían inducir la respuesta hipersensible (HR) (Levine et al., 1994; Jabs et al., 1996). En la interacción incompatible tomate-nematodos se observa la HR (Dropkin, 1969), pero en el análisis transcriptómico de esta misma interacción no se detectó expresión diferencial del gen homólogo gp91phox (Bhattacharai et al., 2008). En la interacción incompatible mediada por *Mi-1* a áfidos se detectó una ligera acumulación de ROS, a las 24 horas de la infestación, pero no se observó HR (Martínez de Ilarduya et al., 2003) ni se estudió la expresión de LeRboh. En la interacción incompatible con *B. tabaci* no se han analizado, hasta el momento, los niveles de ROS en plantas de tomate portadoras del gen *Mi-1* tras la infestación con moscas blancas. Sin embargo, un estudio en *Arabidopsis* determinó que no se detectaron niveles de H₂O₂ tras una interacción prolongada con estos insectos ni se pudo observar HR (Kempema et al., 2007). De los resultados obtenidos en esta Tesis podemos deducir que es posible que tras la infestación con *B. tabaci* en plantas de tomate que contienen el gen *Mi-1* no se produzca acumulación de H₂O₂, ni consecuentemente HR, debido a que los niveles de expresión del gen homólogo gp91phox se reprimieron durante la fase temprana de esta interacción incompatible. Para confirmarlo, serían necesarios estudios complementarios como los llevado a cabo en *Arabidopsis* con moscas blancas (Kempema et al., 2007) o los realizados en tomate con áfidos (Martínez de Ilarduya et al., 2003).

En la primera fase de la interacción incompatible Motelle-*B. tabaci* también se encontró reprimida la proteína ELI3, descrita como un tipo de proteína CAD (Logemann et al., 1997) que, como se vio anteriormente, se expresaba en menor medida en Motelle que en Moneymaker tras la infestación de ambos cultivares con *B. tabaci* y que está relacionada en el metabolismo secundario. Curiosamente, en la interacción tomate-nematodos, se sobreexpresan los niveles de ELI3 tanto en la interacción compatible como en la incompatible (Bhattacharai et al., 2008) indicando que esta proteína podría cumplir un papel significativo en la defensa basal y en la resistencia mediada por *Mi-1* a nematodos. Sin embargo, no se detectó expresión diferencial de ELI3 durante la interacción compatible del tomate con *B. tabaci*, por lo que no parece que este gen intervenga en la defensa basal a la mosca blanca. Aunque, como se ha visto, en las plantas portadoras de *Mi-1* se produce una alteración en la expresión del gen ELI3 tras el ataque de nematodos y moscas blancas, dicha alteración es completamente opuesta. Estas diferencias en las

respuestas a nematodos y moscas blancas podrían ser debidas a que la invasión de ambos organismos es percibida de forma diferente en las plantas de tomate.

Efecto del establecimiento y alimentación de la fase móvil N1 de *B. tabaci* (12dpi) sobre el transcriptoma de tomate con y sin el gen *Mi-1*.

Durante el establecimiento y alimentación de la fase móvil N1 de *B. tabaci* se obtuvieron 1.032 transcritos diferencialmente regulados durante la interacción incompatible y tan sólo 123 expresados diferencialmente en la compatible. Esto sugiere que, aunque existen procesos comunes en las interacciones compatible e incompatible, la reprogramación transcripcional que se produce en las plantas resistentes de tomate tras la infestación con *B. tabaci* es mucho mayor que la provocada en plantas carentes del gen *Mi-1*.

Respuestas comunes a las interacciones compatible e incompatible

En esta fase de la infestación por *B. tabaci* se obtuvieron 84 transcritos comunes a las interacciones compatible e incompatible, que constituían algo más del 68% de los genes diferencialmente regulados durante la interacción compatible y tan sólo un 8% de los correspondientes a la incompatible. En cambio, en la interacción tomate-nematodos, se habían observado previamente porcentajes más elevados de genes comunes entre plantas resistentes y susceptibles (Bhattarai et al., 2008), casi el 78% de los genes diferenciales en la interacción compatible y el 48% de los genes diferenciales en la incompatible eran comunes a ambas interacciones.

La mayoría de estos 84 genes comunes a las interacciones compatible e incompatible tomate-*B. tabaci* se incluyeron en el grupo “desconocido” por no haber podido asociarlos a ningún proceso biológico en particular. Entre los restantes, el grupo con mayor representación en ambas interacciones fue el de la categoría RNA establecida por Mapman y que incluía genes relacionados con procesos de transcripción entre los que se incluyeron factores de transcripción implicados en el desarrollo vegetal y un WRKY que, como se explicó anteriormente al analizar la respuesta exclusiva de la interacción incompatible a los 2dpi, están involucrados en diferentes procesos de defensa en las plantas. Curiosamente, el mismo WRKY-6, sobreexpresado en ambas interacciones tras la actividad de la N1 de *B. tabaci*, únicamente había sido

inducido durante la interacción incompatible tomate-nematodos (Bhattarai et al., 2007), mientras que en la interacción con *B. tabaci* cumple una doble función participando en la defensa basal y en la resistencia mediada por *Mi-1* a moscas blancas.

También fue común a las interacciones compatible e incompatible del tomate con *B. tabaci*, en esta fase tardía de la infestación, la sobreexpresión de una enzima XTH, incluida en la categoría de pared celular por su implicación en procesos de fortificación de la pared celular, así como la represión de la enzima XEGIP que cumple una función inhibidora de las endoglucanasas patogénicas y que podría estar implicada en la defensa en la planta frente a estrés biótico y abiótico (Qin et al., 2003). En ese trabajo también se discute la posibilidad de que no sólo cumpla esta función inhibidora sino que también regule otras enzimas endógenas de la planta que afecten a la modificación y reorganización de la pared celular. En pimiento, la infección con patógenos provocó la acumulación de esta enzima (Choi et al., 2013) por lo que resulta llamativo que esta enzima no incremente su expresión tras la infestación con *B. tabaci*, especialmente, durante la interacción incompatible.

Además, se ha encontrado de forma común, la sobreexpresión de una proteína PR-2, (la β -1,3-glucanasa) que, aunque se ha relacionado con diversos procesos de defensa, generalmente por estrés biótico, Mapman no la pudo asignar a una categoría concreta y la agrupó en la categoría miscelánea. La expresión de esta PR-2, según se conocía previamente, se induce de forma similar en la interacción compatible e incompatible con áfidos en tomate (Martínez de Ilarduya et al., 2003). Sin embargo, a los 12 días de la infestación del tomate con *B. tabaci*, en la interacción incompatible la expresión de esta PR-2 se expresaba 16 veces más en plantas infestadas que en plantas no infestadas, mientras que, en el mismo momento de la interacción compatible, la expresión se inducía sólo 2 veces en las plantas infestadas. Esta mayor expresión en plantas resistentes que en las susceptibles había sido observada también en la interacción trigo-áfidos (van der Westhuizen et al. 1998).

Durante la fase tardía de las interacciones compatible e incompatible del tomate con *B. tabaci* se reprimieron genes implicados en procesos de respuesta a estrés abiótico; entre ellos, los que codifican pequeñas chaperonas

que presentan una doble función, proteger a la planta y participar en el desarrollo vegetal (Neta-Sharir et al., 2005).

Respuestas exclusivas de la interacción compatible

Aproximadamente, el 30% de los genes de tomate exclusivos de cada interacción, compatible e incompatible, con *B. tabaci* a los 12 días de la infestación, no tenía asociado ningún proceso biológico. Entre los restantes, uno de los grupos con mayor representación de genes sobreexpresados en la interacción compatible pero no en la incompatible, es el relativo al metabolismo secundario, principalmente de flavonoides, cuya producción se debe a la activación de la ruta de los fenilpropanoides (Whitbred and Schuler 2000). Los flavonoides desempeñan importantes papeles en la defensa de la planta pudiendo activarse en respuesta a diferentes tipos de estrés, biótico y abiótico (revisado en Treutter, 2006; Ververidis et al., 2007). También se encontraron sobreexpresados únicamente en la interacción compatible, pero no en la incompatible, los factores de transcripción Homeobox y AP2, comentados anteriormente cuando se analizó la respuesta exclusiva de la interacción compatible durante la fase temprana de la infestación. Estos factores de transcripción están relacionados con procesos de desarrollo en la planta y la señalización de estrés, respectivamente (Riechmann and Ratcliffe, 2000).

Entre los genes reprimidos únicamente en la interacción compatible se encontró la enzima celulosa sintasa 3. Estas enzimas son necesarias para la formación de la pared celular por lo que Mapman la incluyó en esta categoría funcional. Sin embargo, se ha visto en *Arabidopsis* que la inhibición de esta enzima puede dar lugar a una activación específica de rutas de defensa (Ellis et al., 2002). En un estudio de microarrays en el que se estudió la interacción entre moscas blancas y *Arabidopsis* también se encontró reprimida esta enzima (Kempema et al., 2007). Es posible que en la interacción compatible con *B. tabaci* se produzca la represión de la enzima como mecanismo de defensa basal en tomate y *Arabidopsis*. El gen que codifica esta enzima ha sido silenciado con éxito mediante VIGS en *N. benthamiana* (Burton et al. 2000) por lo que podría ser interesante realizar ese silenciamiento en tomate y comprobar la alteración en la formación de la pared celular así como los efectos que esta alteración pueden tener en la colonización por *B. tabaci*.

Respuestas exclusivas de la interacción incompatible

Durante el establecimiento y la alimentación de la N1 de *B. tabaci*, como sucedía también a los 2dpi durante la alimentación y oviposición de las hembras adultas, el grupo con mayor representación entre los 948 genes diferencialmente expresados en la interacción incompatible pero no en la compatible, es el denominado por Mapman, RNA, que está formado por factores de transcripción que regulan diferentes procesos en la planta (WRKY, MYB, HB, AP2, bHLH, HSF) (Riechmann and Ratcliffe, 2000). Entre todos los factores de transcripción sobreexpresados, destaca la proteína CONSTANS, regulador positivo de la inducción floral, que interacciona con el factor de transcripción TGA que regula los genes de defensa dependientes del SA (Song et al., 2008). Este resultado confirma la implicación de la ruta del SA en la resistencia a *B. tabaci* mediada por *Mi-1*, como se ha demostrado en otro estudio incluido en esta Tesis, y como ocurre también en la resistencia frente a áfidos y nematodos (Li et al., 2006; Bhattarai et al., 2008).

Otro grupo importante de genes exclusivos de la interacción incompatible del tomate con la N1 de *B. tabaci* fue el relacionado con los procesos de modificación de la pared celular cuya composición, como se ha comentado al describir la fase temprana de la interacción incompatible, suele verse alterada en respuesta al ataque de patógenos e insectos (Thompson and Goggin, 2006). Así, durante el establecimiento y alimentación de la N1 de *B. tabaci* en plantas de tomate portadoras del gen *Mi-1*, se observó la sobreexpresión de genes que codifican xiloglucanos (XTH), expansinas, extensinas, pectinesterasas, proteínas inhibitoras de poligalacturonasas (PGIP) y pectato liasas. Las pectato liasas son principalmente liberadas por los patógenos para degradar la pared celular de las plantas y obtener los nutrientes necesarios (Jakob et al., 2007), pero estas enzimas también regulan diferentes procesos del desarrollo vegetal (revisado en Marín-Rodríguez et al., 2002) y se ha observado en *Arabidopsis* que participan en sistemas defensivos de la planta frente a diferentes tipos de estrés (Palusa et al., 2007). Las PGIP se localizan en la pared celular de las plantas manteniendo una estrategia defensiva frente al ataque de hongos patogénicos, ya que actúan contra las poligalacturonasas (PG) liberadas por éstos, que degradan dicha pared celular (De Lorenzo et al., 2001). Se ha observado la inducción de PGIPs en respuesta a diferentes

estímulos, principalmente en la interacción incompatible planta-patógeno (De Lorenzo and Ferrari, 2002). Sin embargo, estas proteínas inhibidoras no se vieron inducidas durante la interacción incompatible tomate-nematodos (Schaff et al., 2007; Bhattarai et al., 2008). La sobreexpresión de PGIPs durante la interacción incompatible del tomate con *B. tabaci* concuerda con la idea de que los insectos que se alimentan del floema son percibidos por las plantas de forma similar a los patógenos (van de Ven et al., 2002; Kaloshian and Walling, 2005; de Vos et al., 2005; Kempema et al., 2007; Zarate et al., 2007). Todas estas modificaciones estructurales de la pared celular durante la fase tardía de la interacción incompatible, que han sido observadas también en otras interacciones incompatibles con insectos (Thompson and Goggin, 2006; Tjallingii, 2006), sugieren que la regulación de la pared celular juega un importante papel en la resistencia *Mi-1* del tomate a *B. tabaci*.

El establecimiento y la alimentación de la N1 de *B. tabaci* indujo, exclusivamente durante la interacción incompatible, la expresión de un gran número de genes implicados en el metabolismo de diferentes hormonas. Durante esta interacción incompatible destacaron genes que habían sido incluidos en la categoría de hormonas por estar implicados, por ejemplo, en la síntesis de etileno entre los que se encontraba el gen que codifica la enzima ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase) y el gen que codifica la enzima ACO (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase), enzimas clave en la síntesis de etileno (Yang, 1984; Lin et al., 2009). La acumulación de etileno ha sido observada en diversas plantas tras el ataque de patógenos o insectos aunque no siempre tiene el mismo papel en las interacciones compatibles ni en las incompatibles (revisado en van Loon et al., 2006). Las respuestas dependientes de etileno son amplificadas mediante cascadas de señalización a través de factores de transcripción entre los que se encuentra ERF1 (Ethylene Response Factor 1) (Solano et al., 1998), también sobreexpresado durante la fase tardía de la interacción incompatible en tomate con *B. tabaci* presentada en esta Tesis y que fue incluido en la categoría de hormonas establecida por Mapman.

La activación de la señalización de etileno reduce los niveles de giberelinas promoviendo la acumulación de proteínas DELLA que frenan el desarrollo vegetal (Achard et al., 2007). Esto concuerda con la sobreexpresión

de proteínas tipo DELLA (concretamente la proteína GAI) obtenida durante la fase tardía de la interacción incompatible tomate-*B. tabaci*, indicando que en plantas portadoras del gen *Mi-1*, tras una exposición prolongada a *B. tabaci*, se induce la sobreexpresión de esta proteína de forma que los recursos de la planta se centren en la defensa y no en el desarrollo vegetal. Por tanto, las proteínas DELLA, y GAI en particular, podrían estar implicadas en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a *B. tabaci*, como ya se había apuntado anteriormente en el apartado de esta Discusión en el que se analizaban las diferencias basales entre plantas con y sin dicho gen *Mi-1*, antes y después de la infestación. Esta coordinación entre los recursos defensivos y el desarrollo vegetal ha sido descrita recientemente en *Arabidopsis* y arroz, donde la planta prioriza la respuesta defensiva frente al crecimiento interfiriendo con la ruta de las giberelinas (Yang et al., 2012). En tomate, se ha sugerido que las proteínas GRAS están implicadas en la regulación de las respuestas defensivas en la planta al encontrarse estas proteínas inducidas en plantas de tomate resistentes tras el ataque de patógenos (Mysore et al., 2002; Bonshtien et al., 2005; Mayrose et al., 2006). Por otra parte, se ha demostrado que las proteínas DELLA también están relacionadas con la defensa frente al estrés abiótico, ya que la respuesta de plantas de *Arabidopsis* al estrés salino, analizada por microarrays, implicó cambios en la expresión de genes que codifican proteínas DELLA (Achard et al., 2008). Durante la fase tardía de la interacción incompatible en tomate con *B. tabaci*, la sobreexpresión de proteínas DELLA va acompañada por un incremento en los niveles de peroxidasa y glutatión S-transferasa, que regulan la acumulación de ROS. Esto concuerda con los resultados de Achard et al. (2008) quienes realizaron una comparación con otros trabajos de microarrays en los que se habían estudiado el efecto del estrés salino o del patógeno *Erwinia amylovora*, obteniendo, entre otros, genes que codifican enzimas cuya función es reducir los niveles de ROS. Todo ello sugiere que la acumulación de proteínas DELLA, inducida por estrés, activa una regulación que permite controlar la acumulación de ROS evitando el daño oxidativo.

Por otro lado, en la fase tardía de la interacción incompatible tomate-*B. tabaci* se vio incrementada la expresión de genes implicados en la síntesis de SA así como diversas proteínas PR, fenilalanina amonía liasa (PAL) y MAPK dependientes de esta hormona, sugiriendo un papel para el SA en la

resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*. Estos resultados concuerdan con los presentados en el apartado anterior (alimentación y oviposición de hembras adultas de *B. tabaci*) y en otros resultados descritos en esta Tesis. Curiosamente, durante la fase tardía de la interacción incompatible también se sobreexpresaron genes implicados en la síntesis de JA, como son AOS (allene oxide synthase) y FAD3 (fatty acid desaturase 3), así como genes dependientes de la ruta de JA (Pin1 y Pin2), lo que concuerda con los resultados obtenidos previamente durante la interacción incompatible tomate-áfidos, donde se indujo la expresión de los genes Pin1 y Pin2 así como de proteínas PR reguladas por SA (Martínez de Ilarduya et al., 2003) por lo que es ese trabajo se concluyó que, en plantas de tomate resistentes, los áfidos activarían ambas rutas de señalización. Sin embargo, estudios posteriores más precisos demostraron que para la resistencia mediada por *Mi-1* a áfidos es necesaria la participación del SA (Li et al., 2006) pero no la del JA (Bhattacharai et al., 2007). El conjunto de los datos obtenidos en los resultados de esta Tesis confirman la participación e importancia del SA en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*. Sin embargo, los datos obtenidos en este análisis transcriptómico no dejan claro el papel del JA en este tipo de resistencia por lo que no se puede extraer una conclusión definitiva hasta que se realicen otros estudios más específicos, por ejemplo, con plantas mutantes que tengan alterada la ruta de esta hormona, tal y como realizaron otros autores con áfidos (Bhattacharai et al., 2007).

La actividad de las N1 de *B. tabaci* en plantas que contienen el gen *Mi-1* provocó la sobreexpresión de varias glutarredoxinas, entre ellas la misma que se había detectado también en la fase temprana de la interacción incompatible durante la actividad de las hembras adultas. Como se comentaba en esa ocasión, estas glutarredoxinas participan en el control del estrés oxidativo (Kalinina et al., 2008; Meyer et al., 2008), como se ha sugerido para la resistencia a nematodos (Bhattacharai et al., 2008). Estas proteínas mostraron una expresión relativa similar en ambas fases de la infestación con *B. tabaci* (aproximadamente 3 veces más en las plantas infestadas que en las plantas no infestadas) indicando que un moderado incremento sería suficiente para realizar su función. También se sobreexpresaba la enzima péptido metionina sulfóxido reductasa (PMSR), relacionada con la reducción del estrés oxidativo,

comentada al inicio de esta Discusión en la comparación entre las variedades Motelle y Moneymaker, tras la infestación por *B. tabaci*.

Otro gen, PGPS/D12, se vio 7,70 veces más expresados en las plantas Motelle tras la infestación por *B. tabaci* que en plantas de la misma variedad sin infestar. Este gen también se sobreexpresaba durante la fase temprana de la infestación con *B. tabaci* tanto en la interacción incompatible como en la compatible aunque sólo 2,04 y 2,17 veces más en las plantas infestadas, respectivamente. Sin embargo, durante la fase tardía de la infestación por *B. tabaci* no se vio expresado diferencialmente este gen en las plantas que no contienen el gen *Mi-1* y, en cambio, su expresión diferencial en plantas Motelle incrementó considerablemente respecto a la fase temprana de la infestación. Como se comentó en el apartado de la fase temprana de la infestación, este gen no se expresaba diferencialmente durante la interacción compatible ni la incompatible tomate-nematodos (Bhattarai et al., 2008). Todo esto puede indicar que es un gen de respuesta específico a *B. tabaci* en tomate y el aumento en la expresión de PGPS/D12 estaría relacionado con la presencia del gen *Mi-1*.

También quisiera destacar la sobreexpresión de la enzima fosfatasa ácida (Aps-1), con una E.R.=2,41 en la fase tardía de la interacción incompatible. Tal y como se explicaba al inicio de esta discusión, durante la comparación de los cultivares Motelle y Moneymaker tras la infestación con *B. tabaci*, esta enzima, incluida en la categoría miscelánea establecida por Mapman, está implicada en procesos de respuesta defensiva, principalmente a insectos y, además, está estrechamente ligada al gen *Mi-1* (Medina-Filho and Tanksley, 1983). La expresión diferencial del gen que codifica a esta enzima no ha sido detectada ni en la interacción compatible ni en la fase más temprana de la incompatible. Es posible que la actividad de hembras adultas de *B. tabaci* durante dos días no sea suficiente para provocar cambios en la expresión del gen que codifica a Aps-1 y se requiera de una más prolongada exposición del insecto para que la diferencia de expresión sea significativa en un análisis de microarrays.

Por último, hay que resaltar la sobreexpresión de las proteínas codificadas por los genes Ve1 y Ve2 durante la fase tardía de la interacción incompatible con *B. tabaci*. En cambio, durante la infestación temprana con *B. tabaci* únicamente se detectó la sobreexpresión del gen Ve2, en la interacción

incompatible. El locus *Ve*, localizado en el cromosoma 9 del tomate, contiene estos dos genes íntimamente relacionados, pero sólo *Ve1* confieren resistencia a algunas cepas del género *Verticillium* (Fradin et al., 2009). Además, han podido observar que la cascada de señalización del gen *Ve1* se solapa parcialmente con la cascada de señalización mediada por genes de resistencia *Cf* en tomate (Fradin et al., 2009). Todas estas proteínas contienen una región de repeticiones ricas en leucina (LRR) (Kawchuk et al., 2001) aunque con ligeras diferencias entre ellas por lo que Martin et al. (2003) agruparon estas proteínas R en clases diferentes. Aunque la expresión de los genes *Ve1* y *Ve2* fue detectada en plantas susceptibles y resistentes tras la infección con una cepa de *V. dahliae* (Fradin et al., 2009), únicamente se registraron cambios en la expresión de estos genes durante la interacción incompatible con *B. tabaci*. Estos resultados sugieren que ambos tipos de resistencia podrían estar relacionadas de algún modo y quizás existir algún solapamiento entre ambas rutas de señalización. Este sería, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, el primer trabajo que describe una relación directa entre los genes *Mi-1* y *Ve* en la respuesta al ataque de *B. tabaci*.

Entre los genes reprimidos exclusivamente durante la interacción incompatible se encontraba el gen *Snakin-2*, que está incluido en la categoría de procesos fotosintéticos. En cambio, este gen se sobreexpresa también en garbanzo durante la interacción incompatible con *Ascochyta rabiei*, hongo causante de la “rabia del garbanzo” (Coram and Pang, 2005). Por otro lado, en la interacción incompatible mediada por *Mi-1* a nematodos no se encontró expresión diferencial del gen *Snakin-2* (Bhattarai et al., 2008).

Tal y como sucedía durante la fase temprana de la infestación con *B. tabaci*, los genes *ELI3* y *LeRboh* (homólogo de *gp91phox*), incluidos en la categoría de metabolismo secundario y estrés biótico, respectivamente, también se vieron reprimidos en las plantas portadoras del gen *Mi-1* en respuesta a la actividad de las ninfas de primer estadio, indicando que tras una exposición prolongada a moscas blancas se mantiene reducida la expresión de los genes que codifican estas proteínas. En cambio, durante la interacción incompatible con nematodos se había observado la sobreexpresión de la proteína *ELI3* pero no se vio alteración en la expresión del gen *gp91phox* (Bhattarai et al., 2008). Parece evidente que las respuestas que se

desencadenan en las plantas que contienen el gen *Mi-1*, con respecto a la expresión de estos genes, difieren entre la infección por nematodos y la infestación con *B. tabaci*.

Finalmente, quisiera destacar que, como sucedía durante la fase temprana de la infestación con *B. tabaci* en la interacción incompatible, se observó que los genes asociados específicamente a la categoría de estrés biótico se vieron sobreexpresados tras la infestación, a excepción del gen *gp91phox*, comentado en el párrafo anterior, mientras que aquellos que se incluyeron en la categoría de estrés abiótico vieron reprimida su expresión tras la infestación. Algunos de estos genes relacionados con el estrés abiótico codificaban pequeñas chaperonas (sHSP) o era alguna proteína relacionada con el estrés por daño mecánico.

Comparación de las respuestas de la planta en las 2 fases de la interacción compatible del tomate con *B. tabaci*.

La comparación de los genes expresados diferencialmente durante la interacción compatible en ambas fases del desarrollo de *B. tabaci*, a saber, alimentación y oviposición de hembras adultas (2dpi) y establecimiento y alimentación de las N1 (12dpi) produjo 4 genes sobreexpresados comunes a ambas fases (apenas un 4% del total de sobreexpresados en una u otra) y 3 genes comunes reprimidos (un 3% del total de reprimidos en alguna de las dos fases), sugiriendo que la actividad de las hembras adultas y de las N1 de *B. tabaci* provocan cambios significativamente distintos entre sí en plantas de tomate susceptibles. Aparte de estos resultados, existen pocos trabajos previos que hayan analizado mediante el uso de microarrays el transcriptoma de las plantas susceptibles durante la infestación de *B. tabaci* (McKenzie et al., 2005; Gorovits et al., 2007; Kempema et al., 2007; Estrada-Hernández et al., 2009). De entre éstos, únicamente en este último trabajo se analizaron los cambios de expresión producidos en tomate en diferentes etapas del desarrollo de *B. tabaci*, si bien únicamente estudiaron la interacción compatible empleando un cultivar susceptible, Río Fuego, diferente al uso en esta Tesis, Moneymaker; además emplearon el biotipo A de *B. tabaci* mientras que en esta Tesis se trabajó con el biotipo Q y, por último, existe una gran diferencia en la metodología del estudio de la reprogramación transcripcional, tal y como he

comentado en un apartado anterior. Mientras que en el presente trabajo se obtuvieron más genes diferenciales durante la actividad de la fase N1 que durante la alimentación y oviposición de hembras adultas, en el trabajo realizado por Estrada-Hernández et al. (2009) la actividad de N1 produjo menos cambios en la expresión de genes que la alimentación y oviposición de las hembras. En el presente estudio, durante la alimentación y oviposición de las hembras adultas, un mayor número de genes se reprimía en la interacción compatible, mientras que durante la actividad de N1 se encontraron más genes sobreexpresados que reprimidos. Sin embargo, en el trabajo de Estrada-Hernández et al. (2009) se encontraron más genes sobreexpresados que reprimidos en ambas fases del desarrollo de *B. tabaci*.

Existen diferencias en la metodología entre ambos trabajos que podrían explicar estas diferencias. Los cultivares de tomate empleados son diferentes; mientras en esta Tesis se empleó la variedad susceptible Moneymaker, por su alta homología con la variedad Motelle que contiene el gen *Mi-1* (también utilizada), Estrada-Hernández et al. (2009) emplearon únicamente el cultivar susceptible Rio Fuego. En esta Tesis, se emplearon 30 hembras adultas que se mantuvieron durante 48 horas en las plantas mientras que Estrada-Hernández et al. (2009) emplearon 50 adultos sin diferenciar entre sexos que permanecieron en las plantas durante 24 horas. En mi trabajo, el análisis del primer estado ninfal se realizó a los 12dpi, basándome en el trabajo de Bonato et al. (2007) y confirmándolo mediante la infestación de plantas dirigidas exclusivamente al recuento de los individuos en cada fase estudiada. Sin embargo, Estrada-Hernández et al. (2009) encontraron la mayoría de individuos en fase de ninfa 1 a los 7dpi debido a que su trabajo se realizó a mayor temperatura, 28°C, que la empleada en el presente estudio. En mi trabajo, la temperatura era un factor limitante puesto que temperaturas a partir de 28°C provocan la pérdida de resistencia que confiere el gen *Mi-1* (Dropkin, 1969). Otra diferencia consistió en que en esta Tesis se ha empleado el biotipo Q de *B. tabaci* (también denominada Mediterranean, según la terminología de Dinsdale et al., 2010) mientras que Estrada-Hernández et al. (2009) emplearon el biotipo A (New world, según Dinsdale et al., 2010). Estudios con diferentes biotipos de moscas blancas han demostrado la capacidad de las plantas para distinguirlos y responder de modo diferente a unos u otros (van de Ven et al., 2000; Muñiz and Nombela, 2001; Nombela et

al., 2003). Pero la principal diferencia radica en el sistema de análisis y obtención de los datos. En el presente trabajo se empleó la plataforma Affymetrix mediante la que se analizaron aproximadamente 9200 transcritos implicados en diferentes procesos biológicos, mientras que Estrada-Hernández et al. (2009) utilizaron únicamente 244 genes, seleccionados por un lado mediante la hibridación substractiva de supresión (SSH) y, por otro lado, por su implicación en respuestas de resistencia a insectos y patógenos.

De los 7 genes comunes a ambas fases del desarrollo de *B. tabaci* en la interacción compatible, Mapman únicamente pudo asignar alguna función a 3 de ellos. Aunque dos de ellos están implicados en procesos de estrés fueron asignados por Mapman a la categoría miscelánea: una PR-2 (Glucan endo-1,3- β -glucosidasa) que, como se ha comentado anteriormente, ha sido identificada en otras comparaciones y, una glutatión S-transferasa que es importante para la reducción del estrés oxidativo en la planta. En el caso de la PR-2, la infestación temprana de *B. tabaci* provocó una expresión diferencial de esta proteína similar al observado en la infestación tardía (N1). En cambio, la diferencia de expresión del gen que codifica la glutatión S-transferasa disminuyó ligeramente durante la actividad de la N1. El tercer gen al que Mapman pudo asignar alguna función fue el que codifica a una enzima reductasa asociada a la síntesis de fenilpropanoides (metabolismo secundario) en células lignificantes que se vio reprimida tras la infestación por *B. tabaci* sin apenas diferencia entre la fase temprana y la fase tardía de la infestación. Entre los 4 genes que Mapman agrupó en la categoría de genes desconocidos se encontraba sobreexpresada en plantas infestadas una proteína asociada a la membrana del peroxisoma cuya función no ha sido dilucidada.

A partir de la clasificación funcional obtenida por Mapman se pudo observar las diferencias debidas a la actividad de las hembras adultas de *B. tabaci* (fase temprana) y la actividad de la N1 (fase tardía), en la interacción compatible. Mientras que los procesos representativos de la alimentación y oviposición de hembras adultas en la fase temprana de la interacción compatible tomate-Moneymaker estaban relacionados principalmente con la fotosíntesis, categoría en la que destaca la proteína Snakin-2 comentada en un apartado anterior, la actividad de N1 en dichas plantas provocó la sobreexpresión de la mayoría de genes incluidos en la categoría RNA que

incluyó diversos factores de transcripción, algunos implicados en el desarrollo vegetal y otros en procesos de estrés, como un factor de transcripción de la familia WRKY (Riechmann and Ratcliffe, 2000). La mayoría de los genes implicados en procesos de modificación de la pared celular y el metabolismo secundario se sobreexpresaron durante la alimentación de N1 y se reprimían durante la fase temprana de la infestación por *B. tabaci*. Por otro lado, en la fase tardía de la infestación se reprimieron genes de respuesta a estrés abiótico entre los que se encontraban genes que codifican a pequeñas chaperonas. Sin embargo, la actividad de hembras adultas de *B. tabaci* provocó la sobreexpresión de la chaperona Hsp70. Además, esta fase temprana de la infestación incrementó la expresión de un gen relacionado específicamente con procesos de estrés biótico, una proteína PR-1, mientras que durante la fase tardía de la infestación se vieron inducidos genes que aunque han sido relacionados con procesos de defensa, Mapman los agrupó en otras categorías, por ejemplo, el factor de transcripción de la familia WRKY, comentado anteriormente y que se incluyó en la categoría RNA.

Otra diferencia importante durante la interacción compatible entre las actividades de hembras adultas y de N1 de *B. tabaci* se observó en la represión de genes relacionados con procesos de la pared celular durante la fase temprana de la infestación, como las enzimas XTH y endo- β -1,4-D-glucanasa, mientras que otras enzimas XTH se sobreexpresaban durante la fase tardía.

Comparación de las respuestas de la planta en las 2 fases de la interacción incompatible con *B. tabaci*.

Aunque, como se ha comentado anteriormente, se han realizado otros estudios que han analizado los cambios en el transcriptoma de plantas tras la infestación con moscas blancas (McKenzie et al., 2005), algunos de ellos en tomate (Gorovits et al., 2007; Kempema et al., 2007; Estrada-Hernández et al., 2009), esta es la primera vez que se realiza un análisis de la reprogramación transcripcional que se produce en plantas de tomate portadoras del gen *Mi-1* en su interacción incompatible con *B. tabaci*.

La alimentación y oviposición de hembras adultas de *B. tabaci* (2dpi) y el establecimiento y alimentación de las N1 (12dpi) comparten apenas un 6% de todos los genes sobreexpresados y tan sólo un 11% de todos los reprimidos durante la interacción incompatible, lo que indica que las respuestas

desencadenadas en la planta de tomate resistente en estas dos fases de la infestación son radicalmente diferentes, al menos, cuantitativamente. El análisis de los procesos biológicos reveló que los grupos con mayor cantidad de genes comunes a ambas fases de la infestación (ya se tratara de genes sobreexpresados o reprimidos) fueron los incluidos en las categorías RNA, que incluye genes relacionados con la transcripción, y señalización resaltando la importancia de estos procesos durante las actividades de hembras adultas y N1 de *B. tabaci*.

En ambas fases de la infestación con *B. tabaci*, en el tomate resistente se indujeron diversas proteínas PR reguladas por SA, así como la MAPK3. La diferencia de expresión de las PRs, entre las plantas Motelle infestadas por *B. tabaci* y las plantas Motelle no infestadas, fue, en general, mayor durante la fase tardía de la infestación. En cambio, la MAPK3 se expresaba más durante la fase temprana de la infestación. El papel de esta MAPK había sido previamente demostrado en la resistencia mediada por *Mi-1* a áfidos (Li et al., 2006); nuestros resultados indican que la MAPK3 podría también desempeñar un importante papel en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*. También se vio sobreexpresado el gen *Ve* (responsable de la resistencia a ciertas cepas de *Verticillium* spp.) en ambas fases de la interacción incompatible tomate-*B. tabaci*, aunque con mayor expresión durante la actividad del primer estadio ninfal (N1). En principio, este resultado permitiría adjudicar un papel significativo a *Ve* en la resistencia *Mi-1* a *B. tabaci* o, al menos, indicar cierta conexión entre ambos genes R y las resistencias reguladas por ellos, como ya se ha descrito para el gen *Ve1* y la ruta de señalización mediada por el gen *Cf* (Fradin et al., 2009).

Por otro lado se observó que tanto la actividad de hembras adultas como de la N1 provocaron la represión de genes implicados en procesos de respuesta a estrés abiótico, principalmente chaperonas. Esta disminución de proteínas de estrés había sido previamente observada en respuesta a moscas blancas virulíferas y no virulíferas en plantas de tomate resistentes al virus TYLCV (Gorovits et al., 2007). Estos resultados parecen indicar que, aunque existen procesos comunes a ambos tipos de estrés, biótico y abiótico (Fujita et al., 2006), la actividad de las moscas blancas reprime aquellos genes específicamente relacionados con el estrés abiótico.

También en ambas fases de la interacción incompatible tomate-*B. tabaci* se vio reprimida la proteína ELI3, un tipo de proteína CAD, comentada al analizar las diferencias entre los cultivares Motelle y Moneymaker tras la infestación con esta mosca blanca y cuya expresión fue 5,79 veces menor en Motelle que en Moneymaker. Los resultados de la interacción incompatible tomate-*B. tabaci* contrastan con estudios previos en tomate en los que se observó la inducción de ELI3 tras la infección con el patógeno *P. syringae* en plantas resistentes (Thilmony and Martin, datos no publicados) así como tras la infección con nematodos en plantas portadoras del gen *Mi-1* (Bhattarai et al., 2008).

Por último, en ambas fases de la interacción incompatible del tomate con *B. tabaci* se observó la represión del gen homólogo gp91phox implicado en procesos de estrés oxidativo y que Mapman incluyó en la categoría de estrés biótico. La diferencia de expresión de este gen entre plantas infestadas y plantas no infestadas fue ligeramente superior durante la actividad de la N1 de *B. tabaci*. Como se ha comentado en un apartado anterior, la represión moderada de este gen podría ser suficiente para reducir los niveles de ROS que pueden ser perjudiciales para las plantas. Sin embargo, este gen no se vio reprimido en la interacción incompatible con nematodos (Bhattarai et al., 2008) lo que concuerda con el hecho de que en las plantas que contienen el gen *Mi-1* se produzca una respuesta hipersensible (HR) tras la infección con nematodos (Dropkin, 1969). En esta Tesis se ha podido comprobar que durante la interacción incompatible mediada por el gen *Mi-1* a la mosca blanca *B. tabaci* se reprimen genes relacionados con el estrés oxidativo y/o la respuesta hipersensible por lo que se puede esperar que, análisis complementarios en estas plantas no mostrarían signos de HR.

Otra característica observada en la interacción incompatible es que la actividad de *B. tabaci* (tanto de hembras adultas como de N1) ocasiona la sobreexpresión de genes implicados en procesos de modificación de la pared celular cuya composición puede variar tras el ataque de un organismo (Thompson and Goggin, 2006). Sin embargo, aunque en ambas fases de la infestación se encontraron genes sobreexpresados relacionados con la pared celular, existen diferencias no sólo cuantitativas (mayor número de genes se regularon diferencialmente durante la actividad de N1 que durante la alimentación y oviposición de hembras adultas) sino cualitativas. Mientras que

la actividad de las hembras adultas de *B. tabaci* indujo la expresión de xiloglucanos (XTH) y pectinesterasas que fortifican la pared celular (Thompson and Goggin, 2006), la alimentación de las N1 indujo además la expresión de genes que codifican expansinas, extensinas, proteínas inhibidoras de poligalacturonasas (PGIP) y pectato liasas, por lo que la protección debería aumentar durante esta fase posterior del desarrollo de *B. tabaci*. De entre todas estas proteínas, las PGIPs actúan directamente sobre efectores (poligalacturonasas) de hongos patógenos e insectos en judía (De Lorenzo et al., 2001) manteniendo una estrategia defensiva común frente al ataque de organismos perjudiciales diferentes. De un modo similar, estas proteínas podrían cumplir un importante papel en la resistencia del tomate, mediada por *Mi-1*, a *B. tabaci*.

Tanto la actividad de hembras adultas como de la N1 de *B. tabaci* provocaron la sobreexpresión de la enzima isoflavona reductasa aunque su expresión diferencial disminuyó ligeramente durante la fase tardía de la infestación. Esta enzima, implicada en el metabolismo secundario por su participación en la ruta de los flavonoides también aumentaba su expresión tras el ataque del insecto *Nilaparvata lugens* en plantas de arroz resistentes (Zhang et al., 2004). Sin embargo, la interacción incompatible en yuca al patógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam) provocó la represión de la enzima isoflavona reductasa (Lopez et al., 2005). Esto parece indicar que el incremento en la expresión de esta enzima podría estar relacionado con el modo de alimentación que comparten *B. tabaci* y *N. lugens*, esto es, la alimentación del floema.

La actividad de las hembras adultas de *B. tabaci* sobreexpresó la proteína phi-1. Se ha sugerido que el papel de estas proteínas, incluidas en la categoría señalización de Mapman, está relacionado con cambios en el pH intracelular que es percibido por las plantas como un indicador de estrés, por ejemplo, el estrés salino que provoca una inducción en los niveles de estas proteínas (Sano and Nagata, 2002). Esto podría indicar que existe un cierto solapamiento en las respuestas a estrés biótico y abiótico. La infestación temprana con *B. tabaci* también produjo la represión de ciertas proteínas entre las que se encuentra la proteína copina que pertenece a una familia de proteínas dependientes de calcio. Se ha sugerido que esta familia proteica

representa la ruta de transducción universal para la señalización de Ca²⁺ ya que son capaces de interactuar con diferentes proteínas diana (Tomsig et al., 2003). En la interacción incompatible con nematodos no se expresó diferencialmente esta proteína (Bhattarai et al., 2008) por lo que sólo en la interacción con *B. tabaci* parece verse afectada. Sin embargo, como se ha comentado al principio de este apartado, la señalización por Ca²⁺ se produce tras la infestación temprana con moscas blancas puesto que la expresión de las calmodulinas era aproximadamente 4 veces mayor en las plantas infestadas que en las plantas sin infestación. Por último, entre los efectos exclusivos producidos por la actividad de las hembras adultas de *B. tabaci* cabe destacar la represión de la enzima fosfolipasa PLD β 2 que está implicada, entre otros, en procesos de señalización por respuesta a estrés y hormonas (Testerink and Munnik, 2005; Wang, 2005; Bargmann and Munnik, 2006; Wang et al., 2006). Como se ha comentado en un apartado anterior, las PLD tienen patrones de expresión variados en tomate (Laxalt et al., 2001) por lo que es posible que la respuesta a *B. tabaci* varíe con respecto a otro insecto y/o patógeno.

Únicamente durante la actividad de la N1, pero no en la fase más temprana de la interacción incompatible, se detectó la sobreexpresión de proteínas CONSTANS que, como se ha comentado anteriormente en esta Discusión, al analizar en profundidad la respuesta exclusiva de la interacción incompatible durante la fase tardía de la infestación con *B. tabaci*, interacciona con el factor de transcripción TGA que regula los genes de defensa dependientes del SA (Song et al., 2008), lo que apoya los resultados obtenidos en otro estudio de esta Tesis que demostraban la participación del SA en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*. Por último, también quisiera destacar en la fase tardía de la interacción incompatible la sobreexpresión de la proteína DELLA, de los genes *Pin1* y *Pin2* y la enzima fosfatasa ácida, ligada a *Mi*. Todas han sido descritas ampliamente en el apartado de “Establecimiento y alimentación de la fase móvil N1 de *B. tabaci* (12dpi)”.

Efecto del tratamiento con BTH sobre el transcriptoma de tomate carente del gen *Mi-1*. Efecto de una posterior infestación con *B. tabaci* sobre las diferencias entre plantas tratadas y no tratadas con BTH.

El tratamiento de plantas de tomate MoneyMaker (no portadoras del gen *Mi-1*) con un análogo del SA (BTH) provocó una gran reprogramación transcripcional en estas plantas, detectándose 1280 genes diferencialmente expresados, de los cuales 502 genes se sobreexpresaban y 778 se reprimían en las plantas tratadas en relación a las plantas no tratadas. Uno de los grupos más importantes fue el de RNA que incluía factores de transcripción, sobreexpresados y reprimidos, entre los que destacan los de la familia WRKY que desarrollan un importante papel en la reprogramación transcripcional asociada con la respuesta a estrés en la planta (Eulgem et al., 2000; Bhattarai et al., 2008; Bhattarai et al., 2010; Huang et al., 2012). Tal y como se había observado anteriormente en esta Tesis, los factores de transcripción WRKY también parecen cumplir un papel relevante en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* a *B. tabaci*, ya que también se sobreexpresaban en la interacción incompatible durante ambas fases de la infestación.

Las proteínas phi-1 y phi-2 también se encontraron sobreexpresadas en las plantas MoneyMaker (tratadas con BTH, respecto a las plantas no tratadas). Se ha sugerido que el papel de estas proteínas está relacionado con cambios en el pH intracelular que es percibido por las plantas como un indicador de estrés, por ejemplo, el estrés salino que provoca una inducción en los niveles de estas proteínas (Sano and Nagata, 2002).

Como era de esperar, el tratamiento con BTH provocó, además, la sobreexpresión de numerosos genes que codifican proteínas PR asociadas a SA así como MAPKs, calmodulina y la proteína CIP2a (CONSTANS interacting protein 2a) aunque se reprimieron otras proteínas CONSTANS. Esta inducción de defensas asociadas a SA también había sido observada anteriormente en interacciones planta-patógeno/insecto (revisado en Kaloshian and Walling, 2005). Por ejemplo, mediante la sobreexpresión de la proteína PR-2 (β -1,3-glucanasa) tras el ataque de áfidos (Martínez de Ilarduya et al., 2003), así como tras la infestación con *B. tabaci* de plantas susceptibles y resistentes (resultados presentados en esta Tesis). El tratamiento con BTH también provocó un incremento en los niveles de expresión del gen P4, marcador de la respuesta SAR (resistencia sistémica adquirida). Este resultado concuerda con estudios previos (Fidantsef et al., 1999; Herman et al., 2007) realizados con dos análogos del SA: BTH y ASM (Acibenzolar-S-methyl; derivado del BTH).

Por otro lado, el tratamiento de plantas Moneymaker con BTH provocó la represión de genes que han sido relacionados con el estrés por herida, Pin1 y win, asociados al JA. Un efecto similar había sido observado por otros autores en plantas de tomate tratadas con SA o BTH (Doares et al., 1995; Doherty et al., 1988; Fidantsef et al., 1999) lo que les permitió afirmar que la aplicación exógena de SA, o de su análogo, reprime las defensas dependientes de JA estableciéndose una relación antagonista entre ambas rutas. El tratamiento con BTH no sólo provoca una relación antagonista entre el SA y el JA sino también entre el SA y las auxinas, reprimiendo genes dependientes de estas últimas hormonas, hecho que había sido observado previamente en *Arabidopsis* (Wang et al., 2006). También se había comprobado que el desarrollo ninfal de moscas blancas sufría un retraso en plantas de *Arabidopsis* con altos niveles de JA, sugiriendo que son las defensas dependientes de JA, y no de SA, las responsables de este fenómeno (Zarate et al., 2007). Sin embargo, si el tratamiento del tomate con BTH reprime los genes asociados al JA, los mecanismos responsables del retraso en el desarrollo de moscas blancas en plantas tratadas con BTH (Nombela et al., 2005) deben ser otros diferentes al JA.

Cabe destacar que el tratamiento con BTH de plantas de tomate Moneymaker indujo un aumento de la expresión del gen *Ve1*, incluido en la categoría de estrés biótico, que confiere resistencia a algunas cepas del género *Verticillium* y cuya sobreexpresión había sido detectada también durante la interacción incompatible mediada por el gen *Mi-1*, según se ha presentado anteriormente. Parece que el nivel de expresión del gen *Ve1* se incrementa al activarse las respuestas defensivas reguladas por el SA en la planta por la infección del patógeno *Verticillium* (Fradin et al., 2009). En esta Tesis se ha demostrado que esa misma relación entre el gen *Ve1* y las defensas reguladas por el SA también se produce durante la interacción incompatible con *B. tabaci* mediada por el gen *Mi-1* (ya que la infestación de este insecto también provocaba un gran aumento en los niveles de SA en plantas portadoras de *Mi-1*) o, en ausencia de dicho gen, por la aplicación exógena de BTH.

Entre los genes reprimidos tras el tratamiento con BTH se encontraron el gen homólogo *gp91phox*, implicado en procesos de estrés oxidativo y necesario para la acumulación de ROS (Sagi et al., 2004), y el que codifica la proteína

ELI3, un tipo de proteína CAD (Logemann et al., 1997), implicada en la ruta de los fenilpropanoides (metabolismo secundario). No hemos encontrado en la literatura otros trabajos en los que se haya analizado la expresión de ninguno de estos dos genes tras tratar las plantas con BTH, por lo que no podemos asegurar que esta represión se produzca de forma generalizada en otras especies vegetales e incluso en otros cultivares de tomate. Sin embargo, en el análisis transcriptómico de la resistencia mediada por *Mi-1* sí se pudo observar que gp91phox y ELI3 también se reprimieron en la interacción incompatible tomate-*B. tabaci*, tanto durante la fase temprana como tardía de la infestación, y esos resultados ya se han discutido ampliamente con los de otros autores en el apartado correspondiente. En este punto habría que resaltar que estos genes se reprimieron más por el tratamiento con BTH que por la resistencia de *Mi-1*, tanto durante la actividad de hembras adultas como de la primera fase ninfal de *B. tabaci*. Esto parece indicar que el tratamiento con BTH provoca una mayor represión de ambos genes que la resistencia mediada por *Mi-1*.

La mayoría de los genes involucrados en procesos fotosintéticos reprimían su expresión tras el tratamiento con BTH, en un rango entre 2 y 9 veces más reprimido en las plantas tratadas que en las plantas sin tratamiento. Entre estos genes destaca el que codifica a la enzima Rubisco ya que se encontró 180,57 veces más reprimida en plantas tratadas con BTH que en plantas no tratadas. La actividad de esta enzima da lugar a glicolato en el cloroplasto que es translocado al peroxisoma donde, tras su oxidación, se produce la mayor parte de H₂O₂ durante la fotosíntesis (revisado en Apel and Hirt, 2004). La represión de genes implicados en procesos fotosintéticos había sido observado anteriormente en respuesta a otros insectos (Heidel and Balwin, 2004; Kaloshian and Walling, 2005). No obstante, uno de los genes incluidos en esta categoría, Snakin-2, se sobreexpresaba tras el tratamiento con BTH. Este gen está implicado en la defensa basal a patógenos en algunas solanáceas (Berrocal-Lobo et al., 2002; Balaji et al., 2011) y en la interacción incompatible en *Cicer arietinum* a *Ascochyta rabiei* (Coram and Pang, 2005). Este gen no se vio diferencialmente expresado en la interacción incompatible mediada por *Mi-1* durante la fase temprana de la infestación con *B. tabaci*.

Curiosamente, uno de los procesos biológicos que incluyó un mayor número de genes reprimidos por el tratamiento con BTH fue el relacionado con la pared celular. Entre estos genes se encontraron varias enzimas XTH, una pectato liasa, una PGIP, una expansina y una celulosa sintasa. El tratamiento con BTH reprime la expresión de genes implicados en procesos de modificación de la pared celular posiblemente porque activa otros mecanismos que son suficientes como defensa frente a una posterior infestación.

En conjunto, todo lo anterior indica que, como se había comentado al inicio de este apartado de la Discusión, la aplicación exógena de BTH provoca una gran reprogramación transcripcional en plantas de tomate susceptibles. La infestación posterior de esas plantas con hembras adultas de *B. tabaci* altera ligeramente las diferencias debidas al tratamiento ya que, tras la infestación, un 66% de los genes sobreexpresados en las plantas con BTH y un 83% de los reprimidos eran los mismos genes que ya diferenciaban a las plantas tratadas y no tratadas, en ausencia de infestación. Tanto antes como después de la infestación, en las plantas tratadas con BTH se sobreexpresaron factores de transcripción WRKY, calmodulinas, la proteína CIP2a (CONSTANS interacting protein 2a), la proteína phi-1 y el gen Ve1 que han sido descritos en los primeros párrafos de este apartado. Entre los genes reprimidos por el BTH, comunes a plantas con y sin infestar con *B. tabaci*, cabe destacar la proteína ELI3 y el gen gp91phox, pequeñas chaperonas, algunas proteínas CONSTANS, todos ellos descritos en apartados anteriores. Además, genes relacionados con la ruta del JA como Pin1 y FAD3. De forma general parece que en la reprogramación transcripcional que sufren las plantas MoneyMaker por el tratamiento con BTH, la sobreexpresión inicial de genes relacionados con la ruta del SA y la represión de genes asociados a la ruta del JA, que se había demostrado previamente en otros estudios realizados en tomate (Doares et al., 1995; Doherty et al., 1988; Fidantsef et al., 1999), no se alteran significativamente por causa de una infestación posterior con *B. tabaci*. Por otro lado, algunos genes que se sobreexpresaron o reprimieron por el tratamiento con BTH (independientemente de la infestación con *B. tabaci*) también lo hacían durante la interacción incompatible mediada por *Mi-1*, como, por ejemplo, los genes Ve1, gp91phox relacionados con estrés biótico y ELI3 implicada en el metabolismo secundario de flavonoides. Sin embargo, cabe destacar que mientras la expresión relativa del gen Ve1 fue similar en la

interacción incompatible mediada por *Mi-1* y en la comparación entre plantas tratadas con BTH frente a las no tratadas (con y sin infestación), la proteína ELI3 y el gen *gp91phox* presentaron una diferencia de expresión relativa mayor en la comparación entre plantas tratadas con BTH frente a plantas sin tratar que en la interacción incompatible mediada por *Mi-1* durante la infestación temprana.

La diferencia más importante que provoca la infestación por *B. tabaci* sobre el efecto del BTH es la sobreexpresión del gen *Wfi* (Whitefly-induced) incluido en la categoría de estrés biótico, que no se producía en las plantas tratadas con BTH pero no infestadas. Este gen fue descrito por primera vez por otros autores tras la infestación de tomate con 250 adultos de *B. tabaci* que mantuvieron en las plantas durante 7 días consecutivos (Puthoff and Walling, comunicación personal). El gen *Wfi* es un gen *Rboh* (plant respiratory burst oxidative homologs) homólogo a *gp91phox* (NADPH oxidasa), este último comentado en detalle en la interacción incompatible durante la fase temprana de la infestación con *B. tabaci*. Curiosamente, a pesar de que el gen *Wfi* era uno de los 244 genes pre-seleccionados por Estrada-Hernández et al. (2009) no se detectó expresión diferencial del mismo ni en la interacción compatible estudiada en ese trabajo, ni en la compatible ni la incompatible presentada en esta Tesis. Es posible que la expresión de este gen requiera de una gran activación de las defensas dependientes de SA, como la que se produce por el tratamiento previo con BTH, para que la posterior actividad de *B. tabaci* sea detectada. En ausencia de BTH, la infestación por *B. tabaci* debería ser masiva y prolongada en el tiempo para que se detecte la sobreexpresión del gen *Wfi*. Sin embargo, no se puede establecer una hipótesis clara debido a que se desconocen los detalles de la metodología empleada por Puthoff and Walling para la identificación de este gen por lo que sería necesario investigar en detalle el comportamiento de este gen.

Aunque la diferencia más importante entre el efecto por el tratamiento con BTH en ausencia de infestación y tras la infestación era la sobreexpresión del gen *Wfi*, no fue la única. Entre el grupo de genes sobreexpresados en las plantas tratadas con BTH únicamente tras la infestación con *B. tabaci* se encontraron varias histonas, incluidas en la categoría DNA de Mapman, cuya inducción ha sido relacionada con la acción de giberelinas (van den Heuvel et

al., 1999). Por el contrario, los genes implicados en la síntesis de giberelinas se encontraron reprimidos, por lo que es posible que la inducción de estas histonas sea debida a la mayor actividad de la ruta del SA ocasionada por el tratamiento con BTH y no a la relación con las giberelinas demostrada por van den Heuvel et al. (1999).

Teniendo únicamente en cuenta los genes que se expresaron exclusivamente tras la infestación de *B. tabaci* sobre el efecto por el tratamiento con BTH se observó que se expresaron diferencialmente un mayor número de genes, agrupados por Mapman en la categoría de estrés (biótico y abiótico), que el efecto del tratamiento en ausencia de infestación. Sin embargo, existen algunas semejanzas ya que en ambos casos se sobreexpresaron PRs relacionadas con el estrés biótico y se reprimieron otros genes relacionados específicamente con el estrés abiótico. Respecto a la categoría pared celular, existen diferencias debidas a la infestación. Como se comentó en este mismo apartado, el efecto por el tratamiento con BTH provocó la represión de la gran mayoría de genes relacionados con procesos de la pared celular. Sin embargo, al observar los genes que se agruparon en esta categoría, exclusivamente tras la infestación, se observó que se sobreexpresaban más genes que se reprimían. Entre los genes que se sobreexpresaron exclusivamente por la actividad de las hembras adultas de *B. tabaci* se encontró una poligalacturonasa (PGIP). Estas enzimas también se encontraron sobreexpresadas durante la interacción incompatible mediada por *Mi-1* pero no se expresaron diferencialmente durante la interacción compatible con *B. tabaci*.

El tratamiento con BTH, en ausencia de infestación, aumentó la expresión de una proteína implicada en procesos de señalización cuyo análisis de secuencia mostró una alta homología con la MAPK4. Esta MAPK4, en cambio, se vio reprimida durante la fase temprana de la infestación en la interacción incompatible mediada por *Mi-1* mientras que, en esa misma interacción, se sobreexpresaba la MAPK3, cuya participación en la resistencia de *Mi-1* a áfidos ha sido demostrada (Li et al., 2006).

Aunque se ha demostrado que el pre-tratamiento con BTH en plantas de tomate induce resistencia a *B. tabaci* (Nombela et al., 2005), los mecanismos que desarrollan este tipo de resistencia inducida no están claros. El

tratamiento con BTH induce la expresión de genes implicados en la ruta de señalización por SA pero no aumenta los niveles de esta hormona; por otro lado, reprime los genes asociados al JA y, además, reprime genes relacionados con la modificación de la pared celular. Todo esto implica que, la resistencia inducida por BTH se debe a la activación de otras defensas/rutas que aseguran la protección de la planta frente a la invasión de *B. tabaci*.

Comparación del efecto del tratamiento con BTH con el efecto de la infestación con *B. tabaci*, ambos sobre plantas carentes del gen *Mi-1*.

Heidel and Balwin (2004) realizaron un estudio para comparar las respuestas provocadas por diferentes herbívoros y así determinar el papel de las hormonas SA y JA en las respuestas transcripcionales inducidas por estos herbívoros. Este trabajo, realizado en plantas de tabaco, *Nicotiana attenuata*, mostró que la respuesta desencadenada por el tratamiento con BTH se asemejaba a la provocada por la infestación del áfido *M. nicotianae*.

En el presente estudio, aunque parece que hay algunos cambios transcripcionales comunes al efecto por el tratamiento con BTH y al debido a la infestación por *B. tabaci*, existe, entre ambos efectos, una gran diferencia a nivel cuantitativo y cualitativo. La aplicación exógena del BTH provocó la expresión diferencial de 1280 transcritos mientras que, la alimentación y oviposición de hembras adultas de *B. tabaci* había afectado únicamente a la expresión de 79 transcritos. De todos ellos, sólo 18 transcritos sobreexpresados y 31 reprimidos correspondían a genes comunes a los dos procesos comparados. Esos 18 genes sobreexpresados comunes representaban menos del 4% de los 502 genes sobreexpresados por el tratamiento con BTH en las plantas sin infestar y el 56% de los 32 sobreexpresados en la interacción compatible durante la fase temprana de la infestación por *B. tabaci* en las plantas sin tratamiento. En el caso de los genes reprimidos, este porcentaje de genes comunes a ambos procesos era ligeramente mayor: 31 genes que representaban el 4% de los 778 genes reprimidos por el tratamiento con BTH y el 66% de los 47 genes reprimidos por el ataque de *B. tabaci*.

La mayoría de los 18 genes sobreexpresados comunes eran genes que codifican proteínas desconocidas. De los genes restantes, cabe destacar el gen *Snakin-2*, agrupado en la categoría de fotosíntesis, cuyo papel en la defensa

basal a patógenos en tomate y patata ha sido demostrado en otros trabajos (Berrocal-Lobo et al., 2002; Balaji et al., 2011). Tanto el tratamiento con BTH como la actividad de hembras adultas, en plantas de tomate que no contienen el gen *Mi-1*, provocan una respuesta similar en relación a la expresión del gen *Snakin-2*, aunque la expresión diferencial de este gen fue ligeramente superior en la interacción compatible a la observada por el efecto del tratamiento con BTH. Sin embargo, esta es la única semejanza ya que, mientras el tratamiento con BTH reprime la expresión de la mayoría de genes que Mapman agrupó en la categoría fotosíntesis, en la interacción compatible con *B. tabaci* se sobreexpresaron más genes que se reprimieron.

También cabe resaltar, entre los genes comunes sobreexpresados, uno que codificaba una PR relacionada con procesos de estrés biótico, con una expresión diferencial similar en ambas comparaciones, y una enzima peroxidasa que, como se ha comentado en esta Discusión, son importantes para la reducción en la acumulación de ROS. Aunque se ha identificado la participación de estos genes en procesos de respuesta a estrés, Mapman los agrupó en la categoría miscelánea.

Entre los 31 genes reprimidos comunes al efecto del tratamiento con BTH y de la infestación por *B. tabaci* se encontró que una gran cantidad de ellos no codifican proteínas conocidas. De los que se pudo obtener alguna información, destaca la represión de la enzima fosfolipasa PLD β 2 que está implicada, entre otros, en procesos de señalización por respuesta a estrés y hormonas (Testerink and Munnik, 2005; Wang, 2005; Bargmann and Munnik, 2006; Wang et al., 2006) y que Mapman asignó a la categoría de metabolismo de lípidos. La expresión diferencial del gen que codifica esta enzima fue ligeramente superior por efecto del tratamiento con BTH que por la infestación de *B. tabaci*. También se reprimía, de forma similar en ambas comparaciones, una proteína de respuesta hipersensible (HRAP) cuya represión ya había sido detectada en la interacción compatible con otro cultivar susceptible de tomate diferente a Moneymaker (Estrada-Hernández et al., 2009). La represión de HRAP en Moneymaker contribuye a demostrar que no se produce HR en la interacción compatible de este cultivar de tomate con moscas blancas, como ya se había demostrado también en Arabidopsis (Kempema et al., 2007). Por último, se encontró reprimida, en ambas comparaciones, una enzima

relacionada con procesos de la pared celular pero a la que Mapman no pudo asignar a ninguna categoría conocida, una endo- β -1,4-D-glucanasa cuya expresión diferencial fue ligeramente superior por el efecto del tratamiento con BTH que por la actividad de las hembras adultas de *B. tabaci*.

La activación de respuestas dependientes de la ruta del SA es cuantitativamente mayor tras la aplicación del BTH en las plantas Moneymaker no infestadas que tras la infestación por *B. tabaci* en plantas no tratadas del mismo cultivar. Además, el efecto por el tratamiento con BTH provoca en el tomate Moneymaker una relación antagónica entre las rutas del SA y JA que no se producía en la interacción compatible de éste con *B. tabaci*. Esta relación antagónica, debida al efecto del BTH, ya había sido documentada anteriormente también en plantas de tomate (Doares et al., 1995; Doherty et al., 1988; Fidantsef et al., 1999) indicando que la aplicación exógena de este análogo del SA reprime las defensas dependientes de JA y activa las reguladas por SA. Este tipo de relación entre ambas rutas ha sido también sugerida más recientemente en la interacción compatible de moscas blancas con *Arabidopsis* (Kempema et al., 2007) y con tomate (Puthoff et al., 2010). Sin embargo, en la interacción compatible Moneymaker-*B. tabaci* estudiada en el presente trabajo no se detectó expresión diferencial de genes asociados a JA, ni tampoco en un trabajo previo de otros autores con otro cultivar de tomate susceptible (Estrada-Hernández et al., 2009) no pudiendo establecerse ninguna relación entre ambas rutas.

El tratamiento con BTH provocó, en las plantas de tomate empleadas en esta Tesis, otros cambios en la reprogramación transcripcional similares a los desencadenados por el ataque de ciertos patógenos e insectos (Thompson and Goggin, 2006), como la represión de genes implicados en procesos fotosintéticos (Heidel and Balwin, 2004; Kaloshian and Walling, 2005). Sin embargo, en la interacción compatible con *B. tabaci* presentada en esta Tesis no se obtuvo una represión evidente de genes implicados en este tipo de procesos.

Comparación de los transcriptomas de plantas tratadas con BTH y de plantas portadoras del gen *Mi-1*, en ausencia de infestación.

Para conocer las diferencias entre la resistencia inducida por BTH y la resistencia congénita debida a la presencia del gen *Mi-1* se comparó el

transcriptoma de plantas susceptibles Moneymaker pero tratadas con BTH con el transcriptoma de plantas Motelle que contienen el gen *Mi-1* (todas en ausencia de infestación), obteniéndose 1241 genes diferencialmente expresados. De entre todos estos genes, 572 se expresaban más en las plantas tratadas con BTH que en las portadoras del gen *Mi-1*, destacando la presencia del gen *Wfi* (whitefly-induced), descrito anteriormente. La expresión de este gen se indujo 7 veces más en las plantas Moneymaker tratadas con BTH que en las plantas Motelle. Cuando se habían comparado inicialmente plantas Moneymaker y Motelle (todas en ausencia de tratamiento con BTH y de infestación) no se obtuvo expresión diferencial del gen *Wfi*. Se hace complicado extraer unas conclusiones claras acerca del comportamiento de este gen puesto que, después de su identificación por Puthoff and Walling, cuyos resultados no han sido todavía publicados, esta es, hasta nuestro conocimiento, la primera vez que se detecta mediante análisis de microarrays. La falta de trabajos que hayan identificado una expresión diferencial de este gen dificulta el avance en el conocimiento del mismo.

Otro gen más expresado en plantas Moneymaker tratadas con BTH que en plantas Motelle es el gen *Ve* (*Verticillium*) que, como se vio anteriormente, también se expresaba más en plantas Motelle infestadas que en las mismas plantas no infestadas (interacción incompatible mediada por *Mi-1*). Además de este gen *Ve*, también se expresaron más en las plantas Moneymaker tratadas con BTH (por comparación con plantas Motelle) otros genes relacionados con procesos defensivos, entre los que destacaron los factores de transcripción de la familia WRKY, MAPKs, calmodulina, proteína CONSTANS, proteína phi, la enzima PAL y proteínas PR asociadas a SA. Todos ellos han sido comentados a lo largo de esta Discusión, principalmente en el apartado de la interacción incompatible mediada por *Mi-1*.

También se expresaron más en plantas Moneymaker tratadas con BTH que en Motelle las proteínas DELLA, cuya represión en Motelle había sido detectada previamente en la comparación entre ambos cultivares (en ausencia de tratamiento, con y sin infestación por *B. tabaci*). En la comparación entre Motelle y Moneymaker (sin tratamiento ni infestación) se observó que las DELLAs se reprimían 9,62 veces más en Motelle que en Moneymaker. Por otro lado, estas proteínas disminuyeron ligeramente su expresión diferencial

reprimiéndose 8,11 veces más en Motelle que en plantas Moneymaker tratadas con BTH. En cambio, cuando se compararon ambos cultivares infestados, la expresión diferencial de las DELLAs disminuyó considerablemente reprimiéndose sólo 5,74 veces menos en plantas Motelle infestadas que en plantas Moneymaker tras la infestación. Parece evidente que la expresión de estas proteínas depende de la infestación con *B. tabaci* y muy ligeramente del tratamiento con BTH, a pesar de que este tratamiento provoca una mayor reprogramación transcripcional en plantas carentes del gen *Mi-1* que *B. tabaci* en plantas que sí contienen este gen.

Como se ha comentado anteriormente, el tratamiento con BTH en plantas carentes del gen *Mi-1* ocasionó una represión de genes asociados al JA, como los genes Pin y la enzima FAD3. Estos genes también se expresaron menos en las plantas Moneymaker tratadas con BTH que en las plantas Motelle. Es evidente que el tratamiento con BTH provoca una comunicación antagonista que ya había sido observada previamente por otros autores en plantas de tomate Moneymaker (Doherty et al., 1988) y en otros cultivares de la misma especie (Doares et al., 1995; Fidantsef et al., 1999).

La proteína ELI3 se expresaba 5,65 veces menos en las plantas Moneymaker tratadas con BTH que en las plantas Motelle. Cuando se comparó el efecto que provocaba el tratamiento con BTH (plantas Moneymaker tratadas frente a plantas no tratadas) se observaba que en las plantas Moneymaker tratadas con BTH la proteína ELI3 se expresaban 9,68 veces menos que en las plantas del mismo cultivar sin tratar. Sin embargo, cuando se compararon ambos cultivares (sin tratar) no se obtuvo expresión diferencial de esta proteína. En cambio, al infestar ambos cultivares con *B. tabaci* se encontró que ELI3 se expresaba 5,79 veces menos en Motelle que en Moneymaker. Comparando estos resultados entre sí no queda duda sobre el efecto represor del BTH en este tipo de proteínas. Esta represión podría ir relacionada con el hecho de que ELI3 está implicada en el metabolismo secundario de flavonoides y, basándonos en la clasificación obtenida por Mapman, se pudo comprobar que la mayoría de los genes relacionados con el metabolismo secundario se reprimían en plantas que habían sido tratadas con BTH.

También se observó que ciertos genes relacionados con procesos fotosintéticos presentaban una menor expresión en las plantas Moneymaker tratadas con BTH que en plantas Motelle no tratadas. Este hecho ya se ha descrito anteriormente por el efecto del BTH en plantas carentes del gen *Mi-1* en ausencia de infestación. Estos resultados concuerdan con estudios previos (Voelckel and Baldwin, 2003; Heidel and Balwin, 2004) en los que se observó que el tratamiento con este análogo del SA provocaba la represión de genes fotosintéticos.

Expresión génica en la resistencia inducida por BTH y comparación con la interacción compatible y con la resistencia mediada por *Mi-1*.

El pre-tratamiento con BTH ha dado lugar, en algunos trabajos, a resultados negativos o poco concluyentes en la inducción de resistencia a insectos herbívoros distintos de *B. tabaci* (revisado en Moran et al., 2002; Cooper et al., 2004; Li et al., 2006; Boughton et al., 2006; Thompson and Goggin, 2006). Sin embargo, el efecto del BTH como inductor de resistencia a *B. tabaci* fue demostrado previamente en tomate carente del gen *Mi-1* (Nombela et al., 2005). Aparentemente, en este sistema de resistencia inducida, la infestación por *B. tabaci* de las plantas tratadas con BTH parece provocar muy pocos cambios transcripcionales, puesto que únicamente se encontraron 3 genes diferencialmente expresados con respecto a otras plantas tratadas pero no infestadas por el insecto. Sin embargo, no parece muy lógico que en una interacción tan compleja se produzca una reprogramación transcripcional tan limitada, especialmente cuando se han obtenido resultados muy diferentes tras la infestación con *B. tabaci* de las plantas no tratadas con BTH, tanto si eran resistentes como susceptibles (348 y 79, respectivamente). Quizá la explicación se halle en que, como se ha comentado anteriormente en otro apartado de esta Discusión, el tratamiento con BTH previo a la infestación por el insecto, provoca en el tomate Moneymaker una gran reprogramación transcripcional (1280 genes diferenciales), y ésto enmascararía las diferencias de expresión de muchos genes entre plantas infestadas y no infestadas.

De los 3 genes diferenciales identificados en la interacción incompatible inducida por BTH, sólo uno se sobreexpresaba con un valor 1,92 veces más alto tras la infestación por *B. tabaci* de las plantas pre-tratadas que antes de

dicha infestación. Se corresponde con una proteína ZIP transportadora (Guerinot, 2000). Algunos trabajos han asociado esta proteína con procesos de resistencia (Haydon and Cobbett, 2007). No obstante, en la interacción compatible Arabidopsis-moscas blancas este gen se reprimió 1,95 veces (Kempema et al., 2007).

De los dos genes reprimidos por *B. tabaci* en las plantas pre-tratadas con BTH, sólo para uno pudo establecerse su relación con algún proceso biológico. Se trata de una proteína inhibidora de las endoglucanasas específicas de xiloglucano (XEGIP), que fue la primera proteína descrita con función inhibidora de endoglucanasas (Qin et al., 2003). XEGIP representa un tipo de proteínas vegetales que inhiben las enzimas patogénicas que degradan las paredes celulares vegetales. Esta proteína actúa uniéndose a la endoglucanasa del patógeno formando un complejo, aunque la base molecular de esta interacción no está clara. Se ha observado una elevada expresión de XEGIP y proteínas relacionadas tras el ataque de patógenos, herida o estrés abiótico, sugiriendo un papel para XEGIP en la protección de la planta frente al estrés biótico y abiótico (Qin et al., 2003; Choi et al., 2013). Sin embargo, entre los 1280 genes cuya expresión fue diferencialmente inducida por el tratamiento con BTH, no estaba incluido el gen que codifica esta proteína XEGIP, así como tampoco se le detectó en las interacciones compatible e incompatible durante la fase temprana de la infestación con moscas blancas presentadas en los apartados previos. Estos resultados en su conjunto sugieren que la proteína XEGIP no parece tener un papel muy destacado en la defensa frente a *B. tabaci*. No obstante, durante la fase tardía de la interacción compatible y de la incompatible mediada por *Mi-1*, también se encontró reprimida esta proteína.

Como se ha comentado al principio de este apartado, en la interacción incompatible inducida por BTH tan sólo destacaron 3 genes diferencialmente expresados. Ninguno de esos 3 transcritos obtenidos tras la infestación de *B. tabaci* sobre plantas pre-tratadas con BTH, respecto a otras plantas tratadas pero no infestadas por el insecto, se había expresado diferencialmente en la interacción compatible ni la incompatible mediada por *Mi-1* durante la fase temprana de la infestación con *B. tabaci*. Sin embargo, al comparar esos 3 transcritos con la actividad de la N1 de *B. tabaci* (fase tardía de la infestación) se encontró que la proteína XEGIP también se reprimía tanto en la interacción

compatible como en la incompatible. Puede que la expresión de este gen sólo pueda verse alterada por la actividad de las N1 de *B. tabaci* o por la acción combinada del tratamiento con BTH en plantas infestadas con hembras adultas y, por eso, la actividad de hembras adultas o el tratamiento con BTH, por sí solos, no sea suficiente para provocar una expresión diferencial de este gen. En el caso de los otros dos genes sucede algo similar, sólo la acción combinada del tratamiento con BTH y la infestación por *B. tabaci* permite la detección de estos genes. No existe, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, ningún estudio que haya analizado la reprogramación transcripcional en plantas susceptibles tratadas con BTH y posteriormente atacadas por insectos y/o patógenos. Dado el potencial inductor de resistencia del BTH parece interesante seguir investigando en esta línea para conocer más en profundidad los mecanismos por los que las plantas de tomate activan sus rutas de defensa y cómo esa activación las protege frente al ataque de plagas como *B. tabaci*.

CONSIDERACIONES FINALES

Consideraciones Finales.

Los resultados presentados en esta Tesis contribuyen a ampliar el conocimiento sobre la resistencia mediada por el gen *Mi-1* en el tomate a la mosca blanca *Bemisia tabaci*, que fue descrita previamente por nuestro grupo. Para la realización de esta Tesis se plantearon unos objetivos que cubrían diferentes aspectos de la resistencia con el fin de entender mejor los mecanismos que la regulan. Esta Tesis, no sólo aporta más información sobre la resistencia de *Mi-1* a *B. tabaci*, sino que además, establece algunas semejanzas y disimilitudes con la resistencia mediada por este gen a áfidos y/o nematodos:

Por un lado, se ha confirmado que la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci* está regulada por el grado desarrollo de la planta, tal y como se había demostrado previamente con áfidos. Sin embargo, la resistencia de *Mi-1* a nematodos no está regulada por el desarrollo de la planta, siendo ésta efectiva desde la germinación de la plántula. El análisis de la reprogramación transcripcional de la interacción incompatible mediada por *Mi-1* a *B. tabaci* confirmó que, tal y como se había descrito anteriormente en otros trabajos, la expresión del gen *Mi-1* es constante, no viéndose diferencialmente regulado tras la infestación con hembras adultas ni con el primer estadio ninfal de *B. tabaci*.

Por otro lado, se ha determinado que la resistencia mediada por *Mi-1* a moscas blancas requiere la participación de la ruta del ácido salicílico y de la chaperona HSP90, que también cumplen un importante papel en la resistencia mediada por este gen a áfidos y nematodos. El estudio del transcriptoma de plantas de tomate que contienen el gen *Mi-1* ha permitido confirmar el papel del ácido salicílico (SA) en la resistencia mediada por *Mi-1* a moscas blancas al inducirse diversos genes relacionados con esta ruta tras la infestación con *B. tabaci*. Además, este análisis corroboró que la expresión del gen *Hsp90* es constante, ya que no se regula diferencialmente en ninguna de las interacciones tomate-*B. tabaci* analizadas.

Otro punto en común a moscas blancas y áfidos es la inducción de genes relacionados con la ruta del SA y la del ácido jasmónico (JA), indicando que, en la interacción incompatible en tomate mediada por *Mi-1* a estos insectos, no existe relación antagonista entre ambas rutas. Este antagonismo tampoco se observó en la interacción compatible. En cambio, la reprogramación transcripcional provocada por el tratamiento con BTH de plantas de tomate susceptibles ratificó el antagonismo entre las rutas del SA y del JA, que había sido descrito por otros autores tras el tratamiento con este análogo del SA.

Existen diferencias entre moscas blancas y áfidos. Mientras que el SA no cumple ningún papel relevante en la defensa basal en tomate frente a moscas blancas, se sabe que esta hormona participa en la defensa frente a áfidos. Curiosamente, durante la interacción compatible con *B. tabaci* se indujeron algunas proteínas PR dependientes del SA pero, quizás, se requiere una mayor activación de esta ruta para desencadenar una defensa basal frente a moscas blancas.

Finalmente conviene comentar que la infestación por *B. tabaci* provoca una mayor regulación diferencial de genes en la interacción incompatible, mediada por *Mi-1*, que en la compatible, como ocurría también en la infección con nematodos. No obstante, mientras que la respuesta desencadenada por nematodos es similar en plantas susceptibles y resistentes, la infestación por *B. tabaci* difirió muy notablemente entre las plantas que contenían el gen *Mi-1* y las que no lo contenían. Desgraciadamente, no se pueden comparar los resultados obtenidos tras el ataque de *B. tabaci* y nematodos con los de áfidos puesto que, hasta el momento, no se ha publicado ningún trabajo en el que se haya analizado la reprogramación transcripcional de plantas de tomate que contienen el gen *Mi-1* tras la infestación con estos insectos.

Una vez alcanzados los objetivos planteados en esta Tesis, se abren nuevas vías de investigación como el papel que otras hormonas o algunos genes diferencialmente expresados durante la reprogramación transcripcional estudiada en esta Tesis puedan cumplir en la resistencia de *Mi-1* a *B. tabaci*.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La resistencia mediada por el gen *Mi-1* del tomate a *B. tabaci* está regulada por el grado de desarrollo de la planta, incluyendo en este término tanto la edad como el tamaño de la misma.
2. La edad de la planta de tomate tiene más influencia que el tamaño de la misma en la resistencia *Mi-1* a *B. tabaci*, cuya mayor efectividad se alcanza en plantas de 8 semanas de edad.
3. La fecundidad de *B. tabaci* se reduce a medida que aumentan la edad y el tamaño de las plantas portadoras del gen *Mi-1*. La supervivencia de los huevos también disminuye al aumentar la edad y el tamaño de las plantas resistentes. Por otro lado, el crecimiento poblacional de *B. tabaci*, tomando como referencia la tasa intrínseca de crecimiento, se ve limitado a medida que avanza el desarrollo normal de las plantas de tomate que contienen el gen *Mi-1*, tanto por la edad como por el tamaño de las mismas.
4. El ácido salicílico (SA) es un componente importante en la resistencia mediada por el gen *Mi-1* del tomate a *B. tabaci*. En cambio, la defensa basal a este insecto en tomate susceptible no depende del contenido en SA de sus hojas, si bien éste podría afectar ligeramente al desarrollo y la supervivencia del insecto.
5. La eficacia del gen *NahG* para degradar el ácido salicílico a catecol, ya demostrada en plantas más jóvenes de tomate, permanece intacta a las 8 semanas de edad de la planta.
6. La actividad (alimentación y oviposición) de las hembras adultas de *B. tabaci* causó una apreciable acumulación de ácidos salicílico y jasmónico (JA) a los 2 días de la infestación, mucho más acusada en las plantas resistentes VFN portadoras del gen *Mi-1*. Únicamente en las plantas VFNxNahG no se produjo ningún incremento del contenido de SA.
7. A los 12 días de la infestación, los niveles de ambas hormonas se habían reducido considerablemente en respuesta a la actividad de las N1, en todos

- los genotipos de tomate utilizados excepto en las plantas NahG cuyos niveles de JA fueron similares en ambas fases de la infestación.
8. El vector TRV puede ser utilizado para el Silenciamiento Génico Inducido por Virus (VIGS) en estudios con *B. tabaci*, puesto que la infiltración del vector “vacío” no provoca ninguna alteración en el comportamiento del insecto en plantas de tomate susceptibles ni resistentes.
 9. El silenciamiento del gen *Mi-1* mediante VIGS ocasionó una pérdida parcial de la resistencia a *B. tabaci*, confirmando una vez más la implicación fundamental de este gen en este tipo de resistencia y validando la eficacia de la técnica de silenciamiento génico utilizada en este estudio.
 10. El gen *Hsp90* del tomate juega un papel importante en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*, lo que sugiere la existencia de un mecanismo común con las resistencias a nematodos e insectos reguladas por el mismo gen.
 11. Además de la presencia/ausencia del gen *Mi-1*, el análisis comparativo de los transcriptomas de los cultivares de tomate quasi-isogénicos Motelle y Moneymaker ha revelado otras diferencias basales que podrían ser considerados como buenos candidatos para intervenir de un modo u otro en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci*, si bien la relevancia de cada uno de ellos en dicha resistencia debe ser analizada individualmente.
 12. La infestación por *B. tabaci* produce cambios importantes en los transcriptomas de las plantas de tomate, que modifican sustancialmente las diferencias basales observadas entre las variedades Motelle y Moneymaker.
 13. En la interacción incompatible se regula diferencialmente un mayor número de genes que en la compatible, tanto durante la actividad de las hembras adultas (alimentación y oviposición) como del primer estadio ninfal (N1) de *B. tabaci*. Además, en ambas fases de la infestación la expresión diferencial de los genes es mayor durante la interacción incompatible que durante la compatible. Por otro lado, apenas existe solapamiento entre las interacciones compatible e incompatible tomate-*B.*

tabaci ya que presentaban pocos genes comunes, es decir, que se regulen diferencialmente por la infestación en ambos tipos de interacción.

14. La actividad del primer estadio ninfal de *B. tabaci* altera la expresión de un mayor número de genes que la actividad de las hembras adultas, tanto en la interacción compatible como en la incompatible. Además, en ambas interacciones, durante la actividad de N1 se sobreexpresan más genes que se reprimen mientras que durante la fase temprana de la infestación se reprimen más genes que se sobreexpresan.
15. El gen *Snakin-2*, que participa en procesos defensivos, podría cumplir un papel significativo en la defensa basal a *B. tabaci* en tomate al verse incrementada su expresión tras la infestación temprana.
16. La expresión de *Mi-1* es invariable en la interacción incompatible Motelle-*B. tabaci*, no viéndose alterada ni durante la actividad de hembras adultas ni del primer estadio ninfal.
17. La regulación de la pared celular juega un importante papel en la resistencia *Mi-1* del tomate a *B. tabaci*, y más concretamente, durante la actividad de las ninfas N1, ya que provocó la sobreexpresión de un gran número de genes relacionados con procesos de modificación y fortificación de la pared celular.
18. Las proteínas calmodulina y MAPK3 parecen estar implicadas en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci* viéndose sobreexpresadas durante la actividad de hembras adultas y durante la actividad de las N1 estableciéndose puntos comunes con este tipo de resistencia a nematodos y áfidos.
19. La proteína DELLA, conocida por su papel en la coordinación entre procesos de desarrollo y de defensa, podría estar implicada en la resistencia mediada por *Mi-1* a *B. tabaci* al verse inducida su expresión durante la fase tardía de la infestación en la interacción incompatible.
20. La resistencia mediada por el gen *Mi-1* a *B. tabaci* parece estar relacionada con la resistencia que confiere el gen *Ve1* a algunas cepas del

género *Verticillium* puesto que se sobreexpresaba en la interacción incompatible durante la fase temprana y la tardía de la infestación y, además, ya se ha descrito una relación entre el gen *Ve1* y el gen *Cf*. Este sería, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, el primer trabajo que describe una relación directa entre los genes *Mi-1* y *Ve* en la respuesta al ataque de *B. tabaci*.

21. En la interacción incompatible tomate-*B. tabaci* se regulan un mayor número de genes relacionados con el SA que en la interacción compatible, tanto durante la fase temprana de la infestación como durante la tardía. Además, se ha podido observar que no existe relación antagonista entre las rutas del SA y del JA puesto que, durante la fase temprana de la infestación se inducían únicamente genes regulados por SA, tanto en la interacción compatible como en la incompatible y, durante la fase tardía se inducían genes relacionados con ambas rutas de señalización en la interacción incompatible.
22. El tratamiento con BTH, análogo del salicílico y probado inductor de resistencia a *B. tabaci* en plantas de tomate carentes del gen *Mi-1*, induce una gran reprogramación transcripcional, provocándose la expresión diferencial de 1280 genes. Además, el tratamiento con BTH provoca, en plantas de tomate susceptibles (infestadas y no infestadas), una relación antagonista entre las rutas del SA y el JA al inducir la sobreexpresión de numerosos genes asociados al SA y reprimir aquellos relacionados con la ruta de biosíntesis o señalización del JA.
23. La respuesta desencadenada por el tratamiento con BTH comparte, por un lado, semejanza con la respuesta de las plantas a ciertos patógenos e insectos ya que reprime genes implicados en procesos fotosintéticos y, por otro lado, difiere en el efecto que se produce en la pared celular puesto que el tratamiento con BTH reprime numerosos genes relacionados con procesos de modificación, organización y estructuración de la pared celular mientras que tras el ataque de patógenos e insectos se induce la expresión de este tipo de genes.

24. El efecto más interesante de la infestación por *B. tabaci* sobre el tratamiento con BTH fue la sobreexpresión del gen *Wfi* (*Whitefly-induced*). Sin embargo, no existe un patrón claro de expresión de este gen ya que sólo se vio alterada su expresión en otra comparación, la de plantas tratadas con BTH frente a plantas que contienen el gen *Mi-1*, ambas en ausencia de infestación.
25. El tratamiento con BTH provoca mayores cambios transcripcionales en Moneymaker que la infestación por este insecto en plantas no tratadas de la misma variedad (interacción compatible) o de Motelle (interacción incompatible mediada por *Mi-1*). Aunque existen grandes diferencias cuantitativas, se han encontrado algunos genes comunes entre la resistencia de *Mi-1* y el efecto por BTH ya que en ambos casos se encuentran sobreexpresados genes relacionados con el estrés, como PRs y WRKY y se reprimen los genes *ELI3* y *gp91^{phox}*. No obstante, la expresión diferencial de estos genes suele ser mayor en las plantas tratadas con BTH que en las plantas Motelle tras la infestación por *B. tabaci*.
26. El tratamiento con BTH y la infestación por moscas blancas parecen no provocar una respuesta hipersensible (HR) en plantas de tomate Motelle y Moneymaker puesto que se reprimía una proteína de respuesta hipersensible (HRAP) y se expresaban diferencialmente genes que regulan el estrés oxidativo, que puede ocasionar la respuesta hipersensible. Esta regulación es más evidente en la interacción incompatible mediada por *Mi-1*, especialmente durante la actividad de la N1 de *B. tabaci*, donde se expresaron diferencialmente más genes relacionados con la reducción del estrés oxidativo que durante la interacción compatible.
27. La alimentación de *B. tabaci* apenas provoca cambios de expresión en plantas susceptibles que han sufrido previamente una gran reprogramación transcripcional por el tratamiento exógeno con BTH ya que únicamente se regularon diferencialmente 3 genes.

BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarts, J. M., Hontelez, J. G., Fischer, P., Verkerk, R., van Kammen, A. & Zabel, P. (1991). Acid phosphatase-1(1), a tightly linked molecular marker for root-knot nematode resistance in tomato: from protein to gene, using PCR and degenerate primers containing deoxyinosine. *Plant Molecular Biology* 16: 647-661.
- Abramovitch, R. B., Janjusevic, R., Stebbins, C. E. & Martin, G. B. (2006). Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 2851-2856.
- Abramovitch, R. B. & Martin, G. B. (2004). Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 356-364.
- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J. & Harberd, N. P. (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science (New York, N.Y.)* 311: 91-94.
- Achard, P., Renou, J.-P., Berthomé, R., Harberd, N. P. & Genschik, P. (2008). Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Current biology : CB* 18: 656-660.
- Achuo, E. A., Audenaert, K., Meziane, H. & Höfte, M. (2004). The salicylic acid-dependent defense pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. *Plant Physiology* 53: 65-72.
- Aharoni, A. & Vorst, O. (2001). DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant Molecular Biology* 48: 99-118.
- Al-Shahrour, F., Minguez, P., Tárraga, J., Medina, I., Alloza, E., Montaner, D. & Dopazo, J. (2007). FatiGO +: a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments. *Nucleic Acids Research* 35: W91-96.
- Al-Shahrour, F., Minguez, P., Tárraga, J., Montaner, D., Alloza, E., Vaquerizas, J. M., Conde, L., Blaschke, C., Vera, J. & Dopazo, J. (2006). BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. *Nucleic Acids Research* 34: W472-476.
- Altieri, M. A., Gurr, G. M. & Wratten, S. D. (2004). Genetic engineering and ecological engineering : a clash of paradigms or scope for synergy ? In *Ecological Engineering for Pest Management*, Vol. 2, 13-31.
- Alvarez, E., Pennell, R. I., Meijer, P.-j., Ishikawa, A., Dixon, R. A. & Lamb, C. (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 773-784.
- Amador, V., Monte, E., García-Martínez, J. L. & Prat, S. (2001). Gibberellins signal nuclear import of PHOR1, a photoperiod-responsive protein with homology to *Drosophila armadillo*. *Cell* 106: 343-354.

- Ament, K., Kant, M. R., Sabelis, M. W., Haring, M. A. & Schuurink, R. C. (2004). Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. *Plant Physiology* 135: 2025-2037.
- Atamian, H. S., Chaudhary, R., Cin, V. D., Bao, E., Girke, T. & Kaloshian, I. (2013). In planta expression or delivery of potato aphid *Macrosiphum euphorbiae* effectors Me10 and Me23 enhances aphid fecundity. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 26: 67-74.
- Audenaert, K., Meyer, G. B. D. & Höfte, M. M. (2002). Abscisic Acid Determines Basal Susceptibility of Tomato to *Botrytis cinerea* and Suppresses Salicylic Acid- Dependent Signaling Mechanisms. *Plant Physiology* 128: 491-501.
- Axtell, M. J. & Staskawicz, B. J. (2003). Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* 112: 369-377.
- Ayliffe, M. a., Frost, D. V., Finnegan, E. J., Lawrence, G. J., Anderson, P. a. & Ellis, J. G. (1999). Analysis of alternative transcripts of the flax L6 rust resistance gene. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 17: 287-292.
- BAILEY, D. M. (1941). The seedling test method for root-knot-nematode resistance. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*. 38: 573-575.
- Balaji, V., Mayrose, M., Sherf, O., Jacob-Hirsch, J., Eichenlaub, R., Iraki, N., Manulis-Sasson, S., Rechavi, G., Barash, I. & Sessa, G. (2008). Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiology* 146: 1797-1809.
- Balaji, V., Sessa, G. & Smart, C. D. (2011). Silencing of host basal defense response-related gene expression increases susceptibility of *Nicotiana benthamiana* to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 101: 349-357.
- Bali, M., Zhang, B., Morano, K. A. & Michels, C. A. (2003). The Hsp90 molecular chaperone complex regulates maltose induction and stability of the *Saccharomyces* MAL gene transcription activator Mal63p. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 47441-47448.
- Bar-Or, C., Kapulnik, Y. & Koltail, H. (2005). A broad characterization of the transcriptional profile of the compatible tomato response to the plant parasitic root knot nematode *Meloidogyne javanica*. *European Journal of Plant Pathology* 111: 181-192.
- Barcala, M., García, A., Cabrera, J., Casson, S., Lindsey, K., Favery, B., García-Casado, G., Solano, R., Fenoll, C. & Escobar, C. (2010). Early transcriptomic events in microdissected *Arabidopsis* nematode-induced giant cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 61: 698-712.
- Bargmann, B. O. & Munnik, T. (2006). The role of phospholipase D in plant stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 515-522.

- Bari, R. & Jones, J. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 69: 473-488.
- Barrientos, Z. R., Apablaza, H. J., Norero, S. A. & Estay, P. P. (1998). Temperatura base y constante termica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Ciencia e Investigacion Agraria* 25: 133-137.
- Baulcombe, D. C. (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 109-113.
- Baumann, M. J., Eklöf, J. M., Michel, G., Kallas, A. M., Teeri, T. T., Czjzek, M. & Brumer, H. (2007). Structural evidence for the evolution of xyloglucanase activity from xyloglucan endo-transglycosylases: biological implications for cell wall metabolism. *The Plant Cell* 19: 1947-1963.
- Becker, A. & Lange, M. (2010). VIGS--genomics goes functional. *Trends in Plant Science* 15: 1-4.
- Beckers, G. J. M. & Spoel, S. H. (2006). Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. *Plant biology (Stuttgart, Germany)* 8: 1-10.
- Beitia, F. J., Carnero, A., Hernández-Suárez, E., Onillon, J. C. & Guirao, P. (1997). Posibilidades de control biológico de *Bemisia tabaci*: situación en Canarias. In *Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Murcia*, 81-85.
- Benjamini, Y. & Yekutieli, D. (2001). THE CONTROL OF THE FALSE DISCOVERY RATE IN MULTIPLE TESTING UNDER DEPENDENCY. *The Annals of Statistics* 29: 1165-1188.
- Bergey, D. R. & Ryan, C. A. (1999). Wound- and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. *Plant Molecular Biology* 40: 815-823.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A. & Solano, R. (2002). Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 29: 23-32.
- Bhattacharai, K. K., Atamian, H. S., Kaloshian, I. & Eulgem, T. (2010). WRKY72-type transcription factors contribute to basal immunity in tomato and *Arabidopsis* as well as gene-for-gene resistance mediated by the tomato R gene Mi-1. *The Plant Journal* 63: 229-240.
- Bhattacharai, K. K., Li, Q., Liu, Y., Dinesh-Kumar, S. P. & Kaloshian, I. (2007a). The MI-1-mediated pest resistance requires Hsp90 and Sgt1. *Plant Physiology* 144: 312-323.
- Bhattacharai, K. K., Xie, Q.-G., Mantelin, S., Bishnoi, U., Girke, T., Navarre, D. A. & Kaloshian, I. (2008). Tomato Susceptibility to Root-Knot Nematodes Requires an Intact Jasmonic Acid Signaling Pathway. *Molecular plant-microbe interactions* 21: 1205-1214.
- Bhattacharai, K. K., Xie, Q.-G., Pourshalimi, D., Younglove, T. & Kaloshian, I. (2007b). Coil-dependent signaling pathway is not required for Mi-1-mediated potato aphid resistance. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 20: 276-282.

- Bi, J. L. & Felton, G. W. (1995). Foliar oxidative stress and insect herbivory: Primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. *Journal of Chemical Ecology* 21: 1511-1530.
- Birch, L. C. (1948). The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *Journal of Animal Ecology* 17: 15-26.
- Bokshi, A. I., Morris, S. C. & Deverall, B. J. (2003). Effects of benzothiadiazole and acetylsalicylic acid on beta-1,3-glucanase activity and disease resistance in potato. *Plant Pathology* 52: 22-27.
- Bolle, C. (2004). The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* 218: 683-692.
- Bonato, O., Lurette, A., Vidal, C. & Fargues, J. (2007). Modelling temperature-dependent bionomics of Bemisia tabaci (Q-biotype). *Physiological entomology* 32: 50-55.
- Bonshtien, A., Lev, A., Gibly, A., Debbie, P., Avni, A. & Sessa, G. (2005). Molecular Properties of the Xanthomonas AvrRxv Effector and Global Transcriptional Changes Determined by Its Expression in Resistant Tomato Plants. *Molecular plant-microbe interactions* 18: 300-310.
- Bos, J. I. B., Prince, D., Pitino, M., Maffei, M. E., Win, J. & Hogenhout, S. a. (2010). A functional genomics approach identifies candidate effectors from the aphid species Myzus persicae (green peach aphid). *PLoS genetics* 6: e1001216.
- Bostock, R. M. (2005). Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annual Review of Phytopathology* 43: 545-580.
- Botha, C. E. J. & Matsiliza, B. (2004). Reduction in transport in wheat (Triticum aestivum) is caused by sustained phloem feeding by the Russian wheat aphid (Diuraphis noxia). In *South African Journal of Botany*.
- Bouché, N., Yellin, A., Snedden, W. A. & Fromm, H. (2005). Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annual review of plant biology* 56: 435-466.
- Boughton, A. J., Hoover, K. & Felton, G. W. (2006). Impact of chemical elicitor applications on greenhouse tomato plants and population growth of the green peach aphid, Myzus persicae. *Entomologia Experimentails et Applicata* 120: 175-188.
- Bowles, D. J. (1990). Defense-related proteins in higher plants. *Annual review of biochemistry* 59: 873-907.
- Boyko, E. V., Smith, C. M., Thara, V. K., Bruno, J. M., Deng, Y., Starkey, S. R. & Klaahsen, D. L. (2006). Molecular Basis of Plant Gene Expression During Aphid Invasion: Wheat Pto and Pti-Like Sequences Are Involved in Interactions Between Wheat and Russian Wheat Aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 99: 1430-1445.
- Brading, P. A., Hammond-Kosack, K. E., Parr, A. & Jones, J. D. (2000). Salicylic acid is not required for Cf-2- and Cf-9-dependent resistance of tomato to Cladosporium fulvum. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 23: 305-318.

- Braham, W. S. & Winstead, N. N. (1957). Inheritance of resistance to root-knot nematodes in tomatoes. *American Society for Horticultural Science* 69: 372-377.
- Brigneti, G., Martín-Hernández, A. M., Jin, H., Chen, J., Baulcombe, D. C., Baker, B. & Jones, J. D. G. (2004). Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *The Plant Journal : for cell and molecular biology* 39: 264-272.
- Brown, J. K. (1994). Current status of *Bemisia tabaci* as a pest and virus vector in world agroecosystems. *Fao Plant Protection Bulletin* 42: 3-32.
- Brown, J. K. & Czosnek, H. (2002). Whitefly transmission of plant viruses. *Advances in Botanical Research* 36: 65-76.
- Brown, J. K., Frohlich, D. R. & Rosell, R. C. (1995). The Sweetpotato or Silverleaf Whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a Species Complex? *Annual Review of Entomology* 40: 511-534.
- Bruce, T. J. A. & Pickett, J. A. (2007). Plant defence signalling induced by biotic attacks. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 387-392.
- Buckner, J. S., Freeman, T. P., Ruud, R. L., Chu, C.-c. & Henneberry, T. J. (2002). Characterization and functions of the whitefly egg pedicel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 49: 22-33.
- Burch-Smith, T. M., Anderson, J. C., Martin, G. B. & Dinesh-Kumar, S. P. (2004). Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *The Plant Journal : for cell and molecular biology* 39: 734-746.
- Burch-Smith, T. M., Schiff, M., Liu, Y. & Dinesh-Kumar, S. P. (2006). Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 142: 21-27.
- Burton, R. a., Gibeaut, D. M., Bacic, a., Findlay, K., Roberts, K., Hamilton, a., Baulcombe, D. C. & Fincher, G. B. (2000). Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene. *The Plant Cell* 12: 691-706.
- Busi, M. V., Bustamante, C., D'Angelo, C., Hidalgo-Cuevas, M., Boggio, S. B., Valle, E. M. & Zabaleta, E. (2003). MADS-box genes expressed during tomato seed and fruit development. *Plant Molecular Biology* 52: 801-815.
- Byrne, D. N. & Bellows, T. S. (1991). Whitefly Biology. *Annual Review of Entomology* 36: 431-457.
- Byrne, D. N., Cohen, A. C. & Draeger, E. A. (1990). Water uptake from plant tissue by the egg pedicel of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae). *Canadian Journal of Zoology* 68: 1193-1195.
- C, G. J. & C, M. D. (1956). Inheritance of resistance to severe root-knot from *Meloidogyne incognita* in commercial-type tomatoes. *American Society for Horticultural Science* 63: 437-442.
- Cameron, R. K., Dixon, R. A. & Lamb, C. J. (1994). Biologically induced systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 5: 715-725.
- Cao, Y., Ding, X., Cai, M., Zhao, J., Lin, Y., Li, X., Xu, C. & Wang, S. (2007). The Expression Pattern of a Rice Disease Resistance Gene *Xa3/Xa26* Is

- Differentially Regulated by the Genetic Backgrounds and Developmental Stages That Influence Its Function. *Genetics* 177: 523-533.
- Caplan, J., Padmanabhan, M. & Dinesh-Kumar, S. P. (2008). Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. *Cell host & microbe* 3: 126-135.
- Carter, W. W. (1982). Influence of Soil Temperature on Meloidogyne incognita Resistant and Susceptible Cotton, Gossypium hirsutum. *Journal of Nematology* 14: 343-346.
- Century, K. S., Lagman, R. A., Adkisson, M., Morlan, J., Tobias, R., Schwartz, K., Smith, A., Love, J., Ronald, P. C. & Whalen, M. C. (1999). Developmental control of Xa21-mediated disease resistance in rice. *The Plant Journal* 20: 231-236.
- Cicero, J. M. & Brown, J. K. (2011). Anatomy of Accessory Salivary Glands of the Whitefly Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) and Correlations to Begomovirus Transmission. *Annals of the Entomological Society of America* 104: 280-286.
- Clay, N. K., Adio, A. M., Denoux, C., Jander, G. & Ausubel, F. M. (2009). Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response. *Science* 323: 95-101.
- Coelho, a. C., Horta, M., Neves, D. & Cravador, a. (2006). Involvement of a cinnamyl alcohol dehydrogenase of Quercus suber in the defence response to infection by Phytophthora cinnamomi. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69: 62-72.
- Cohen, S. & Berlinger, M. J. (1986). Transmission and cultural control of whitefly-borne viruses. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 17: 89-97.
- Colomo, M. V., Berta, D. C. & Chocobar, M. J. (2002). El complejo de himenópteros parasitoides que atacan a la “polilla del tomate” Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) en la Argentina. *Acta zoológica lilloana* 46: 81-92.
- Conrath, U., Pieterse, C. M. J. & Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 7: 210-216.
- Consortium, T. t. g. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635-641.
- Cooper, W. C., Jia, L. & Goggin, F. L. (2004). Acquired and R-gene-mediated resistance against the potato aphid in tomato. *Journal of Chemical Ecology* 30: 2527-2542.
- Cortina, C. & Culiáñez-Macià, F. A. (2004). Tomato Transformation and Transgenic Plant Production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76: 269-275.
- Cubas, P., Lauter, N., Doebley, J. & Coen, E. (1999). The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 18: 215-222.
- Czosnek, H. & Laterrot, H. (1997). A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Archives of Virology* 142: 1391-1406.

- Chen, H., Wilkerson, C. G., Kuchar, J. A., Phinney, B. S. & Howe, G. A. (2005). Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *PNAS* 102: 19237-19242.
- Chen, J.-C., Jiang, C.-Z., Gookin, T. E., Hunter, D. A., Clark, D. G. & Reid, M. S. (2004). Chalcone synthase as a reporter in virus-induced gene silencing studies of flower senescence. *Plant Molecular Biology* 55: 512-530.
- Chen, L., Hamada, S., Fujiwara, M., Zhu, T., Thao, N. P., Wong, H. L., Krishna, P., Ueda, T., Kaku, H., Shibuya, N., Kawasaki, T. & Shimamoto, K. (2010). The Hop/Sti1-Hsp90 chaperone complex facilitates the maturation and transport of a PAMP receptor in rice innate immunity. *Cell host & microbe* 7: 185-196.
- Chen, W., Provart, N. J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.-S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham, S. A., Budworth, P. R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J. A., Harper, J. F., Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Heinlein, M., Kobayashi, K., Hohn, T., Dangl, J. L., Wang, X. & Zhu, T. (2002). Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *The Plant Cell* 14: 559-574.
- Chiasson, D., Ekengren, S. K., Martin, G. B., Dobney, S. L. & Snedden, W. A. (2005). Calmodulin-like proteins from Arabidopsis and tomato are involved in host defense against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Plant Molecular Biology* 58: 887-897.
- Chiel, E., Gottlieb, Y., Zchori-Fein, E., Mozes-Daube, N., Katzir, N., Inbar, M. & Ghanim, M. (2007). Biotype-dependent secondary symbiont communities in sympatric populations of *Bemisia tabaci*. *Bulletin of Entomological Research* 97: 407-413.
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B. & Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803-814.
- Cho, S. K., Jung, K. W., Jeung, J. U., Kang, K. H., Shim, K. S., You, M. K., Yoo, K. S., Ok, S. H. & Shin, J. S. (2005). Analysis of differentially expressed transcripts from planthopper-infested wild rice (*Oryza minuta*). *Plant Cell Reports* 24: 59-67.
- Chrispeels, H. E., Oettinger, H., Janvier, N. & Tague, B. W. (2000). AtZFP1, encoding Arabidopsis thaliana C2H2 zinc-finger protein 1, is expressed downstream of photomorphogenic activation. *Plant Molecular Biology* 42: 279-290.
- Chu, C.-c., Henneberry, T. J., Thomas, J. & Cohen, A. C. (1995). *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae): Host preference and factors affecting oviposition and feeding site preference. *Environmental Entomology* 24: 354-360.
- Chung, E., Seong, E., Kim, Y.-C., Chung, E. J., Oh, S.-K., Lee, S., Park, J. M., Joung, Y. H. & Choi, D. (2004). A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang). *Molecules and cells* 17: 377-380.

- Dangl, J. L. & Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833.
- Davis, M. J., Gillaspie, a. G., Vidaver, a. K. & Harris, R. W. (1984). Clavibacter: a New Genus Containing Some Phytopathogenic Coryneform Bacteria, Including Clavibacter xyli subsp. xyli sp. nov., subsp. nov. and Clavibacter xyli subsp. cynodontis subsp. nov., Pathogens That Cause Ratoon Stunting Disease of Sugarcane and Be. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34: 107-117.
- De Barro, P. J., Liu, S.-S., Boykin, L. M. & Dinsdale, A. B. (2011). Bemisia tabaci: a statement of species status. *Annual Review of Entomology* 56: 1-19.
- de la Fuente van Bentem, S., Vossen, J. H., de Vries, K. J., van Wees, S., Tameling, W. I. L., Dekker, H. L., de Koster, C. G., Haring, M. a., Takken, F. L. W. & Cornelissen, B. J. C. (2005). Heat shock protein 90 and its co-chaperone protein phosphatase 5 interact with distinct regions of the tomato I-2 disease resistance protein. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 43: 284-298.
- De Lorenzo, G., D'Ovidio, R. & Cervone, F. (2001). The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 39: 313-335.
- De Lorenzo, G. & Ferrari, S. (2002). Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 295-299.
- De Vos, M. & Jander, G. (2009). Myzus persicae (green peach aphid) salivary components induce defence responses in Arabidopsis thaliana. *Plant, cell & environment* 32: 1548-1560.
- de Vos, M., Kim, J. H. & Jander, G. (2007). Biochemistry and molecular biology of Arabidopsis-aphid interactions. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 29: 871-883.
- De Vos, M., Van Oosten, V. R., Van Poecke, R. M. P., Van Pelt, J. a., Pozo, M. J., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J.-P., Van Loon, L. C., Dicke, M. & Pieterse, C. M. J. (2005). Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 18: 923-937.
- Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E. & Ryals, J. (1994). A central role of salicylic Acid in plant disease resistance. *Science (New York, N.Y.)* 266: 1247-1250.
- Delgado, A. M. (1997). El virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) en la región de Murcia: Aspectos generales para su control. In *El virus del rizado amarillo (Hoja en cuchara) del tomate (TYLCV) y su vector Bemisia tabaci. Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Murcia.*, 67-73.
- Dempsey, D. M. A., Shah, J. & Klessig, D. F. (1999). Salicylic Acid and Disease Resistance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18: 547-575.

- Denholm, I., Cahill, M., Dennehy, T. J. & Horowitz, A. R. (1998). Challenges with managing insecticide resistance in agricultural pests, exemplified by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B1* 353: 1757-1767.
- Desneux, N., Wajnberg, E., Wyckhuys, K. A. G., Burgio, G., Arpaia, S., Narváez-Vasquez, C. A., González-Cabrera, J., Catalán Ruescas, D., Tabone, E., Frandon, J., Pizzol, J., Poncet, C., Cabello, T. & Urbaneja, A. (2010). Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of Pest Science* 83: 197-215.
- Dicke, M., van Loon, J. J. A. & Soler, R. (2009). Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nature chemical biology* 5: 317-324.
- Diezel, C., von Dahl, C. C., Gaquerel, E. & Baldwin, I. T. (2009). Different lepidopteran elicitors account for cross-talk in herbivory-induced phytohormone signaling. *Plant Physiology* 150: 1576-1586.
- Dinesh-Kumar, S. P., Anandalakshmi, R., Marathe, R., Schiff, M. & Liu, Y. (2003). Virus-induced gene silencing. *Methods in molecular biology* 236: 287-294.
- Ding, X. S., Schneider, W. L., Chaluvadi, S. R., Mian, M. A. R., Nelson, R. S., Roberts, S., Foundation, N. & Parkway, S. N. (2006). Characterization of a Brome mosaic virus strain and its use as a vector for gene silencing in monocotyledonous hosts. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 19: 1229-1239.
- Ding, Y., Wei, W., Wu, W., Davis, R. E., Jiang, Y., Lee, I.-M., Hammond, R. W., Shen, L., Sheng, J.-P. & Zhao, Y. (2013). Role of gibberellic acid in tomato defence against potato purple top phytoplasma infection. *Annals of Applied Biology* 162: 191-199.
- Dinsdale, A., Cook, L., Riginos, C., Buckley, Y. M. & De Barro, P. (2010). Refined Global Analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) Mitochondrial Cytochrome Oxidase 1 to Identify Species Level Genetic Boundaries. *Annals of the Entomological Society of America* 103: 196-208.
- Dittrich, V., Uk, S. & Ernst, G. H. (1990). Chemical control and insecticide resistance of whiteflies. In *Whiteflies: their Bionomics, Pest Status and Management.*, 263-286.
- Divol, F., Vilaine, F., Thibivilliers, S., Kusiak, C., Sauge, M. H. & Dinant, S. (2007). Involvement of the xyloglucan endotransglycosylase/hydrolases encoded by celery XTH1 and Arabidopsis XTH33 in the phloem response to aphids. *Plant, cell & environment* 30: 187-201.
- Dixon, M. S., Golstein, C., Thomas, C. M., van Der Biezen, E. a. & Jones, J. D. (2000). Genetic complexity of pathogen perception by plants: the example of Rcr3, a tomato gene required specifically by Cf-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 8807-8814.
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847.

- Doares, S. H., Narvaez-Vasquez, J., Conconi, A. & Ryan, C. A. (1995). Salicylic Acid Inhibits Synthesis of Proteinase Inhibitors in Tomato Leaves Induced by Systemin and Jasmonic Acid. *Plant Physiology* 108: 1741-1746.
- Doherty, H. M., Selvendran, R. R. & Bowles, D. J. (1988). The wound response of tomato plants can be inhibited by aspirin and related hydroxy-benzoic acids. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 33: 377-384.
- Doke, N., Miura, Y., Sanchez, L. M., Park, H. J., Noritake, T., Yoshioka, H. & Kawakita, K. (1996). The oxidative burst protects plants against pathogen attack. mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence - a review. *Gene* 179: 45-51.
- Dopazo, J. (2006). Functional interpretation of microarray experiments. *Omics : a journal of integrative biology* 10: 398-410.
- Dreyer, D. L. & Campbell, B. C. (1987). Chemical basis of host-plant resistance to aphids. *Plant, Cell and Environment* 10: 353-361.
- Dropkin, V. H. (1969). The Necrotic Reaction of Tomatoes and Other Dosts Resistant to Meloidogyne: reversal by temperatnre. *Phytopathology*: 1632-1637.
- Drost, Y. C., van Lenteren, J. C. & van Roermund, H. J. W. (1998). Life-history parameters of different biotypes of Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) in relation to temperature and host plant: a selective review. *Bulletin of Entomological Research* 88: 219-230.
- Durgbanshi, A., Arbona, V., Pozo, O., Miersch, O., Sancho, J. V. & Gómez-Cadenas, A. (2005). Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8437-8442.
- Ebel, J. & Scheel, D. (1997). Signals in Host-Parasite Interactions. In *Plant Relationships*, 85-105 (Eds G. C. Carroll and P. Tudzynski). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Ebrahim, S., Usha, K. & Singh, B. (2011). Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*: 1043-1054.
- Eckardt, N. A. (2003). Viral Defense and Counterdefense: A Role for Adenosine Kinase in Innate Defense and RNA Silencing. *The Plant Cell Online* 15: 2758-2761.
- Egas, M., Norde, D.-J. & Sabelis, M. W. (2003). Adaptive learning in arthropods: spider mites learn to distinguish food quality. *Experimental and Applied Acarology* 30: 233-247.
- Egelund, J., Skjøt, M., Geshi, N., Ulvskov, P. & Petersen, B. L. (2004). A complementary bioinformatics approach to identify potential plant cell wall glycosyltransferase-encoding genes. *Plant Physiology* 136: 2609-2620.
- Eichenseer, H., Mathews, M., Bi, J., Murphy, J. & Felton, G. (1999). Salivary glucose oxidase: multifunctional roles for helioverpa zea? *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 42: 99-109.
- Ekgren, S. K., Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S. P. & Martin, G. B. (2003). Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a

- role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *The Plant Journal* 36: 905-917.
- El Mehrach, K., Chouchane, S. G., Mejia, L., Williamson, V. M., Vidavski, F., Hatimi, A., Salus, M. S., Martin, C. T. & Maxwell, D. P. (2005). PCR-based methods for tagging the Mi-1 locus for resistance to root-knot nematode in begomovirus-resistant tomato germplasm. *Acta Horticulturae (ISHS)* 695: 263-270.
- El Oirdi, M., El Rahman, T. A., Rigano, L., El Hadrami, A., Rodriguez, M. C., Daayf, F., Vojnov, A. & Bouarab, K. (2011). Botrytis cinerea manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *The Plant Cell* 23: 2405-2421.
- Ellis, C., Karafyllidis, I. & Turner, J. G. (2002). Constitutive activation of jasmonate signaling in an Arabidopsis mutant correlates with enhanced resistance to Erysiphe cichoracearum, Pseudomonas syringae, and Myzus persicae. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 15: 1025-1030.
- Ellsworth, P. C. & Martinez-Carrillo, J. L. (2001). IPM for Bemisia tabaci: a case study from North America. *Crop Protection* 20: 853-869.
- Emden, H. F. V., Eastop, V. F., Hughes, R. D. & Way, M. J. (1969). The Ecology of Myzus Persicae. *Annual Review of Entomology* 14: 197-270.
- Escobar, C., Brown, S. & Mitchum, M. G. (2011). Transcriptomic and Proteomic Analysis of the Plant Response to Nematode Infection. In *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*, 157-173 (Eds J. Jones, G. Gheysen and C. Fenoll). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Estrada-Hernández, M. G., Valenzuela-Soto, J. H., Ibarra-Laclette, E. & Délano-Frier, J. P. (2009). Differential gene expression in whitefly Bemisia tabaci-infested tomato (Solanum lycopersicum) plants at progressing developmental stages of the insect's life cycle. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*: 44-60.
- Eulgem, T. (2005). Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. *Trends in Plant Science* 10: 71-78.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S. & Somssich, I. E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* 5: 199-206.
- Eulgem, T., Weigman, V. J., Chang, H.-S., McDowell, J. M., Holub, E. B., Glazebrook, J., Zhu, T. & Dangl, J. L. (2004). Gene expression signatures from three genetically separable resistance gene signaling pathways for downy mildew resistance. *Plant Physiology* 135: 1129-1144.
- FAO (2005). FAO. www.fao.org.
- Farmer, E. E. & Ryan, C. A. (1992). Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors. *The Plant Cell* 4: 129-134.
- Fei, Z., Tang, X., Alba, R. & Giovannoni, J. (2006). Tomato Expression Database (TED): a suite of data presentation and analysis tools. *Nucleic Acids Research* 34: 766-770.

- Fidantsef, A. L., Stout, M. J., Thaler, J. S., Duffey, S. S. & Bostock, R. M. (1999). Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 54: 97-114.
- Finnegan, E. J., Peacock, W. J. & Dennis, E. S. (1996). Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 8449-8454.
- Firdaus, S., Heusden, A. W., Hidayati, N., Supena, E. D. J., Visser, R. G. F. & Vosman, B. (2012). Resistance to *Bemisia tabaci* in tomato wild relatives. *Euphytica* 187: 31-45.
- Floer, M., Bryant, G. O. & Ptashne, M. (2008). HSP90/70 chaperones are required for rapid nucleosome removal upon induction of the GAL genes of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2975-2980.
- Flor, H. H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 275-296.
- Foyer, C. H. & Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell* 17: 1866-1875.
- Fradin, E. F., Zhang, Z., Juarez Ayala, J. C., Castroverde, C. D. M., Nazar, R. N., Robb, J., Liu, C.-M. & Thomma, B. P. H. J. (2009). Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato Ve1. *Plant Physiology* 150: 320-332.
- Freeman, T. P., Buckner, J. S., Nelson, D. R., Chu, C.-C. & Henneberry, T. J. (2001). Stylet penetration by *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) into host leaf tissue. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94: 761-768.
- Frick, U. & Schaller, A. (2002). cDNA microarray analysis of fusicoccin-induced changes in gene expression in tomato plants. *Planta* 216: 83-94.
- Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Rella, M. G., Meier, B., Dincher, S., Staub, T., Uknes, S., Mettraux, J.-P., Kessmann, H. & Ryals, J. (1996). A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *The Plant Journal* 10: 61-70.
- Fu, D.-Q., Zhu, B.-Z., Zhu, H.-L., Jiang, W.-B. & Luo, Y.-B. (2005). Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 43: 299-308.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 436-442.
- Fujiwara, A., Kawasaki, T., Usami, S., Fujie, M. & Yamada, T. (2008). Genomic characterization of *Ralstonia solanacearum* phage phiRSA1 and its related prophage (phiRSX) in strain GMI1000. *Journal of bacteriology* 190: 143-156.

- Fukuda, Y. (1996). Coordinated activation of chitinase genes and extracellular alkalization in suspension-cultured tobacco cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60: 2005-2010.
- Fuller, V. L., Lilley, C. J., Atkinson, H. J. & Urwin, P. E. (2007). Differential gene expression in Arabidopsis following infection by plant-parasitic nematodes *Meloidogyne incognita* and *Heterodera schachtii*. *Molecular Plant Pathology* 8: 595-609.
- Funk, C. J. (2001). Alkaline phosphatase activity in whitefly salivary glands and saliva. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 46: 165-174.
- Gabriëls, S. H. E. J., Takken, F. L. W., Vossen, J. H., de Jong, C. F., Liu, Q., Turk, S. C. H. J., Wachowski, L. K., Peters, J., Witsenboer, H. M. a., de Wit, P. J. G. M. & Joosten, M. H. a. J. (2006). CDNA-AFLP combined with functional analysis reveals novel genes involved in the hypersensitive response. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 19: 567-576.
- Gady, A. L. F., Vriezen, W. H., Van de Wal, M. H. B. J., Huang, P., Bovy, A. G., Visser, R. G. F. & Bachem, C. W. B. (2012). Induced point mutations in the phytoene synthase 1 gene cause differences in carotenoid content during tomato fruit ripening. *Molecular breeding : new strategies in plant improvement* 29: 801-812.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. & Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic Acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science (New York, N.Y.)* 261: 754-756.
- Ganal, M. W. & Tanksley, S. D. (1996). Recombination around the Tm2a and Mi resistance genes in different crosses of *Lycopersicon peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 101-108.
- García-Olmedo, F., Carmona, M. J., López-Fando, J. J., Fernández, J. A., Castagnaro, A., Molina, A., Hernández-Lucas, C., Carbonero, P., Boller, T. & Meins, F. (1992). Characterization and analysis of thionin genes.: 283-302.
- Gassmann, A. J., Stock, S. P., Sisterson, M. S., Carrière, Y. & Tabashnik, B. E. (2008). Synergism between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* crops: integrating biological control and resistance management. *Journal of Applied Ecology* 45: 957-966.
- Gelli, a., Higgins, V. J. & Blumwald, E. (1997). Activation of Plant Plasma Membrane Ca²⁺-Permeable Channels by Race-Specific Fungal Elicitors. *Plant Physiology* 113: 269-279.
- Germain, J. F., Lacordaire, A. I., Cocquempot, C., Ramel, J. M. & Oudard, É. (2009). A new tomato pest in France: *Tuta absoluta*. *PHM Revue Horticole*: 37-41.
- German, T. L., Ullman, D. E. & Moyer, J. W. (1992). Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Annual Review of Phytopathology* 30: 315-348.
- Gibly, A., Bonshtien, A., Balaji, V., Debbie, P., Martin, G. B. & Sessa, G. (2004). Identification and Expression Profiling of Tomato Genes Differentially Regulated During a Resistance Response to *Xanthomonas*

- campestris pv. vesicatoria. *Molecular plant-microbe interactions* 17: 1212-1222.
- Gijsegem, F., Somssich, I. E. & Scheel, D. (1995). Activation of defense-related genes in parsley leaves by infection with *Erwinia chrysanthemi*. *European Journal of Plant Pathology* 101: 549-559.
- Gilbert, J. C. (1958). Some linkage studies with the Mi gene for resistance to root-knot. *Tomato Genetics Cooperative* 8: 15-17.
- Glazebrook, J. (2001). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*--2001 status. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 301-308.
- Glazebrook, J., Zook, M., Mert, I. F., Kagan, I., Rogers, E. E., Crute, I. R., Holub, E. B., Hammerschmidt, R. & Ausubelt, F. M. (1997). Phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics* 146: 381-392.
- Goel, R. K. & Gupta, A. K. (1990). Host age in relation to resistance in rice to bacterial blight caused by *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Tropical Agriculture* 67: 368-370.
- Goggin, F. L., Shah, G., Williamson, V. M. & Ullman, D. E. (2004). Developmental regulation of Mi-mediated aphid resistance is independent of Mi-1.2 transcript levels. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 17: 532-536.
- Gómez-Gómez, L. (2004). Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Molecular immunology* 41: 1055-1062.
- González Zamora, J. E. & Gallardo, J. M. (1999). Desarrollo y capacidad reproductiva de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera; Aleyrodidae) en pimiento a tres temperaturas. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas* 25: 3-11.
- González Zamora, J. E., Gallardo, J. M. & García, M. M. (1997). Toxicity of different pesticides on pupae of *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) parasitizing *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). In *¿Integrated Control in Protected Crops-Mediterranean Climate? (Iobc/Wprs)*, 114-120.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K. H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H. & Ryals, J. (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell* 8: 629-643.
- Gorovits, R., Akad, F., Beery, H., Vidavsky, F., Mahadav, A. & Czosnek, H. (2007). Expression of stress-response proteins upon whitefly-mediated inoculation of Tomato yellow leaf curl virus in susceptible and resistant tomato plants. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 20: 1376-1383.
- Griffin, G. D. & Hunt, O. J. (1972). Effects of Temperature and Inoculation Timing on the Meloidogyne hapla/Corynebacterium insidiosum Complex in Alfalfa. *Journal of Nematology* 4: 70-71.
- Guerinot, M. L. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et biophysica acta* 1465: 190-198.

- Guirao, P., Beitia, F. & Cenis, J. L. (1997). Biotype determination of Spanish populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Bulletin of Entomological Research* 87: 587-593.
- Gurr, G. M. & Kvedaras, O. L. (2010). Synergizing biological control: Scope for sterile insect technique, induced plant defences and cultural techniques to enhance natural enemy impact. *Biological Control* 52: 198-207.
- Gutsche, A., Heng-Moss, T., Sarath, G., Twigg, P., Xia, Y., Lu, G. & Mornhinweg, D. (2009). Gene expression profiling of tolerant barley in response to *Diuraphis noxia* (Hemiptera: Aphididae) feeding. *Bulletin of Entomological Research* 99: 163-173.
- Halitschke, R., Gase, K., Hui, D., Schmidt, D. D., Baldwin, I. T. & Jena, D. (2003). Molecular Interactions between the Specialist Herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and Its Natural Host *Nicotiana attenuata*. VI. Microarray Analysis Reveals That Most Herbivore-Specific Transcriptional Changes Are Mediated by Fatty Acid-Ami. *Plant Physiology* 131: 1894-1902.
- Hammond-Kosack, K. E. & Jones, J. D. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8: 1773-1791.
- Hammond-Kosack, K. E. & Parker, J. E. (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 177-193.
- Harberd, N. P. (2003). Relieving DELLA restraint. *Science* 299: 1853-1854.
- Haroon, S. a., Baki, a. a. & Huettel, R. N. (1993). An In Vitro Test for Temperature Sensitivity and Resistance to *Meloidogyne incognita* in Tomato. *Journal of Nematology* 25: 83-88.
- Haydon, M. J. & Cobbett, C. S. (2007). A novel major facilitator superfamily protein at the tonoplast influences zinc tolerance and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 143: 1705-1719.
- Hayward, A. C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 29: 65-87.
- Heidel, A. J. & Baldwin, I. T. (2004). Microarray analysis of salicylic acid- and jasmonic acid- signalling in responses of *Nicotiana attenuata* to attack by insects from multiple feeding guilds. *Environment* 27: 1362-1373.
- Hein, I., Barciszewska-Pacak, M., Hrubikova, K., Williamson, S., Dinesen, M., Soenderby, I. E., Sundar, S., Jarmolowski, A., Shirasu, K. & Lacomme, C. (2005). Virus-Induced Gene Silencing-Based Functional Characterization of Genes Associated with Powdery Mildew Resistance in Barley. *Plant Physiology* 138: 2155-2164.
- Heinrich, M., Baldwin, I. T. & Wu, J. (2011). Two mitogen-activated protein kinase kinases, MKK1 and MEK2, are involved in wounding- and specialist lepidopteran herbivore *Manduca sexta*-induced responses in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Experimental Botany* 62: 4355-4365.
- Held, M. a., Penning, B., Brandt, A. S., Kessans, S. a., Yong, W., Scofield, S. R. & Carpita, N. C. (2008). Small-interfering RNAs from natural antisense transcripts derived from a cellulose synthase gene modulate cell wall

- biosynthesis in barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 20534-20539.
- Herman, M. A. B., Restrepo, S. & Smart, C. D. (2007). Defense gene expression patterns of three SAR-induced tomato cultivars in the field. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71: 192-200.
- Hileman, L. C., Drea, S., Martino, G., Litt, A. & Irish, V. F. (2005). Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species *Papaver somniferum* (opium poppy). *The Plant journal : for cell and molecular biology* 44: 334-341.
- Ho, J.-y., Weide, R., Ma, H. M., van Wordragen, M. F., Lambert, K. N., Koornneef, M., Zabel, P. & Williamson, V. M. (1992). The root-knot nematode resistance gene Mi in tomato: construction of a molecular linkage map and identification of dominant cDNA markers in resistant genotypes. *The Plant Journal* 2: 971-982.
- Hogenhout, S. a., Van der Hoorn, R. a. L., Terauchi, R. & Kamoun, S. (2009). Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 22: 115-122.
- Holzberg, S., Brosio, P., Gross, C. & Pogue, G. P. (2002). Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *The Plant Journal* 30: 315-327.
- Horowitz, A. R. & Ishaaya, I. (1996). Chemical control of *Bemisia tabaci*-management and application. In *Bemisia 1995: Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management.*, Vol. 0, 537-556.
- Howe, G. A. & Jander, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annual review of plant biology* 59: 41-66.
- Huang, C., Qian, Y., Li, Z. & Zhou, X. (2012a). Virus-induced gene silencing and its application in plant functional genomics. *SCIENCE CHINA Life Sciences* 55: 99-108.
- Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. a. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research* 37: 1-13.
- Huang, S., Gao, Y., Liu, J., Peng, X., Niu, X., Fei, Z., Cao, S. & Liu, Y. (2012b). Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum*. *Molecular genetics and genomics : MGG* 287: 495-513.
- Huang, S., van der Vossen, E. A. G., Kuang, H., Vleeshouwers, V. G. A. A., Zhang, N., Borm, T. J. A., van Eck, H. J., Baker, B., Jacobsen, E. & Visser, R. G. F. (2005). Comparative genomics enabled the isolation of the R3a late blight resistance gene in potato. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 42: 251-261.
- Hubert, D. a., Tornero, P., Belkhadir, Y., Krishna, P., Takahashi, A., Shirasu, K. & Dangl, J. L. (2003). Cytosolic HSP90 associates with and modulates the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. *The EMBO journal* 22: 5679-5689.
- Hui, D., Iqbal, J., Lehmann, K., Gase, K., Saluz, H. P. & Baldwin, I. T. (2003). Molecular Interactions between the Specialist Herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera , Sphingidae) and Its Natural Host *Nicotiana attenuata* : V .

- Microarray Analysis and Further Characterization of Large-Scale Changes in Herbivore-Induced mRNAs 1. *Plant Physiology* 131: 1877-1893.
- Hussey, R. S. (1989). Disease-Inducing Secretions of Plant-Parasitic Nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 27: 123-141.
- Inbar, M., Doostdar, H., Gerling, D. & Mayer, R. T. (2001). Induction of systemic acquired resistance in cotton by BTH has a negligible effect on phytophagous insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 99: 65-70.
- Inbar, M., Doostdar, H., Sonoda, R. M., Leibe, G. L. & Mayer, R. T. (1998). Elicitors of Plant Defensive Systems Reduce Insect Densities and Disease Incidence. *Journal of Chemical Ecology* 24: 135-149.
- Ingle, R. a., Carstens, M. & Denby, K. J. (2006). PAMP recognition and the plant-pathogen arms race. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 28: 880-889.
- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U. & Speed, T. P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics (Oxford, England)* 4: 249-264.
- Islam, M. T. & Shunxiang, R. (2007). Development and reproduction of Bemisia tabaci on three tomato varieties. *Journal of Entomology* 4: 231-236.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K. & Scheel, D. (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 4800-4805.
- Jacobs, A. K., Lipka, V., Burton, R. A., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefert, P. & Fincher, G. B. (2003). An Arabidopsis Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. *The Plant Cell* 15: 2503-2513.
- Jahr, H., Bahro, R., Burger, A., Ahlemeyer, J. & Eichenlaub, R. (1999). Interactions between Clavibacter michiganensis and its host plants. *Environmental microbiology* 1: 113-118.
- Jakob, K., Kniskern, J. M. & Bergelson, J. (2007). The role of pectate lyase and the jasmonic acid defense response in Pseudomonas viridiflava virulence. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 20: 146-158.
- Jakobek, J. L. & Lindgren, P. B. (1993). Generalized Induction of Defense Responses in Bean Is Not Correlated with the Induction of the Hypersensitive Reaction. *The Plant Cell* 5: 49-56.
- Jatala, P. & Russell, C. C. (1972). Nature of Sweet Potato Resistance to Meloidogyne incognita and the Effects of Temperature on Parasitism. *Journal of Nematology* 4: 1-7.
- Jia, Y. & Martin, G. B. (1999). Rapid transcript accumulation of pathogenesis-related genes during an incompatible interaction in bacterial speck disease-resistant tomato plants. *Plant Molecular Biology* 40: 455-465.
- Jia, Y., McAdams, S. a., Bryan, G. T., Hershey, H. P. & Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The EMBO journal* 19: 4004-4014.

- Jiang, C.-Z., Chen, J.-C. & Reid, M. (2011). Virus-Induced Gene Silencing in Ornamental Plants. In *RNAi and Plant Gene Function Analysis : Methods and Protocols*, Vol. 744, 81-96.
- Jiang, C. & Fu, X. (2007). GA action: turning on de-DELTA repressing signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 461-465.
- Jiang, Y.-X., Nombela, G. & Muñiz, M. (2001). Analysis by DC -EPG of the resistance to Bemisia tabaci on a Mi-tomato line. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 99: 295-302.
- Jin, H., Liu, Y., Yang, K.-Y., Kim, C. Y., Baker, B. & Zhang, S. (2003). Function of a mitogen-activated protein kinase pathway in N gene-mediated resistance in tobacco. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 33: 719-731.
- Jones, D. R. (2003). Plant Viruses Transmitted by Whiteflies. *European Journal of Plant Pathology* 109: 195-219.
- Jones, J. B., Pohronezny, K. L., Stall, R. E. & Jones, J. P. (1986). Survival of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. *Phytopathology* 76: 430-434.
- Jones, J. D. G. (1996). Plant disease resistance genes: structure, function and evolution. *Current Opinion in Biotechnology* 7: 155-160.
- Jones, J. D. G. & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Kalinina, E. V., Chernov, N. N. & Saprin, A. N. (2008). Involvement of thio-, peroxi-, and glutaredoxins in cellular redox-dependent processes. *Biochemistry. Biokhimiia* 73: 1493-1510.
- Kaloshian, I. (2004). Gene-for-gene disease resistance: Bridging insect pest and pathogen defense. *J. Chem. Ecol.* 30: 2419-2438.
- Kaloshian, I., Kinsey, M. G., Ullman, D. E. & Williamson, V. M. (1997). The impact of Meu1-mediated resistance in tomato on longevity, fecundity and behavior of the potato aphid, Macrosiphum euphorbiae. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 83: 181-187.
- Kaloshian, I., Kinsey, M. G., Williamson, V. M. & Ullman, D. E. (2000). Mi - Mediated Resistance Against the Potato Aphid Macrosiphum euphorbiae (Hemiptera: Aphididae) Limits Sieve Element Ingestion. *Environmental Entomology* 29: 690-695.
- Kaloshian, I., Lange, W. H. & Williamson, V. M. (1995). An Aphid-Resistance Locus is Tightly Linked to the Nematode-Resistance Gene, Mi, in Tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 622-625.
- Kaloshian, I. & Walling, L. L. (2005). Hemipterans as plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 491-521.
- Kaloshian, I., Williamson, V. M., Miyao, G., Lawn, D. A. & Westerdahl, B. B. (1996). nematodes identified in California tomatoes. *California Agriculture* 50: 18-19.
- Kaloshian, I., Yaghoobi, J., Liharska, T., Hontelez, J., Hanson, D., Hogan, P., Jesse, T., Wijbrandi, J., Simons, G., Vos, P., Zabel, P. & Williamson, V. M. (1998). Genetic and physical localization of the root-knot nematode

- resistance locus mi in tomato. *Molecular & general genetics* : MGG 257: 376-385.
- Kammen, A. v. (1997). Virus-induced gene silencing in infected and transgenic plants. *Trends in Plant Science* 2: 409-410.
- Kandoth, P. K., Ranf, S., Pancholi, S. S., Jayanty, S., Walla, M. D., Miller, W., Howe, G. A., Lincoln, D. E. & Stratmann, J. W. (2007). Tomato MAPKs LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 function in the systemin-mediated defense response against herbivorous insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 12205-12210.
- Kang, J.-H., Wang, L., Giri, A. & Baldwin, I. T. (2006). Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Manduca sexta*. *The Plant Cell* 18: 3303-3320.
- Kant, M. R., Ament, K., Sabelis, M. W., Haring, M. A. & Schuurink, R. C. (2004). Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiology* 135: 483-495.
- Kanzaki, H., Saitoh, H., Ito, A., Fujisawa, S., Kamoun, S., Katou, S., Yoshioka, H. & Terauchi, R. (2003). Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Pathology* 4: 383-391.
- Kawano, T. (2003). Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Reports* 21: 829-837.
- Kawchuk, L. M., Hachey, J., Lynch, D. R., Kulcsar, F., van Rooijen, G., Waterer, D. R., Robertson, a., Kokko, E., Byers, R., Howard, R. J., Fischer, R. & Prufer, D. (2001). Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 6511-6515.
- Keen, N. T. (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual review of genetics* 24: 447-463.
- Kempema, L. A., Cui, X. P., Holzer, F. M. & Walling, L. L. (2007). Arabidopsis transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. *Plant Physiology* 143: 849-865.
- Kessler, A. & Baldwin, I. T. (2002). Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual review of plant biology* 53: 299-328.
- Khatri, P. & Drăghici, S. (2005). Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. *Bioinformatics (Oxford, England)* 21: 3587-3595.
- Khokhlatchev, a. V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E. & Cobb, M. H. (1998). Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93: 605-615.
- Kiedrowski, S., Kawalleck, P., Hahlbrock, K., Somssich, I. E. & Dangl, J. L. (1992). Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent

- on the Arabidopsis RPM1 disease resistance locus. *The EMBO journal* 11: 4677-4684.
- KLIEBENSTEIN, D. J. (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through Arabidopsis thaliana tinged glasses. *Plant, Cell and Environment* 27: 675-684.
- Kobe, B. & Kajava, A. V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology* 11: 725-732.
- Korth, K. L. (2003). Profiling the response of plants to herbivorous insects. *Genome biology* 4: 221.
- Kotchoni, S. O. & Gachomo, E. W. (2006). The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *Journal of biosciences* 31: 389-404.
- Krishna, P. & Gloor, G. (2001). The Hsp90 family of proteins in Arabidopsis thaliana. *Cell stress & chaperones* 6: 238-246.
- Kumagai, M. H., Donson, J., della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K. & Grill, L. K. (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 1679-1683.
- Kunkel, B. N. & Brooks, D. M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 325-331.
- Kus, J. V., Zaton, K., Sarkar, R. & Cameron, R. K. (2002). Age-Related Resistance in Arabidopsis Is a Developmentally Regulated Defense Response to Pseudomonas syringae. *The Plant Cell* 14: 479-490.
- Kusano, T., Tateda, C., Berberich, T. & Takahashi, Y. (2009). Voltage-dependent anion channels: their roles in plant defense and cell death. *Plant Cell Reports* 28: 1301-1308.
- Kusnierczyk, A., Winge, P., Midelfart, H., Armbruster, W. S., Rossiter, J. T. & Bones, A. M. (2007). Transcriptional responses of Arabidopsis thaliana ecotypes with different glucosinolate profiles after attack by polyphagous Myzus persicae and oligophagous Brevicoryne brassicae. *Journal of Experimental Botany* 58: 2537-2552.
- Lacomme, C. & Roby, D. (1999). Identification of new early markers of the hypersensitive response in Arabidopsis thaliana(1). *FEBS letters* 459: 149-153.
- Langlois-Meurinne, M., Gachon, C. M. M. & Saindrenan, P. (2005). Pathogen-responsive expression of glycosyltransferase genes UGT73B3 and UGT73B5 is necessary for resistance to Pseudomonas syringae pv tomato in Arabidopsis. *Plant Physiology* 139: 1890-1901.
- Lao, N. T., Long, D., Kiang, S., Coupland, G., Shoue, D. A., Carpita, N. C. & Kavanagh, T. A. (2003). Mutation of a family 8 glycosyltransferase gene alters cell wall carbohydrate composition and causes a humidity-sensitive semi-sterile dwarf phenotype in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 53: 647-661.
- Lawton, K. A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T. & Ryals, J. (1996). Benzothiadiazole induces disease

- resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 10: 71-82.
- Laxalt, A. M., ter Riet, B., Verdonk, J. C., Parigi, L., Tameling, W. I., Vossen, J., Haring, M., Musgrave, A. & Munnik, T. (2001). Characterization of five tomato phospholipase D cDNAs: rapid and specific expression of LePLDbeta1 on elicitation with xylanase. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 26: 237-247.
- Lee, S., Kim, S.-Y., Chung, E., Joung, Y.-H., Pai, H.-S., Hur, C.-G. & Choi, D. (2004). EST and microarray analyses of pathogen-responsive genes in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) non-host resistance against soybean pustule pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*). *Functional & integrative genomics* 4: 196-205.
- Leite, G. L. D., Picanço, M., Guedes, R. N. C. & Zanuncio, J. C. (2001). Role of plant age in the resistance of *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* to the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Lepidoptera : Gelechiidae). *Scientia Horticulturae* 89: 103-113.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. & Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- Li, C., Schillmiller, A. L., Liu, G., Lee, G. I., Jayanty, S., Sageman, C., Vrebalov, J., Giovannoni, J. J., Yagi, K., Kobayashi, Y. & Howe, G. A. (2005). Role of beta-oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *The Plant Cell* 17: 971-986.
- Li, L., Lee, G. I. & Howe, G. A. (2002). Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *PNAS* 99: 6416-6421.
- Li, Q., Xie, Q. G., Smith Becker, J., Navarre, D. A. & Kaloshian, I. (2006). Mi-1-Mediated Aphid Resistance Involves Salicylic Acid and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Cascades. *Molecular Plant Microbe Interactions: Mpmi* 19: 655-664.
- Li, Y., Zou, J., Li, M., Bilgin, D. D., Vodkin, L. O., Hartman, G. L. & Clough, S. J. (2008). Soybean defense responses to the soybean aphid. *The New phytologist* 179: 185-195.
- Liharska, T., Wordragen, M., Kammen, A., Zabel, P. & Koornneef, M. (1996). Tomato chromosome 6: effect of alien chromosomal segments on recombinant frequencies. *Genome / National Research Council Canada = Génome / Conseil national de recherches Canada* 39: 485-491.
- Lin, Z., Zhong, S. & Grierson, D. (2009). Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany* 60: 3311-3336.
- Lindbo, J. a., Silva-Rosales, L., Proebsting, W. M. & Dougherty, W. G. (1993). Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance. *The Plant Cell* 5: 1749-1759.

- LIU, F., CUI, L., COX-FOSTER, D. & FELTON, G. W. (2004a). CHARACTERIZATION OF A SALIVARY LYSOZYME IN LARVAL *Helicoverpa zea*. *Journal of Chemical Ecology* 30: 2439-2457.
- Liu, Y., Burch-Smith, T. M., Schiff, M., Feng, S. & Dinesh-Kumar, S. P. (2004b). Molecular Chaperone Hsp90 Associates with Resistance Protein N and Its Signaling Proteins SGT1 and Rar1 to Modulate an Innate Immune Response in Plants. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 2101-2108.
- Liu, Y., Nakayama, N., Schiff, M., Litt, A., Irish, V. F. & Dinesh-Kumar, S. P. (2004c). Virus induced gene silencing of a DEFICIENS ortholog in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Molecular Biology* 54: 701-711.
- Liu, Y., Schiff, M. & Dinesh-Kumar, S. P. (2002a). Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal* 31: 777-786.
- Liu, Y., Schiff, M. & Dinesh-Kumar, S. P. (2004d). Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 38: 800-809.
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R. & Dinesh-Kumar, S. P. (2002b). Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal* 30: 415-429.
- Logemann, E., Reinold, S., Somssich, I. E. & Hahlbrock, K. (1997). A novel type of pathogen defense-related cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Biological Chemistry* 378: 909-913.
- Loh, Y.-t. & Martin, C. B. (1995). The Pto Bacterial Resistance Gene and the Fen Insecticide sensitivity gene encode functional protein kinases with serine/threonine specificity. *Plant Physiology* 108: 1735-1739.
- Lou, Y. & Baldwin, I. T. (2006). Silencing of a Germin-Like Gene in *Nicotiana attenuata* Improves Performance of Native Herbivores. *Plant Physiology* 140: 1126-1136.
- Lowe, S., Browne, M., Boudlejas, S. & De Poorter, M. (2000). 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the global invasive species database. In *The Invasive Species Specialist Group (ISSG)*, 12pp.
- Lu, R., Malcuit, I., Moffett, P., Ruiz, M. T., Peart, J., Wu, A.-J., Rathjen, J. P., Bendahmane, A., Day, L. & Baulcombe, D. C. (2003). High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *The EMBO journal* 22: 5690-5699.
- Luderer, R., Takken, F. L. W., de Wit, P. J. G. M. & Joosten, M. H. a. J. (2002). *Cladosporium fulvum* overcomes Cf-2-mediated resistance by producing truncated AVR2 elicitor proteins. *Molecular microbiology* 45: 875-884.
- MacFarlane, S. A. (1999). Molecular biology of the tobnaviruses. *The Journal of general virology* 80: 2799-2807.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J. M., Ecker, J. R. & Dangl, J. L. (2003). Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* 112: 379-389.
- Mackey, D., Holt, B. F., Wiig, A. & Dangl, J. L. (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell* 108: 743-754.

- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., Dangl, J. L. & Dietrich, R. A. (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics* 26: 403-410.
- MANAGEMENT., C. F. I. P. (1996). Insects and Related Pests of Field Crops. *North Carolina Cooperative Extension Service AG -271, North Carolina State University*.: <http://ipm.ncsu.edu/AG271/contents.html>.
- Mansaray, A. & Sundufu, A. J. (2009). Oviposition, development and survivorship of the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* on soybean, *Glycine max*, and the garden bean, *Phaseolus vulgaris*. *Journal Of Insect Science* 9: 1-6.
- Mantelin, S., Bhattarai, K. K. & Kaloshian, I. (2009). Ethylene contributes to potato aphid susceptibility in a compatible tomato host. *New Phytologist* 183: 444-456.
- Mantelin, S., Peng, H.-C., Li, B., Atamian, H. S., Takken, F. L. W. & Kaloshian, I. (2011). The receptor-like kinase SlSERK1 is required for Mi-1-mediated resistance to potato aphids in tomato. *The Plant Journal* 67: 459-471.
- Marin-Rodriguez, M. C. (2002). Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany* 53: 2115-2119.
- Martin, G. B., Bogdanove, A. J. & Sessa, G. (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual review of plant biology* 54: 23-61.
- Martínez, C., Pons, E., Prats, G. & León, J. (2004). Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *The Plant Journal* 37: 209-217.
- Martínez de Ilarduya, O. & Kaloshian, I. (2001). Mi-1.2 Transcripts Accumulate Ubiquitously in Resistant *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Nematology* 33: 116-120.
- Martínez de Ilarduya, O., Moore, A. E. & Kaloshian, I. (2001). The tomato *Rme1* locus is required for Mi-1-mediated resistance to root-knot nematodes and the potato aphid. *The Plant Journal* 27: 417-425.
- Martínez De Ilarduya, O., Nombela, G., Hwang, C.-f., Williamson, V. M., Muñiz, M. & Kaloshian, I. (2004). *Rme1* is Necessary for Mi-1-Mediated Resistance and Acts Early in the Resistance Pathway. *Society*.
- Martínez de Ilarduya, O., Xie, Q. & Kaloshian, I. (2003). Aphid-induced defense responses in Mi-1-mediated compatible and incompatible tomato interactions. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 16: 699-708.
- Mayer, R. T., Inbar, M., McKenzie, C. L., Shatters, R., Borowicz, V., Albrecht, U., Powell, C. a. & Doostdar, H. (2002). Multitrophic interactions of the silverleaf whitefly, host plants, competing herbivores, and phytopathogens. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 51: 151-169.
- Mayor, A., Martinon, F., De Smedt, T., Pétrilli, V. & Tschopp, J. (2007). A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nature immunology* 8: 497-503.

- Mayrose, M., Bonshtien, A. & Sessa, G. (2004). LeMPK3 is a mitogen-activated protein kinase with dual specificity induced during tomato defense and wounding responses. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 14819-14827.
- Mayrose, M., Ekengren, S. K., Melech-Bonfil, S., Martin, G. B. & Sessa, G. (2006). A novel link between tomato GRAS genes, plant disease resistance and mechanical stress response. *Molecular Plant Pathology* 7: 593-604.
- Mazel, A. & Levine, A. (2002). Induction of glucosyltransferase transcription and activity during superoxide-dependent cell death in Arabidopsis plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 133-140.
- Mckenzie, C. L., Bausher, M., Albano, J. P. & Jr, R. G. S. (2005). Deciphering Changes in Plant Physiological Response to Whitefly Feeding Using Microarray Technology. *Acta Horticulturae (ISHS)* 695: 347-351.
- McKinlay, R. G. (1992). Pests of Solanaceous crops. In *Vegetable crop pests.*, 263-326: Macmillan Press Ltd.
- Medina, I., Carbonell, J., Pulido, L., Madeira, S. C., Goetz, S., Conesa, A., Tárraga, J., Pascual-Montano, A., Nogales-Cadenas, R., Santoyo, J., García, F., Marbà, M., Montaner, D. & Dopazo, J. (2010). Babelomics: an integrative platform for the analysis of transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling. *Nucleic Acids Research* 38: W210-213.
- Meissner, D., Albert, A., Böttcher, C., Strack, D. & Milkowski, C. (2008). The role of UDP-glucose:hydroxycinnamate glucosyltransferases in phenylpropanoid metabolism and the response to UV-B radiation in Arabidopsis thaliana. *Planta* 228: 663-674.
- Mellersh, D. G., Foulds, I. V., Higgins, V. J. & Heath, M. C. (2002). H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 29: 257-268.
- Mes, J. J., van Doorn, a. a., Wijbrandi, J., Simons, G., Cornelissen, B. J. & Haring, M. a. (2000). Expression of the Fusarium resistance gene I-2 colocalizes with the site of fungal containment. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 23: 183-193.
- Messeguer, R., Ganal, M., Vicente, M. C., Young, N. D., Bolkan, H. & Tanksley, S. D. (1991). High resolution RFLP map around the root knot nematode resistance gene (Mi) in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 82.
- Mew, T. W. (1987). Current Status and Future Prospects of Research on Bacterial Blight of Rice. *Annual Review of Phytopathology* 25: 359-382.
- Meyer, Y., Siala, W., Bashandy, T., Riondet, C., Vignols, F. & Reichheld, J. P. (2008). Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochimica et biophysica acta* 1783: 589-600.
- Miles, P. W. (1999). Aphid saliva. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 74: 41-85.
- Milligan, S. B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P. & Williamson, V. M. (1998). The Root Knot Nematode Resistance Gene Mi from Tomato Is

- a Member of the Leucine Zipper, Nucleotide Binding, Leucine-Rich Repeat Family of Plant Genes. *The Plant Cell* 10: 1307-1319.
- Miranda, M. M. M., Picanco, M., Zanuncio, J. C. & Guedes, R. N. C. (1998). Ecological Life Table of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Biocontrol Sci Technology* 8: 597-606.
- Mitchell, H. J. & Barber, M. S. (1994). Elicitor-Induced Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase Activity in Wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant Physiology* 104: 551-556.
- Moon, H., Lee, B., Choi, G., Shin, D., Prasad, D. T., Lee, O., Kwak, S.-S., Kim, D. H., Nam, J., Bahk, J., Hong, J. C., Lee, S. Y., Cho, M. J., Lim, C. O. & Yun, D.-J. (2003). NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 358-363.
- Moran, P. J., Cheng, Y., Cassell, J. L. & Thompson, G. a. (2002). Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* in compatible plant-aphid interactions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 51: 182-203.
- Moran, P. J. & Thompson, G. A. (2001). Molecular Responses to Aphid Feeding in *Arabidopsis* in Relation to Plant Defense Pathways. *Plant Physiology* 125: 1074-1085.
- Morel, J. B. & Dangl, J. L. (1997). The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell death and differentiation* 4: 671-683.
- Moriones, E., Arnó, J., Accotto, G. P., Noris, E. & Cavallarin, L. (1993). First Report of Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Spain. *Plant Disease* 77: 953.
- Moriones, E. & Navas-Castillo, J. (2000). Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus research* 71: 123-134.
- Muñiz, M. & Nombela, G. (2001a). *Bemisia tabaci*: A new clip-cage for biological studies. *European Whitefly Studies Network*: 1-2.
- Muñiz, M. & Nombela, G. (2001b). Differential variation in development of the B- and Q-biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on Sweet Pepper at constant temperatures. *Environmental Entomology* 30: 720-727.
- Muñiz, M., Nombela, G. & Barrios, L. (2002). Within-plant distribution and infestation pattern of the B- and Q-Biotypes of the whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato and pepper plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 104: 369-373.
- Mur, L. A. J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O. & Wasternack, C. (2006). The Outcomes of Concentration-Specific Interactions between Salicylate and Jasmonate Signaling Include Synergy, Antagonism, and Oxidative Stress Leading to Cell Death. *Plant Physiology* 140: 249-262.
- MUSA, P. D. & REN, S.-X. (2005). Development and reproduction of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on three bean species. *Insect Science* 12: 25-30.
- Mutti, N. S., Louis, J., Pappan, L. K., Pappan, K., Begum, K., Chen, M.-S., Park, Y., Dittmer, N., Marshall, J., Reese, J. C. & Reeck, G. R. (2008). A protein from the salivary glands of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, is

- essential in feeding on a host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 9965-9969.
- Mutty, S. D. & Hossenkhan, N. T. (2008). Age-related resistance in commercial varieties of *Solanum tuberosum* to the late blight pathogen, *Phytophthora infestans*. *Plant pathology Journal* 7: 168-173.
- Mysore, K. S., Crasta, O. R., Tuori, R. P., Folkerts, O., Swirsky, P. B. & Martin, G. B. (2002). Comprehensive transcript profiling of Pto- and Prf-mediated host defense responses to infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 32: 299-315.
- Naranjo, S. E. (2001). Conservation and evaluation of natural enemies in IPM systems for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection* 20: 835-852.
- Narváez-Vásquez, J., Pearce, G. & Ryan, C. a. (2005). The plant cell wall matrix harbors a precursor of defense signaling peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 12974-12977.
- Nava-Camberos, U., Riley, D. G. & Harris, M. K. (2001). Temperature and Host Plant Effects on Development, Survival, and Fecundity of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). *Environmental Entomology* 30: 9.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N. P. & Jones, J. D. G. (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current biology* 18: 650-655.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T. & Jones, J. D. G. (2004). The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiology* 135: 1113-1128.
- Neckers, L. & Tatu, U. (2008). Molecular chaperones in pathogen virulence: emerging new targets for therapy. *Cell host & microbe* 4: 519-527.
- Neta-Sharir, I., Isaacson, T., Lurie, S. & Weiss, D. (2005). Dual role for tomato heat shock protein 21: protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. *The Plant Cell* 17: 1829-1838.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B. F. & Dangl, J. L. (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annual review of genetics* 37: 579-609.
- Nombela, G., Beitia, F. J. & Muñiz, M. (2000). Variation in tomato host response to *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in relation to acyl sugar content and presence of the nematode and potato aphid resistance gene Mi. *Bulletin of Entomological Research* 90: 161-167.
- Nombela, G., Beitia, F. J. & Muñiz, M. (2001). A differential interaction study of *Bemisia tabaci* Q-biotype on commercial tomato varieties with or without the Mi resistance gene, and comparative host responses with the B-biotype. *Entomol. Exp. Appl.* 98: 339-344.
- Nombela, G., Garzo, E., Duque, M. & Muñiz, M. (2009). Preinfestations of tomato plants by whiteflies (*Bemisia tabaci*) or aphids (*Macrosiphum*

- euphorbiae) induce variable resistance or susceptibility responses. *Bulletin of Entomological Research* 99: 183-191.
- Nombela, G., Pascual, S., Aviles, M., Guillard, E. & Muñiz, M. (2005). Benzothiadiazole induces local resistance to *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in tomato plants. *Journal of Economic Entomology* 98: 2266-2271.
- Nombela, G., Williamson, V. M. & Muñiz, M. (2003). The root-knot nematode resistance gene Mi-1.2 of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Mol. Plant Microbe Interactions* 16: 645-649.
- O'Donnell, P. J., Schmelz, E., Block, A., Miersch, O., Wasternack, C., Jones, J. B. & Klee, H. J. (2003). Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense response. *Plant Physiology* 133: 1181-1189.
- Ogawa, T. (1993). Methods and strategy for monitoring race distribution and identification of resistance genes to bacterial leaf blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) in rice [*Oryza sativa*]. *JARQ* 27: 71-80.
- Okada, S. F., O'Neal, W. K., Huang, P., Nicholas, R. a., Ostrowski, L. E., Craigen, W. J., Lazarowski, E. R. & Boucher, R. C. (2004). Voltage-dependent anion channel-1 (VDAC-1) contributes to ATP release and cell volume regulation in murine cells. *The Journal of general physiology* 124: 513-526.
- Oldroyd, D. & Staskawicz, B. J. (1998). Genetically engineered broad-spectrum disease resistance in tomato. *PNAS* 95: 10300-10305.
- Oliveira, M. R. V. & Anderson, P. (2001). History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection* 20: 709-723.
- Oliveros, J. C. (2007). *VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn diagrams.*
- OMB, P. D., LR, R. & J, B. M. (1990). Whitefly plant-relationships: plant resistance. In *Whiteflies: their bionomics, pest status and management*, 91-106.
- Oriani, M. A. d. G., Vendramim, J. D. & Vasconcelos, C. J. (2011). Biology of *Bemisia tabaci* (Genn.) B biotype (Hemiptera, Aleyrodidae) on tomato genotypes. *Sci. Agric.* 68: 37-41.
- Orozco-Cardenas, M. & Ryan, C. a. (1999). Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 6553-6557.
- Orzaez, D., Mirabel, S., Wieland, W. H. & Granell, A. (2006). Agroinjection of Tomato Fruits. A Tool for Rapid Functional Analysis of Transgenes Directly in Fruit. *Plant Physiology* 140: 3-11.
- Paal, J., Henselewski, H., Muth, J., Meksem, K., Menéndez, C. M., Salamini, F., Ballvora, A. & Gebhardt, C. (2004). Molecular cloning of the potato Gro1-4 gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 38: 285-297.

- Palumbo, J. C., Horowitz, A. R. & Prabhaker, N. (2001). Insecticidal control and resistance management for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection* 20: 739-765.
- Panter, S. N., Hammond-Kosack, K. E., Harrison, K., Jones, J. D. G. & Jones, D. A. (2002). Developmental control of promoter activity is not responsible for mature onset of Cf-9B-mediated resistance to leaf mold in tomato. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 15: 1099-1107.
- Panter, S. N. & Jones, D. A. (2002). Age-related resistance to plant pathogens. *Advances in Botanical Research* 38: 251-280.
- Panthee, D. R. & Chen, F. (2010). Genomics of fungal disease resistance in tomato. *Current Genomics* 11: 30-39.
- Paolacci, A. R., Tanzarella, O. a., Porceddu, E. & Ciaffi, M. (2009). Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC molecular biology* 10: 11.
- Park, C. Y., Lee, J. H., Yoo, J. H., Moon, B. C., Choi, M. S., Kang, Y. H., Lee, S. M., Kim, H. S., Kang, K. Y., Chung, W. S., Lim, C. O. & Cho, M. J. (2005). WRKY group IId transcription factors interact with calmodulin. *FEBS letters* 579: 1545-1550.
- Pascual, S., Avilés, M., Nombela, G., Muñoz, M. & Beitia, F. (2000). Development of *Bemisia tabaci* (biotype Q) on tomato cultivars with/without the Mi gene. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* 65/2a: 291-292.
- Pautot, V., Holzer, F. M., Reisch, B. & Walling, L. L. (1993). Leucine aminopeptidase: an inducible component of the defense response in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 9906-9910.
- Peart, J. R., Mestre, P., Lu, R., Malcuit, I. & Baulcombe, D. C. (2005). NRG1, a CC-NB-LRR protein, together with N, a TIR-NB-LRR protein, mediates resistance against tobacco mosaic virus. *Current biology : CB* 15: 968-973.
- Pedley, K. F. & Martin, G. B. (2003). Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annual Review of Phytopathology* 41: 215-243.
- Pedley, K. F. & Martin, G. B. (2004). Identification of MAPKs and their possible MAPK kinase activators involved in the Pto-mediated defense response of tomato. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 49229-49235.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D. E., King, K. E., Cowling, R. J., Murphy, G. P. & Harberd, N. P. (1997). The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes & development* 11: 3194-3205.
- Perring, T. M. (2001). The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protection* 20: 725-737.
- Peterson, D. G., Boehm, K. S. & Stack, S. M. (1997). Isolation of milligram quantities of nuclear DNA from tomato (*Lycopersicon esculentum*), A plant containing high levels of polyphenolic compounds. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 148-153.

- Pflieger, S., Blanchet, S., Camborde, L., Drugeon, G., Rousseau, A., Noizet, M., Planchais, S. & Jupin, I. (2008). Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis using a 'one-step' TYMV-derived vector. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 56: 678-690.
- Picard, D. (2002). Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59: 1640-1648.
- Piedras, P., Hammond-kosack, K. E., Harrison, K. & Jones, J. D. G. (1998). Rapid, Cf-9- and Avr9-Dependent Production of Active Oxygen Species in Tobacco Suspension Cultures. *Molecular plant-microbe interactions* 11: 1155-1166.
- Pieterse, C. M. J., Ton, J. & Van Loon, L. C. (2001). Cross-talk between plant defence signalling pathways : boost or burden ? *AgBiotechNet* 3: 1-8.
- Portillo, M., Lindsey, K., Casson, S., García-Casado, G., Solano, R., Fenoll, C. & Escobar, C. (2009). Isolation of RNA from laser-capture-microdissected giant cells at early differentiation stages suitable for differential transcriptome analysis. *Molecular Plant Pathology* 10: 523-535.
- Potting, R., van der Gaag, D. J., Loomans, A., van der Straten, M., Anderson, H., MacLeod, A., Castrillón, J. M. G. & Cambra, G. V. (2013). Tuta absoluta, Tomato leaf miner moth or South American tomato moth. *Ministry of Agriculture, Nature and Food Quality, Plant Protection Service of the Netherlands*.
- Pratt, W. B. & Toft, D. O. (2003). Regulation of Signaling Protein Function and Trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Experimental Biology and Medicine* 228: 111-133.
- Prodromou, C. (2012). The 'active life' of Hsp90 complexes. *Biochimica et biophysica acta* 1823: 614-623.
- Pugin, a., Frachisse, J. M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R. & Guern, J. (1997). Early Events Induced by the Elicitor Cryptogein in Tobacco Cells: Involvement of a Plasma Membrane NADPH Oxidase and Activation of Glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway. *The Plant Cell* 9: 2077-2091.
- Purkayastha, A. & Dasgupta, I. (2009). Virus-induced gene silencing: a versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale* 47: 967-976.
- Puthoff, D. P., Holzer, F. M., Perring, T. M. & Walling, L. L. (2010). Tomato Pathogenesis-related Protein Genes are Expressed in Response to Trialeurodes vaporariorum and Bemisia tabaci Biotype B Feeding. *Journal of Chemical Ecology* 36: 1271-1285.
- Puthoff, D. P., Nettleton, D., Rodermeil, S. R. & Baum, T. J. (2003). Arabidopsis gene expression changes during cyst nematode parasitism revealed by statistical analyses of microarray expression profiles. *The Plant Journal* 33: 911-921.
- Qi, Y., Kawano, N., Yamauchi, Y., Ling, J., Li, D. & Tanaka, K. (2005). Identification and cloning of a submergence-induced gene OsGGT

- (glycogenin glucosyltransferase) from rice (*Oryza sativa* L.) by suppression subtractive hybridization. *Planta* 221: 437-445.
- Qi, Z. & Mew, T. W. (1985). Adult-plant resistance of rice cultivars to bacterial blight. *Plant Disease* 69: 896-898.
- Qin, Q., Bergmann, C. W., Rose, J. K. C., Saladie, M., Kolli, V. S. K., Albersheim, P., Darvill, A. G. & York, W. S. (2003). Characterization of a tomato protein that inhibits a xyloglucan-specific endoglucanase. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 34: 327-338.
- QIU, B.-l., REN, S.-x., MANDOUR, N. S. & LIN, L. (2003). EFFECT OF TEMPERATURE ON THE DEVELOPMENT AND REPRODUCTION OF BEMISIA TABACI B BIOTYPE (HOMOPTERA: ALEYRODIDAE). *Insect Science* 10: 43-49.
- Queiroz, J. M. & Oliveira, P. S. (2001). Tending ants protect honeydew-producing whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). *Environmental Entomology* 30: 295-297.
- Raes, J., Rohde, A., Christensen, J. H., Van de Peer, Y. & Boerjan, W. (2003). Genome-Wide Characterization of the Lignification Toolbox in Arabidopsis 1 [w]. *Plant Physiology* 133: 1051-1071.
- Rairdan, G. J. & Delaney, T. P. (2002). Role of salicylic acid and NIM1/NPR1 in race-specific resistance in arabidopsis. *Genetics* 161: 803-811.
- Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A. M. & Baulcombe, D. C. (2001). Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal* 25: 237-245.
- Reed, J. W. (2001). Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* 6: 420-425.
- Reid, M., Chen, J.-c. & Jiang, C.-z. (2009). Virus-Induced Gene Silencing for Functional Characterization of Genes in Petunia. In *Virus-Induced Gene Silencing*, 381-394.
- Reina, J. & Bejarano, E. R. (1997). Perspectivas en la obtención de resistencia transgénica para TYLCV. In *El virus de la hoja en cuchara del tomate y su vector, Bemisia tabaci. Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Murcia.*, 87-89.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M. & Farmer, E. E. (2000). Differential Gene Expression in Response to Mechanical Wounding and Insect Feeding in Arabidopsis. *The Plant Cell* 12: 707-719.
- Riechmann, J. L. & Ratcliffe, O. (2000). A genomic perspective on plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 423-434.
- Rivas, S. & Thomas, C. M. (2005). Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annual Review of Phytopathology* 43: 395-436.
- Roberts, P. A. & Thomason, I. J. (1986). Variability in reproduction of isolates of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* on resistant tomato genotypes. *Plant Disease* 70: 547-551.
- Roberts, P. A. & Thomason, I. J. (1989). A review of variability in four *Meloidogyne* spp. measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon*. *Agricultural Zoology Reviews* 3: 225-252.

- Robertson, D. (2004). VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annual review of plant biology* 55: 495-519.
- Rojo, E., Solano, R. & Sánchez-Serrano, J. J. (2003). Interactions Between Signaling Compounds Involved in Plant Defense. *Journal of Plant Growth Regulation* 22: 82-98.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D. F., Hirt, H. & Jones, J. D. (1999). Rapid Avr9- and Cf-9 -dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *The Plant Cell* 11: 273-287.
- Rossi, M., Goggin, F. L., Milligan, S. B., Kaloshian, I., Ullman, D. E. & Williamson, V. M. (1998). The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 9750-9754.
- Roth, R., Boudet, A. M. & Pont-lezica, R. (1997). Lignification and cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in developing stems of tomato and poplar : a spatial and kinetic study through tissue printing. *Journal of Experimental Botany* 48: 247-254.
- Rotter, A., Usadel, B., Baebler, S., Stitt, M. & Gruden, K. (2007). Adaptation of the MapMan ontology to biotic stress responses: application in solanaceous species. *Plant Methods* 3: 10.
- Ruiz, M. T., Voinnet, O. & Baulcombe, D. C. (1998). Initiation and Maintenance of Virus-Induced Gene Silencing. *Society* 10: 937-946.
- Ryan, C. A. (1990). Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 28: 425-449.
- Ryan, C. a. (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et biophysica acta* 1477: 112-121.
- Salmeron, J. M., Oldroyd, G. E. D., Rommens, C. M. T., Scofield, S. R., Kim, H.-s., Lavelle, D. T., Dahlbeck, D. & Staskawicz, B. J. (1996). Tomato Prf Is a Member of the Leucine-Rich Repeat Class of Plant Disease Resistance Genes and Lies Embedded within the Pto Kinase Gene Cluster. *Cell* 86: 123-133.
- SANCHEZ-HERNANDEZ, C., LOPEZ, M. G. & DELANO-FRIER, J. P. (2006). Reduced levels of volatile emissions in jasmonate-deficient spr2 tomato mutants favour oviposition by insect herbivores. *Plant, Cell and Environment* 29: 546-557.
- Sangster, T. A. & Queitsch, C. (2005). The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 86-92.
- Sanseverino, W., Roma, G., De Simone, M., Faino, L., Melito, S., Stupka, E., Frusciante, L. & Ercolano, M. R. (2010). PRGdb: a bioinformatics platform for plant resistance gene analysis. *Nucleic Acids Research* 38: D814-821.
- Scandalios, J. G. (1997). Oxidative stress and defense mechanisms in plants - introduction. *Free Radical Biology & Medicine* 23: 471-472.
- Scofield, S. R., Huang, L., Brandt, A. S. & Gill, B. S. (2005). Development of a Virus-Induced Gene-Silencing System for Hexaploid Wheat and Its Use in

- Functional Analysis of the Lr21-Mediated Leaf Rust Resistance Pathway. *Plant Physiology* 138: 2165-2173.
- Schaff, J. E., Nielsen, D. M., Smith, C. P., Scholl, E. H. & Bird, D. M. (2007). Comprehensive Transcriptome Profiling in Tomato Reveals a Role for Glycosyltransferase in Mi-Mediated Nematode Resistance. *Plant Physiology* 144: 1079-1092.
- Schaller, A. & Frasson, D. (2001). Induction of wound response gene expression in tomato leaves by ionophores. *Planta* 212: 431-435.
- Schaller, A. & Oecking, C. (1999). Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *The Plant Cell* 11: 263-272.
- Scheel, D. (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 305-310.
- 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. *PNAS* 97: 11655-11660.
- Schmelz, E. a., Carroll, M. J., LeClere, S., Phipps, S. M., Meredith, J., Chourey, P. S., Alborn, H. T. & Teal, P. E. a. (2006). Fragments of ATP synthase mediate plant perception of insect attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 8894-8899.
- Schmelzer, E., Kruger-Lebus, S. & Hahlbrock, K. (1989). Temporal and Spatial Patterns of Gene Expression around Sites of Attempted Fungal Infection in Parsley Leaves. *The Plant Cell* 1: 993-1001.
- Schornack, S., Ballvora, A., Gürlebeck, D., Peart, J., Ganai, M., Baker, B., Bonas, U. & Lahaye, T. (2004). The tomato resistance protein Bs4 is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates defense responses to severely truncated derivatives of AvrBs4 and overexpressed AvrBs3. *The Plant Journal* 37: 46-60.
- Schuster, D. J., Stansly, P. A. & Polston, J. A. (1996). Expressions of plant damage by Bemisia. In *Bemisia 1995: Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management.*, 153-165.
- Schwessinger, B. & Zipfel, C. (2008). News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 389-395.
- Shah, J. (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 365-371.
- Shen, K. A., Chin, D. B., Arroyo-Garcia, R., Ochoa, O. E., Lavelle, D. O., Wroblewski, T., Meyers, B. C. & Michelmore, R. W. (2002). Dm3 is one member of a large constitutively expressed family of nucleotide binding site-leucine-rich repeat encoding genes. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 15: 251-261.
- Shimono, M., Sugano, S., Nakayama, A., Jiang, C.-J., Ono, K., Toki, S. & Takatsuji, H. (2007). Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. *The Plant Cell* 19: 2064-2076.

- Shirano, Y., Kachroo, P., Shah, J. & Klessig, D. F. (2002). A gain-of-function mutation in an Arabidopsis Toll Interleukin1 receptor-nucleotide binding site-leucine-rich repeat type R gene triggers defense responses and results in enhanced disease resistance. *The Plant Cell* 14: 3149-3162.
- Shirasu, K. & Schulze-Lefert, P. (2003). Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways. *Trends in Plant Science* 8: 252-258.
- Silverstone, A. L. (1998). The Arabidopsis RGA Gene Encodes a Transcriptional Regulator Repressing the Gibberellin Signal Transduction Pathway. *The Plant Cell Online* 10: 155-170.
- Simmons, A. T. & Gurr, G. M. (2005). Trichomes of Lycopersicon species and their hybrids: effects on pests and natural enemies. *Agricultural and Forest Entomology* 8: 1-11.
- Simón, B., Hernández, E., Carnero, A., Beitia, F. J., Aguiar, A., Benazoun, A. & Cenis, J. L. (2001). Biotypes of Bemisia tabaci in the westernMediterranean basin and Atlantic islands. *European Whitefly Symposium, Ragusa (Sicily, Italy)* 104: 25.
- Smith, P. G. (1944). Embryo culture of a tomato species hybrid. *American Society for Horticultural Science* 44: 413-416.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q. & Ecker, J. R. (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes & development* 12: 3703-3714.
- Somssich, I. E., Bollmann, J., Hahlbrock, K., Kombrink, E. & Schulz, W. (1989). Differential early activation of defense-related genes in elicitor-treated parsley cells. *Plant Molecular Biology* 12: 227-234.
- Song, W.-Y., Wang, G.-L., Chen, L.-L., Kim, H.-S., Pi, L.-Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.-X., Zhu, L.-H., Fauquet, C. & Ronald, P. (1995). A Receptor Kinase-Like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science* 271: 1804-1806.
- Song, Y. H., Song, N. Y., Shin, S. Y., Kim, H. J., Yun, D.-J., Lim, C. O., Lee, S. Y., Kang, K. Y. & Hong, J. C. (2008). Isolation of CONSTANS as a TGA4/OBF4 interacting protein. *Molecules and cells* 25: 559-565.
- Spiteller, D., Dettner, K. & Bolan, W. (2000). Gut bacteria may be involved in interactions between plants, herbivores and their predators: microbial biosynthesis of N-acylglutamine surfactants as elicitors of plant volatiles. *Biological Chemistry* 381: 755-762.
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M. C., Korzelius, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J.-P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L. C., Dong, X. & Pieterse, C. M. J. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell* 15: 760-770.
- Stadnik, M. J. & Buchenauer, H. (1999). Accumulation of Autofluorogenic Compounds at the Penetration Site of Blumeria graminis f. sp. tritici is Associated with Both Benzothiadiazole-induced and Quantitative Resistance of Wheat. *Journal of Phytopathology* 147: 615-622.

- Stadnik, M. J. & Buchenauer, H. (2000). Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 25-34.
- Storey, J. D. & Tibshirani, R. (2003). Statistical significance for genomewide studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 9440-9445.
- Strassner, J., Schaller, F., Frick, U. B., Howe, G. A., Weiler, E. W., Amrhein, N., Macheroux, P. & Schaller, A. (2002). Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 32: 585-601.
- Su, Y.-L., Li, J.-M., Li, M., Luan, J.-B., Ye, X.-D., Wang, X.-W. & Liu, S.-S. (2012). Transcriptomic analysis of the salivary glands of an invasive whitefly. *PLoS ONE* 7: e39303.
- Sun, W., Xu, X., Zhu, H., Liu, A., Liu, L., Li, J. & Hua, X. (2010). Comparative transcriptomic profiling of a salt-tolerant wild tomato species and a salt-sensitive tomato cultivar. *Plant & cell physiology* 51: 997-1006.
- Sun, X., Cao, Y., Yang, Z., Xu, C., Li, X., Wang, S. & Zhang, Q. (2004). Xa26, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 37: 517-527.
- Suza, W. P., Rowe, M. L., Hamberg, M. & Staswick, P. E. (2010). A tomato enzyme synthesizes (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine in wounded leaves. *Planta* 231: 717-728.
- Swidzinski, J. A., Leaver, C. J. & Sweetlove, L. J. (2004). A proteomic analysis of plant programmed cell death. *Phytochemistry* 65: 1829-1838.
- T, Y., Y, I. & N, S. (2000). Oligosaccharide Elicitors and Their Receptors for Plant Defense Responses. *Trends Glycoscience Glycotechnology* 12: 113-120.
- Tai, Y.-S., Bragg, J. & Edwards, M. C. (2005). Virus vector for gene silencing in wheat. *BioTechniques* 39: 310, 312, 314.
- Takahashi, A., Casais, C., Ichimura, K. & Shirasu, K. (2003). HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 11777-11782.
- Talarczyk, a. & Hennig, J. (2001). Early defence responses in plants infected with pathogenic organisms. *Cellular & molecular biology letters* 6: 955-970.
- Tang, X., Frederick, R., Zhou, J., Halterman, D., Jia, Y. & Martin, G. (1996). Initiation of Plant Disease Resistance by Physical Interaction of AvrPto and Pto Kinase. *Science (New York, N.Y.)* 274: 2060-2063.
- Tang, X., Mingtang, X., Kim, Y. J., Zhou, J., Klessig, D. F. & Martin, G. B. (1999). Overexpression of P to Activates Defense Responses and Confers Broad Resistance. *The Plant Cell Online* 11: 15-30.

- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.-s., Han, B., Zhu, T., Zou, G. & Katagiri, F. (2003). Quantitative Nature of Arabidopsis Responses during Compatible and Incompatible Interactions with the Bacterial Pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell* 15: 317-330.
- Tao, Y., Yuan, F., Leister, R. T., Ausubel, F. M. & Katagiri, F. (2000). Mutational Analysis of the Arabidopsis Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeat Resistance Gene RPS2. *The Plant Cell* 12: 2541-2554.
- Tateda, C., Watanabe, K., Kusano, T. & Takahashi, Y. (2011). Molecular and genetic characterization of the gene family encoding the voltage-dependent anion channel in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 62: 4773-4785.
- Tateda, C., Yamashita, K., Takahashi, F., Kusano, T. & Takahashi, Y. (2009). Plant voltage-dependent anion channels are involved in host defense against *Pseudomonas cichorii* and in Bax-induced cell death. *Plant Cell Reports* 28: 41-51.
- Testerink, C. & Munnik, T. (2005). Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends in Plant Science* 10: 368-375.
- Thaler, J. S., Agrawal, A. A. & Halitschke, R. (2010). Salicylate-mediated interactions between pathogens and herbivores. *Ecology* 91: 1075-1082.
- Thaler, J. S., Fidantsef, A. L. & Bostock, R. M. (2002). Antagonism between jasmonate- and salicylate-mediated induced plant resistance: effects of concentration and timing of elicitation on defense-related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato. *Journal of Chemical Ecology* 28: 1131-1159.
- Thatcher, L. F., Anderson, J. P. & Singh, K. B. (2005). Plant defence responses : what have we learnt from Arabidopsis ? *Functional Plant Biology* 32: 1-19.
- Thilmony, R., Underwood, W. & He, S. Y. (2006). Genome-wide transcriptional analysis of the Arabidopsis thaliana interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 46: 34-53.
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L. A., Rhee, S. Y. & Stitt, M. (2004). MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 37: 914-939.
- Thompson, G. A. & Goggin, F. L. (2006). Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects. *Journal of Experimental Botany* 57: 755-766.
- Tjallingii, W. F. (2006). Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *Journal of Experimental Botany* 57: 739-745.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E. & Rodríguez-Concepción, M. (2010). Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 11626-11631.

- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters* 4: 147-157.
- Trezzini, G. F., Horrichs, A. & Somssich, I. E. (1993). Isolation of putative defense-related genes from *Arabidopsis thaliana* and expression in fungal elicitor-treated cells. *Plant Molecular Biology* 21: 385-389.
- Turnage, M. a., Muangsan, N., Peele, C. G. & Robertson, D. (2002). Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 30: 107-114.
- Umesha, S. & Kavitha, R. (2011). Induction of cinnamyl alcohol dehydrogenase in bacterial spot disease resistance of tomato. *Journal of Bacteriology Research* 3: 16-27.
- Urbanczyk-Wochniak, E., Usadel, B., Thimm, O., Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Davy, M., Bläsing, O., Kowalczyk, M., Weicht, D., Polinceusz, A., Meyer, S., Stitt, M. & Fernie, A. R. (2006). Conversion of MapMan to allow the analysis of transcript data from Solanaceous species: effects of genetic and environmental alterations in energy metabolism in the leaf. *Plant Molecular Biology* 60: 773-792.
- Urbaneja, A., Vercher, R., Navarro, V., García Mari, F. & Porcuna, J. L. (2007). La polilla del tomate, *Tuta absoluta*. *Phytoma España* 194: 16-23.
- Ussuf, K. K., Laxmi, N. H. & Mitra, R. (2001). Proteinase inhibitors: Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. *Current Science* 80: 847-853.
- van de Ven, W. T., LeVesque, C. S., Perring, T. M. & Walling, L. L. (2000). Local and systemic changes in squash gene expression in response to silverleaf whitefly feeding. *The Plant Cell* 12: 1409-1423.
- Van der Biezen, E. a. & Jones, J. D. (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in biochemical sciences* 23: 454-456.
- Van der plank, J. E. (1968). Disease resistance in plants.: 206pp.
- van der Westhuizen, A. J., Qian, X.-M. & Botha, A.-M. (1998). beta-1,3-Glucanases in wheat and resistance to the Russian wheat aphid. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 103: 125-131.
- van Esse, H. P., Fradin, E. F., de Groot, P. J., de Wit, P. J. G. M. & Thomma, B. P. H. J. (2009). Tomato transcriptional responses to a foliar and a vascular fungal pathogen are distinct. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 22: 245-258.
- van Loon, L. C., Geraats, B. P. J. & Linthorst, H. J. M. (2006). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* 11: 184-191.
- van Ooijen, G., Mayr, G., Kasiem, M. M. A., Albrecht, M., Cornelissen, B. J. C. & Takken, F. L. W. (2008). Structure-function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins. *Journal of Experimental Botany* 59: 1383-1397.
- van Ooijen, G., van den Burg, H. a., Cornelissen, B. J. C. & Takken, F. L. W. (2007). Structure and function of resistance proteins in solanaceous plants. *Annual Review of Phytopathology* 45: 43-72.

- Vanacker, H., Lu, H., Rate, D. N. & Greenberg, J. T. (2001). A role for salicylic acid and NPR1 in regulating cell growth in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 28: 209-216.
- Veenman, L., Shandalov, Y. & Gavish, M. (2008). VDAC activation by the 18 kDa translocator protein (TSPO), implications for apoptosis. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 40: 199-205.
- Ververidis, F., Trantas, E., Douglas, C., Vollmer, G., Kretzschmar, G. & Panopoulos, N. (2007). Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnology journal* 2: 1214-1234.
- Visker, M. H. P. W., Keizer, L. C. P., Budding, D. J., Van Loon, L. C., Colon, L. T. & Struik, P. C. (2003). Leaf position prevails over plant age and leaf age in reflecting resistance to late blight in potato. *Phytopathology* 93: 666-674.
- Voehringer, D. W., Hirschberg, D. L., Xiao, J., Lu, Q., Roederer, M., Lock, C. B., Herzenberg, L. A. & Steinman, L. (2000). Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 2680-2685.
- Voelckel, C. & T. Baldwin, I. (2003). Detecting herbivore-specific transcriptional responses in plants with multiple DDRT-PCR and subtractive library procedures. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 118: 240-252.
- Vogt, T. & Jones, P. (2000). Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends in Plant Science* 5: 380-386.
- von Lintig, J., Welsch, R., Bonk, M., Giuliano, G., Batschauer, A. & Kleinig, H. (1997). Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 12: 625-634.
- von Saint Paul, V., Zhang, W., Kanawati, B., Geist, B., Faus-Kessler, T., Schmitt-Kopplin, P. & Schäffner, A. R. (2011). The Arabidopsis glucosyltransferase UGT76B1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence. *The Plant Cell* 23: 4124-4145.
- Vorwerk, S., Somerville, S. & Somerville, C. (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science* 9: 203-209.
- WALGENBACH, J. F. (1997). Effect of Potato Aphid (Homoptera: Aphididae) on Yield, Quality, and Economics of Staked-Tomato Production. *Journal of Economic Entomology* 90: 996-1004.
- Walling, L. L. (2008). Avoiding effective defenses: Strategies employed by phloem-feeding insects. *Plant Physiology* 146: 859-866.
- Wang, C., Cai, X., Wang, X. & Zheng, Z. (2006). Optimisation of tobacco rattle virus-induced gene silencing in Arabidopsis. *Functional Plant Biology* 33: 347.

- Wang, D., Amornsiripanitch, N. & Dong, X. (2006a). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLOS Pathogens* 2: e123.
- Wang, F., Zhu, D., Huang, X., Li, S., Gong, Y., Yao, Q., Fu, X., Fan, L.-M. & Deng, X. W. (2009). Biochemical insights on degradation of Arabidopsis DELLA proteins gained from a cell-free assay system. *The Plant Cell* 21: 2378-2390.
- Wang, G.-F., Wei, X., Fan, R., Zhou, H., Wang, X. X. X. X., Yu, C., Dong, L., Dong, Z., Kang, Z., Ling, H., Shen, Q.-H., Wang, D. & Zhang, X. (2011). Molecular analysis of common wheat genes encoding three types of cytosolic heat shock protein 90 (Hsp90): functional involvement of cytosolic Hsp90s in the control of wheat seedling growth and disease resistance. *New Phytologist* 191: 418-431.
- Wang, H., Hao, L., Shung, C.-Y., Sunter, G. & Bisaro, D. M. (2003). Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *The Plant Cell* 15: 3020-3032.
- Wang, X. (2005). Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant Physiology* 139: 566-573.
- Wang, X., Devaiah, S. P., Zhang, W. & Welti, R. (2006b). Signaling functions of phosphatidic acid. *Progress in lipid research* 45: 250-278.
- Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., Neumerkel, J., Feussner, I. & Miersch, O. (2006). The wound response in tomato--role of jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology* 163: 297-306.
- Wegele, H., Müller, L. & Buchner, J. (2004). Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 151: 1-44.
- Weretilnyk, E. A. (2001). Maintaining Methylation Activities during Salt Stress. The Involvement of Adenosine Kinase. *Plant Physiology* 125: 856-865.
- Whalen, M. C., Innes, R. W., Bent, A. F. & Staskawicz, B. J. (1991). Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of Arabidopsis and a bacterial locus determining avirulence on both Arabidopsis and soybean. *The Plant Cell* 3: 49-59.
- Whitbred, J. M. & Schuler, M. A. (2000). Molecular characterization of CYP73A9 and CYP82A1 P450 genes involved in plant defense in pea. *Plant Physiology* 124: 47-58.
- Wijkamp, I., Almarza, N., Goldbach, R. W. & Peters, D. (1995). Distinct levels of specificity in Thrips transmission of tospoviruses. *Phytopathology* 85: 1069-1074.
- Willats, W. G., McCartney, L., Mackie, W. & Knox, J. P. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology* 47: 9-27.
- Williamson, V. M. & Colwell, G. (1991). Acid Phosphatase-1 from Nematode Resistant Tomato. *Plant Physiology* 97: 139-146.

- Williamson, V. M., Ho, J.-Y., Wu, F. F., Miller, N. & Kaloshian, I. (1994). A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, Mi, in tomato. *Theor Appl Genet* 87: 757-763.
- Wordragen, M. F., Weide, R., Liharska, T., Steen, A., Koornneef, M. & Zabel, P. (1994). Genetic and molecular organization of the short arm and pericentromeric region of tomato chromosome 6. *Euphytica* 79: 169-174.
- Wyss, U., Grundler, F. M. W. & Munch, A. (1992). The Parasitic Behaviour of Second-Stage Juveniles of Meloidogyne Incognita in Roots of Arabidopsis Thaliana. *Nematologica* 38: 98-111.
- Xiao, S., Brown, S., Patrick, E., Brearley, C. & Turner, J. G. (2003). Enhanced Transcription of the Arabidopsis Disease Resistance Genes RPW8.1 and RPW8.2 via a Salicylic Acid-Dependent Amplification Circuit Is Required for Hypersensitive Cell Death. *The Plant Cell Online* 15: 33-45.
- Xiong, L. & Yang, Y. (2003). Disease Resistance and Abiotic Stress Tolerance in Rice Are Inversely Modulated by an Abscisic Acid – Inducible Mitogen-Activated Protein Kinase. *The Plant Cell* 15: 745-759.
- Yan, H.-Z. & Liou, R.-F. (2006). Selection of internal control genes for real-time quantitative RT-PCR assays in the oomycete plant pathogen Phytophthora parasitica. *Fungal genetics and biology : FG & B* 43: 430-438.
- Yan, Y., Peng, L., Liu, W.-X., Wan, F.-H. & Harris, M. K. (2011). Host plant effects on alkaline phosphatase activity in the whiteflies, Bemisia tabaci Biotype B and Trialeurodes vaporariorum. *2Journal of Insect Science* 11: 1-13.
- Yang, D.-H., Hettenhausen, C., Baldwin, I. T. & Wu, J. (2010). BAK1 regulates the accumulation of jasmonic acid and the levels of trypsin proteinase inhibitors in Nicotiana attenuata's responses to herbivory. *Journal of Experimental Botany* 62: 641-652.
- Yang, D.-L., Yao, J., Mei, C.-S., Tong, X.-H., Zeng, L.-J., Li, Q., Xiao, L.-T., Sun, T.-p., Li, J., Deng, X.-W., Lee, C. M., Thomashow, M. F., Yang, Y., He, Z. & He, S. Y. (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: E1192-1200.
- Yang, S. F. & Hoffman, N. E. (1984). Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 155-189.
- Yang, T.-C. & Chi, H. (2006). Life tables and development of Bemisia argentifolii (Homoptera: Aleyrodidae) at different temperatures. *Journal of Economic Entomology* 99: 691-698.
- Yee, W. L., Toscano, N., Chu, C.-C., Henneberry, T. J. & Nichols, R. L. (1996). Bemisia argentifolii (Homoptera: Aleyrodidae) action thresholds and cotton photosynthesis. *Environmental Entomology* 25: 1267-1273.
- Yudelman, M., Ratta, A. & Nygaard, D. (1998). Pest Management and Food Production: Looking to the Future. *International Food Policy Research Institute* 25: 59pp.

- Zarate, S. I., Kempema, L. A. & Walling, L. L. (2007). Silverleaf whitefly induces salicylic acid Defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant Physiology* 143: 866-875.
- Zhang, F., Zhu, L. & He, G. (2004). Differential gene expression in response to brown planthopper feeding in rice. *Journal of Plant Physiology* 161: 53-62.
- Zhang, G.-F. & Wan, F.-H. (2012). Suitability Changes With Host Leaf Age for Bemisia tabaci B Biotype and Trialeurodes vaporariorum. *Environmental Entomology* 41: 1125-1130.
- Zhang, P.-J., Zheng, S.-J., van Loon, J. J. A., Boland, W., David, A., Mumm, R. & Dicke, M. (2009). Whiteflies interfere with indirect plant defense against spider mites in Lima bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 21202-21207.
- Zhang, S. & Klessig, D. F. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science* 6: 520-527.
- Zhang, Z., Quick, M. K., Kanelakis, K. C., Gijzen, M. & Krishna, P. (2003). Characterization of a plant homolog of hop, a cochaperone of hsp90. *Plant Physiology* 131: 525-535.
- Zhou, H., Li, S., Deng, Z., Wang, X., Chen, T., Zhang, J., Chen, S., Ling, H., Zhang, A., Wang, D. & Zhang, X. (2007a). Molecular analysis of three new receptor-like kinase genes from hexaploid wheat and evidence for their participation in the wheat hypersensitive response to stripe rust fungus infection. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 52: 420-434.
- Zhou, S., Wei, S., Boone, B. & Levy, S. (2007b). Microarray analysis of genes affected by salt stress in tomato. *African Journal of Environmental Science and Technology* 1: 14-26.
- Zhu-salzman, K., Salzman, R. A., Ahn, J.-e. & Koiwa, H. (2004). Transcriptional Regulation of Sorghum Defense Determinants against a Phloem-Feeding Aphid. *Plant Physiology* 134: 420-431.
- Zhu, X., Caplan, J., Mamillapalli, P., Czymbek, K. & Dinesh-Kumar, S. P. (2010). Function of endoplasmic reticulum calcium ATPase in innate immunity-mediated programmed cell death. *The EMBO journal* 29: 1007-1018.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D. G., Felix, G. & Boller, T. (2004). Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature* 428: 764-767.