AISLAMIENTO DE SECUENCIAS EXPRESADAS DIFERENCIALMENTE DURANTE LA RESPUESTA DE DEFENSA AL ATAQUE DE LA MOSCA BLANCA (*Aleurotrachelus socialis*) EN EL CULTIVO DE YUCA (*Manihot esculenta* CRANTZ) MEDIANTE GENÓMICA FUNCIONAL

ADRIANA BOHÓRQUEZ CHAUX

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADOS

PALMIRA 2011

AISLAMIENTO DE SECUENCIAS EXPRESADAS DIFERENCIALMENTE DURANTE LA RESPUESTA DE DEFENSA AL ATAQUE DE LA MOSCA BLANCA (*Aleurotrachelus socialis*) EN EL CULTIVO DE YUCA (*Manihot esculenta* CRANTZ) MEDIANTE GENÓMICA FUNCIONAL

ADRIANA BOHÓRQUEZ CHAUX

Trabajo de tesis como requisito parcial para optar al título de Doctor en Ciencias Agropecuarias Línea de Investigación Mejoramiento Genético Vegetal

DIRIGIDO POR:

JOSEPH TOHME, Ph.D.
HERNÁN CEBALLOS, Ph.D.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADOS

PALMIRA 2011

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
MEJORAMIENTO GENETICO VEGETAL

En Palmira a los 07 días del mes de junio de 2011, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores: SILVIA RESTREPO, CAMILO LOPEZ y LUIS AUGUSTO BECERRA

Para calificar la Tesis de Grado de:

ADRIANA BOHORQUEZ CHAUX

Titulada:

"AISLAMIENTO DE SECUENCIAS EXPRESADAS DIFERENCIALMENTE DURANTE LA RESPUESTA DE DEFENSA AL ATAQUE DE MOSCA BLANCA (Aleurotrachelus socialis) EN YUCA (Manihot esculenta Crantz) MEDIANTE GENOMICA FUNCIONAL" bajo la dirección de Joseph Tohme, Ph.D. y Hernán Ceballos, Ph.D.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los Doctores SILVIA RESTREPO, CAMILO LOPEZ y LUIS AUGUSTO BECERRA y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADA X

REPROBADA ____

SILVIA RESTREPO

CAMILO LOPEZ

LUIS AUGUSTO BECERRA

AGRADECIMIENTOS

Al CIAT, porque ha sido mi escuela, mi segundo hogar, la oportunidad de poder ejercer la biología.

A la Universidad Nacional de Colombia y sus profesores, porque la educación es el futuro de nuestro país.

Al Dr. Joe Tohme por brindarme la oportunidad de hacer mi doctorado y por su incondicional apoyo.

A la Fundación Ginés-Mera mi eterno agradecimiento por el apoyo financiero para la realización de mis estudios doctorales.

Al Dr. Anthony Bellotti, Bernardo Arias, y a los muchachos de Entomología de Yuca del CIAT, por toda la colaboración en los bioensayos y su valiosa y querida amistad.

A Diana Bernal por sus enseñanzas en microarreglos y su colaboración en el laboratorio.

A Fausto Rodríguez sobretodo por su amistad y por su invaluable colaboración y ayuda en los análisis de secuencias.

A los Drs. Silvia Restrepo, Luis Augusto Becerra y Camilo López por sus valiosos aportes y correcciones del documento de tesis.

A Claudia Zúñiga y Olga Lucía Cruz por toda su ayuda, su increíble eficiencia, su cariño y amistad.

A mis grandes amigos y compañeros del alma Gerardo Gallego, Eliana Gaitán, Olga Ximena Giraldo y Luisa Fory, por sus consejos, voces de aliento y su incondicional amistad.

A mis amiguitas Lili y Auradela, por su compañía y amistad.

A mis compañeros del laboratorio que están en CIAT y a los que han partido a otros rumbos, Federico, Chikelu, Diego Cortés, Normita, Leo F. Galindo, Adriana Almeida, Quimbaya, Juliana, Paola Sotelo, Huguito, Fabio Escobar, Rosita, Janet, Myriam Cristina, Roossevelt, Paul, Haritold, Carolina, Maryam, Constanza, Lucia, Alicia, las Marus, Claudia, Pablito, Carlos, por todo lo compartido en la cotidianeidad de nuestro trabajo y en el día a día, con los cuales se construyen grandes amistades para toda la vida.

Dedico esta tesis a la memoria de mis hermanas Lucero y Marta
A mis padres Julio y Naty
A mi hijo Juan Esteban y mi esposo Jorge Enrique

La facultad y los jurados de tesis no se harán
responsables de las ideas emitidas
por el autor. Artículo 24, resolución 04 de 1974

CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCIÓN *21*

1 MARCO DE REFERENCIA **24**

1.1 Cultivo de la yuca *24*

1.1.1 Principales plagas del cultivo de la yuca: las moscas blancas 24

1.1.2 Clasificación taxonómica de las especies de mosca blanca encontradas en yuca 25

1.1.3 Descripción de los estados biológicos de *A. socialis* 26

1.1.3.1 Estado de huevo 26

1.1.3.2 Instares ninfales 27

1.1.3.3 Estado adulto 28

1.1.4 Daño ocasionado por la mosca blanca *A. socialis* 29

1.1.5 Manejo de *A. socialis* en el cultivo de yuca 30

1.1.5.1 Control mediante resistencia varietal 30

1.1.6 Pubescencia en genotipos de yuca 32

1.1.7 Pubescencia y grado de daño por *A. socialis* 32

1.2 Defensas naturales de la yuca contra artrópodos-plaga *33*

1.2.1 Mecanismos físicos 33

1.2.2 Mecanismos químicos 33

1.3 Resistencia en plantas *34*

1.3.1 Inmunidad en plantas a insectos herbívoros 35

1.3.1.1 Eventos tempranos de señalización en la interacción planta-insecto 38

1.3.1.1.1 Daño mecánico versus herbivoría 39

1.3.1.1.2 Secreciones orales de insectos 39

1.3.1.1.3 Resistencia mediada por *genes R* en áfidos 41

1.3.1.1.4 Flujo de iones calcio (Ca^{2+}), potencial de membrana y proteínas kinasas Mitogen-activated (MAPK) 42

1.3.1.2 Regulación de las respuestas de defensa por Jasmonatos (JA) 43

1.3.1.2.1 Funciones de los jasmonatos (JA) en inmunidad de plantas a insectos 44

1.3.1.2.2 Percepción de los JA 45

1.3.1.2.3 Especificidad de las defensas basadas en JA 46
1.3.1.2.4 Señalización sistémica 48
1.3.1.3 Respuestas de defensa directas 49
1.3.1.3.1 Metabolitos secundarios 49
1.3.1.3.2 Proteínas de defensa 51
1.3.1.4 Compuestos volátiles como mediadores de defensas directas e indirectas 53
1.3.1.4.1 Comunicación entre y dentro de plantas mediada por volátiles 54
1.3.2 Estudios moleculares de la interacción Planta-Mosca Blanca 55
1.3.2.1 El papel de las PR, de los metabolitos secundarios y volátiles en resistencia a Hemípteros 56
1.3.2.2 Secreciones orales de Hemípteros: inductores de defensa 57
1.3.2.3 Interacción A. thaliana-B. tabaci 58
1.4 Genética y genómica de yuca *58*
1.4.1 Genómica Funcional 60
1.4.1.1 Librerias sustractivas: herramienta para encontrar genes diferencialmente expresados 61
1.4.1.2 La metodología DSC (*Diferencial Subtraction Chain*) 62
1.4.1.3 Microarreglos de ADN 63
1.4.1.4 Construcción de microarreglos de ADN 63
1.4.1.5 Cassava Unigene Microarray 65
1.5 Bioinformática *66*
1.5.1 Bases de datos 67
1.5.1.1 Bases de datos primarias de secuencias de proteínas 68
1.5.1.2 Bases de datos secundarias 69
1.5.2 Búsqueda y comparación de secuencias en bases de datos 70
2 MODELO METODOLÓGICO **72**
2.1 Sitio de trabajo y Material vegetal *72*
2.2 Estrategia *72*
2.3 Ensayos de invernadero *73*
2.4 Construcción de librerías sustractivas *76*
2.4.1 Aislamiento de ARN 76

2.4.2 Hibridación sustractiva 76
2.4.3 Amplificación de insertos de los clones recombinantes por PCR 80
2.5 Secuenciación y análisis bioinformático *81*
2.6 RT-PCR *82*
2.7 Construcción y análisis de microarreglos *83*
2.7.1 Construcción del microarreglo 83
2.7.2 Diseño experimental para microarreglos 84
2.7.3 Análisis de los datos 85
2.7.3.1 Normalización de los datos 88
2.7.3.2 Identificación de los genes diferenciales 89
2.7.3.3 Métodos de agrupamiento y visualización de los datos 92
3 RESULTADOS **93**
3.1 Extracción de ARN total y síntesis de ADNc *93*
3.2 Hibridización sustractiva *93*
3.2.1 Amplificación de insertos de los clones recombinantes por PCR 97
3.2.2 Secuenciación y análisis bioinformático de la librería sustractiva 97
3.2.2.1 Secuencias diferencialmente inducidas por *A. socialis* en yuca 99
3.2.2.1.1 Librerías sin sustraer 103
3.2.2.1.2 Librerías reversas 104
3.2.2.1.3 Librerías sustractivas 105
3.2.2.2 RT-PCR de genes implicados en defensa 109
3.3 Microarreglos *110*
3.3.1 Normalización de los datos 110
3.3.2 Identificación de los genes diferenciales en el Cassava Unigene Microarray 114
3.3.3 Genes regulados por *A. socialis* en el Cassava Unigene Microarray 114
3.3.3.1 Clasificación de los genes regulados por *A. socialis* en al Cassava Unigene Microarray 117
3.3.3.2 Metabolismo de carbohidratos y fotosíntesis 123
3.3.3.3 Metabolismo de Nitrógeno 123
3.3.3.4 Genes de defensa 124
3.3.3.4.1 Regulación de genes de defensa inducidos por JA, ET y SA 125

3.3.3.5 Estrés oxidativo 127
3.3.3.6 Señales de transducción 129
3.3.3.6.1 Factores de transcripción 130
3.3.3.6.2 Flujo de iones calcio (Ca^{2+}) y proteínas kinasas Mitogen-activated (MAPK)131
3.3.3.7 Biosíntesis y modificación de pared celular 132
3.3.3.8 Metabolismo secundario 133
3.3.3.9 Proteólisis 134
3.3.3.10 Traducción y síntesis de proteínas y aminoácidos 135
3.3.3.11 Respuestas a diferentes clases de estrés y estímulos 135
3.3.3.11.1 Respuestas a estreses abióticos 137
3.3.3.12 Transporte y tráfico de proteínas 138
3.3.3.13 Genes regulados implicados en metabolismo celular, glicólisis, desarrollo, estructura 139
3.3.3.14 Silenciamiento de genes 140

4 DISCUSIÓN GENERAL 141

4.1 4.1 Evidencia biológica de la resistencia de MEcu 72 a A. socialis 141
4.2 Regulación de genes durante la interacción yuca- Aleurotrachelus socialis 143
4.2.1 Reconocimiento: ¿qué percibe la yuca en la mosca blanca para disparar la respuesta de defensa? 145
4.2.1.1 Fuente de inductores en interacciones Planta-Mosca blanca 145
4.2.1.1.1 Inductores salivares 145
4.2.1.1.2 Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs): La quitina 147
4.2.2 Después de la inducción es disparada la respuesta de defensa 149
4.2.2.1 Eventos tempranos: despolarización de membrana, flujo de iones calcio y proteínas kinasas Mitogen-activated (MAPK) 149
4.2.2.2 Aleurotrachelus socialis induce en yuca, enzimas que están envueltas en la generación y detoxificación de ROS 150
4.2.2.3 Aleurotrachelus socialis induce las vías de JA/ET en yuca 151
4.2.2.3.1 Secuencias similares a genes implicados en biosíntesis de JA 153
4.2.2.3.2 Secuencias similares a genes involucrados en regulación y señalización de JA y ET 156

4.2.2.3.2.1 CEV1 (CONSTITUTIVE EXPRESSION OF VSP 1) 156
4.2.2.3.2.2 EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE 2) 156
4.2.2.3.2.3 La vía de señalización de JA tiene dos ramas antagónicas corriente abajo de *COI1*, reguladas por *MYC2* y *ERF* 157
4.2.2.4 Activación de genes de defensa 160
4.2.2.4.1 Proteínas inducibles por artrópodos: ataque directo al intestino del insecto 160
4.2.2.4.1.1 Cysteine proteinase inhibitor 6 (CYS6) 162
4.2.2.4.2 Proteínas relacionadas con Patogenicidad (PR) 164
4.2.2.4.2.1 Quitinasa básica (*CHIB* o *PR-3*) 165
4.2.2.4.2.2 PR-1 básica (*PRB1*) 166
4.2.2.5 Aleurotrachelus socialis induce remodelación de pared celular en yuca? 170
4.2.2.6 El metabolismo primario de la yuca es influenciado por *A. socialis* 170
4.2.2.7 Degradación de proteínas en las respuestas de defensa 172
4.3 Modelo hipótetico propuesto (Figura 38) *175*
5 CONCLUSIONES **177**
6 PERSPECTIVAS **181**
6.1 Validación de los genes diferencialmente expresados *181*
6.2 Identificación y caracterización de inductores en la mosca blanca *181*
6.3 Identificación y caracterización funcional de la señalización de defensa en la yuca *182*
6.3.1 Aplicación de genética reversa 182
6.3.2 Silenciamiento del ARN 183
6.3.3 Identificación de marcadores moleculares y construcción de mapas genéticos 184
6.3.4 Transformación genética 185
BIBLIOGRAFIA **186**

LISTA DE TABLAS

Tabla 1**:** Tiempos de colecta de material (hojas) infestadas con *A. socialis* para la construcción de la librería sustractiva y los microarreglos, de acuerdo al ciclo de vida del insecto (una colecta por cada estadío). 75

Tabla 2**:** Comparaciones utilizadas para la sustracción, entre los diferentes tiempos de colecta. "Ecu" corresponde a MEcu 72 (resistente) infestado, "ESI" corresponde a MEcu 72 sin infestar y "CMC" corresponde a CMC 40 (suceptible) infestado. 76

Tabla 3**:** Condiciones de amplificación por PCR de los clones de las librerias sustractivas. 80

Tabla 4**:** Hibridizaciones realizadas, las cuales fueron 12 por cada una de las tres réplicas biológicas para un total de 36 en el Cassava Unigene Microarray. 83

Tabla 5**:** Nombre de las librerías sustractivas construidas con los métodos DSC y SSH, cada una corresponde a una placa de cultivo de 384 pozos, para un total de 3072clones. 96

Tabla 6**:** Mejores hit encontrados en GenBank utilizando el algoritmo MEGABLAST de las secuencias obtenidas en las librerías sustractivas y mapeadas en el genoma de yuca. 99

Tabla 7**:** Listado de genes regulados por *A. socialis* en yuca, clasificados por categorías funcionales diferencialmente expresados en el Cassava Unigene Microarray. 118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Plantas de yuca de 45 días de edad infestadas con adultos de A. socialis utilizando jaulas-pinza. 74

Figura 2. Plantas de yuca de 45 días de edad en materas plásticas infestadas con adultos de *A. socialis* utilizando jaulas-pinza, ubicadas en las jaulas de madera de 1mt x 1mt cubiertas de muselina. 74

Figura 3. Ciclo de vida de *A. socialis*. Tiempos calculados sobre el genotipo susceptible CMC 40. (Tomado de Arias, 1995) 75

Figura 4. Representación esquemática del método DSC. 77

Figura 5. Representación esquemática del método de hibridización sustractiva SSH (Adaptado de *PCR-Select cDNA Subtraction kit, User Manual*). 80

Figura 6. Salida del programa GOMP mostrando el resultado de la búsqueda de una secuencia EST (CK643792), se observan los términos de *Gene Ontology* (GO), *Kegg orthology* (KO), *Enzyme codes* (EC) y el reporte del BLAST donde se muestra la secuencia más similar en el Gene Bank y en *TAIR*. 82

Figura 7. Esquema del diseño experimental utilizado para el análisis de microarreglos. Se utilizó el mismo esquema para las dos comparaciones, aquí se muestra el caso del resistente infestado vs. el susceptible infestado. 85

Figura 8**.** flujograma donde se muestra los diferentes pasos como son procesados los datos de microarreglos. 86

Figura 9. Ventanas del programa *VersArray Analyzer® ChipReader* donde se muestra la forma que se escanean los microarreglos. 87

Figura 10. gráfico interactivo de SAM donde se observan los puntos del microarreglo hibridizado con los puntajes observados (eje Y) y los puntajes esperados (eje X). 91

Figura 11. ARNs extraídos con el método de Cloruro de Litio. "E" corresponde a Ecu 72 infestado y "ESI" a Ecu 72 sin infestar, en cada tiempo y cada réplica biológica. 93

Figura 12. ADNc amplificados con el kit *SMART^{TM} PCR cDNA synthesis* CLONTECH. "E" corresponde a Ecu 72 infestado en cada tiempo y cada réplica biológica. 93

Figura 13. Gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata, donde las flechas muestran las diferencias en los productos de PCR obtenidos a partir de las tres rondas de hibridaciones sustractivas con el método DSC. 95

Figura 14. PCR "anidado" a partir de dos rondas de hibridización sustractiva obtenidos con el método SSH. 96

Figura 15. Gel de agarosa en el que se muestran productos de PCR obtenidos a partir de algunas librerías Sustractivas, escogidos al azar. 97

Figura 16. Diagrama de torta en el que se muestran la clasificación de los genes por categorías funcionales inferidas por GO, obtenidos en la librería sustractiva en respuesta al ataque de *A. socialis.* 103

Figura 17. Análisis RT-PCR de las secuencias de genes implicados en defensa. 110

Figura 18. Tabla de datos obtenida del procesamiento de los datos con *VersArray Analyzer*®111

Figura 19. Gráficos *RI* a la derecha e Histograma de frecuencias a la izquierda, de las comparaciones (de arriba hacia abajo) EyESI(1y2), (3y4), (5y6) y EyC(1y2), (3y4), (5y6). 114

Figura 20. Gráfico de torta donde se clasifica el número de genes regulados en cada comparación y tiempo. 115

Figura 21. Genes regulados en las dos comparaciones EyC y EyESI a través de los diferentes tiempos en que *A. socialis* se alimenta sobre yuca. 116

Figura 22. Diagrama de Venn donde se muestran el número total de genes regulados para cada comparación y los genes que fueron regulados en ambas. Los genes reprimidos se muestran en letra itálica. 116

Figura 23. Diagrama de torta en el que se muestran la clasificación de los genes regulados en el Cassava Unigene Microarray, por categorías funcionales inferidas por GO. 117

Figura 24. Gráfico de barras donde se muestra la distribución de los genes regulados por *A. socialis* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en metabolismo de carbohidratos y fotosíntesis. 123

Figura 25. Gráfico de barras donde se muestra la distribución de los genes regulados por *A. socialis* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en respuesta de defensa. 124

Figura 26. Gráfico de barras donde se muestra la distribución de los genes regulados por *A. socialis* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en estrés oxidativo. 127

Figura 27. Gráfico de barras donde se muestra la distribución de los genes regulados por *A. socialis* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en señales de transducción.129

Figura 28. Gráfico de barras donde se muestra la distribución de los genes regulados por *A. socialis* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en biosíntesis y modificación de pared celular. 132

Figura 29. Gráfico de barras donde se muestra la distribución de los genes regulados por *A. socialis* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en proteólisis. 134

Figura 30. Gráfico de barras donde se muestra la distribución de los genes regulados por *A. socialis* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en traducción. 135

Figura 31. Gráfico de barras donde se muestra la distribución de los genes regulados por *A. socialis* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en respuesta a estreses y estímulos. 136

Figura 32. Gráfico de barras donde se muestra la distribución de los genes regulados por *A. socialis* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en transporte y tráfico de proteínas. 138

Figura 33. Porcentaje de mortalidad de ninfas y tiempo de desarrollo de *A. socialis* sobre diferentes genotipos de yuca, entre estos MEcu 72 y CMC 40. E (Egg, huevo), N1, N2, N3 y N4 los estadíos ninfales. (Tomado de Bellotti & Arias, 2001). 141

Figura 34. Detalle de las hojas infestadas donde se muestran las diferencias en la población de ninfas de instar III de *A. socialis* sobre genotipos de yuca, (A) CMC 40 y (B) MEcu 72.142

Figura 35. Representación esquemática de la ingestión de floema por la mosca blanca. 147

Figura 36. Esquema que muestra la vía metabólica del ácido α-linolénico precursor del ácido jasmónico. 155

Figura 37. Modelo hipotético del papel de las vías metabólicas JA/ET en la respuesta de defensa de la yuca a *A. socialis.* 169

Figura 38. Modelo hipotético de la respuesta de defensa de MEcu 72 cuando es atacada por *A. socialis*, basado en los transcritos aislados en las librerías sustractivas e identificados en los microarreglos. 176

LISTA DE ANEXOS

Anexo A: Extracción de ARN total a partir de hojas de yuca (Chang et al. 1993). 221

Anexo B: Tratamiento con DNAse I 222

Anexo C: Hibridización sustractiva de ADNc por el método de DSC 223

Anexo D: Programa de amplificación de insertos de los clones recombinantes por PCR 225

Anexo E: Listado de primers específicos para el RT-PCR 226

Anexo F: Marcaje Indirecto de sondas para microarreglos 227

Anexo G: Síntesis de ADNc 230

ANEXO H: Listados de genes diferencialmente expresados en el Cassava Unigene Microarray en cada uno de los tiempos y comparaciones estudiadas, y valor delta. 231

RESUMEN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un alimento básico, esencial en la dieta de los países en vía de desarrollo y representa la tercera fuente más importante de calorías para aproximadamente 750 millones de personas pobres en el mundo; siendo esta producida principalmente por pequeños agricultores de recursos limitados. La identificación e implementación de nuevos mecanismos de selección de líneas mejoradas para incrementar la producción de yuca por pequeños agricultores en Africa, Latinoamérica y Asia serían un importante paso para acabar con el hambre a nivel mundial. Actualmente, los insectos floemófagos y específicamente las moscas blancas son el mayor estrés biótico que amenaza la sostenibilidad de los cultivos básicos, incluyendo la yuca. En la yuca, la mosca blanca causa daño directo por alimentación y en casos extremos puede acabar un cultivo entero. Altas densidades poblacionales de moscas blancas son un factor clave en la aparición de otras epidemias tal como la del virus del mosaico africano. Por lo tanto, la búsqueda de mecanismos efectivos de defensa para controlar las infestaciones de mosca blanca en yuca disminuiría el daño directo y el riesgo o la incidencia de enfermedades virales aumentando así el rendimiento de este cultivo a nivel mundial. Entre las especies mas importantes que atacan a la yuca esta *Aleurotrachelus socialis* Bondar en el norte de Suramérica y *Bemisia tabaci* Gennadius en Africa y algunas zonas del Asia. En CIAT se han identificado varias fuentes de resistencia a esta plaga principalmente a *A. socialis*, destacándose la variedad MEcu 72 que ha expresado altos niveles de resistencia, seguida de otras variedades cultivadas o especies silvestres, expresando tanto antibiosis como antixenosis. Por lo anterior se plantearon los siguientes objetivos: 1) Aislar y caracterizar las secuencia de aquellos genes que se expresan diferencialmente durante la respuesta de defensa al ataque de *A. socialis* en la yuca. 2) Determinar las vías de transducción de señales que se activan en respuesta a *A. socialis* en yuca. 3) Desarrollar modelos de funciones proteicas con base en herramientas bioinformáticas. 4) Construir un modelo de las respuestas de plantas de yuca a la infestación con la mosca blanca *A. socialis.* Se utilizaron la técnica de microarreglos y las librerías sustractivas para identificar los genes expresados diferencialmente en la yuca durante el ataque de *A. socialis*. Estas metodologías permitieron identificar 405 secuencias inducidas por *A. socialis* en todos los estadíos de su ciclo de vida. Estas secuencias están implicadas en funciones como defensa, modificación de pared celular, estrés oxidativo, señales de transducción, transporte, metabolismo primario y fotosíntesis. Algunas de estas secuencias hacen parte de las vías de señalización reguladas por ácido jasmónico (JA) y etileno (ET), las cuales están implicadas en respuesta de defensa a patógenos y herbívoros. Cuando *A. socialis* se alimenta sobre hojas del genotipo MEcu 72, introduce su estilete y un inductor derivado del insecto (un/unos componentes salivares y/o quitina) son reconocidos por un receptor en la planta. En el caso de la quitina, está comprobado que la familia de factores de transcripción *AP2/ERF* son inducidos por este oligosacárido componente del exoesqueleto de los insectos. A su vez este factor de transcripción es inducido por la cascada de señalización que empieza con la despolarización de la membrana plasmática y flujo de iones Ca^{2+}, después son activadas las cascadas de señalización por MAP kinasas y la subsecuente inducción de las vías de fitohormonas como JA/ET. Los factores de transcripción de la familia *AP2/ERF* son los potenciales mediadores del proceso de inducción sinérgica entre JA y ET e inducen genes de defensa como las proteínas vacuolares básicas *PRB1, CHIB (PR-3),* además de lectinas e inhibidores de proteinasas. Estas

proteínas de defensa pueden tener varios efectos contra el insecto, como envenenamiento, pueden tener como blanco los componentes del intestino del insecto que contienen carbohidratos, pueden inhibir la acción de sus proteasas impidiendo que digieran bien el alimento, muriendo de desnutrición. La respuesta de defensa es compleja y abarca todos los procesos del metabolismo celular, algunos de los cuales en sí mismos pueden ser mecanismos efectores que están controlando al atacante. Entre estos se encuentra la generación de ROS, la cual produce enzimas que pueden afectar la dieta del insecto o inducir las vías de señalización de fitohormonas mencionadas arriba. La modificación de pared celular, la cual puede dificultar la alimentación del insecto y puede también mediar la respuesta de defensa regulada por JA/ET y por último la maquinaria de degradación proteica en la cual se encuentran diversas proteasas con diferentes papeles algunos implicados en defensa contra patógenos. Al mismo tiempo la planta reprime su metabolismo primario y la fotosíntesis, reasignando los recursos de C y N hacia la defensa. La aplicación de genómica funcional en el estudio de las respuestas de defensa de la yuca abre una amplia gama de futuras aplicaciones a diferentes niveles, tanto *in silico* como experimental. Análisis de la expresión génica, construcción de mapas físicos y genéticos, análisis de secuencias genómicas, silenciamiento de genes y producción de organismos genéticamente modificados, son algunos de los proyectos que podrán se desarrollados en un futuro.

Palabras claves: *Aleurotrachelus socialis, Manihot esculenta,* mosca blanca, yuca, ácido jasmónico (JA), etileno (ET), respuesta de defensa.

SUMMARY

Cassava is an essential food staple of developing countries, is the third most important source of calories for >700 M of the world's poorest people, and produced primarily by smallholder farmers. Identifying and deploying novel mechanisms to increase the quality and quantity of cassava produced by smallholder farmers in Africa, Latin America and Asia will be an important step to abolishing worldwide hunger. Currently, phloem-feeding whiteflies are the major biotic stress that threatens the sustainability of staple crop, including cassava. Whiteflies cause direct damage due to feeding and can obliterate an entire cassava crop. High whiteflies population densities are a key factor in cassava mosaic and cassava brownstreak virus epidemics. Therefore, effective gene-based mechanisms to control whiteflies infestations of cassava would decrease the direct damage and incidence of viral disease and, thereby, increase the quality and quantity of cassava produced by smallholder farmers in worldwide. Twelve whiteflies species are serious pests of cassava including *Aleurotrachelus socialis* and *Bemisia tabaci.* One of the most potent resistance mechanisms to whiteflies was discovered at CIAT, after screening over 5000 cassava germplasm accessions for resistance to *A. socialis*. Wild cassava and several *M. esculenta* cultivars originating from Ecuador and Peru display significant resistance to whiteflies in the field. The resistance cassava expresses both antibiosis and/or antixenosis. On the resistance line, MEcu 72 whiteflies deposit fewer eggs, establish fewer feeding sites, nymph development is delayed, and whiteflies mortality is increased. For the above the following objectives: 1) Isolate and characterize the sequence of genes that are differentially expressed during the defense response to attack by *A. socialis* on cassava. 2) Determine the signal transduction pathways that are activated in response to *A. socialis* on cassava. 3) Develop models of protein functions based on bioinformatics tools. 4) Build a hypothetical model of the responses of cassava plants to infestation with the whitefly *A. socialis*. Microarrays technology and subtractive libraries were used to identify differentially expressed genes in cassava during *A. socialis* attack. These methodologies allowed us to identify 405 sequences induced by *A. socialis* in all stages of their life cycle. These sequences are involved in biological process like defense, cell wall modification, oxidative burst, signal transduction, transport, primary metabolism and photosynthesis. Some of these sequences are part of the signaling pathways regulated by jasmonic acid (JA) and ethylene (ET), which are involved in defense response to pathogens and herbivores. When *A. socialis* feeding on leaves of genotype MEcu 72, introduce their stylet, and insect-derived elicitor (salivary components and / or chitin) are recognized by a plant receptor. In the case of chitin, it is proven that the family of transcription factors *AP2/ERF* are induced by chitin, which is a component of the insect exoskeleton. This transcription factor is induced by the signaling cascade that begins with plasma membrane depolarization and Ca^{2+} flow, then are activated MAPK signaling cascades and subsequent induction of phytohormones pathways such as JA / ET. *AP2/ERF* transcription factors are potential mediators of the synergistically induction process between JA and ET and induce defense genes such as basic vacuolar proteins *PRB1, CHIB (PR-3),* as well as lectins and proteinase inhibitors. These proteins can have several effects against insects, such as poisoning, may target components of the insect gut that contain carbohydrates, can inhibit the action of proteases preventing digest their food well, dying of malnutrition. The defense response is complex and involves all the processes of cellular metabolism, some of which themselves can be effector mechanisms that are controlling the attacker. Among these are, the generation of ROS, which produces enzymes that can affect insect diet or inducing

plant hormone signaling pathways mentioned above. Cell wall modification, which may make it difficult to insect feeding and may also mediate the defense response regulated by JA / ET, and finally the protein degradation machinery in which are various proteases with different roles involved in defense against pathogens. At the same time the plant represses its primary metabolism and photosynthesis, reallocating C and N resources to the defense. The application of functional genomics approach in the study of cassava defense responses, opens a wide range of future applications at different levels, both *in silico* and experimentally. Gene expression analysis, construction of physical and genetic maps, genomic sequence analysis, gene silencing and production of genetically modified organisms are some of the projects will be developed in the future.

Keywords: *Aleurotrachelus socialis, Manihot esculenta,* white fly, cassava, jasmonic acid (JA), ethylene (ET), defense response.

INTRODUCCIÓN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un alimento básico, esencial en la dieta de los países en vía de desarrollo y representa la tercera fuente más importante de calorías para aproximadamente 750 millones de personas pobres en el mundo; siendo esta producida principalmente por pequeños agricultores de recursos limitados (Nhassico et al. 2008). La identificación e implementación de nuevos mecanismos de selección de líneas mejoradas para incrementar la producción de yuca por pequeños agricultores en Africa, Latinoamérica y Asia serían un importante paso para acabar con el hambre a nivel mundial.

Patógenos, plagas y malezas limitan la producción de alimentos a nivel mundial; se estima que las pérdidas pre y post cosechas están en un total del 40% del suministro mundial de alimentos (FAO 2010; Lucas 1998). Estrategias de resistencia a los insectos que sean accesibles y fáciles de implementar significativamente incrementarían la calidad y cantidad de alimentos producidos por pequeños agricultores y la disponibilidad de alimento para la gente de los países en vía de desarrollo. Para llevar a cabo este objetivo, nuevas estrategias basadas en los genes de resistencia a la herbivoría deben ser identificados y utilizados por los pequeños agricultores. Estas estrategias consiste en el uso de mecanismos naturales de resistencia identificados tanto en especies de plantas cultivadas o silvestres, como en la utilizacion de estrategias transgénicas (Bellotti & Arias 2001; Chen 2008; Gatehouse 2008; Kaloshian & Walling 2005). Las inversiones en el mejoramiento de los cultivos resistentes a los insectos tienen alta rentabilidad para el pequeño agricultor y el medio ambiente. Estos cultivos pueden mejorar significativamente su calidad y rendimiento, reducir el uso de pesticidas, disminuir los costos de producción, mejorar la salud y seguridad del pequeño agricultor (Batista & Oliveira 2009; Brookes & Barfoot 2006).

Actualmente, los insectos floemófagos y específicamente las moscas blancas son el mayor estrés biótico que amenaza la sostenibilidad de los cultivos básicos, incluyendo la yuca (Dalton 2006). En la yuca, la mosca blanca causa daño directo por alimentación y en casos extremos puede acabar un cultivo entero. Altas densidades poblacionales de moscas blancas son un factor clave en la aparición de otras epidemias tal como la del virus del mosaico

africano (Dalton 2006). Por lo tanto, la búsqueda de mecanismos efectivos de defensa para controlar las infestaciones de mosca blanca en yuca disminuiría el daño directo y el riesgo o la incidencia de enfermedades virales aumentando asi el rendimiento de este cultivo a nivel mundial. Entre las especies mas importantes que atacan a la yuca esta *Aleurotrachelus socialis* Bondar en el norte de Suramérica (Colombia, Ecuador, Venezuela) y *Bemisia tabaci* Gennadius que predomina en la mayor parte del Africa y algunas zonas del Asia (Bellotti et al. 2002).

Los resultados de trabajos realizados en CIAT, han permitido identificar varias fuentes de resistencia a esta plaga principalmente a *A. socialis*, destacándose la variedad MEcu 72 que ha expresado altos niveles de resistencia, seguida de otras variedades cultivadas o especies silvestres. Entre las especies silvestres están *M. flabellifolia* y *M. peruviana*, y entre las variedades están MEcu 64, MPer 335, MPer 415 entre otras. Estas variedades de yuca y especies de *Manihot* expresan tanto antibiosis como antixenosis (Bellotti & Arias 2001).

En este proyecto se busca identificar regiones del genoma o genes asociados con la resistencia a la especie *A. socialis,* identificada en yuca cultivada (genotipo MEcu 72). Trabajos previos sugieren que la resistencia en MEcu 72 es de rasgo genéticamente complejo (Vargas 2005). La resistencia a moscas blancas en MEcu 72 podría ser usada para desarrollar nuevas variedades de yuca resistente a esta plaga con atributos agronómicos valorados por los pequeños agricultores en Latinoamérica, Africa y Asia. El acceso a variedades de yuca resistentes a mosca blanca proveería un mecanismo eficaz, amigable con el ambiente para controlar esta plaga, que puede hacerse disponible para el pequeño cultivador de yuca, a través de variedades mejoradas.

La tecnología de microarreglos de ADNc ha permitido realizar análisis globales de patrones de expresión de cientos o miles de genes (Harrington et al. 2000). Otra herramienta de la genómica funcional muy utilizada en la actualidad para identificar genes expresados diferencialmente son las librerías sustractivas. Las técnicas de sustracción permiten aislar genes que sólo pertenecen a una de las dos poblaciones que se comparan. Estas tecnologías se utilizaron para identificar las secuencias implicadas en la resistencia a mosca blanca. Se

identificaron 405 secuencias inducidas por *Aleurotrachelus socialis*, las cuales están implicadas en funciones como defensa, modificación de pared celular, estrés oxidativo, señales de transducción, transporte, metabolismo primario y fotosíntesis. Algunas de estas secuencias hacen parte de las vías de señalización reguladas por ácido jasmónico (JA) y etileno (ET), las cuales están implicadas en respuesta de defensa a patógenos y herbívoros. A pesar de conocerse poco acerca de los mecanismos moleculares implicados en resistencia a insectos, este trabajo pretende acercarse un poco más a este objetivo. También contribuiría a entender los mecanismos básicos y tambien podría facilitar nuevos logros en el mejoramiento y protección del cultivo de la yuca.

Por lo anterior se plantearon los siguientes objetivos: 1) Aislar y caracterizar las secuencia de aquellos genes que se expresan diferencialmente durante la respuesta de defensa al ataque de la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis* Bondar) en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). 2) Determinar las vías de transducción de señales que se activan en respuesta a *A. socialis* en yuca. 3) Desarrollar modelos de funciones proteicas con base en herramientas bioinformáticas. 4) Construir un modelo de las respuestas de plantas de yuca a la infestación con la mosca blanca *A. socialis*.

1 MARCO DE REFERENCIA

1.1 Cultivo de la yuca

Desde su introducción desde Suramérica a Africa y Asia, la yuca ha contribuido a la seguridad alimentaria y el mejoramiento del nivel de vida de más de mil millones de personas alrededor del mundo (Balagopalan 2002; Hillocks 2002; Jennings & Iglesias 2002). Actualmente, la yuca es el sexto cultivo más importante del mundo en términos de producción y la tercera fuente de calorías para más de 700 millones de personas mas pobres (Nhassico et al. 2008). La yuca es un cultivo donde su principal producto son las raíces que posee un alto contenido de almidón y crece muy bien bajo condiciones ambientales marginales, haciéndolo un cultivo ideal para los medios de vida sostenibles de los pequeños agricultores de escasos recursos en muchos países tropicales, especialmente del Africa sub-sahariana. Debido a los altos rendimientos de almidón, la yuca no solo es considerado un cultivo de subsistencia pero también un cultivo industrial particularmente en el sureste de Asia y en Latinoamérica (Mann 1997).

Actualmente, los rendimientos de yuca están afectados por suelos pobres en nutrientes, extensión de las estaciones secas, y daños por patógenos e insectos (Bellotti et al. 1999). El calentamiento global probablemente aumentará los retos para los rendimientos en yuca, particularmente en Africa, por la limitación en el suministro de agua y el incremento en las temperaturas, el daño causado por insectos floemófagos se incrementaría (Eke-Okoro et al. 2009).

1.1.1 Principales plagas del cultivo de la yuca: las moscas blancas

Existe una gran variedad de plagas (ej. artrópodos) atacando el cultivo de yuca en las Américas. Entre las plagas mayores, es decir, las que han coevolucionado con el cultivo y que causan pérdidas en el rendimiento, están los ácaros, las moscas blancas, los trips, el gusano

cachón, el piojo harinoso, el chinche de encaje, el chinche subterráneo o la viruela de la yuca y los barrenadores de tallo. Otras plagas, como las escamas, el saltahojas, la chisa blanca, el gusano trozador, la hormiga cortadora de hojas, la mosca de la fruta, la mosca del cogollo y los comejenes pueden ocasionar daños esporádicos o localizados al cultivo y se consideran plagas menores o generalistas que atacan el cultivo en forma oportunista, especialmente en períodos de sequía (Bellotti et al. 2002).

Doce especies de mosca blanca (Hemiptera: Aleyrodidae) son plagas importantes en yuca incluyendo *A. socialis* y *B. tabaci.* Grandes poblaciones de moscas blancas pueden reducir severamente la calidad y masa de las raíces de yuca y por lo tanto tienen un impacto sustancial en la seguridad alimentaria., La especie de mosca blanca de yuca mas importante en el norte de Suramérica y Brasil, *A. socialis* que puede causar reducción en el rendimiento de hasta el 52% en un solo año (Bellotti & Arias 2001).

En Africa y Asia, las moscas blancas vectoras de geminiviruses, son la mayor amenaza para la producción de yuca (Hillocks 2002). El virus que causa la enfermedad del mosaico en yuca (CMD por sus siglas en inglés) se encuentra restringido al Africa y partes del Asia (Ceballos et al. 2004). Para controlar las inmensas pérdidas debidas a CMD, variedades de yuca resistentes al virus han sido seleccionadas utilizando estrategias de mejoramiento clásico y transformación genética; aunque éstas plantas no han sido ampliamente distribuidas en Africa (Dixon & Ssemakula 2008; Eke-Okoro et al. 2009). Aunque no se reportan casos de *B. tabaci* sub-Sahariana que colonizen a la yuca en Latinoamérica, esta yuca es altamente susceptible a CMD cuando es transferida al Africa (Hillocks 2002). *B. tabaci* infesta muchos cultivos (Fríjol, garbanzos, batata, tomate, algodón, entre otros) y plantas nativas que crecen muy próximas a la yuca. Estas plantas son reservorios para *B. tabaci* y la producción de estos importantes cultivos es también limitada por el daño inducido por *B. tabaci* y la transmisión de virus (Inbar & Gerling 2008).

1.1.2 Clasificación taxonómica de las especies de mosca blanca encontradas en yuca

El más grande complejo de especies de moscas blancas se encuentra en el neotrópico donde 11 especies han sido reportadas (Bellotti 2002). De las 11 especies, ocho especies de moscas blancas han sido reportadas alimentándose de yuca en Colombia (Castillo 1996). Las moscas blancas son insectos de aproximadamente 2 a 3 mm de longitud que se asemejan a pequeñas polillas. Los adultos de ambos sexos son alados y las alas están cubiertas con un polvillo blanco (Borror et al. 1992). La clasificación taxonómica está basada en las características morfológicas del cuarto ínstar ninfal o "pupa" como orificio vasiforme, opérculo, língula, surcos traqueales, setas caudales y setas dorsales (Caballero 1992). Las moscas blancas pertenecen al orden Hemiptera (anteriormente conocido como Homoptera), suborden Sternorhincha, familia Aleyrodidae, que se divide en 2 subfamilias: Aleurodicinae y Aleyrodinae (Borror et al. 1992). Los individuos de la subfamilia Aleurodicinae se caracterizan por la presencia de secreciones de cera en forma de filamentos dorsales o algodonosas. Los adultos son grandes, con tres o cuatro venas en las alas, se alimentan succionando savia elaborada por árboles y arbustos. Las ninfas de la subfamilia Aleyrodinae se caracterizan por presentar secreciones largas y dorsales, de color transparente, amarillo o negro y se alimentan principalmente de plantas herbáceas (Caballero 1992). La familia Aleyrodidae, cuenta con 126 géneros que comprenden 1156 especies y es la más ampliamente distribuída en las regiones tropicales del mundo (Castillo 1996).

1.1.3 Descripción de los estados biológicos de *A. socialis*

1.1.3.1 Estado de huevo

El huevo es ovipositado por la hembra sobre el envés de las hojas jóvenes (cogollo), rodeado de un polvillo blanco secretado por las glándulas abdominales. El huevo recién ovipositado es blanco en apariencia y a partir del segundo día de desarrollo adquiere un color café brillante que se intensifica a medida que avanza la incubación. La forma del huevo es semejante a la de un banano y presenta un pedicelo corto en el extremo más ancho, mediante el cual la hembra lo adhiere a la hoja. Se ha reportado una duración de 10.2 días para este

estadío, y una longitud promedio de 0.076 mm por 0.031 mm de ancho sobre el genotipo susceptible CMC 40 de yuca (Arias 1995).

1.1.3.2 Instares ninfales

La emergencia de las ninfas ocurre a través de una abertura longitudinal en forma de "T" invertida que se forma en el corión. La mosca blanca *A. socialis* pasa por cuatro ínstares ninfales. La ninfa de primer ínstar es pequeña, traslúcida, de color verde-amarillento, forma ovalada y aplanada, con antenas largas y tres pares de patas desarrolladas. Este es el único ínstar ninfal en el cual ocurre desplazamiento (Bellotti & Vargas 1986). Se caracteriza por la presencia de 8 poros dorsales conectados a igual número de glándulas de cera localizadas en el abdomen. A partir del segundo día, la ninfa inicia la secreción de cera por dichos poros, la cual adquiere forma de papilas. Se ha reportado una duración promedio de 5.1 días para este estadío, 0.229 mm de largo por 0.113 mm de ancho, color amarillento, forma ovalada y en alto relieve con bordes gruesos sobre el genotipo CMC40 (Arias 1995).

El segundo ínstar, se evidencia por la presencia de la exuvia del primer ínstar (con poros dorsales) sobre la nueva cutícula. La nueva ninfa es de color amarillento y tanto por los poros dorsales como laterales secreta una sustancia cerosa. Se ha reportado una duración promedio de 3.5 días para este instar y un promedio de 0.324 mm de longitud por 0.187 mm de ancho sobre el genotipo susceptible CMC 40 (Arias 1995).

En el tercer ínstar el cuerpo de la ninfa se torna negro después de unas horas de ocurrida la muda, ya que inicialmente es hialino y la capa cerosa que lo rodea es más abundante. La exuvia del segundo ínstar, es liberada mediante movimientos distales quedando sobre o al lado del insecto en forma de “V” invertida y de color claro o amarillo. Se ha reportado una duración promedio de 4.1 días para este instar y un promedio de 0.413 mm de longitud por 0.245 mm de ancho (Arias 1995). Como en todos los ínstares, al inicio, el cuerpo se observa más plano y al final del estado es más voluminoso, debido posiblemente al crecimiento y

desarrollo.

Durante el cuarto ínstar la ninfa pasa por dos fases: una inicial en la cual se alimenta y otra en la que deja de hacerlo y sufre cambios (esta es la fase que se conoce como “pupa”). Se ha reportado a este ínstar como el de mayor tamaño, con una longitud de 0.620 mm por 0.363 mm de ancho y una duración promedio de 9.4 días sobre el genotipo susceptible CMC 40 (Arias 1995). Gold (1987), no encontró una característica obvia para diferenciar entre el tercero y cuarto ínstar; sin embargo, el tamaño de este último y la presencia de una exuvia negra en forma de “V” invertida sobre el cuerpo negro y quitinizado cuando ésta no se cae puede diferenciarlos. Gill (1990), indica que el cuarto instar no es una verdadera pupa, ya que ocurre alimentación durante la primera parte de este instar y la formación del adulto ocurre en la última parte sin una muda “pupal” aparente.

1.1.3.3 Estado adulto

El adulto emerge a través de una abertura en forma de ‘T’ invertida que aparece en la superficie dorsal anterior de las ninfas de cuarto instar. Los adultos son insectos pequeños, con dos pares de alas, patas y antenas bien desarrolladas; su cuerpo está cubierto de un polvo blanco que le da una apariencia cerosa (Bellotti & Vargas 1986). El cuerpo generalmente es pálido, parcialmente pigmentado o completamente pigmentado. Los dos pares de alas poseen venación reducida, son pálidas o con manchas café o café grisáceo pálidas. El cuerpo está totalmente cubierto con minúsculas espínulas. Las antenas son elongadas y tienen 7 segmentos. Los ojos compuestos son completamente divididos en ojos dorsales y ventrales o están unidos por un omatidio. Las partes de la boca son elongadas y desarrolladas para perforar y succionar el tejido vegetal (USDA 2001).

En general, los machos son pequeños y activos y las hembras son de mayor tamaño y menor movilidad, pero el tamaño no es un criterio muy seguro para diferenciar el sexo. El mejor criterio es observar en el macho 2 apéndices en el extremo abdominal denominados

"clasper" los cuales hacen ver el abdomen más alargado y fino que el de la hembra, el cual es más grueso y achatado (Bellotti & Vargas 1986). La duración del ciclo biológico de *A. socialis* (huevo a adulto), fluctúa entre 34 y 47 días sobre MCol 112, medido tanto en condiciones de campo como en confinamiento a una temperatura de 18 a 34°C y humedad relativa de 19 a 72% (Bellotti & Vargas 1986). Se ha reportado un promedio de duración del ciclo biológico de 32.2 días sobre el genotipo susceptible CMC 40 en cuarto de cría con condiciones controladas de temperatura y humedad relativa (28 ± 1ºC, 70% HR y 12 horas luz) (Arias 1995). Estudios de oviposición en *A. socialis* indican que una hembra puede colocar hasta 224 huevos (Bellotti 2000).

1.1.4 Daño ocasionado por la mosca blanca *A. socialis*

La importancia económica de los daños causados por el ataque de la mosca blanca *A. socialis* en Colombia se refleja directamente en el rendimiento de las raíces y la disponibilidad de estacas para siembras posteriores. Ensayos de campo realizados por CIAT y CORPOICA-Nataima (Tolima), registraron pérdidas en rendimiento hasta del 79% (Bellotti & Vargas 1986). Estas pérdidas son producidas directamente por la alimentación tanto del adulto como de las ninfas, disminuyendo la savia circulante por el floema de la planta e indirectamente por la mielecilla excretada por el insecto en el proceso de alimentación, la cual sirve como medio de crecimiento al hongo conocido como fumagina, que causa un efecto adverso en la fotosíntesis al impedir la llegada de la luz a la superficie foliar (Bellotti & Vargas 1986).

Un ataque por adultos se manifiesta con amarillamiento y encrespamiento de las hojas apicales. Las hojas del tercio medio de las plantas, donde se encuentran las ninfas, reducen su tamaño normal, se amarillan desde los bordes hacia el centro y presentan áreas corrugadas verdosas, dando una apariencia de mosaico. Estas hojas generalmente se tornan amarillas, necrosan y finalmente caen, según la intensidad del ataque (Arias 1995). Según el mismo autor en variedades susceptibles cuando los ataques se inician en edad temprana del cultivo y duran casi todo el período vegetativo, las plantas se tornan raquíticas y sus tallos delgados sufren volcamiento con formación de rebrotes que son apetecidos por los adultos de la plaga. Para el

caso de *A. socialis*, existe una correlación entre la duración de su ataque y las pérdidas en producción de raíces, es decir, infestaciones de 1, 6 y 11 meses, resultaron en un 5, 42 y 79% de reducción en el rendimiento, respectivamente (Bellotti & Vargas 1986).

1.1.5 Manejo de *A. socialis* en el cultivo de yuca

Hasta el momento el control de las poblaciones de *A. socialis* se ha implementado a través de programas de manejo integrado de plagas, que implica la aplicación oportuna de diversos métodos de control tales como: la resistencia varietal, el control biológico, el control cultural y el químico.

1.1.5.1 Control mediante resistencia varietal

Las evidencias de resistencia planta-hospedera (RPH) a la mosca blanca en especies cultivadas es rara, esto es debido principalmente a la poca investigación, al reducido número de materiales mejorados y a la escasa selección de híbridos y especies silvestres o cultivadas con niveles de resistencia a la mosca blanca (De Ponti et al. 1990). Además de lo anterior, en muchos casos el rango del germoplasma evaluado es limitado para obtener la diversidad de genes que confieren resistencia a la mosca blanca (Bellotti & Arias 2001).

El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), desde hace más de 15 años viene evaluando la resistencia a la mosca blanca en el cultivo de la yuca (Bellotti & Arias 2001). Los resultados de este trabajo han permitido identificar varias fuentes de resistencia a esta plaga principalmente a *A. socialis*, destacándose la variedad MEcu 72 que ha expresado altos niveles de resistencia, seguida de otras variedades cultivadas o especies silvestres con niveles de resistencia que fluctúan de moderado a alto. Entre las especies silvestres están *M. flabellifolia* y *M. peruviana*, y entre las variedades están MEcu 64, MPer 335, MPer 415, MPer 317, MPer 216, MPer 221, MPer 265, MPer 266 y MPer 365. Estas variedades de yuca y especies de *Manihot* expresan tanto antibiosis como antixenosis. Cuando *A. socialis* ataca a MEcu 72, MEcu 64 y MPer 415, deposita pocos huevos, establece pocos sitios de alimentación, el desarrollo de las ninfas se retarda y su mortalidad se incrementa (Bellotti & Arias 2001;

Gomez 2004). La mortalidad total de *A.socialis* sobre MEcu 72 presentó un 72.5%, comparado con el genotipo susceptible (CMC 40) con un 33%. Este comportamiento indica que existe un mecanismo de resistencia posiblemente antibiótico sobre el genotipo MEcu 72 y sobre algunas de sus progenies evaluadas (Arias 1995).

Los resultados anteriores fueron la base para que la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) en cooperación con el CIAT, continuaran con el mejoramiento genético de variedades de yuca con resistencia a la mosca blanca *A. socialis.* Los genotipos (MEcu 72 madre y MBra 12 padre), agronómicamente deseables y con resistencia en campo a mosca blanca, se cruzaron y parte de su progenie (CG489-34, CG489-4, CG489-31 y CG489-23) fue seleccionada mostrando alta producción y resistencia moderada a alta respecto a la mosca blanca *A. socialis* en condiciones de campo (Arias & Guerrero 2000). Después de la evaluación en pruebas de eficiencia agronómica y comercial, se encontraron variedades resistentes adaptadas a la zona, con rendimiento y calidad superior a las variedades regionales y comerciales. La variedad NATAIMA 31 (Progenie CG 489-31), es la primera en el mundo que se libera como resistente a la mosca blanca *A. socialis* y puede ser usada en la alimentación humana y en la agroindustria (Vargas et al. 2002).

Otros estudios de (RPH) se han llevado a cabo con otras especies de mosca blanca como por ejemplo: *Trialeurodes vaporariorum* sobre pepino en Europa (Laska et al. 1986); *Aleurotrixus aepim* sobre yuca en Brasil (Farias 1994); *T. vaporariorum* sobre tomate en Holanda (De Ponti et al. 1990; Van Giessen et al. 1995). Para el complejo de *Bemisia tabaci*, la literaratura reporta varios cultivos con genotipos "resistentes", en la mayoria de los casos no son cultivares desarrollados si no, líneas mejoradas que se espera tengan resistencia. En varios de estos casos, los mecanismos que están operando parecen ser de antixenosis (no preferencia para alimentación y oviposición) o de tolerancia (Bellotti & Arias 2001). De igual manera se vincula con la resistencia varietal a la pubescencia (Wilson et al. 1993; Lambert et al. 1995); la densidad de tricomas (Heinz & Zalom 1995; McAuslane et al. 1996; Meagher et al. 1997) y a los acilazúcares (Butler et al. 1992; Liedl et al. 1995).

1.1.6 Pubescencia en genotipos de yuca

Arias (1995), buscando explicaciones con relación a las causas de mortalidad de los estados inmaduros de *A. socialis* sobre yuca, sin descartar los posibles efectos antibióticos, realizó observaciones con respecto a la pubescencia existente en algunos genotipos. Utilizando un microscopio electrónico de barrido se tomaron fotografías del envés de la hoja 2 enumerada en forma descendente para cuantificar y medir la pubescencia presente en los genotipos. El genotipo MEcu 72 presentó la mayor densidad de pubescencia, por encima de 33.000 tricomas/ cm^2 sobre la hoja número 2, mientras que el genotipo susceptible (CMC 40) la densidad más baja, por debajo de 189 tricomas/cm^2. Arias (1995) sugiere que lo anterior podría indicar que el levantamiento de las ninfas de la superficie foliar, fenómeno observado en algunos genotipos de yuca, es causado por la densidad de tricomas. En los testigos susceptibles CMC 40 y MCol 1505, la poca pilosidad encontrada en sus hojas, se clasificó como corta (< 0.1 mm) y con distancias amplias sobrepasando a 0.7 mm en la mayoría de las observaciones. El genotipo resistente (MEcu 72), además de presentar el mayor número tricomas en la hoja 2, mostró el mayor porcentaje de tricomas cortos (46%), mientras que el genotipo (MBra 12) presentó el mayor porcentaje de tricomas largos (56%). Se observó que la densidad de tricomas disminuye drásticamente en las hojas de mayor edad y que tanto su longitud como su separación aumentan, indicando que posiblemente la pubescencia continúa creciendo y que a medida que la hoja crece, éstos se separan (Arias 1995).

1.1.7 Pubescencia y grado de daño por *A. socialis*

Arias (1995), estableció una correlación entre el grado de daño ocasionado por *A. socialis* y la caracterización de la pubescencia hecha por el programa de fitomejoramiénto de yuca CIAT en 578 genotipos. Se obtuvo una correlación negativa ($r= -0.39$) y altamente significativa ($P < 0.01$). Lo anterior podría indicar que a mayor pubescencia menor grado de daño, sin embargo la relación no es muy fuerte debido a su valor bajo. Se realizó también una prueba de independencia (Chi-cuadrado) entre el grado de daño y la pubescencia, teniendo como base una escala de 0 a 6 (0= Lampiño y 6= Mucha pubescencia). Se rechazó la hipótesis de

independencia, es decir que a mayor pubescencia no siempre el grado de daño ocasionado por la plaga es menor. Esto indica que en un cultivo de yuca con mucha pubescencia puede haber genotipos sin daño, con daño intermedio y con daño alto.

1.2 Defensas naturales de la yuca contra artrópodos-plaga

La literatura general reporta que la yuca, presenta mecanismos físicos y químicos contra las plagas de artrópodos. Las defensas naturales de la yuca parecen afectar particularmente el establecimiento o la alimentación sostenida (fagorrepulsiva) de la plaga en la planta por mecanismos de defensa física (pilosidad, producción de callo) o química (HCN, rutina) (Calatayud & Múnera 2002).

1.2.1 Mecanismos físicos

En estudios de resistencia de la yuca contra especies de trips, se encontró que la pubescencia presente en sus hojas contribuye a la defensa de la planta contra el ataque de estos insectos. Un aumento de la pubescencia sobre sus hojas incrementa el efecto resistente hacia los trips, ya que molesta los procesos de establecimiento (Bellotti & Schoonhoven 1978). En el estudio de las interacciones de la yuca y piojo harinoso *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrer (Homóptera: Pseudococcidae), se evidenció la formación de callo (polímero de ß(1,3)-D-glucopiranosa) al contacto con sus estiletes. Esta reacción cicatriza el floema y perturba la alimentación sostenida del insecto floemófago (Calatayud et al. 1996).

1.2.2 Mecanismos químicos

Ha consecuencia del daño mecánico, los tejidos de yuca emiten el ácido cianhídrico (HCN), proceso llamado cianogénesis que resulta particularmente de la acción de la enzima endógena (ß-glucosidasa) conocida como linamarasa (Conn 1980). La cianogénesis permite la liberación de una molécula tóxica que constituye un sistema de protección para la yuca contra

las plagas; sin embargo, tal protección no ha sido claramente demostrada (Hruska 1988). En las raíces, la cianogénesis constituye una defensa contra el chinche de la viruela *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) (Castaño et al. 1985; Bellotti & Riis 1994).

1.3 Resistencia en plantas

Las plantas no pueden moverse para escapar de los retos ambientales. Los estreses bióticos son el resultado de una batería de patógenos potenciales como hongos, oomicetos, bacterias, nemátodos e insectos los cuales interceptan los fotosintatos producidos por las plantas, y los virus utilizan su maquinaria de replicación a expensas del hospedero. Las plantas a cambio han desarrollado sofisticados mecanismos para percibir tales ataques y traducir esa percepción hacia una respuesta adaptativa (Dangl & Jones 2001). Muchas plantas son resistentes a la mayoría de patógenos. Existen tres razones para que el patógeno o plaga falle:

1- La planta es incapaz de servir de nicho para un patógeno o plaga potencial, siendo así un No-hospedero.

2- La planta posee barreras estructurales preformadas o componentes tóxicos que confinan las infecciones exitosas a especies de patógenos o plagas especializados (Defensa Constitutiva).

3- Basado en el reconocimiento del ataque del patógeno o la plaga, los mecanismos de defensa son elaborados, y la invasión permanece localizada (Defensa Inducida).

Entonces, la enfermedad ocurre cuando las defensas preformadas de las plantas son inapropiadas, o la planta no detecta al patógeno o la plaga, o la defensa inducida no es efectiva (Hammond-Kosack & Jones 1996). En el caso de la defensa inducida en patógenos, está generalmente dada por patrones de reconocimiento, los cuales son los genes de Resistencia (*genes R*), que actúan como "centinelas" en la puerta. Estos *genes R* reconocen efectores codificados por el patógeno directa o indirectamente. Estos efectores son las llamadas proteínas de avirulencia (*Avr*). Los *genes R* disparan unas señales iniciales, llevando a una efectiva activación de respuestas de defensa y finalmente a la resistencia al patógeno.

Defensa Constitutiva o Defensa Pasiva: Son barreras físicas que impiden el ingreso a los tejidos de la planta de un patógeno o de un artrópodo. Algunas plantas despliegan químicos disuasivos sobre su superficie cuticular (suberinas, callosa, cutículas), o almacenan componentes tóxicos en vacuolas o tricomas glandulares, (aleloquímicos). Estas estructuras preformadas y metabolitos proveen una inmediata defensa al ataque del patógeno o del insecto evitando la colonización e incremento de las poblaciones, teniendo un efecto antixenótico. También pueden tener un efecto antibiótico, o sea que evita el crecimiento, reproducción, desarrollo y sobrevivencia en el caso de las plagas (Fluhr 2001).

Defensa Inducida o Defensa Activa: Es una respuesta plástica que desvía los recursos de Carbono y Nitrógeno del crecimiento y reproducción de la planta hacia una resistencia sistémica duradera y que sirve para un amplio espectro de patógenos y plagas. Las interacciones planta:patógeno son gobernadas por interacciones entre *genes R* de la planta que reconocen efectores del patógeno producidas durante la infección (Dangl & Jones 2001). Algunos autores también utilizan el concepto de Defensa Directa (Constitutiva), la cual es cualquier rasgo de la planta (tricomas, metabolitos primarios, secundarios, espinas), que en sí mismas afectan la susceptibilidad de la planta al artrópodo, o la ocurrencia de su ataque.

1.3.1 Inmunidad en plantas a insectos herbívoros

Las plantas terrestres son fuente de alimento para ~1 millón de especies de insectos de diversos grupos taxonómicos. Los insectos utilizan varias estrategias de alimentación para obtener nutrientes a partir de todas las partes de la planta. Aunque todos los insectos fitófagos ocasionan daño mecánico en los tejidos de las plantas, la cantidad y calidad del daño varía enormemente, dependiendo de la estrategia de alimentación. Aproximadamente dos terceras partes de todas las especies de insectos herbívoros conocidos son escarabajos comedores de hojas del orden Coleoptera u orugas del género Lepidoptera, entre los cuales se encuentran masticadores, cortadores o trozadores (Schoonhoven et al. 1998). Los herbívoros perforadores-

chupadores tales como trips y ácaros utilizan estructuras en forma de tubo para succionar el contenido líquido de las células laceradas; mientras que los minadores de hojas se alimentan del tejido que se encuentra entre las capas epidermales de la célula.

Los áfidos, las moscas blancas y otros insectos del orden Hemiptera, insertan sus especializados estiletes entre las células para establecer su sitio de alimentación en el floema. En cada una de estas relaciones planta-insecto, ambas partes envían y reciben señales químicas que determinan el resultado de la interacción. Se ponen en contacto quimiorreceptores ubicados en las piezas bucales, antenas, tarsos (pies) del insecto, y con esto pueden medir por ejemplo, la disponibilidad del hospedero como fuente de alimento. Por el contrario, las células de la planta reconocen y responden al movimiento del insecto, al daño mecánico ocasionado por la alimentación y a los componentes de las secreciones orales de los insectos.

Los insectos generalistas (ó polífagos) se alimentan de muchos hospederos de muchas familias de plantas, por el contrario, los insectos especialistas (ó monófagos y oligófagos) se alimentan de una o unas pocas especies de plantas de la misma familia. La decisión del insecto de aceptar o rechazar un hospedero es determinada en gran parte por un gran número de químicos disuasivos o atrayentes (Walling 2000). Algunos científicos creen que mucha de la gran diversidad de los componentes de plantas llamados metabolitos secundarios surgió de la coevolución entre herbívoros y plantas y su eterna lucha (Becerra 2007). Las plantas, como organismos sésiles dependen en gran medida de las defensas químicas para frustrar el ataque de los insectos. Componentes antinutritivos, que disuaden o tienen efectos tóxicos sobre los herbívoros, barreras físicas tales como la dureza de la hoja y tricomas que incrementan la adecuación de la planta en presencia del herbívoro son comúnmente conocidos como defensas directas. Un tipo de protección indirecta es la otorgada por compuestos volátiles de plantas inducidos por herbívoros y néctar que atrae enemigos naturales del herbívoro (Kessler & Baldwin 2002). Los efectos combinados de defensas directas e indirectas proveen una resistencia durable a un amplio espectro de artrópodos herbívoros en los ecosistemas naturales (Gatehouse 2002; Kessler et al. 2004).

Los rasgos de las plantas que confieren resistencia a plagas pueden también ser clasificados de acuerdo a la manera en que son regulados. Algunos rasgos son expresados constitutivamente independientemente si el ataque por el herbívoro ocurre o no. Por ejemplo, los tejidos reproductivos típicamente acumulan grandes cantidades de proteínas defensivas y metabolitos. Contrastando con estas barreras preformadas, las plantas retan a los herbívoros montando activas respuestas de defensa en el sitio del tejido dañado y, en muchos casos, sistémicamente en tejidos no dañados (Bostock 2005); esta altamente dinámica forma de defensa inducida ha sido documentada en especies a lo largo del reino Plantae (Karban & Baldwin 1997). La evidencia indica que las defensas inducidas evolucionaron debido a que éstas gastan menos recursos que las características de resistencia constitutiva (Karban & Baldwin 1997; Baldwin 1998). Sumado a estos rasgos de defensa inducida, las plantas pueden minimizar las consecuencias de pérdida de tejido mediante la activación de procesos fisiológicos, tales como la captura de azúcares en los tejidos que se encuentran debajo del suelo, lo cual permite a la planta tolerar mejor la herbivoría (Schwachtje et al. 2006).

La habilidad de las plantas para reconocer y responder defensivamente al ataque de los herbívoros constituye una forma de inmunidad. A diferencia del altamente específico y adaptativo sistema inmune de los vertebrados, en el cual células móviles defensoras reconocen y eliminan los patógenos, la inmunidad de las plantas a los insectos se basa en la habilidad innata de cada célula para percibir las señales de peligro, transmitir esta información sistémicamente, prevenir futuros ataques y montar defensas directas e indirectas que reduzcan la acción del insecto. El actual conocimiento que se tiene de los mecanismos y orígenes evolucionarios del reconocimiento inmune en plantas, viene de estudios de interacciones planta-patógeno (Jones & Dangl 2006). La resistencia basal a infección por patógenos es disparada por receptores transmembrana que reconocen los patrones moleculares asociados con patógenos (PAMPs), estas antiguas moléculas microbianas, las cuales incluyen fragmentos de pared celular de bacteria, flagelina y EF-Tu (factor de elongación Tu) alertan al hospedero de la presencia de microorganismos intrusos (Zipfel et al. 2006). Como segunda línea de defensa, están las proteínas de resistencia (R) a enfermedades, las cuales detectan moléculas efectoras (factores de virulencia) que secretan los patógenos dentro de las células de las plantas para contrarrestar o debilitar la defensa del hospedero.

Relativamente poco es lo que se conoce acerca de los eventos moleculares de reconocimiento que disparan la inmunidad en plantas a insectos herbívoros. Sin embargo, las plantas parecen utilizar múltiples sistemas de sobrevivencia para reconocer insectos con un amplio rango de estilos de vida y comportamientos alimentarios. Uno de estos sistemas de reconocimiento es conceptualmente similar a la inmunidad disparada por patógenos, debido a que involucra la percepción de moléculas exógenas que, cuando se liberan hacia las células de las plantas vía secreciones de los insectos, induce una respuesta de defensa del hospedero. Estos inductores pueden ser moléculas derivadas del insecto o componentes de la planta que son modificados por el insecto. La noción que las plantas reconocen componentes modificados por el insecto es consistente con la hipótesis del "gen guardián", la cual postula que las proteínas de resistencia, reconocen el daño en las proteínas endógenas de las plantas y subsecuentemente inicia la respuesta de defensa (Jones & Dangl 2006). El hecho que las plantas activen muchas defensas anti-insectos en respuesta al daño mecánico del tejido indica que las señales endógenas producidas por las células alteradas también juegan un papel crítico en la percepción de la herbivoría por parte de la planta. La hormona de plantas ácido jasmónico (JA) y componentes de señalización relacionadas (colectivamente referidos como jasmonatos) son señales ubicuas para el tejido dañado y para la subsecuente activación de respuestas de defensa a muchos insectos herbívoros (De Vos et al. 2005; Reymond et al. 2004).

1.3.1.1 Eventos tempranos de señalización en la interacción planta-insecto

La implementación exitosa de una respuesta de defensa inducida requiere que la planta responda a la herbivoría rápida y adecuadamente. Estos eventos tempranos de señalización que ocurren antes de los cambios en la expresión de los genes de la planta hospedera y del metabolismo relacionado con defensa, son críticos para el proceso de reconocimiento del herbívoro (Maffei et al. 2007). Algunos estudios han identificado inductores de insectos que le permiten a la planta distinguir la herbivoría del daño mecánico. En el caso de los herbívoros hemípteros, hay evidencia que *genes R* están involucrados en el control de la resistencia en la planta (Dogimont et al. 2007; Nombela et al. 2003; Rossi et al. 1998).

1.3.1.1.1 Daño mecánico versus herbivoría

Aunque toda herbivoría resulta en tejido de la planta dañado, el rompimiento del tejido *per se* no es siempre un indicador de un ataque de insectos. Por lo tanto para evitar gastar recursos en defensa, las plantas deben diferenciar la alimentación por insectos del simple daño mecánico, tal como el que es causado por granizo o viento. Algunas respuestas, incluyen la inducción de genes requeridos para reparación celular y respuesta a estrés osmótico, probablemente ocurrirían como resultado de si es herbivoría o daño mecánico.

Sin embargo, la producción de metabolitos secundarios tóxicos y otras respuestas de defensa probablemente solo beneficiarían a las plantas atacadas por herbívoros. Cambios en la expresión de los genes están bajo la síntesis inducida de muchos metabolitos secundarios defensivos y proteínas. Experimentos con microarreglos con varias especies, incluyendo *Arabidopsis thaliana* (De Vos et al. 2005; Reymond et al. 2004), *Nicotiana attenuata* (Voelckel et al. 2004), especies del género *Populus* (Major & Constabel 2006; Ralph et al. 2006), comparan los patrones de expresión génica inducida por daño mecánico con la inducida por la alimentación por insectos o herbivoría simulada. Aunque se encontró un considerable sobrelapamiento en los patrones de expresión inducida, hay también respuestas transcripcionales que parecen ser específicas de las respuestas a la herbivoría o a la aplicación de secreciones orales de insectos al sitio de daño. En algunos casos, estas respuestas han sido asociadas con la producción de componentes disuasivos específicos de insectos tales como la nicotina (Hui et al. 2003) y los glucosinolatos (Mewis et al. 2006). Las plantas discriminan la herbivoría del daño mecánico, probablemente porque reconocen los componentes en las secreciones orales del insecto. Esto es apoyado por la identificación de varios factores derivados de insectos que inducen respuestas de defensa cuando se aplican a heridas artificiales.

1.3.1.1.2 Secreciones orales de insectos

Una de las repuestas de las plantas a la herbivoría mejor estudiadas, es la elevada liberación de compuestos volátiles, los cuales incluyen terpenos, volátiles de hojas verdes, etileno, entre otros. Estudios realizados con varias interacciones planta-insecto han demostrado que la alimentación por insectos o la aplicación de secreciones orales a las heridas inducen diferente o más intensa respuesta de compuestos volátiles que las del daño mecánico (Arimura et al. 2004; DeMoraes et al. 2001; Schmelz et al. 2006). Las plantas pueden beneficiarse de la producción de volátiles específicos de la herbivoría a través de efectos directos disuasivos sobre los herbívoros, como son la atracción de predadores al sitio de alimentación del insecto y efecto de señales dentro de la planta que llevan al tejido sin infestar a una inducción de una respuesta de defensa más rápida.

Han sido identificados inductores derivados de insectos, la N-17-hidroxilinolenoil-l-glutamina (volicitin) fue identificada en secreciones orales de *Spodoptera exigua*, lo que le permite inducir la liberación de compuestos volátiles en maíz (*Zea mays*) (Alborn et al. 1997). Este compuesto fue el primer ejemplo de lo que parece ser una amplia producción de conjugados de ácidos grasos y amino-ácidos (FACs) por larvas de Lepidópteros (Alborn et al. 2003; Halitschke et al. 2001; Mori et al. 2001).

Respuestas específicas a FACs en secreciones orales de lepidópteros, incluyendo cambios en expresión génica, alteraciones en el proteoma de la planta y producción inducida de nicotina e inhibidores de proteasas, han sido estudiados más extensivamente en *N. attenuata* (Giri et al. 2006; Halitschke et al. 2003). Algunas plantas incluyendo *Phaseolus lunatus* (fríjol lima) y *Gossypium hirsutum* (algodón), no responden a los FACs (Spiteller et al. 2001). Sin embargo, la liberación de compuestos volátiles por plantas insensibles a FACs en respuesta a la alimentación por larvas, indican que otros inductores están presentes en las secreciones orales. En un bio-ensayo para la producción de inductores de etileno en *Vigna unguiculata*, llevaron a la identificación de fragmentos proteolíticos de ATP sintasa subunidad γ en las secreciones orales de *Spodoptera frugiperda* (Schmelz et al. 2006). Al menos cuatro de estos péptidos, llamados inceptinas, son producidos a través de la digestion de proteínas de plantas en el tracto digestivo de *S. frugiperda* (Schmelz et al. 2007), aunque los receptores para estos inductores permanecen sin identificar. Secreciones orales de insectos ortópteros también

utilizan un mecanismo independiente de FACs para inducir la emisión de compuestos volátiles en las plantas hospederas de estos insectos.

Otro tipo de ácidos grasos llamados Califerinas, fueron identificadas en las secreciones orales de *Shistocerca americana* y otras especies de saltahojas (Alborn et al. 2007). Al igual que los FACs, las califerinas inducen la liberación de terpenos volátiles a partir de plantas de maíz. No se conoce si estas respuestas funcionan para disuadir al saltahojas de alimentarse directamente, para atraer predadores, o provee algún otro beneficio a la planta hospedera. Dados los numerosos insectos herbívoros que disparan respuestas de defensa y el pequeño número de combinaciones planta-insecto que han sido examinados en detalle, el descubrimiento de componentes adicionales de las secreciones orales que inducen respuestas de defensa en el hospedero pueden ser anticipadas. Otros tipos de secreciones orales también inducen respuestas de defensa. Por lo tanto, las plantas pueden responder a los fluidos de oviposición de insectos, anticipándose a un inminente herbivoría o para atraer predadores que se coman los huevos (Hilker et al. 2006).

Las Bruchinas en el fluido oviposicional de *Bruchis pisorum* (gorgojo de la arveja) inducen tumores debajo de los huevos sobre la arveja (*Pisum sativum*), lo cual inhibe la entrada de las larvas dentro de la vaina. La oviposición de *Pieris brassicae* (mariposa blanca grande) sobre *A. thaliana* dispara la expresión de genes de defensa (Little et al. 2007). Los componentes de señalización de la planta, ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA) acumulados en los huevos del insecto pueden contribuir a la inducción de respuestas de defensa (Tooker & DeMoraes 2005).

1.3.1.1.3 Resistencia mediada por *genes R* en áfidos

Inductores derivados de insectos no han sido aún identificados en áfidos, moscas blancas y otros floemófagos hemípteros. Aunque estos insectos causan comparativamente menos daño en el tejido cuando se alimentan de la savia del floema, las plantas son capaces de responder con distintas respuestas metabólicas y transcripcionales al ataque de estos insectos (De Vos et al. 2005; Kempema et al. 2007; Mewis et al. 2006; Voelckel et al. 2004). Las enzimas

salivales de los áfidos tales como las peroxidasas y las pectinasas podrían ser inductores de respuesta de defensa en plantas (Miles 1999), pero esta hipótesis debe ser probada rigurosamente. Evidencia de especies cultivadas monocotiledóneas y dicotiledóneas apoyan la idea que los productos de los *genes R* median la resistencia a insectos floemófagos (Smith & Boyko 2007). En ambos casos, las proteínas NBS-LRR (*nucleotide binding site-leucine rich repeat*) específicas de las plantas que contribuyen al reconocimiento de herbívoros hemípteros han sido identificados. El gen *Mi-1* de tomate provee resistencia a algunos aislados de *Macrosiphum euphorbiae* (áfido de la papa), aunque no a *Myzus persicae* (áfido del durazno) (Rossi et al. 1998; Nombela et al. 2003). Otra proteína NBS-LRR, codificada por el gen *Vat* de melón confiere resistencia tanto a *Aphis gossypii* (áfido del algodón) como a la transmisión de virus de plantas por esta especie de áfido (Dogimont et al. 2007). Por analogía a la defensa contra patógenos en plantas, estos estudios sugieren una interacción gen por gen entre la planta y el áfido. Sin embargo, las presuntas proteínas de avirulencia no han sido identificadas en la saliva del áfido.

1.3.1.1.4 Flujo de iones calcio (Ca^{2+}), potencial de membrana y proteínas kinasas Mitogen-activated (MAPK)

Relativamente poco es lo que se conoce acerca de las vías de transducción de señales que conectan los inductores específicos de los insectos a las repuestas de las plantas que ellos provocan (Walling 2000). El ión calcio (Ca^{2+}) ha sido implicado como un segundo mensajero en muchas vías de señalización en plantas, incluyendo respuestas a la herbivoría (Maffei et al. 2007). Bajo condiciones normales, el contenido de Ca^{2+} citosólico es varios órdenes de magnitud más bajo que en el fluido apoplástico y en las organelas. Incrementos en los niveles de Ca^{2+} citosólico activan la calmodulina y otras proteínas sensibles al calcio que seguidamente promueven eventos de señalización corriente abajo, incluyendo fosforilación de proteínas y respuestas transcripcionales. *Spodoptera littoralis* (gusano egipcio del algodón) alimentándose sobre *P. lunatus* causa un incremento en el Ca^{2+} citosólico en células adyacentes al sitio de mordida del insecto (Maffei et al. 2006). En otros experimentos con *P. lunatus*, tratamientos con agentes quelantes de Ca^{2+} impiden la inducción de los genes de defensa en respuesta a la alimentación por *Tetranychus urticae* (ácaro araña) y compuestos

volátiles de plantas vecinas infestadas con los ácaros (Arimura et al. 2000). En *A thaliana*, la proteína nuclear IQD1 se une a calmodulina de un modo dependiente de Ca^{2+} afectando la transcripción de genes envueltos en biosíntesis de glucosinolatos. La sobre expresión de IQD1 reduce la herbivoría por *M. persicae* y *Trichoplusia ni*, sugiriendo que estas proteínas están involucradas en percibir señales de Ca^{2+} para modular la respuesta de defensa en plantas (Levy et al. 2005).

Los *genes R* mediando resistencia a patógenos y a otras respuestas de estreses ambientales en las plantas envuelven cascadas de señalización llamadas *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (Hamel et al. 2006). Aunque hasta el momento no ha sido identificada una vía MAPK completa que lleve a resistencia a insectos, existe evidencia que tales vías juegan un papel en algunas interacciones planta-insecto. En tomate *Solanum lycopersicum*, el gen *Mi-1* media resistencia que fue atenuada cuando la expresión de ciertas MAPK y MAPKK fueron reducidas por silenciamiento de genes utilizando el método VIGS (*Virus-induced gene silencing*, Li et al. 2006). Los estudios hechos con VIGS en tomate han mostrado que al menos tres MAPKs son requeridas para la respuesta de defensa mediada por *sistemin* a *Manduca sexta* (gusano del tabaco) (Kandoth et al. 2007). FACs en secreciones orales de *M. sexta* incrementa la expresión de MAPK inducidas por SA y MAPK inducidas por daño mecánico en *N. attenuata (*Wu et al. 2007). En arroz silvestre *Oryza minuta*, la expresión de una supuesta MAPKK (OmMKK1), es inducida por la alimentación de *Nilaparvata lugens* (saltahojas café), así como también por tratamientos con JA y SA (You et al. 2007).

1.3.1.2 Regulación de las respuestas de defensa por Jasmonatos (JA)

Evidencia que se ha acumulado en los últimos años indica que la familia de los componentes de señalización jasmonatos (JA) funciona como reguladores endógenos de la resistencia en plantas a artrópodos herbívoros (Howe 2004; Kessler & Baldwin 2002).

1.3.1.2.1 Funciones de los jasmonatos (JA) en inmunidad de plantas a insectos

Los jasmonatos (JA) juegan un papel central en la regulación de las respuestas de defensa a herbívoros los cuales inflingen varios tipos de daño al tejido. Esta conclusión está basada en numerosos estudios en campo y laboratorio que muestran que los mutantes de JA están comprometidos en resistencia a un amplio rango de herbívoros artrópodos, incluyendo orugas (Lepidoptera), escarabajos y gorgojos (Coleoptera), trips (Thysanoptera), saltahojas (Homoptera), ácaros (Acari), además insectos de los órdenes Diptera y Heteroptera (Bostock 2005; Howe 2004; Kessler & Baldwin 2002). Estudios con microarreglos muestran que la vía de los JA tiene una función dominante en los cambios de regulación globales de la expresión de genes en respuesta a daño mecánico y herbivoría (De Vos et al. 2005; Devoto et al. 2005; Halitschke et al, 2003; Major & Constabel 2006; Ralph et al. 2006; Reymond et al. 2004). Los JA también están involucrados en interacciones tritróficas (Engelberth et al. 2004; Thaler 1999; van Poecke & Dicke 2002), resistencia en plantas a insectos floemófagos (Ellis et al. 2002; Gao et al. 2007; Mewis et al. 2005; Zarate et al. 2007), defensas basadas en tricomas (Boughton et al. 2005; Li et al. 2004), función en defensas directas e indirectas (Engelberth et al. 2004; Ton et al. 2007), resistencia a patógenos (Glazebrook 2005) y transmisión sistémica de señales de defensa (Schilmiller & Howe 2005). Además de estos procesos relacionados con defensa, los JA regulan varios aspectos del desarrollo de las plantas, la hormona generalmente regula procesos reproductivos y defensivos, mientras inhibe el crecimiento y la fotosíntesis de los tejidos vegetativos (Devoto & Turner 2005; Giri et al. 2006). Estas actividades cruzadas sugieren un amplio papel de los JA en manejar el dilema de las plantas "crecer o defenderse" (Herms & Mattson 1992) en ambientes hostiles y cambiantes. El daño provocado por insectos masticadores o daños mecánicos resultan en una rápida (<30 min.) acumulación de JA en el sitio de la herida.

En plantas superiores los JA son sintetizados por la vía octadecanoide. Todos los genes que codifican para esta vía biosintética han sido identificados (Schaller et al. 2005). Ahora se sabe que en el metabolismo de las plantas, los JA juegan un papel crítico en la regulación de las repuestas transcripcionales corriente abajo. Entre las rutas que los JA modulan en respuesta a estreses bióticos están: la síntesis del compuesto volátil metil-JA (MeJA) por la

JA-carboximetil tranferasa (Schaller et al. 2005) y la formación de Jasmonoil-isoleucina (JA-Ile) y otros conjugados amino ácidos-JA (JACs) por el JASMONATE RESISTANT 1 (JAR1) y enzimas conjugadas relacionadas (Kang et al. 2006; Staswick & Tiryaki 2004). Un estricto requerimiento para síntesis de JA en defensa anti-insectos fue demostrada por el uso de mutantes en el estado de ß-oxidación de la vía octadecanoide (Li et al. 2005; Schilmiller et al. 2007). Esta conclusión es consistente con el hecho que la conjugación de JA o isoleucina es requerida para defensas directas contra orugas (Kang et al. 2006). Otro JA, el ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) está implicado como señal *per se* para varias respuestas de defensa a herbivoría directas (Stintzi et al. 2001) e indirectas (Koch et al. 1999).

1.3.1.2.2 Percepción de los JA

Los análisis de mutantes que fallan en la percepción de JA y de MeJA han ayudado a entender el papel de los JA en interacciones planta-insecto (Devoto & Turner 2005). En particular los mutantes que son defectivos en el gen CORONATINE INSENSITIVE 1 (*COI1*) el cual está implicado en todos los procesos de señalización de los JA y como consecuencia, estos mutantes son altamente susceptibles a un amplio rango de herbívoros artrópodos (Chen et al. 2005; Li et al. 2004; Mewis et al. 2005; Paschold et al. 2007; Reymond et al. 2004; Stintzi et al. 2001; Zarate et al. 2007). *COI1* es el componente *F-box* de una multiproteína *E3-ubiquitin ligasa* llamada SCF_{COI1} (abreviación de *SKP1, cullin* y proteínas *F-box* del complejo). La señalización de los JA involucra la ubiquitinación mediada por SCF_{COI1} de proteínas regulatorias que controlan la transcripción de los genes JA (Devoto & Turner 2005). Un paso mayor hacia la elucidación de los mecanismos de acción de los JA vino del descubrimiento de los dominios proteicos JA ZIM (*JAZ*) que son el blanco de SCF_{COI1} para su degradación durante la señalización de los JA (Chini et al. 2007; Thines et al. 2007). Varias evidencias indican que al menos algunos miembros de la familia *JAZ* actúan como represores de los genes JA. Primero las proteínas *JAZ* son degradadas en un *COI1* y el 26S proteasoma en respuesta al tratamiento con JA. Segundo, las mutaciones en el dominio conservado C-terminal de las proteínas *JAZ* se estabilizan contra la degradación mediada por SCF_{COI1} y, como consecuencia reduce la respuesta de la planta al JA/MeJA (Chini et al. 2007; Thines et al. 2007; Yan et al. 2007). Finalmente, la interacción física de *COI1* y *JAZ1* es estimulada de

una manera dependiente de la dosis de JA-Ile y mucho menos por la JA-Leu (Thines et al. 2007).

Para algunos autores la acción de los JA es análoga a la vía de señalización de las auxinas, en la cual las auxinas se unen al dominio LRR del receptor TRANSPORT INHIBITOR 1 (*TIR1*) promoviendo la degradación de los represores transcripcionales Aux/IAA (Tan et al. 2007). Sería interesante determinar si el concepto de auxina como "pegante" molecular que promueve la interacción *TIR1*-sustrato se extiende al JA-Ile como sitio de unión para el dominio LRR de *COI1*.

Los nuevos hallazgos dentro de los mecanismos de acción de los JA sugiere que la cascada de transducción de señales para la expresión inducida por daño mecánico y herbívoros de genes de defensa está compuesta de relativamente pocos pasos. En plantas sin daño, bajos niveles de JA-Ile probablemente permiten la acumulación de *JAZ*, reprimiendo así la transcripción de los genes defensa. Esto involucra la interacción directa de las proteínas *JAZ* con los factores de transcripción, tales como *MYC2*, el cual promueve la expresión de los genes JA (Chini et al. 2007). En respuesta a tejido dañado, la acumulación rápida de JA-Ile dispararía la degradación mediada por SCF_{COI1} de las proteínas *JAZ* y la subsecuente expresión de los genes de defensa. Una característica notable de muchos transcritos *JAZ* es su rápida acumulación en respuesta a tratamiento con JA (Thines et al. 2007). La rápida síntesis de represores *JAZ* probablemente produce un mecanismo para restringir la expresión de demanda energética y procesos defensivos que potencialmente dañarían la célula, cuando lo niveles de JA bajen, por ejemplo cuando el insecto deja de alimentarse. Este mecanismo de control sugiere que la expresión de las defensas basadas en JA deberían ser vistas más como un continuo que como un estadío inducido o no inducido discreto.

1.3.1.2.3 Especificidad de las defensas basadas en JA

Una importante pregunta concerniente a las defensas reguladas por JA es si la respuesta es específica para diferentes herbívoros, y si es así, cómo esta especificidad es lograda. En un estudio hecho con un insecto especialista *Pieris rapae* (mariposa blanca pequeña) y un

generalista *S. littoralis* se mostró que el patrón de expresión génica era muy similar en *A. thaliana* (Reymond et al. 2004). Se encontraron patrones muchos más divergentes en plantas infestadas con insectos con diferentes formas de alimentación (De Vos et al. 2005; Heidel & Baldwin 2004). Por ejemplo, aunque la respuesta transcripcional de *A. thaliana* a un insecto masticador (*P. rapae*), y a un insecto perforador-chupador (*Frankliniella occidentalis*, trips de las flores) estuvieron dominadas por los genes regulados por JA, la mayoría de estos genes (61%) exhibió un patrón de expresión que fue específico para cada uno de los dos tipos de insectos (De Vos et al. 2005).

Los perfiles de transcritos inducidos por insectos floemófagos son marcadamente diferentes de los inducidos por insectos con otras formas de alimentación y están generalmente asociados con la activación de los genes de respuesta SA y una débil expresión de los genes de JA (De Vos et al. 2005; Gao et al. 2007; Kempema et al. 2007; Thompson & Goggin 2006). La inducción de la vía de los JA por áfidos probablemente refleja el daño celular causado por el estilete (Kaloshian & Walling 2005; Thompson & Goggin 2006). El floemófago mosca blanca *B. tabaci*, la cual causa mucho menos daño mecánico que los áfidos no activan los genes de JA (Zarate et al. 2007). Estos estudios indican que los floemófagos suprimen activamente las defensas basadas en JA (Thompson & Goggin 2006; Zarate et al. 2007). Resumiendo, los insectos con diferentes modos de alimentación tienden a inducir distintos (pero sobrelapantes) patrones de expresión de genes, mientras que insectos con el mismo modo de alimentación inducen respuestas muy similares.

Debido a que la mayoría de insectos delatan su presencia disparando la síntesis de JA en tejidos dañados, estas defensas pueden haber evolucionado como una estrategia no específica para disuadir una gran variedad de diferentes herbívoros. Se conoce muy poco acerca de los eventos tempranos de señalización involucrados en la producción de JA bioactivos inducidas por herbívoros. Otros tipos de daño, estreses abióticos y aspectos del desarrollo de las plantas activan la síntesis de JA y muchas defensas asociadas, indicando que los factores derivados de insectos no son estrictamente requeridos para estas respuestas. Más bien parecería que los inductores derivados de insectos tales como los FACs e inceptinas, los cuales estimulan la síntesis de JA cuando son aplicados sobre heridas hechas artificialmente, refuerzan o

amplifican la vía de los JA (Kessler & Baldwin 2002; Schmelz et al. 2006). Sumado a la regulación por factores derivados del herbívoro, las defensas reguladas podrían ser positiva o negativamente moduladas por otras fitohormonas (Bostock 2005). El SA, por ejemplo es bien conocido por su habilidad para antagonizar respuestas de defensa inducidas por lepidópteros (Bostock 2005; Cui et al. 2002). El Etileno (ET) también afecta la expresión de proteínas defensivas y metabolitos secundarios (Harfouche et al. 2006; Hudgins & Franceschi 2004). Sin embargo, en comparación con los JA, la producción de ET durante el ataque de los herbívoros se considera que juega un papel menor en la respuesta de defensas activas (von Dahl & Baldwin 2007). La especificidad de las respuestas de defensa inducida a la herbivoría puede también ser influenciada por interacciones diferenciales entre varios JA bioactivos, *COI1*, proteínas *JAZ* y los factores de transcripción que ellos regulan. Por ejemplo, miembros específicos de la familia *JAZ* podrían controlar distintos conjuntos de genes de respuesta a herbívoros en diferentes tipos de células o en respuesta a diferentes sustratos con que se unen. La fosforilación de proteínas *JAZ* por una MAPK (Katou et al. 2005), sugiere un mecanismo para modificar la especificidad de las respuestas o integrar la vía de los JA con otras señales. Estudios previos (Staswick & Tiryaki 2004) han mostrado que JA está conjugado al precursor de ET 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC), esto es interesante porque JA y ET se acumulan simultáneamente y actúan sinérgicamente en respuesta a la herbivoría (Horiuchi et al. 2001; Schmelz et al. 2003; von Dahl & Baldwin 2007). La hipótesis que dice que JA-ACC está involucrada en el control de defensas que son coordinadamente reguladas por JA y ET debe ser probada.

1.3.1.2.4 Señalización sistémica

Muchas defensas inducibles son expresadas rápidamente (en unas pocas horas) en hojas sin dañar, de plantas que han sido atacadas por herbívoros. Esta respuesta sistémica, la cual ha sido documentada en un amplio rango de especies de plantas, provee una resistencia efectiva para futuros ataques de insectos (Bostock 2005; Karban & Baldwin 1997). Desde su descubrimiento hace más de 38 años (Green & Ryan 1972), se han hecho considerables esfuerzos en investigación para identificar las señales sistémicas de daño y los mecanismos subyacentes por los cuales ellas son producidas, transportadas y percibidas. Algunos de estos

estudios indican que la expresión de los inhibidores de proteinasas sistémicos (PI) en *S. lycopersicum* depende de la síntesis de JA en el sitio de la herida y de la percepción de los JA en hojas distales sin daño. Estos y otros estudios apoyan el modelo en el cual los JA actúan como una señal móvil del floema (Schaller et al. 2005). El péptido *sistemin*, el cual es un potente inductor de expresión de PI en *S. lycopersicum*, parece reforzar las defensas sistémicas amplificando la síntesis de JA en plantas dañadas (Schilmiller & Howe 2005). Sin embargo, el homólogo de *sistemin* en *Solanum nigrum* (hierba mora negra) no media la expresión de de PI o de otras respuestas de defensa directas (Schmidt & Baldwin 2006). El divergente papel de *sistemin* en especies estrechamente relacionadas sugiere que diferentes plantas pueden emplear distintos mecanismos para regular la síntesis de JA y las respuestas sistémicas a la herbivoría (Howe 2004). Estudios con *N. attenuata* indican que los FACs en secreciones orales de *M. sexta* inducen una rápida activación de actividad MAPK y de genes relacionados con defensa en áreas sin dañar de las hojas atacadas (Wu et al. 2007). Esta respuesta sistémica dentro de la hoja es seguida por la producción de señales móviles secundarias (por ejemplo JA) que inician la expresión de PI en hojas distales sin dañar. Estos hallazgos sugieren que las múltiples señales intercelulares, actúan sobre un rango de distancias, mediando la compleja respuesta espacio-temporal de las plantas a la herbivoría. Tanto el *sistemin* de *S. lycopersicum* y los FAC regulan positivamente la síntesis de JA por intermedio de la cascada de las MAPK (Kandoth et al. 2007; Wu et al. 2007) sugiriendo que las vías de señalización paralela iniciadas en la interfase planta-insecto podrían converger en la vía de los JA.

1.3.1.3 Respuestas de defensa directas

1.3.1.3.1 Metabolitos secundarios

Es probable que todas las plantas presenten acumulación constitutiva o inducida de metabolitos secundarios tóxicos como parte de su defensa contra la herbivoría. Investigaciones hechas con numerosas especies de plantas han revelado una gran variedad de pequeñas moléculas con efectos tóxicos o anti alimentarios a los insectos herbívoros. Muchos

terpenoides, la clase metabólicamente más diversa de metabolitos secundarios de plantas (más de 40000 estructuras conocidas), juegan un importante papel en defensa (Aharoni et al. 2005). Los alcaloides, metabolitos secundarios ampliamente distribuidos, los cuales son mejor conocidos por sus efectos metabólicos en mamíferos (cafeína, nicotina, morfina, estricnina, cocaína), probablemente evolucionaron como defensa contra insectos herbívoros. Otra clase de metabolitos secundarios de plantas bien estudiados con propiedades defensivas incluye a las furanocumarinas, cardenolidas, taninos, saponinas, glucosinolatos y glucósidos cianogénicos.

Los avances en biología molecular de plantas han hecho posible la identificación de las vías biosintéticas que llevan a la producción de toxinas defensivas. Un ejemplo de estos, fue el descubrimiento de las cinco enzimas involucradas en la biosíntesis de 2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-one (DIBOA), una toxina encontrada en maíz, trigo y otras gramíneas (Frey et al. 1997). También han sido identificados casi todos los genes requeridos para la producción de glucosinolatos, una diversa clase de metabolitos encontrados en *A. thaliana* y otras Brassicaceas (Halkier & Gershenzon 2006). Como un ejemplo de cómo tales conocimientos de las rutas bioquímicas pueden ser aplicados a cambios en la inmunidad de las plantas a la herbivoría, *A. thaliana* fue transformada con tres enzimas de *Sorghum bicolor* para producir el glucósido cianogénico *dhurrin,* el cual realza la resistencia a *Phyllotreta nemorum* (Tattersall et al. 2001).

Muchos componentes defensivos son potencialmente tóxicos para las plantas que los producen. Los dos sistemas defensivos anteriormente mencionados incluyen compuestos que son secuestrados en las plantas, pero no son activados hasta que ocurre la herbivoría. DIBOA es almacenada como DIBOA-glucósido inactivo, y es enzimáticamente activado durante la herbivoría. La compleja mezcla de toxinas encontradas en muchas plantas puede producir efectos sinérgicos en defensa contra herbívoros. Por ejemplo, una combinación de dos monoterpenoides es casi 10 veces más tóxica para *Spodoptera litura* (gusano del tabaco) que lo que habría sido predicho como un simple efecto aditivo (Hummelbrunner & Isman 2001). Similarmente la exposición de *Callosobruchus maculatus* (gorgojo brúquido) a PI muestra efectos sinérgicos, es decir, la inhibición en el crecimiento por varios PI es más efectiva que la suma de los inhibidores individuales (Amirhusin et al. 2007). Aunque algunos herbívoros

podrían compensar la presencia de PI consumiendo adicionalmente tejido de la planta (Winterer & Bergelson 2001), el incremento de consumo de alimentos puede verse limitado por el efecto nocivo del incremento a la exposición de las toxinas. Sumado a los posibles efectos sinérgicos, la diversidad metabólica en producción de toxinas por plantas individuales podría también proveer defensa contra múltiples herbívoros con diferentes modos de alimentación o diferentes mecanismos de resistencia.

Estudios hechos con glucosinolatos han demostrado como la selección natural para un diverso perfil de metabolitos secundarios puede proveer especificidad defensiva. Cerca de 40 diferentes glucosinolatos han sido encontrados en *A. thaliana* y más de 100 productos de degradación son probablemente formados después de la activación por la enzima myrosinasa. Experimentos con cuatro insectos herbívoros mostraron que el indol derivado de triptófano, los glucosinolatos alifáticos derivados de metionina tienen diferentes efectos sobre Hemíptera y Lepidoptera (Mewis et al. 2005). Los indoles glucosinolatos proveen una mejor defensa contra *M. persicae* (Kim & Jander 2007). Los isotiocianatos proveen mejor resistencia a *T. ni, S. littoralis* y *P. rapae* que los nitrilos (Burow et al. 2006), sin embargo la continua presencia de proteínas generadas por nitrilos en muchas variedades de *A. thaliana* (Lambrix et al. 2001) sugiere que la producción de nitrilos beneficia a las plantas en la naturaleza.

1.3.1.3.2 Proteínas de defensa

La alimentación por insectos dispara la expresión de proteínas de defensa en la planta, las cuales ejercen efectos directos sobre el atacante. Las PI que comprenden varias clases de proteasa digestivas en el intestino del insecto, han sido estudiadas por su papel en las respuestas de defensa activas (Green & Ryan 1972; Ryan 1990). La inhibición de las proteasas del intestino del insecto por PI resulta en deficiencias en amino ácidos que afectan negativamente el crecimiento y desarrollo del herbívoro (Lison et al. 2006; Zavala et al. 2004). La efectividad de PI como defensa es a menudo frustrada por la habilidad adaptativa del insecto para expresar proteasas digestivas que son insensibles a los PI de la planta hospedera, o los inactivan (Bayes et al. 2005; Giri et al. 1998; Jongsma et al. 1995). La diversidad y rápida evolución de ciertas familias de genes de PI podrían reflejar la evolución de adaptaciones del

insecto que ha llevado a la carrera de armas químicas entre plantas y herbívoros (Talyzina & Ingvarsson 2006). El arsenal de proteínas defensivas de las plantas también incluye enzimas que rompen el aparato digestivo del insecto y otros aspectos de la alimentación. Miembros de la familia de enzimas cisteína proteasas, por ejemplo, rompen la membrana peritrófica rica en quitina que protege el epitelio del intestino (Mohan et al. 2006). Lectinas y quitinasas de plantas pueden tener como blanco los componentes del intestino del insecto que contienen carbohidratos (Lawrence & Novak 2006; Peumans & Vandamme 1995). Las enzimas oxidativas tales como las polifenol oxidasas (PPO) y lipoxigenasas (LOX) modifican la proteína dietaria a través de la producción de *o*-quinonas y peróxidos lípidos, respectivamente (Constabel et al. 1995; Felton et al. 1994; Wang & Constabel 2004).

El descubrimiento de nuevas proteínas de defensa ha sido facilitado por análisis proteómicos del contenido del intestino y de las heces de los insectos. Este enfoque está basado en la premisa que las proteínas de defensa son relativamente resistentes a las proteasas del intestino y, como consecuencia, son altamente enriquecidas durante el paso del bolo alimenticio a través del insecto. Aplicación de este procedimiento a tomate infestado con larvas de *M. sexta* llevó a la identificación de isoformas de arginasa y treonina desaminasa (TD), las cuales degradan los aminoácidos esenciales arginina y treonina, respectivamente, en el intestino del insecto (Chen et al. 2005). Arginasa y TD parecen ser los componentes de un sistema de defensa de varios niveles que funciona para agotar la disponibilidad de amino ácidos en el ambiente alcalino del intestino del lepidóptero; el bajo contenido de proteína (amino ácidos) del tejido de la planta es frecuentemente un factor limitante para el crecimiento de insectos herbívoros (Mattson 1980). La habilidad de la TD para degradar treonina es activada durante el ataque del herbívoro por remoción proteolítica del dominio regulatorio C-terminal de la enzima (Chen et al. 2007). En resumen, las defensas post-ingestación inducidas por daño probablemente involucran interacciones sinérgicas entre PI, enzimas oxidativas, enzimas que degradan amino ácidos y metabolitos que ejercen una combinación de efectos tóxicos y anti alimentarios. El papel protagónico de las proteínas en este proceso amplia el tradicional punto de vista que los metabolitos secundarios son los mayores determinantes de la utilización de la planta hospedera por los insectos. La expresión inducida de muchas proteínas anti-insectos está estrechamente regulada por la vía de señalización de los JA. Ejemplo de

proteínas inducibles por JA que tienen un papel ya establecido o supuesto en defensa directa incluye PPO, arginasa, TD, leucina amino peptidasa, fosfatasa ácida (*VSP2*), y un amplio espectro de PI (Chen et al. 2007; Chen et al. 2005; Constabel et al. 1995; Felton et al. 1994; Lison et al. 2006). La abundancia de muchas de estas proteínas en el intestino del insecto está correlacionada con los altos niveles de acumulación de los correspondientes transcritos en las hojas dañadas por insectos (Chen et al. 2007, 2005). La transcripción inducida por JA y la alta estabilidad de las proteínas parecen proveer un mecanismo complementario para maximizar la efectividad de las defensas basadas en proteínas mientras minimizan los altos costos asociados con la producción de estas defensas basada en proteínas. La pérdida de expresión en proteínas inducibles por JA en mutantes *coi1* indican que estas proteínas son indispensables para el crecimiento vegetativo de las plantas en el laboratorio. Esta observación junto con la esporádica ocurrencia de proteínas inducibles por JA (como TD) en linajes específicos de plantas, sugieren que las enzimas defensivas activas en el intestino, evolucionaron a partir de enzimas del metabolismo basal preexistentes que catabolizan nutrientes esenciales durante el desarrollo normal de la planta.

1.3.1.4 Compuestos volátiles como mediadores de defensas directas e indirectas

La emisión de volátiles en respuesta a la herbivoría puede proveer un beneficio defensivo directo disuadiendo a una posterior oviposición (DeMoraes et al. 2001) o produciendo un beneficio indirecto por atracción de predadores (Kessler & Baldwin 2001). La atracción de avispas parasitoides por volátiles inducidos por daño es un fenómeno que ha sido muy bien estudiado en muchas especies de plantas. Los parasitoides asociados con olores derivados de la planta con presencia de la presa, lo cual provee un beneficio defensivo a la planta que los emite tan grande como la producción de volátiles es un signo confiable de herbivoría. La especificidad de esta interacción ha sido demostrada con la expresión del TPS10 de *Z. mays* una terpeno sintasa inducida por herbívoros que forma (*E*)-β-farneseno, (*E*)-α-bergamoteno, y otros sesqui terpenos en *A. thaliana* (Schnee et al. 2006). Las hembras del parasitoide *Cotesia marginiventris,* la cual ha aprendido a asociar este olor con su presa, *S. littoralis,* fueron subsecuentemente atraídas a *A. thaliana* produciendo TPS10. Debido a que

normalmente *A. thaliana* no produce cantidades significativas de terpenos volátiles, este experimento demostró que un solo gen de *Z. mays* inducido por herbívoros es suficiente para inducir esta defensa indirecta. Otro trabajo con *Z. mays* mostró que la emisión de volátiles provee una defensa indirecta contra herbívoros del suelo. En respuesta al ataque de *Diabrotica virgifera* (gusano de la raíz del maíz), las raíces emitían (*E*)-β-cariofileno, el cual atrae a el nemátodo *Heterorhabditis megidis* el cual se alimenta de las larvas de *D. virgifera* (Rassman et al. 2005).

1.3.1.4.1 Comunicación entre y dentro de plantas mediada por volátiles

Sumado al papel que cumplen mediando interacciones de herbívoros y predadores, los volátiles inducidos por daño pueden producir señales que permiten a las plantas vecinas prepararse para una inminente herbivoría. Este proceso conocido como "priming", resulta en una más rápida o mejor repuesta a la subsecuente herbivoría (Arimura et al. 2000; Engelberth et al. 2004; Karban et al. 2000). Un ejemplo de esto es el estudio hecho con compuestos volátiles de "hojas verdes" (productos de la degradación primaria de los ácidos linoleico y linolénico) liberados por *Z. mays* los cuales alertan a las plantas vecinas a responder más vigorosamente al subsecuente daño mecánico y a la aplicación de secreciones orales de orugas (Engelberth et al. 2004). Plantas de *N. attenuata* sembradas al lado de *Artemisia tridentata* (Artemisa) reciben una mezcla de compuestos volátiles orgánicos que alteran la expresión génica y causan una más rápida inducción de PI una vez son atacadas por *M. sexta* (Kessler et al. 2006). A primera vista, parecería como si esta comunicación con señales volátiles produjeran un beneficio defensivo solo a la planta que lo recibe. Sin embargo, en un árbol u otra planta más grande, los volátiles transferidos entre ramas u hojas de un mismo individuo potencialmente permitiría una comunicación más rápida que las señales sistémicas propagadas a través del floema (como se describió arriba). Estudios hechos con dos sistemas de interacción planta-insecto proveen evidencia de tales comunicaciones intra planta mediadas por volátiles. Experimentos en campo con *A. tridentata* cortada mecánicamente mostraron que esta defensa depende del movimiento de las señales a través del aire entre ramas dañadas y ramas sin dañar (Karban et al. 2006). Experimentos en laboratorio con *Populus deltoides* × *Populus nigra* (poplar híbrido), mostraron que los volátiles emitidos por hojas atacadas por *Lymantria dispar*

(mosca gypsy) inducían a las hojas cercanas en la misma planta a liberar terpenos volátiles más rápidamente en respuesta al subsecuente ataque hecho por *L. dispar* (Frost et al. 2007).

1.3.2 Estudios moleculares de la interacción Planta-Mosca Blanca

Al igual que los estudios realizados para dilucidar las respuestas mediadas por el JA, en el caso de la respuesta de defensa a moscas blancas, se ha utilizado como modelo experimental el tomate, una cucurbitácea, la calabaza y *A. thaliana* (Walling 2000; Zarate et al. 2007). Los genes inducidos durante la respuesta de defensa a mosca blanca (*Bemisia tabaci* y *B. argentifolii*) en tomate y calabaza son:

Tomate *Wf1:* es una subunidad grande que pertenece a una multi subunidad de un complejo de membrana-plasma llamado NADPH Oxidasa, la cual genera especies de oxígeno reactivo (ROI). Sólo la gp91-*phox* ha sido clonada en plantas (Walling 2000).

Calabaza *SLW1:* (*Silverleaf whitefly induced 1*) codifica para una peptidasa M20b. Su función es desconocida. Es preferencialmente inducido por *Bemisia argentifolii* y es regulada por la vía del JA/ET (van de Ven et al. 2000).

Calabaza *SLW3:* (*Silverleaf whitefly induced 3*) codifica para una proteína similar a una β-glucosidasa, su función es desconocida. Es preferencialmente inducido por *Bemisia argentifolii* y parece estar regulada por una nueva vía de señalización (van de Ven et al. 2000).

Tanto en calabaza como en tomate, estos genes responden a señales generadas por especies específicas de insectos y estados específicos de desarrollo. Las señales generadas por la alimentación de áfidos y moscas blancas así como tambien sus estados inmaduros y adultos, son distintos. Los transcriptos de estos genes se incrementan en respuesta a alimentación por ninfas y no por adultos de *B. argentifolii*. En esta especie los transcriptos de *SLW1* y *SLW3* se acumulan después del deficit hídrico, sugiriendo que las señales producidas por la alimentación de *B. argentifolii* y las de deficit hídrico podrían compartir algunas características. Transcriptos de *SLW1 y SLW3* se acumulan en calabaza sistémicamente

después de la alimentación de *B. argentifolii* y no de *B. tabaci* (van de Ven et al. 2000). Esta expresión preferencial de estos genes por *B. argentifolii* sugiere que esta especie genera: i) una nueva señal, ii) grandes cantidades de elicitores sistémicos, o iii) tiene una señal más potente que la producida por *B. tabaci. SLW1* es regulado por la vía del JA/ET, por el contrario los transcriptos de *SLW3* no se acumulan en respuesta a ninguna señal de defensa o daño conocida, sugiriendo que *B. argentifolii* activa una nueva vía de señalización que induce la expresión de *SLW3* (van de Ven et al. 2000).

1.3.2.1 El papel de las PR, de los metabolitos secundarios y volátiles en resistencia a Hemípteros

El papel de las proteínas **PR** y otros productos de genes cuya expresión es inducida por herbívoros chupadores es desconocido. La acelerada expresión de los genes PR en plantas resistentes a herbívoros, sugiere que uno o más componentes, inducidos por su modo de alimentación, podría funcionar en Antixenosis o Antibiosis (Bronner et al. 1991; van der Westhuizen et al. 1998). En cuanto a los metabolitos secundarios estos parecen influenciar mucho la alimentación de herbívoros chupadores. Generalmentes los metabolitos secundarios pueden ser producidos por tricomas glandulares, los cuales afectan el asentamiento y sobrevivencia del herbívoro sobre la planta hospedera (Wagner et al. 2004). Estos tricomas producen toda una gama de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles que incluyen acil azúcares, terpenoides, fenil propanoides, flavonoides. La acción de estos metabolitos es realzada y suprimida por las señales de defensa del JA y del SA respectivamente (Li et al. 2004). En especies del género *Solanum*, los tricomas glandulares tipo **IV** y **VI** están asociados con altos niveles de resistencia a diversas especies de artrópodos como áfidos y moscas blancas (Wagner et al. 2004; Kennedy 2003). Se han mapeado QTLs que controlan la resistencia mediada por estos tricomas tipo **IV** y **VI**, correlacionados con producción de acil azúcares y compuestos fenólicos tóxicos. Los acil azúcares son irritantes y evitan el asentamiento y alimentación del insecto. Los tricomas tipo **VI** contienen peroxidasa, polifenoloxidasa, rutina, ácido clorogénico y conjugados de ácido cafeico que cuando son liberados reducen la calidad nutricional de los tejidos de la planta para los insectos. Genes que

controlan la producción de estos componentes han sido utilizados en programas de mejoramiento para resistencia a insectos. (Kaloshian & Walling 2005).

1.3.2.2 Secreciones orales de Hemípteros: inductores de defensa

Las señales generadas por estos herbívoros que perforan las células de las plantas para remover líquidos como fuente de nutrientes, son muy complejas. Algunas señales, como la expresión de genes PR, son probablemente compartidas por muchos herbívoros (moscas blancas, áfidos, ácaros) (Walling 2000). Algunos inductores parecen regular las respuestas especie-específicas, tales como cambios en los niveles de ARNs de *SLW* y *Wf1* y del complejo de mezclas volátiles que regulan las interacciones planta - herbívoro - enemigo natural (van de Ven et al. 2000). Un componente de la saliva de herbívoros es probablemente el inductor para la expresión de los genes PR, *Wf1, SLW* (Kaloshian & Walling 2005). Los áfidos y las moscas blancas secretan dos tipos de saliva a lo largo de la vía en que penetra el estilete en el sitio donde se alimentan (Miles 1999): a: *Saliva envolvente* que rápidamente se gelifica y envuelve el estilete, compuesta de proteínas, fosfolípidos, carbohidratos conjugados. No es claro si alguno de estos componentes son inductores de las interacciones planta-herbívoro. b: *Saliva líquida*, digestiva, esta es mucho más compleja, conteniendo una amplia variedad de enzimas como pectinasas, celulasas, amilasas, proteasas, lipasas, fosfatasas alcalina y acídica y peroxidasas (Miles 1999).

Los inductores generales y especie-específicos podrían corresponder a uno de estos constituyentes o algún constituyente salivar sin caracterizar (Walling 2000). Un ejemplo de estos constituyentes como inductores está, el *quitosán* (aislado de ácaros), los oligogalacturónidos (OGAs) producidos por pectinasas, ROS generado por peroxidasas (Bronner et al. 1989). Los inductores especie específicos y generales, podrían ser directamente sintetizados por el insecto o podrían ser producto de una bacteria endosimbionte (Douglas 1998). Estos inductores también podrían generar la producción por parte de la planta, de volátiles derivados del SA (Metil Salicilato, MeSA) y lípidos C_6 los cuales se

acumulan en respuesta a la alimentación por áfidos y evitan activamente el asentamiento y la fecundidad del insecto (Hardie et al. 1994; Shulaev et al. 1997). La producción de volátiles puede actuar como un mecanismo de defensa directo, teniendo un efecto disuasivo hacia el insecto (Antixenosis) o indirecto atrayendo enemigos naturales de la plaga como predadores o parasitoides. Algunas avispas parasíticas frecuentemente utilizan estos volátiles para ubicar sus hospederos particulares y aún instares particulares de su hospedero (Pare & Tumlinson 1999).

1.3.2.3 Interacción *A. thaliana-B. tabaci*

La interacción *A. thaliana -B. tabaci* B es la mejor caracterizada hasta ahora (Kempema et al. 2007; Zarate et al. 2007). Análisis de expresión de perfiles génicos y la acción de mosca blanca sobre plantas mutantes con genes de defensa muestra que las moscas blancas suprimen las respuestas de defensa efectivas reguladas por el ácido jasmónico (antibiosis), manipulando a *A. thaliana* a ser un mejor hospedero para el crecimiento de las ninfas (Zarate et al. 2007). Utilizando la estrategia de secuenciación de *Illumina*® llamada RNA-seq, actualmente se están identificando los genes de *A. thaliana* cuya expresión está estrictamente correlacionada con el realce (*cev1,* NahG*, npr1*) o incapacidad (*cim10, coi1)* de la resistencia a *B. tabaci* (Walling, comunicación personal).

1.4 Genética y genómica de yuca

La yuca es un alopoliploide con 36 cromosomas (Magoon et al. 1969). Debido a la pobre producción de semilla, la heterocigocidad natural del cultivo, la alta carga génica y la alta susceptibilidad a la depresión endogámica causando pérdida de heterocigocidad, la mayoría de las variedades de yuca son propagadas por esquejes, preservando así su naturaleza heterocigoto (Blair et al. 2007). Esta heterocigocidad no solo representa un reto para los mejoradores de yuca, sino que también ha permitido la identificación de cerca de 600 marcadores moleculares (Fregene et al. 1997; Mba et al. 2001). Marcadores de secuencia

simple repetida (SSR) fueron utilizados para estudiar la estructura y diversidad genética en una gran colección de variedades locales de Africa y Latinoamérica (http://newapp.ciat.cgiar.org/molcas). En CIAT se ha construido el primer mapa de ligamiento de yuca (Fregene et al. 1997). Los marcadores moleculares se han ligado a genes simples que confieren resistencia a CMD, ácaro verde, la enfermedad CBB (Cassava bacterial bligth), aumento en el contenido de β-caroteno y rendimiento en producción de raíces (Ferreira et al. 2008; Marin Colorado et al. 2009; Ogunjobi et al. 2006). En CIAT, también se ha desarrollado un mapa de ligamiento genético con marcadores de tipo microsatélites y AFLPs a partir de una F1 proveniente del cruce entre el genotipo MEcu 72 (Resistente a mosca blanca) y el genotipo MCol 2246 (Susceptible) (Vargas 2005). El mapa de ligamiento posee 132 marcadores, 103 microsatélites, 1 RGA (*Resistance gene analogs*) y 57 AFLPs. El mapa consiste de 20 grupos de ligamiento, lo cual representa aproximadamente el genoma haploide de yuca. Los datos moleculares fueron analizados con el paquete QTL cartographer para determinar la asociación entre los marcadores y la caracterización fenotípica para resistencia a mosca blanca (Vargas 2005).

La versión 4 del genoma de yuca (variedad AM560-2) fue publicado por el *Department of Energy's Joint Genome Institute (JGI-DOE*) bajo el programa comunitario de secuenciación *Community Sequencing Program* (http://www.jgi.doe.gov/CSP). Esta secuencia cubre ~70% de las 760-Megabases del genoma de yuca y virtualmente todas las regiones génicas de la misma. La Fundación Gates también ha invertido $1.3 millones de dólares para refinar la anotación del genoma y desarrollar una robusta plataforma de marcadores SNP, con el fin de facilitar el mapeo molecular de yuca y el mejoramiento utilizando Selección Asistida por Marcadores (MAS) (CPG 2009). Sumado a esto, otros tres genomas secuenciados fueron ensamblados en China (ISSAA 2010). Cerca de 30,000 loci que codifican proteínas están actualmente anotados en el genoma de yuca. Cerca de 60,400 ESTs obtenidos a partir de librerías de ADNc para respuestas a estreses abióticos e infecciones por virus y bacterias han sido identificadas (Mba et al. 2001; Sakurai et al. 2007). Se han construido dos librerías a partir de tejido de raíces de yuca para bajo y alto contenido de almidón y a partir de tejido sometido al patógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. Se han secuenciado 11954 clones de ADNc y a partir del análisis de Cluster, se ha identificado

un set de genes únicos con 5700 secuencias (López et al, 2004), con el cual se ha contruido un microarreglo de unigenes de yuca (López et al, 2004). Dos librerías de ADNc adicionales obtenidas a partir de 23 tratamientos incluyendo infestación de hojas de MEcu 72 con *A. socialis* están siendo actualmente analizadas (CIAT/RIKEN).

1.4.1 Genómica Funcional

La genómica funcional pretende explicar la función de cada gen descubierto en los estudios de genómica estructural. La función de un gen puede ser considerada desde varios puntos de vista: la función bioquímica de la proteína para la cual este codifica, la función celular determinada por el proceso en el cual este participa, la función en el desarrollo del organismo que lo contiene y, por último, la función adaptativa de este, es decir, cómo influye la su presencia en la aptitud del individuo (Bouchez & Höfte 1998). Las búsquedas de similitudes en las bases de datos son la forma más sencilla de obtener información funcional de un gen, aunque éstas provean únicamente de funciones bioquímicas putativas (Bouchez & Höfte 1998). En general, el patrón de expresión espacial y temporal de un gen o su inducción bajo un estímulo en particular, están ligados a la función que este elemento desempeña en el organismo, por lo tanto su estudio puede utilizarse como indicador de los procesos en los que está involucrado. La habilidad para representar estos perfiles transcripcionales mejora rápidamente, hecho que promete aumentar nuestra capacidad para comprender los múltiples elementos que determinan los caracteres fenotípicos poligénicos en el futuro (Doerge 2002).

En los últimos 25 años con el desarrollo de la genómica, se han secuenciado genomas enteros de muchos organismos, entre ellos más de 200 procariotas y también genomas de eucariotes como *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana, Oryza sativa, Manihot esculenta, Drosophila melanogaster* y *Homo sapiens* entre otros (www.genomesonline.org). Sin embargo, es necesario realizar una conexión entre la información de secuencia y la información funcional contenida en el genoma. La genómica funcional a gran escala que pueda rendir cuentas, tanto de la proteína específica que un gen codifica, como del papel de

ese gen en un sentido funcional más amplio de sistema, célula y organismo. El término genómica funcional se define como "el desarrollo y aplicación de experimentos a gran escala (genomas o sistemas completos) para estudiar funciones génicas haciendo uso de la información suministrada por la genómica estructural" (Hieter & Bogusky 1997). Dado que la genómica funcional se aproxima al entendimiento del genoma desde un punto de vista amplio, todos sus análisis se dirigen a sistemas biológicos en lugar de componentes individuales de esos sistemas. De esta manera se busca, en teoría, desarrollar métodos que permitan realizar "en masa y con alta eficiencia" (en inglés, "Highthroughput") estudios funcionales de un gran número de genes (Bouchez & Hofte 1998). La última década ha sido testigo del gran avance de la genómica estructural y funcional. Respecto a la primera, muchos genomas se han secuenciado y muchos otros están en proceso. En cuanto a la genómica funcional, existen estudios a diferentes niveles: expresión génica, de proteínas, genética reversa, mutagénesis etc. que han generado una abrumadora cantidad de datos de una amplia variedad de especies.

1.4.1.1 Librerías sustractivas: herramienta para encontrar genes diferencialmente expresados

Una de las herramientas más utilizadas en la última década para identificar genes expresados diferencialmente son las librerías sustractivas (Yang et al. 1999). Las técnicas de sustracción permiten aislar genes que sólo pertenecen a una de dos poblaciones que se comparan. Por ejemplo, genes expresados diferencialmente entre dos tejidos distintos, genes que pertenecen exclusivamente a ciertos estados de desarrollo ó genes expresados diferencialmente en respuesta al ataque de un patógeno etc. (Diatchenko et al. 1996; Luo et al. 1999). Diferentes métodos se han desarrollado para construir librerías sustractivas, entre ellos se encuentran la Hibridación Sustractiva (*Supression Subtractive Hybridization* SSH, Diatchenko et al. 1996), RDA (*Representational Difference Analysis*) (Hunt & Livesey, Eds. 2000), perfiles diferenciales (*Differential Display*) (Liang & Pardee 1992), y el DSC (*Diferencial Subtraction Chain*) (Luo et al. 1999). Las técnicas de perfiles diferenciales y SSH poseen frecuentes falsos positivos y significativa amplificación de secuencias no deseadas "background". Por otro lado, el SSH permite sólo un ciclo de hibridación. El método

de RDA ha sido reportado como bastante complicado y laborioso. En contraste, el método de sustracción DSC produce un rápido y eficiente aislamiento de secuencias de baja expresión con mínimo "background" (Luo et al. 1999; Soto 2003).

1.4.1.2 La metodología DSC (*Diferencial Subtraction Chain*)

El método DSC puede identificar diferencias entre dos poblaciones de ADN. Está basado en una doble eliminación de las secuencias compartidas entre las dos poblaciones, mientras preserva las secuencias de una población que no tienen contraparte en la otra (Luo et al. 1999). En principio el ADNc que es usado para sustraer o "driver", y el ADNc que está siendo sustraído o "tester", son digeridos con la misma enzima de restricción. Seguidamente, el producto de la digestión es ligado con un adaptador/primer diferente para cada población de ADNc y el producto de esta ligación es amplificado con primers específicos. El "driver" amplificado es digerido con la misma enzima de restricción para remover los adaptadores, después se mezclan el "tester" (que aún tiene adaptadores) y "driver" (donde han sido removidos) y son denaturados e hibridados. Los productos de la hibridación son tratados con una nucleasa (en inglés, *Mung Bean nuclease*) para remover los adaptadores (presentes como extremos cohesivos de cadena sencilla en las secuencias hibridadas) en la hibridación entre las secuencias comunes de las dos poblaciones de ADNc "tester" y "driver", mientras se conservan los adaptadores de las secuencias hibridadas propias únicamente del "tester". Finalmente, el ADNc es sometido a denaturación y rehibridación el número de veces que sea necesario (Luo et al. 1999). Así, se conservan las secuencias que están presentes únicamente en el "tester". De esta manera pueden construirse librerías que sólo contienen estas secuencias. El número de copias que sobreviven de "tester" después de cada ronda de sustracción puede ser predicha a través de la siguiente ecuación: $\log Ye = logY + 2nlogA$ donde Ye es el número probable de copias que sobreviven después de n rondas, Y es el número total de copias de "tester" y A es la probabilidad que las secuencias de "tester" sufran auto-alineación antes de la primera ronda de DSC. Según la ecuación, 10^9 copias iniciales de "tester" serán eliminadas en presencia de 99 veces más de "driver" con sólo 3 rondas de hibridación (Luo et al. 1999).

1.4.1.3 Microarreglos de ADN

El estudio de la expresión génica con los métodos tradicionales de biología molecular generalmente abarcan uno o pocos genes en un solo experimento, lo cual significa que la obtención y comprensión de una imagen amplia de el funcionamiento génico es limitada. La tecnología de microarreglos de ADNc permite realizar un análisis global de patrones de expresión de cientos o miles de genes (Harrington et al. 2000). Han sido desarrollados dos tipos de microarreglos de ácidos nucleicos:

1) Basado en oligonucleótidos: se sintetizan los oligonucleótidos sobre unas pequeñas láminas de vidrio (*in situ)* aplicando varias estrategias de química combinatoria y fotolitografía, de esta manera pueden escogerse de las bases de datos las secuencias que se desean poner en el arreglo y sintetizarlas. Requiere conocer la secuencia del genoma completo para diseñar los oligos (Lemieux et al. 1998). La compañía Affymetrix ha producido en masa "chips" de ADN a bajo costo (Knudsen 2002).
2) Basado en fragmentos de ADN: se forman los microarreglos organizando fragmentos del ADN de interés sobre las láminas de vidrio, las cuales pueden ser obtenidas a partir de librerías genómicas o de ADNc y por amplificación por PCR.

1.4.1.4 Construcción de microarreglos de ADN

En la construcción de microarreglos un robot organiza una matriz con fragmentos de ADN amplificados por PCR sobre una lámina de vidrio, cada uno de ellos correspondiente a un único gen. Estos fragmentos pueden ser clones anónimos de ADNc, clones de ESTs, clones genómicos anónimos, o ADN amplificado de marcos de lectura abiertos (ORF) encontrados en genomas secuenciados (Somerville & Somerville 1999). Pueden organizarse en un arreglo hasta 10000 clones/3.24 cm^2 (Kehoe 1999). Una vez organizados los clones en

la matriz, son hibridados con dos poblaciones de ADNc derivado de dos muestras de ARNm diferentes: la muestra control y el tratamiento. En el proceso de transcripción reversa para la síntesis del ADNc se introducen dos tipos de nucleótidos fluorescentes Cye3-dUTP (fluorescencia Verde) y Cye5-dUTP (fluorescencia Roja) para marcar diferencialmente cada población. Luego de remover el exceso de ADNc no hibridado, la matriz del microarreglo es excitada con luz. Un programa de computador asigna valores cuantitativos a las señales de fluorescencia asociadas con cada elemento del microarreglo que indican su intensidad y dan un estimativo de la abundancia de los ADNc en la muestra correspondiente, también se calcula la razón entre la intensidad de las señales de cada muestra, de manera que se presenta una abundancia relativa de ADNc de una muestra con respecto a la otra (Duggan et al. 1999).

Abundantes secuencias de ADNc están representadas por puntos del microarreglo que tienen alta fluorescencia, en contraste con las secuencias raras que presentan fluorescencia débil. La expresión génica usando microarreglos puede ser analizada desde por lo menos tres niveles de acuerdo a su complejidad (Hatfield et al. 2003). En el primero, se analizan genes únicos y se estudia el comportamiento en el patrón de expresión de cada gen cuando se compara un tratamiento o condición dada contra un control. En el segundo nivel, se estudian múltiples genes "clusters" determinando posibles funciones comunes, interacciones, coregulación, etc. Finalmente, en el tercer nivel, se estudian sistemas biológicos y el objetivo es entender los genes y sus proteínas desde el punto de vista amplio de sistemas completos y organismo.

El análisis de la expresión diferencial puede hacerse a través de estadísticos t (Callow et al. 2000), o estadísticos Z (Quackenbush 2001) o utilizando análisis de varianza (ANOVA) (Cui & Churchill 2003). Las imágenes capturadas con el escáner CCD (*Charge-Coupled Device*) muestran tres tipos de señales fluorescentes diferentes: amarilla, verde y roja. Los elementos del arreglo que presentan fluorescencia amarilla indican que las dos señales han tenido intensidades similares, es decir, que las poblaciones de ARNm fueron igualmente expresadas en las dos muestras. Los elementos con fluorescencia roja indican que la población de ARNm marcada con Cye5-dUTP presentó mayores niveles de expresión. Y en el

último caso es la población marcada con Cye3-dUTP quien presenta los mayores niveles de expresión. Diferentes estrategias pueden ser adoptadas para realizar estudios de expresión con microarreglos, entre ellas:

1) Elegir un grupo de genes cuya secuencia y posible función es conocida y que se cree participan en el objeto biológico de estudio (estrés, resistencia y defensa, alguna vía metabólica etc.) (Seki et al. 2001).
2) Construir grandes microarreglos de clones no conocidos y escoger sólo aquellos que presenten una expresión diferencial (expresados únicamente en el control ó en el tratamiento).
3) Generar un gran "Chip" que contenga todos los genes expresados de un organismo (DeRisi et al. 1997). En yuca existe un Microarreglo con 5700 Unigenes (López et al. 2004).

Utilizando los microarreglos se puede tener información cuantitativa de los patrones de expresión de genes que responden a patógenos, plagas, sequía, frío, variación en las condiciones salinas, fotoperíodo y otras variaciones ambientales. Igualmente, se tiene información acerca de genes que responden a diferentes estados de desarrollo como germinación, crecimiento y floración; o genes que responden a fitohormonas, reguladores de crecimiento, herbicidas y otros agroquímicos (Somerville & Somerville 1999).

1.4.1.5 Cassava Unigene Microarray

El Cassava Unigene Microarray fue construido a partir de una colección de ESTs de yuca (López et al. 2004), generados de ADNc de tejido de hojas, raíces y tallos de cinco variedades de esta especie. Estos ESTs fueron aislados de librerías estándar y librerías sustractivas. Algunas de estas variedades sometidas a la enfermedad vascular (CBB, *Cassava Bacterial Blight*) producida por *Xanthomonas axonopodis*, y las otras evaluadas por su contenido de almidón. Se secuenciaron 11954 clones de ADNc y por análisis de clusters se identificaron

5700 unigenes. A partir de esta librería de unigenes se construyó el Microarreglo, el cual consta de 14 placas de 384 pozos. Los ESTs y el microarreglo generado en este estudio proveen una importante herramienta para entender los mecanismos moleculares envueltos en dos procesos biológicos, la resistencia a CBB y la biosíntesis de almidón (López et al. 2004).

En el presente estudio se decidió utilizar el Cassava Unigene Microarray para analizar el perfil de transcripción de la yuca cuando es atacada por *A. socialis* un insecto chupador de floema, como complemento a las librerías sustractivas que construimos. *A. socialis* no es un patógeno como CBB, sin embargo decenas de estudios en la última década y gracias al desarrollo de técnicas como los microarreglos entre otras, se ha demostrado que a pesar que cada interacción planta-patógeno/insecto induce su propio perfil de transcripción en el hospedero, las vías de respuesta de defensa en plantas son conservadas (De Vos et al 2005). Las diferencias en estas respuestas depende de las características de la especie de la planta, si es resistente o susceptible, el modo de alimentación del insecto atacante, si el patógeno es biótrofo o necrótrofo, el tiempo que demora la planta en responder, y toda una cascada de señalización que depende de muchos factores que activan o no la respuesta de defensa (De Vos et al. 2005; Kempema et al. 2007; Mewis et al. 2006; Voelckel et al. 2004; Kessler & Baldwin, 2002; Glazebrook 1995). Yuca (*Manihot esculenta*) tiene aproximadamente 34000 genes (http://genome.jgi-psf.org/cassava/cassava.home.html), 5700 unigenes en parte inducidos por un patógeno, es un número considerable (la sexta parte) que puede dilucidar como responde la yuca al ataque de una plaga como *A. socialis* en diferentes momentos del ciclo de vida del insecto y comparando genotipo resistente infestado y sin infestar (EyESI) y el genotipo resistente y el susceptible ambos infestados (EyC). Muchos de estos genes del unigene juegan un importante papel en señales de transducción y eventos de regulación génica específicos para la respuesta de resistencia y algunos muestran similaridad a genes previamente identificados en mecanismos de defensa.

1.5 Bioinformática

Con el objetivo de explotar y transformar la gran cantidad de datos de secuencia en conocimiento biológico, e interpretar y organizar los datos de genómica funcional de una manera amplia y precisa, ha surgido **La Bioinformática** como una disciplina con poderosas herramientas que fusiona los conocimientos en biología, matemáticas y ciencias de la computación (Brown 2000). Puede ser definida como el uso de computadores para la adquisición, manejo, almacenamiento y análisis de la información biológica (Brown 2000). Ha surgido necesariamente como consecuencia del explosivo crecimiento de las aplicaciones en biotecnología y el crecimiento paralelo de las tecnologías en información. La bioinformática suministra un grupo de herramientas para realizar análisis de secuencias que pueden clasificarse entre otras:

1. Las que permiten localizar secuencias en bases de datos públicas utilizando un número de accesión o una palabra clave que dirige la búsqueda.
2. Las utilizadas para alinear dos o más secuencias.
3. Las que permiten encontrar secuencias similares a una de interés en una base de datos.
4. Las utilizadas para el análisis de secuencias de ADN, reuniendo cortos segmentos sobrelapados en secuencias consenso.
5. Las que permiten analizar propiedades físicas y químicas de proteínas.
6. Las utilizadas para localizar sitios de restricción, promotores, dominios de unión a ADN de proteínas.
7. Herramientas para análisis filogenéticos (Brown 2000).

Una de las áreas de la bioinformática que más se ha desarrollado como consecuencia de la gran demanda de datos biológicos es la construcción de bases de datos. Un extenso conjunto de bases de datos se pueden encontrar públicamente en Internet, con énfasis en diferentes 35 áreas (Baxevanis 2003).

1.5.1 Bases de datos

La bioinformática busca organizar, almacenar, integrar y analizar ambos tipos de información genómica: estructural y funcional. Grandes reservorios de información (millones de caracteres A, C, G y T que han sido generados en los proyectos de secuenciación) requieren decenas de giga bites y sofisticados recursos de informática para su manipulación (Baxevanis 2003). Para poder llevar a cabo el análisis de la gran cantidad de información de secuencias disponibles, es necesario reunir estas secuencias en recursos centrales y compartibles, es decir, en Bases de Datos. En el contexto de análisis de secuencias, se encuentran bases de datos primarias, compuestas y secundarias. Las bases de datos primarias de secuencias de nucleótidos más conocidas pertenecen a la Colaboración Internacional de Bases de Datos en Secuencias de Nucleótidos, conformada por el NCBI (del inglés, National Center for Biotechnology Information) creada en 1988, la base de datos de Japón DDBJ (del inglés, DNA Data Bank of Japan) y la base de datos de la unión europea EMBL (del inglés, European Molecular Biology Laboratory) (Baxevanis 2003).

1.5.1.1 Bases de datos primarias de secuencias de proteínas

PIR (Protein Sequence Database): fue desarrollada por la Fundación Nacional para la Investigación Biomédica (NBRF, National Biomedical Research Foundation). En la actualidad, PIR mantiene la base de datos de secuencias de proteínas PSD (PSD, Protein 36 Sequence Database) que contiene alrededor de 283.000 secuencias de un rango taxonómico amplio. También mantiene el NREF (del inglés, Non-redundant Reference Database) una base de datos con más de 1.000.000 secuencias de proteínas, e iProclass, una base de datos de familias de proteínas con información sobre estructura y función (Wu et al. 2003).

MIPS (Munich Information Center for Protein Sequence): recoge y analiza datos de secuencia de numerosas fuentes. Actualmente mantiene una serie de bases de datos (1) PEDANT una base de datos que analiza secuencias de muchos genomas de eucariotas (entre ellos ratón y humanos), (2) MYGD (del inglés, MIPS Yeast Genome Database) una base de datos para el genoma de levaduras (3) MATD (del inglés, MIPS *Arabidopsis thaliana*

Database) encargada de procesar las secuencias del genoma secuenciado de este organismo y (4) MEST una base de datos con herramientas de informática para hacer agrupaciones "Clusters" de ESTs de humanos.

SWISS-PROT: proporciona información de secuencias de alto nivel, incluyendo descripciones de la función de la proteína y de la estructura de sus dominios, modificaciones post-tradicionales etc. La base de datos *TrEMBL* fue creada como un suplemento de SWISS-PROT, contiene traducciones de todas las secuencias codificantes del EMBL y está dividida en SP-TrEMBL (contiene registros que serán incorporados a SWISS-PROT) y REM-TrEMBL (Contiene secuencias que no va a ser almacenadas en SWISS-PROT) (http://us.expasy.org/sprot/). Buscando solucionar el gran problema de proliferación de bases de datos primarias se pensó en construir bases de datos que reunieran varias de esas bases de datos.

De las anteriores surgieron las **bases de datos compuestas,** entre ellas se encuentran:

(1) *MIPSX,* una base de datos producida en el Instituto Max-Planck que contiene secuencias de diferentes fuentes (MIPS, PIR, SWISS37 PROT).

(2) *SWISS-PROT+TrEMBL,* Esta es considerada la mejor base de datos de proteínas en el mundo, viene de la combinación de dos bases de datos primarias, contiene baja redundancia y brinda información de alto nivel, y finalmente

(3) *NRDB* (del inglés, Non-Redundant Data Base) está construida como parte del NCBI, es la plataforma sobre las cual se realizan las búsquedas de similitud en el GenBank, esta base de datos es también exhaustiva y contiene información actualizada.

1.5.1.2 Bases de datos secundarias

Son el producto del análisis de las bases de datos primarias y compuestas. *SWISS-PROT* se ha radicado como la fuente primaria de la mayoría de bases de datos secundarias. Entre las más conocidas se encuentran: *PROSITE, PRINTS*, puede caracterizar una secuencia dentro de

una familia en particular de acuerdo con la presencia de varios dominios conservados. *ENZYME, BLOCKS y PROFILES.*

Un valioso recurso para la comunidad científica que trabaja en plantas lo constituye la base de datos de *TAIR* (del inglés, The *Arabidopsis* Information Resource). Contiene una variada y amplia cantidad de información sobre este organismo modelo que incluye información funcional de genes y proteínas, familias génicas, familias de proteínas, vías metabólicas, polimorfismos de secuencia, información sobre germoplasmas y fenotipos, experimentos de expresión génica y microarreglos.

1.5.2 Búsqueda y comparación de secuencias en bases de datos

Las alineaciones de secuencias suministran un poderoso método para comparar secuencias de interés con genes previamente caracterizados o hallar relaciones evolutivas entre ellos. Altschul et al. (1990) desrrollaron un método para realizar búsquedas de similitud entre secuencias llamado BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). En la práctica realizar esta búsqueda es simple; pueden utilizarse muchos programas para realizarlas, sin embargo el más común es BLAST (Altschul et al. 1990). Las regiones de similitud de una secuencia de interés con otros genes presentes en la base de datos, NCBI por ejemplo, pueden ser detectadas con este algoritmo.

El programa BLAST con libre acceso en el GenBank (NCBI) posee una familia de programas de búsqueda para varias combinaciones de secuencias de proteínas y ADN. Cuando BLAST compara una secuencia de interés con secuencias almacenadas en la base de datos determina los niveles de similitud basado en una alineación local o global. Con el primero, compara cortos segmentos de la secuencia con aquellas disponibles en la base de datos, con el segundo, busca la mejor alineación para la secuencia completa (Brown 2000). Con BLAST los cortos segmentos de la secuencia de interés exploran el espacio de posibles alineaciones en la base de datos. El algoritmo está diseñado para introducir huecos (gaps) para

maximizar el número de pares de bases alineadas correctamente. La calidad de la alineación puede evaluarse asignando un valor (SCORE) a cada posible alineación, el SCORE para cada una de ellas se obtiene sumando cada par de residuos idénticos o similares y restándole aquellos que son erróneos y los huecos. Adicionalmente, se evalúa utilizando un parámetro que describe el número de alineaciones que pueden ser esperados por azar contra la base de datos. Un valor Esperado (*e-value*) alto indica que la probabilidad de encontrar la alineación por azar (no por verdadera similitud) es muy alta (Altschul et al. 1998). Para búsquedas de bases de datos de proteínas, se utilizan las matrices de similaridad PAM (*point accepted mutation*) (Dayhoff et al. 1978) y BLOSUM (block sum) (Henikoff & Henikoff 1992) las cuales van incorporando la información de cuales residuos han sido satsfactoriamente reemplazados por otros durante el curso de la evolución.

Con todo esto, se puede ver que la construcción de plataformas de análisis, públicas y privadas ha evolucionado rápidamente. En la actualidad existen numerosas bases de datos que cuentan con poderosos programas de análisis de genómica funcional y estructural (Baxevanis 2003). Bases de datos con secuencias almacenadas (de ADN, y proteínas), donde pueden hacerse búsquedas de similitud entre secuencias, comparación de genomas, análisis de expresión génica, estructura e identificación de genes, mapas génicos, rutas metabólicas, señales de transducción, estructura y función de proteínas entre muchos otros. La disponibilidad de catálogos de genes de organismos completamente secuenciados puestos públicamente en bases de datos ha creado grandes oportunidades para estudiar numerosos aspectos de las funciones génicas a escala genómica.

2 MODELO METODOLÓGICO

2.1 Sitio de trabajo y Material vegetal

El trabajo de invernadero y de laboratorio se realizó en el CIAT, municipio de Palmira, Departamento del Valle del Cauca, a 900 m.s.n.m., en el laboratorio de Agrobiodiversidad y Biotecnología.

Se utilizaron plantas de 45 días (clones) de *Manihot esculenta* Crantz, sembradas en potes de plástico con suelo estéril. Estos clones pertenecen a dos variedades: MEcu 72, la cual se utilizará como genotipo resistente a la especie de mosca blanca *A. socialis*. CMC 40, variedad susceptible, utilizada en la cría del insecto. Todos estos genotipos han sido evaluados en ensayos de campo de CORPOICA-Nataima (Tolima), mediante la escala de población y de daño para *A. socialis* de Bellotti & Vargas (1986), modificada por Arias (1995), cuyos rangos oscilan entre 1 y 6. El genotipo MEcu 72, se ha evaluado por varios años en el Tolima y en el CIAT, manifestando en forma constante un alto nivel de resistencia (combinación de antibiosis y antixenosis, Gomez, 2004).

2.2 Estrategia

Las poblaciones de ADN comparadas por medio de librerías sustractivas obtenidas con los métodos DSC y SSH fueron: 1) ADNc proveniente de plantas **sin infestar** del genotipo MEcu 72 (resistente a *A. socialis*) el cual representa las secuencias que nos interesa eliminar, incluyendo genes que sustentan las funciones de mantenimiento (*housekeeping*) y genes que son inducidos por las condiciones de crecimiento y el desarrollo normal de la planta. 2) ADNc proveniente de plantas **infestadas** del mismo genotipo, el cual incluye los genes mencionados anteriormente y un grupo diferencial de secuencias inducidas por el ataque de *A. socialis*. 3) ADNc proveniente de plantas infestadas del genotipo CMC 40 (suceptible) el cual representa

las secuencias que nos interesa eliminar. Esta población fue comparada con la población 2, con esta comparación se espera obtener los genes de resistencia constitutivos presentes en la variedad resistente. De esta manera se podrían identificar los genes de resistencia candidatos y su posible función dentro de la ruta metabólica generada durante la respuesta de defensa. Estas librerías sustractivas se utilizaron para construir los microarreglos donde se ubicaron los clones expresados diferencialmente.

2.3 Ensayos de invernadero

En un cuarto de cría con condiciones controladas de humedad y temperatura (28 ± 1ºC, 70 ± 10% HR y 12 horas luz), se establecieron nueve jaulas de madera de 1 mt de largo x 1 mt de ancho, recubiertas de muselina blanca, en las cuales se ubicaron 6 potes con las variedades de yuca utilizadas en el presente estudio. En seis de las jaulas se ubicó el genotipo MEcu 72, y en las otras tres el genotipo CMC 40. La infestación se realizó en tres jaulas de MEcu 72 y en las tres jaulas de CMC 40, utilizando jaulas-pinza (viales de plástico, cortados en círculo y cubiertos con tul) (Figura 1), soportadas por pitillos enterrados en el suelo de la matera plástica (Figura 2). En cada hoja, se seleccionaron tres lóbulos para infestar, los cuales se insertaron en la jaula pinza, ésta presenta un agujero lateral a través del cual se introdujeron en promedio 20 adultos de mosca blanca, capturados al azar mediante un aspirador bucal, de la colonia sobre el genotipo susceptible. Se hicieron tres repeticiones por tratamiento, para un total de nueve jaulas-pinza por tratamiento. Las restantes tres jaulas del genotipo MEcu 72 se dejaron con las jaulas-pinzas sin infestar, con el objetivo que todas las plantas tuvieran el daño mecánico que ocasiona la presión de la jaula-pinza, que aunque es mínimo podría llegar a ser significativo.

Figura 1. Plantas de yuca de 45 días de edad infestadas con adultos de *A. socialis* utilizando jaulas-pinza.

Figura 2. Plantas de yuca de 45 días de edad en materas plásticas infestadas con adultos de *A. socialis* utilizando jaulas-pinza, ubicadas en las jaulas de madera de 1mt x 1mt cubiertas de muselina.

Las plantas infestadas se mantuvieron durante 72 horas, pasado este tiempo se retiraron las jaulas-pinza de los lóbulos infestados. Las plantas se dispusieron en un diseño completamente al azar debido al microclima existente en los cuartos de cría, según estudios reportados por Castrillón & Perlaza (2000), el cual no se puede detectar a través de un higrotermógrafo. Se procedió a realizar la colecta de hojas de cada genotipo, tanto de las jaulas que habían sido infestadas, como de las jaulas sin infestar. Estas plantas de donde se

colectó fueron marcadas para no volver a ser utilizadas. Este experimento se hizo en tres épocas diferentes, correspondiendo cada una a una réplica biólogica. Las colectas se realizaron en seis tiempos diferentes, de acuerdo al ciclo de vida de la mosca blanca (Figura 3) y se hicieron agrupamientos con el tejido para finalmente quedar con tres tiempos (Tabla 1).

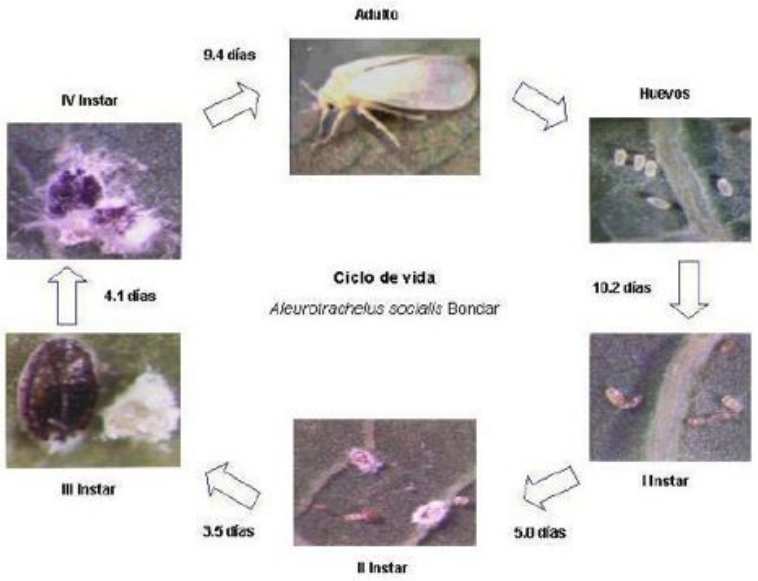


Figura 3. Ciclo de vida de *A. socialis*. Tiempos calculados sobre el genotipo susceptible CMC 40. (Tomado de Arias, 1995)

Tabla 1**:** Tiempos de colecta de material (hojas) infestadas con *A. socialis* para la construcción de la librería sustractiva y los microarreglos, de acuerdo al ciclo de vida del insecto (una colecta por cada estadío).

Estadío de *A. socialis*	**Tiempos de Colecta después de la infestación**	**Agrupamientos**
Adulto	Tiempo **1** (5 horas)	1
Huevo	Tiempo **2** (7 dias)	1
Ninfa I	Tiempo **3** (14 dias)	2
Ninfa II	Tiempo **4** (18 dias)	2
Ninfa III	Tiempo **5** (20 dias)	3
Ninfa IV	Tiempo **6** (27 dias)	3

Tabla 2**:** Comparaciones utilizadas para la sustracción, entre los diferentes tiempos de colecta. "Ecu" corresponde a MEcu 72 (resistente) infestado, "ESI" corresponde a MEcu 72 sin infestar y "CMC" corresponde a CMC 40 (suceptible) infestado.

Población 1 ("tester")	Población 2 ("Driver")	Abreviación
Ecu infestado tiempo 1 y 2 (adulto y huevo)	CMC infestado tiempo 1 y 2 (adulto y huevo)	E vs C (1y2)
Ecu infestado tiempo 3 y 4 (ninfa 1 y ninfa 2)	CMC infestado tiempo 3 y 4 (ninfa 1 y ninfa 2)	E vs C (3y4)
Ecu infestado tiempo 5 y 6 (ninfa 3 y ninfa 4)	CMC infestado tiempo 5 y 6 (ninfa 3 y ninfa 4)	E vs C (5y6)
Ecu infestado tiempo 1 y 2 (adulto y huevo)	Ecu sin infestar tiempo 1 y 2 (adulto y huevo)	E vs ESI (1y2)
Ecu infestado tiempo 3 y 4 (ninfa 1 y ninfa 2)	Ecu sin infestar tiempo 3 y 4 (ninfa 1 y ninfa 2)	E vs ESI (3y4)
Ecu infestado tiempo 5 y 6 (ninfa 3 y ninfa 4)	Ecu sin infestar tiempo 5 y 6 (ninfa 3 y ninfa 4)	E vs ESI (5y6)

2.4 Construcción de librerías sustractivas

2.4.1 Aislamiento de ARN

Para la extracción del ARN los lóbulos de las hojas colectados se almacenaron en nitrógeno líquido, luego se llevaron al laboratorio y se almacenaron en una nevera a -80°C hasta el momento de la extracción del ARN. La extracción del ARN se hizo con el método de Cloruro de litio (Chang et al. 1993) con modificaciones (Anexo A). El ARN total se trató con la DNAse I *RQ1 RNAse-free DNAse* de PROMEGA siguiendo las especificaciones del fabricante (Anexo B), el aislamiento del ARNm se realizó con el *MicroPoly(A) Purist*™ de AMBION siguiendo las especificaciones del fabricante. Para la síntesis del ADNc se utilizó el *SMARTer*™ *Pico PCR cDNA Synthesis kit* de CLONTECH siguiendo las especificaciones del fabricante.

2.4.2 Hibridación sustractiva

El método de sustracción DSC (*Differential Subtraction Chain*) (Figura 4) se aplicó siguiendo las especificaciones de Luo et al (1999) de la siguiente manera: los dos pares de poblaciones de ADNc a comparar (Tabla 2) fueron digeridas con la enzima de restricción

*Dpn*II, la cual deja extremos cohesivos (Figura 4). A tales extremos se ligaron adaptadores diferentes (Anexo C): adaptador Bam I para el ADNc de plantas infestadas ("*tester"*) y Bam II para el ADNc de plantas sin infestar y para la suceptible infestada ("*drivers"*). La secuencia de los adaptadores sirve como sitio de alineamiento para amplificar por PCR los fragmentos (i. e. amplicones) en ambas poblaciones (Anexo C.1). Varias reacciones de PCR simultáneas fueron realizadas para generar la cantidad suficiente de amplicones de los "*drivers"*, pues para que la reacción de hibridación sea eficiente, éstos deben estar en un exceso de cien veces respecto a los amplicones del "*tester"*. Una vez purificados los amplicones de los "*drivers"*, se les eliminaron los adaptadores por digestión con *Dpn*II; 10 µg de estos amplicones fueron mezclados con 0,1 µg de amplicones del "*tester"*. La mezcla fue precipitada con etanol y resuspendida en 32 µl del buffer de hibridización 1 o 2 (Anexo C.2). Luego, la muestra fue denaturada a 98°C durante 5 minutos y renaturada a 67°C por 16 horas. Este largo período de incubación es aconsejable para que la renaturación suceda lentamente.

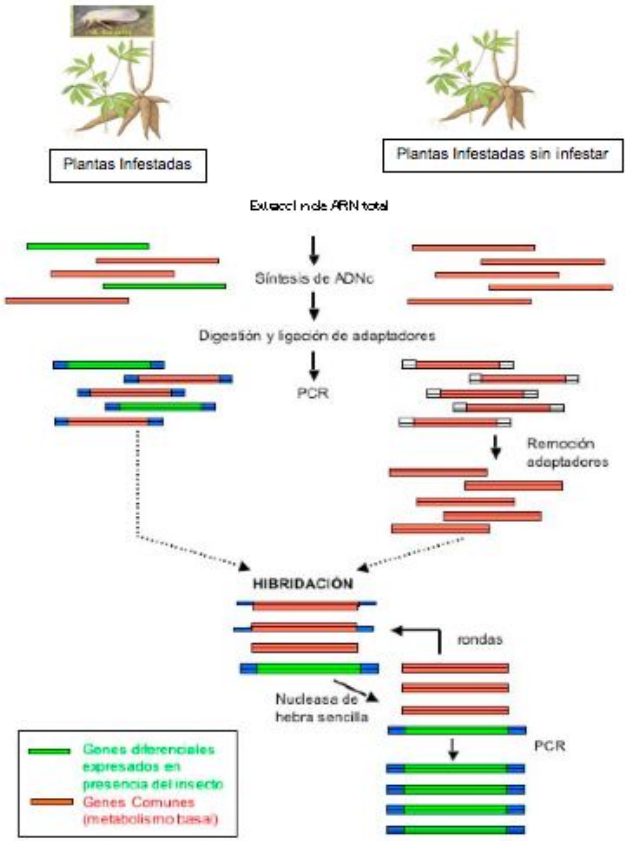


Figura 4. Representación esquemática del método DSC.

Una vez sintetizado el ADNc cada conjunto de secuencias es digerido y ligado a adaptadores. Estos se usan como sitios de alineamiento para realizar una amplificación por PCR que permite normalizar las poblaciones y obtener la cantidad de DNA necesaria para la hibridación. Posteriormente se remueven los adaptadores de la muestra proveniente de plantas sin infestar. La hibridación de las dos poblaciones de ADNc genera cuatro posibles híbridos, pero sólo los transcritos que conservan sus adaptadores en ambas hebras permanecen intactos despúes del tratamiento con la nucleasa. Estas secuencias, señaladas en verde, están presentes únicamente en plantas infestadas, por lo tanto son consideradas como transcritos inducidos por la presencia del insecto. La muestra es sometida a varias rondas de hibridación por medio de las cuales se sustraen exponencialmente las secuencias comunes, señaladas en naranja. Finalmente los transcritos diferenciales son amplificados y clonados.

Para el método SSH (*Suppression Subtraction Hybridization*) (Figura 5) se utilizó el *PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit* de CLONTECH según las indicaciones del fabricante. Primero, el ADNc es sintetizado a partir 0.5-2 ug ARNm de dos poblaciones que se van a comparar. Tanto "*tester"* como "*driver"* son digeridos con *RsaI*, una enzima de restricción que reconoce cuatro pares de bases y que genera extremos romos. El "*tester"* es subdividido en dos porciones y cada una es ligada con diferentes adaptadores. Los extremos del adaptador no contienen grupo fosfato, así solo una cadena del adaptador se une al extremo 5' del ADNc. Los dos adaptadores tienen secuencia idéntica en sus extensiones lo que permite que el primer de PCR se alinee, una vez los extremos hayan sido llenados. Luego dos hibridizaciones son ejecutadas; en la primera, un exceso de "*driver"* es adicionado a cada muestra del "*tester".* Las muestras son luego denaturadas y se permite que se alineen generando las moléculas tipo **a, b, c** y **d** (Figura 5). La concentración de secuencias de alta y baja abundancia es equilibrada entre el tipo de moléculas **a** debido a que el realineamiento es más rápido para muchas moléculas abundantes por la cinética de segundo orden de la hibridización. Al mismo tiempo, las moléculas tipo **a** son significativamente enriquecidas para las secuencias diferencialmente expresadas, mientras que los ADNc que no están diferencialmente expresados forman las moléculas tipo **c** con el "*driver".* Durante la segunda hibridización, las dos muestras de hibridización primarias son mezcladas juntas sin denaturar. Ahora, solo los ADNc "*tester"* sustraídos de cadena simple pueden reasociarse y formar un nuevo tipo de híbridos **e.** Estos nuevos híbridos son moléculas "*tester"* de doble cadena con extremos diferentes, los cuales

corresponden a las secuencias de los adaptadores 1 y 2R. Se adiciona un tubo nuevo con ADNc "*driver*" denaturado a las moléculas tipo **e.** Después de llenar los extremos con la DNA polimerasa, las moléculas tipo **e** (las secuencias del "*tester*" diferencialmente expresadas) tienen diferentes sitios de alineamiento en los extremos 5' y 3', para los primers anidados.

La población entera de moléculas es sometida a PCR para amplificar las secuencias diferencialmente expresadas. Durante este PCR, las moléculas tipo **a** y **d** pierden los sitios de alineamiento de los primers, y no son amplificadas. Debido al efecto de supresión del PCR, muchos tipos de moléculas **b** forman una estructura que no permite su amplificación exponencial. Las moléculas tipo **c** tienen solo un sitio de alineamiento al primer y amplifica linealmente. Solo las moléculas tipo **e** (secuencias diferencialmente expresadas con dos diferentes adaptadores) amplifican exponencialmente. Luego, una amplificación por PCR secundaria es ejecutada utilizando primers anidados para eliminar cualquier producto de PCR inespecífico y enriquecer las secuencias diferencialmente expresadas.

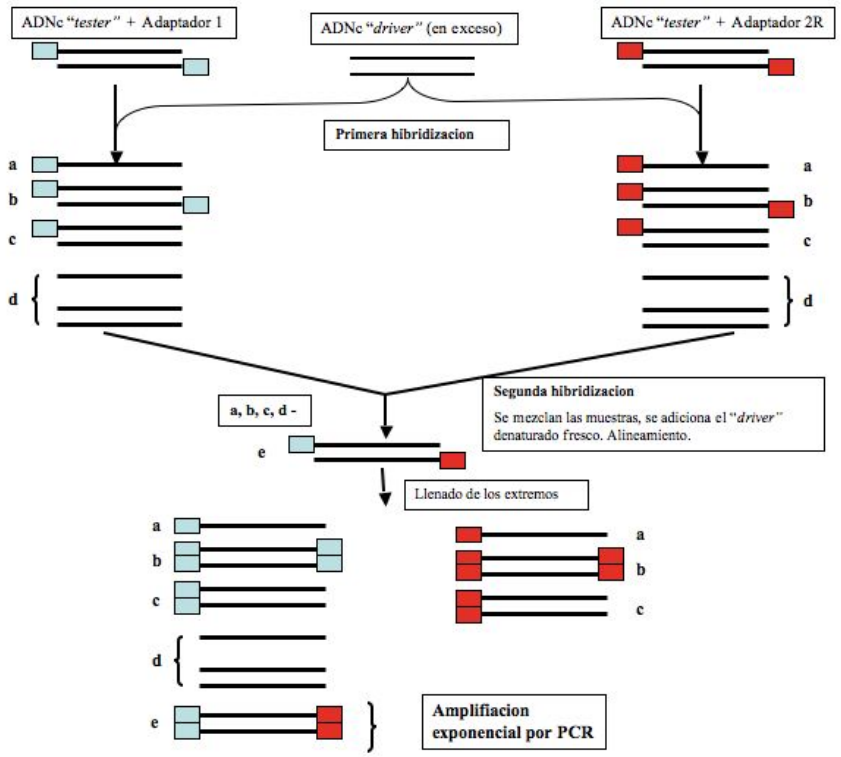


Figura 5. Representación esquemática del método de hibridización sustractiva SSH (Adaptado de *PCR-Select cDNA Subtraction kit, User Manual*).

Las bandas diferenciales obtenidas fueron visualizadas en geles agarosa al 2% teñido con *SYBR safe*. Estas bandas diferenciales obtenidas a partir de las diferentes comparaciones con los anteriores métodos, fueron clonadas utilizando el plásmido *pGEM®-T Easy Vector System I* de PROMEGA siguiendo las indicaciones del fabricante. Se transformaron células electrocompetentes de *Escherichia coli* cepa DH5α con los plásmidos ligados con las bandas diferenciales. Las bacterias recombinantes fueron sembradas en placas de petri en medio LB-agar con ampicilina (100 ug/ml), XGal (80 ug/ul) e IPTG (0.5 mM). Se dejaron incubando toda la noche a 37°C en horno. Al siguiente dia se picaron las colonias blancas las cuales contienen los plásmidos recombinantes, estas fueron sembradas en placas de cultivo de 384 pozos en medio LB líquido con ampicilina (100 ug/ml). Con el fin de verificar la presencia del clon y analizar la redundancia, se realizó PCR utilizando primers T7 y Sp6 para amplificar las bandas clonadas las cuales fueron visualizadas utilizando geles de agarosa al 1.5% en TBE 0.5X y teñidas con *SYBR safe.*

2.4.3 Amplificación de insertos de los clones recombinantes por PCR

Las bacterias de la cepa DH-5α de *E. coli* que poseen los insertos de la sustracción son mantenidas en medio de crecimiento LB (Bacto triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%) con ampicilina (0.1 mg/ml). Se hizo la amplificación por PCR en formato de placa de 96 pozos, utilizando como molde 5 ul del cultivo de la bacteria crecido durante 16 horas 37°C, bajo las siguientes condiciones: para cada reacción con volumen final de 50 ul:

Tabla 3**:** Condiciones de amplificación por PCR de los clones de las librerias sustractivas.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN
Agua bidestilada estéril	-	34.2 ul
Buffer Taq (10X)	1X	5 ul
$MgCl_2$ (25 mM)	1.5 mM	3.0 ul
dNTPs (5 mM c/u)	0.2 uM	0.4 ul

Primer T7 (10 uM)	0.2 uM	1.0 ul
Primer Sp6 (10 uM)	0.2 uM	1.0 ul
Taq polimerasa*	-	0.4 ul
Cultivo de la bacteria recombinante	-	5.0 ul

*Preparación No comercial producida en el Laboratorio de Agrobiodiversidad y Biotecnología

Programa de amplificación (Anexo D). Se confirmó la amplificación observando 5 ul del PCR anterior en un gel de agarosa al 1.5% tenido con SYBR safe.

2.5 Secuenciación y análisis bioinformático

El 12% de los clones de las librerías sustractivas obtenidas por ambos métodos fueron purificados y utilizados como molde en la reacción de secuencia con el kit *Big Dye Terminator*® (Applied Biosystems) las cuales fueron resueltas en el secuenciador automático *AbiPrism 377*™. Otra parte de estas secuencias se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. Korea. Las secuencias obtenidas se editaron utilizando el programa Sequencher 4.1 (Gene Codes Co.) y sometidas a búsquedas de similitud contra la base de datos de proteínas del GeneBank por medio del algoritmo BLASTX (Altschul et al. 1990). Los ESTs del Cassava Unigen Microarray (López et al. 2004) fueron anotados en el 2003, el 37% de las secuencias eran "Unknown function" o proteínas hipotéticas cuya función también era desconocida en ese momento. Por esta razón en los años 2009-2010 (en los cuales las bases de datos estaban enriquecidas con muchas más datos de expresión y función), se hicieron los análisis con este microarreglo, decidimos volver a anotarlo (los datos y el análisis de la anotación completa no son mostrados en este trabajo) utilizando el programa GOMP (Rodriguez et al. Documento en preparación). Este programa permite analizar todas las secuencias de estos ESTs y compararlas a secuencias de proteínas conocidas (*The Arabidopsis Information Resource, TAIR*), mapearlas en términos de *Gene Ontology* (GO) y vías metabólicas (KEGG) utilizando BLASTX (Figura 6).

GOMP: Query Results

gi|56920651|gb|CK644988.1|CK644988

Gene Ontology Terms

Accession	Name	Type
GO:0005829	cytosol	CC
GO:0042409	caffeoyl-CoA O-methyltransferase activity	MF

KEGG Orthology (KO)

Accession	Name	Type
K00588	caffeoyl-CoA O-methyltransferase	NA

Enzyme Codes (EC)

Accession	Name	Type
2.1.1.104	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase	NA

KEGG Pathways

Accession	Path Name	Type
ath00940	Phenylpropanoid biosynthesis	NA
ath00941	Flavonoid biosynthesis	NA

BLAST Report

Best Hit	Raw Score	e-Value	Identity	Database	BLAST
NP_849491	138	9e-09	92.9	GOA	See Report
AT4G34050	138	9e-09	92.9	KEGG	See Report

Figura 6. Salida del programa GOMP mostrando el resultado de la búsqueda de una secuencia EST (CK643792), se observan los términos de *Gene Ontology* (GO), *Kegg orthology* (KO), *Enzyme codes* (EC) y el reporte del BLAST donde se muestra la secuencia más similar en el Gene Bank y en *TAIR*.

2.6 RT-PCR

El RT-PCR fue utilizado para analizar la expresión de algunas secuencias supuestamente envueltas en defensa en plantas. Primers específicos (Anexo E) de las secuencias aquí obtenidas fueron diseñados en los genes mapeados utilizando un script de PERL en el genoma de yuca, en el cual se tuvo en cuenta que el producto amplificado no tuviera mas de una copia, tuviera un tamaño menor a 250 bp y un Tm de 60ºC. El ADNc de primera cadena fue obtenido por transcripción reversa de 3 µg de ARN total tratado con DNAsa (ver Aislmiento de ARN en esta sección) utilizando el *SMARTer™ Pico PCR cDNA Synthesis kit* de CLONTECH. Las condiciones del RT-PCR fueron estandarizadas utilizando el gen gliceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase (*G3PDH*) de yuca. La reacción de PCR y el perfil térmico se utilizó de acuerdo a las condiciones recomendadas por López et al (2004).

2.7 Construcción y análisis de microarreglos

2.7.1 Construcción del microarreglo

En la construcción del microarreglo se utilizó un robot SPBIO *Microarray Spotting Station* (MiraBio inc.) que organiza una matriz con los fragmentos de ADNc amplificados por PCR obtenidos de la librería del Cassava Unigene Microarray (López et al. 2004), sobre una lámina de vidrio. Luego se hibridizaron utilizando el método indirecto (Anexo F) con dos poblaciones de ADNc derivado de dos muestras de ARNm diferentes, la muestra control y el tratamiento marcados diferencialmente con dos tipos fluorocromos (Tabla 4).

Tabla 4**:** Hibridizaciones realizadas, las cuales fueron 12 por cada una de las tres réplicas biológicas para un total de 36 en el Cassava Unigene Microarray.

Tratamiento	Control	Fluorocromo
Ecu infestado. ADNc de tiempo 1 y 2	CMC infestado. ADNc de tiempo 1 y 2	Control Cy3 Tratamiento Cy5 Dye Swap
Ecu infestado. ADNc de tiempo 3 y 4	CMC infestado. ADNc de tiempo 3 y 4	Control Cy3 Tratamiento Cy5 Dye Swap
Ecu infestado. ADNc de tiempo 5 y 6	CMC infestado. ADNc de tiempo 5 y 6	Control Cy3 Tratamiento Cy5 Dye Swap
Ecu infestado. ADNc de tiempo 1 y 2	Ecu sin infestar. ADNc de tiempo 1 y 2	Control Cy3 Tratamiento Cy5 Dye Swap
Ecu infestado. ADNc de tiempo 3 y 4	Ecu sin infestar. ADNc de tiempo 3 y 4	Control Cy3 Tratamiento Cy5 Dye Swap
Ecu infestado. ADNc de tiempo 5 y 6	Ecu sin infestar. ADNc de tiempo 5 y 6	Control Cy3 Tratamiento Cy5 Dye Swap
	Total Hibridizaciones	**12**

El ADNc se sintetizó utilizando el kit *SMART™ PCR cDNA synthesis* CLONTECH (Anexo G) a partir de dos poblaciones de ARN de los genotipos MEcu 72 y CMC 40 como se muestra en la Tabla 4. Se utilizó 1 µg de ADNc para marcar e hibridizar.

2.7.2 Diseño experimental para microarreglos

Es necesario tener un diseño adecuado antes de empezar el experimento porque es importante identificar *a priori* todas las posibles fuentes de variación. El diseño de experimentos tiene tres niveles que se deben tener en cuenta, las unidades experimentales (réplicas biológicas), las muestras de ARN y el orden y cantidad de veces que están los clones en el microarreglo (réplicas técnicas) (Kerr & Churchill 2001). Las réplicas biológicas permiten establecer significancia estadística, extrapolar los resultados a la población y derivar confianza sobre la reproducibilidad de los resultados. Las fuentes de variación en las unidades experimentales están a dos niveles, muestras de ARNm obtenidas de varios especímenes o de experimentos independientes (variación biológica). La variación biológica es intrínseca a todos los organismos y responde a factores genéticos, ambientales, metodológicos, técnicos y aleatorios (error experimental). Mezclar (pooling) muestras es una estrategia para aumentar la precisión de los tests de tratamientos, reduce la varianza del error al reducir el componente de varianza de la muestra. Es interesante si la variación entre muestras es grande (No. de pools). Las réplicas técnicas (el ARN viene de la misma muestra) incrementan el poder del experimento y proveen una base para determinar diferencias dentro de tratamientos. La multiplicación de clones en un array incrementa la precisión y provee un control de calidad y robustez al experimento (reproducibilidad). En este estudio (Figura 7), se hicieron tres réplicas biológicas (experimentos completos) y dos réplicas técnicas (incluído el "Dye swap") para cada comparación y tiempo.

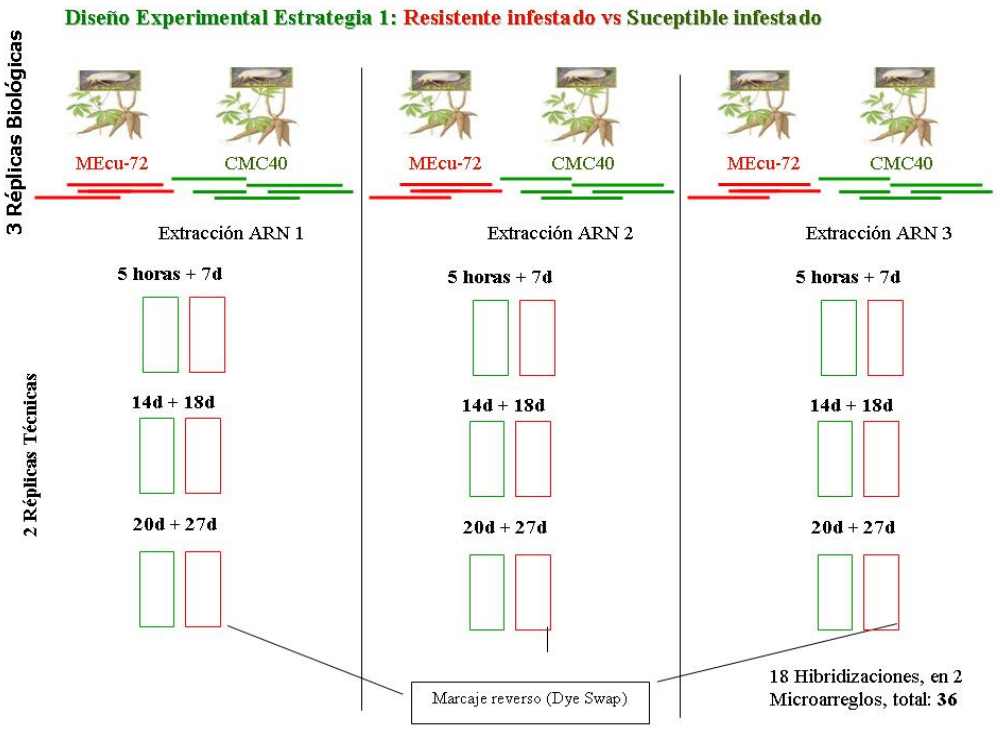


Figura 7. Esquema del diseño experimental utilizado para el análisis de microarreglos. Se utilizó el mismo esquema para las dos comparaciones, aquí se muestra el caso del resistente infestado vs. el susceptible infestado.

2.7.3 Análisis de los datos

Para identificar los genes que fueron significativos para mosca blanca, los datos de los microarreglos fueron procesados de la siguiente manera:

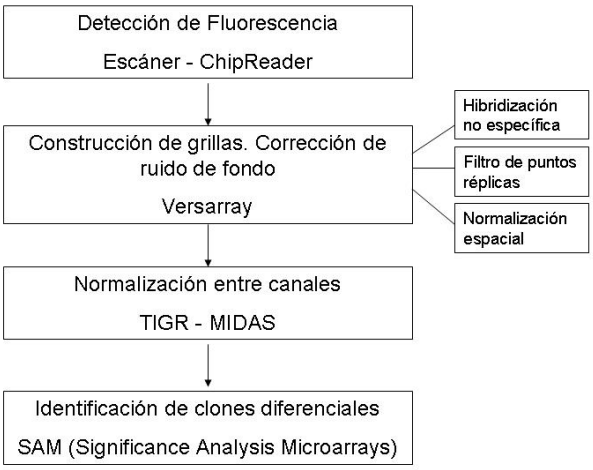


Figura 8**.** flujograma donde se muestra los diferentes pasos como son procesados los datos de microarreglos.

Estos datos fueron preprocesados utilizando el software *VersArray Analyzer® ChipReader*. Este sistema escanea, guarda y extrae las señales luminosas de los microarreglos y otros especímenes fluorescentes depositados sobre porta objetos u otros sustratos. El programa *ChipReader* utiliza esta información para generar imágenes electrónicas de formato .TIFF que pueden ser luego analizadas con este programa u otros. El programa hace parte de un paquete informático e instrumental que incluye un escáner con láser óptico, una parte electrónica y un programa que permite su funcionamiento. En el escáner los rayos de luz emitidos por el láser excitan los fluorocromos que están sobre el porta objetos y luego recoge las emisiones de luz que estos producen con las cuales genera las imágenes mencionadas anteriormente (Figura 9).

A B

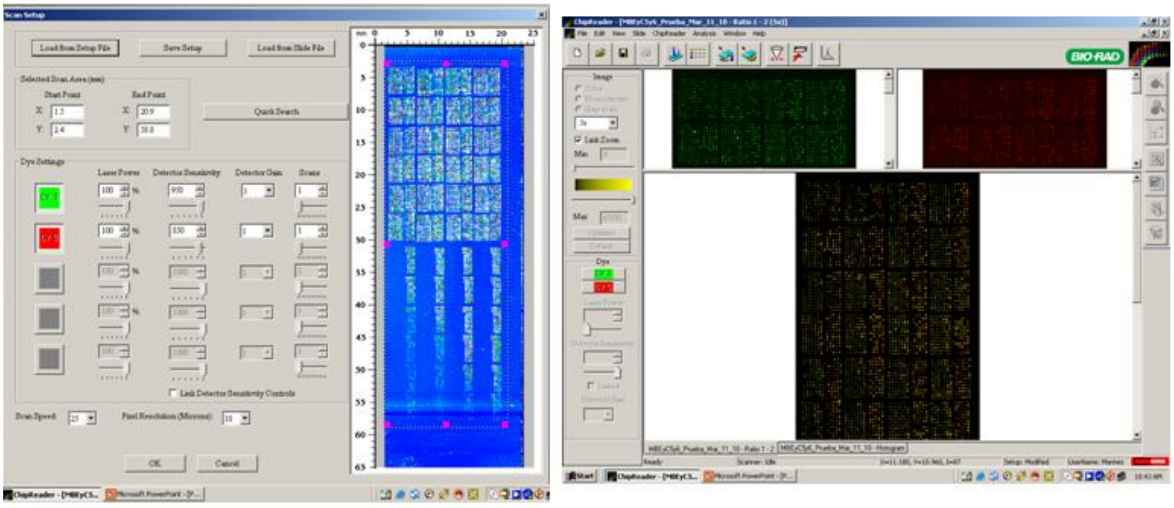


Figura 9. Ventanas del programa *VersArray Analyzer® ChipReader* donde se muestra la forma que se escanean los microarreglos.

(A) el "quicksearch" o vista rápida del microarreglo en el cual se elije una pequeña porción del arreglo para optimizar los parámetros de escaneo. (B) escaneo del arreglo donde se observan los dos canales rojo y verde separados (arriba) y la unión de los dos colores (abajo).

Para otorgar valores de señal a cada elemento del arreglo, el programa *VersArray Analyzer® ChipReader* ajusta una malla en todo el arreglo, de manera que se fija un círculo a cada elemento del arreglo. El programa mide la intensidad para ambos colores en cada elemento y asigna un valor con unidades en píxeles (el elemento más pequeño en una imagen digitalizada). Se ha estimado que el valor de la intensidad podría ser directamente proporcional al número de moléculas de ARN hibridadas a cada elemento del arreglo. La razón entre las intensidades roja / verde para cada clon da un estimativo preliminar de los cambios en la expresión.

VersArray Analyzer® ChipReader ofrece la posibilidad de calcular el "background" local en las proximidades de cada elemento del arreglo. El "background" es determinado en un área

definida en los alrededores de cada elemento del arreglo y normalizado al área dentro de cada elemento (es decir, dentro del círculo que se ha fijado a cada elemento), para ello proyecta el "background"/área calculado en las proximidades al interior del círculo, de modo que puede entregar un estimativo corregido de la señal menos el "background" para cada elemento del arreglo (**Señal** = Intensidad - "background"). Existen varias formas de elegir este "background" local entre ellas están por anillo local ("local ring") y por esquina local ("local corner"), en este trabajo se eligió el "background" por anillo local. Para poder eliminar el efecto del "background" se realizó una corrección de los elementos del arreglo, todos los clones que presentaron un valor de señal en la fluorescencia verde o roja inferior a dos veces la desviación estándar del "background" fueron eliminados (Quackenbush 2001). Para ser tenidos en cuenta en los análisis posteriores, la señal para cada elemento debe ser: Señal (Rojo) > 2 d ("background"); Señal (Verde) > 2 d ("background"); d = desviación estándar

Una vez obtenido el/los archivo(s) de imágenes, se transformaron las intensidades de las señales obtenidas en datos numéricos, discriminando la señal informativa del ruido que pudiera haber en segundo plano. Aunque la razón Rojo / verde da un estimativo inicial de los cambios en la expresión, tiene la desventaja de presentar estos cambios en una escala no continua ni homogénea, la alternativa que se ha seguido es transformar los datos de señal a escala logarítmica, siguiendo las recomendaciones de Quackenbush (2002). Para un gen dado (fila) pueden compararse las intensidades entre muestras y generar un reporte que exprese encendido y apagado de genes o de cuántas veces más o menos expresado se encuentra en las diferentes condiciones ensayadas. No deben compararse intensidades entre genes (filas) del mismo experimento ya que el nivel de expresión es una propiedad de cada gen, se puede modificar por la expresión de otro gen presente en altos niveles en el mismo experimento y está ligado a complejas vías de control.

2.7.3.1 Normalización de los datos

Para la normalización de los datos se utilizó el programa MIDAS®. La normalización es el ajuste a las intensidades de cada muestra para hacerlas comparables entre sí y se asegura que las diferencias en intensidad encontradas son debidas a la expresión diferencial y no a artefactos incluidos en la experimentación, como por ejemplo, cantidades iniciales de ARN diferentes, diferencias en la eficiencia de la reacción de marcaje con los dos fluorocromos, diferencias en la eficiencia de la hibridización, diferencias en la eficiencia de la detección (Yang et al. 2002).

Para corregir estas tendencias en la intensidad se pueden utilizar varios métodos como son, la normalización global, la normalización lineal y la normalización global LOWESS (del inglés, *Locally Weighted Scatter Plot Smooth*). En todos los casos hay que decidir el conjunto de genes a usar en la normalización, estos pueden ser subconjuntos como los "housekeeping genes" o todos los genes del microarreglo. En este trabajo se eligió para normalizar todos los genes del microarreglo y el método de normalización de LOWESS. Teniendo en cuenta la razón $T_i = \log_2(R_i/ G_i)$, este método busca eliminar de la razón T_i el sesgo dependiente de la intensidad de los valores G_i y R_i (G_i= valores del canal verde; R_i = valores del canal rojo). LOWESS utiliza localmente una aproximación lineal. En esta regresión local se eligen los puntos más cercanos para el ajuste de la ecuación. El porcentaje de puntos a usar los define el usuario y pueden ser del 20 – 40%. En este estudio se utilizó el programa MIDAS® para la normalización y en este programa está definido el 33%. Después de aplicar el LOWESS, la nube de puntos ya normalizada debe ser horizontal, y la mayoría de puntos deberan ubicarse alrededor de cero, indicando que no hay efecto de la intensidad en la diferenciación entre R y G.

2.7.3.2 Identificación de los genes diferenciales

Para determinar la expresión diferencial de los genes ubicados en el microarreglo fue utilizado el programa de análisis SAM (del inglés, *Significance Analysis of Microarrays*) (Tusher et al. 2001). SAM es una técnica estadística para encontrar genes significativos en un

conjunto de experimentos de microarreglos. Los datos de entrada a SAM son las mediciones de expresión génica de un conjunto de experimentos de microarreglos, así como también las variables respuesta de cada experimento. La variable respuesta describe un grupo de datos basados en condiciones experimentales. En este estudio se realizó el SAM con variable respuesta de Clase Uno (One class) donde se prueba si el promedio de la expresión génica es diferente a cero. SAM identifica los genes significativos estadísticamente mediante la realización de pruebas-t específicas para cada gen y computa un estadístico d_i para cada gen *j,* el cual mide la fuerza de la relación entre la expresión génica y la variable respuesta. Estos análisis utilizan estadísticas no paramétricas, ya que los datos no siguen una distribución normal. En este método permutaciones repetidas de los datos son usadas para determinar si la expresión de cualquier gen es significativa en relación a la variable respuesta. El uso del análisis basado en permutaciones cuenta para las correlaciones en los genes y evita supuestos paramétricos acerca de la distribución de genes individual. Esta es una ventaja sobre otras técnicas como la ANOVA y Bonferroni, las cuales asumen igual varianza y/o independencia de los genes. El análisis estadístico llevado a cabo por SAM es similar a la prueba estadística t-student. El estadístico t es una diferencia de medias sobre la desviación estándar, el puntaje P es similar en SAM, el cual hace parte de una distribución *P(i)*:

$$P(i) = SR - Sv \;/\; Si + So$$

Donde *P(i)* es la diferencia relativa en la expresión génica, *SR y Sv* son el promedio de las señales en Rojo y verde respectivamente, *Si* es la desviación estándar y *So* es una constante adicionada para asegurar que la varianza de *P(i)* es independiente de la intensidad. El problema con los experimentos de microarreglos es que la distribución de *P(i)* no tiene una forma matemática conocida (como t, normal, chi-cuadrado, distribución binomial etc.), por lo que SAM utiliza las permutaciones para determinar esta distribución. A partir de las permutaciones se estima la distribución nula (distribución de *P(i)* para los genes que no son diferencialmente expresados), una vez la distribución es conocida se calcula el valor de delta (δ), el cual es similar al valor-p del estadístico t, y este es utilizado para encontrar los genes diferencialmente expresados. Para esto, SAM asigna un valor de la función *p(i)* a cada gen, este valor es llamado puntaje observado (Po). Este puntaje Po es comparado con un puntaje esperado (Pe) calculado a partir de las permutaciones con todos los datos, lo que da una estimación de la aparición de expresión diferencial solo por azar y no por factores biológicos. La zona de significancia δ en

los cambios de expresión que determina el resultado de la comparación Po:Pe puede ser asignada por el investigador. La asignación de los valores δ debe hacerse teniendo en cuenta su relación con los FDR (*False Discovery Rate*), mientras más pequeño sea δ un mayor número de genes significativamente diferenciales serán encontrados, pero el porcentaje de FDR aumentará, debe entonces hallarse un equilibrio de acuerdo con el criterio del investigador. Finalmente, durante la comparación Po:Pe, si Po - Pe > δ, los genes son considerados significativos positivamente, en cambio si Pe – Po > δ son considerados significativos negativamente. El punto de corte para la significancia está determinado por el parámetro de ajuste delta (δ), seleccionado por el usuario basado en la tasa de descubrimiento de falsos positivos (Figura 10).

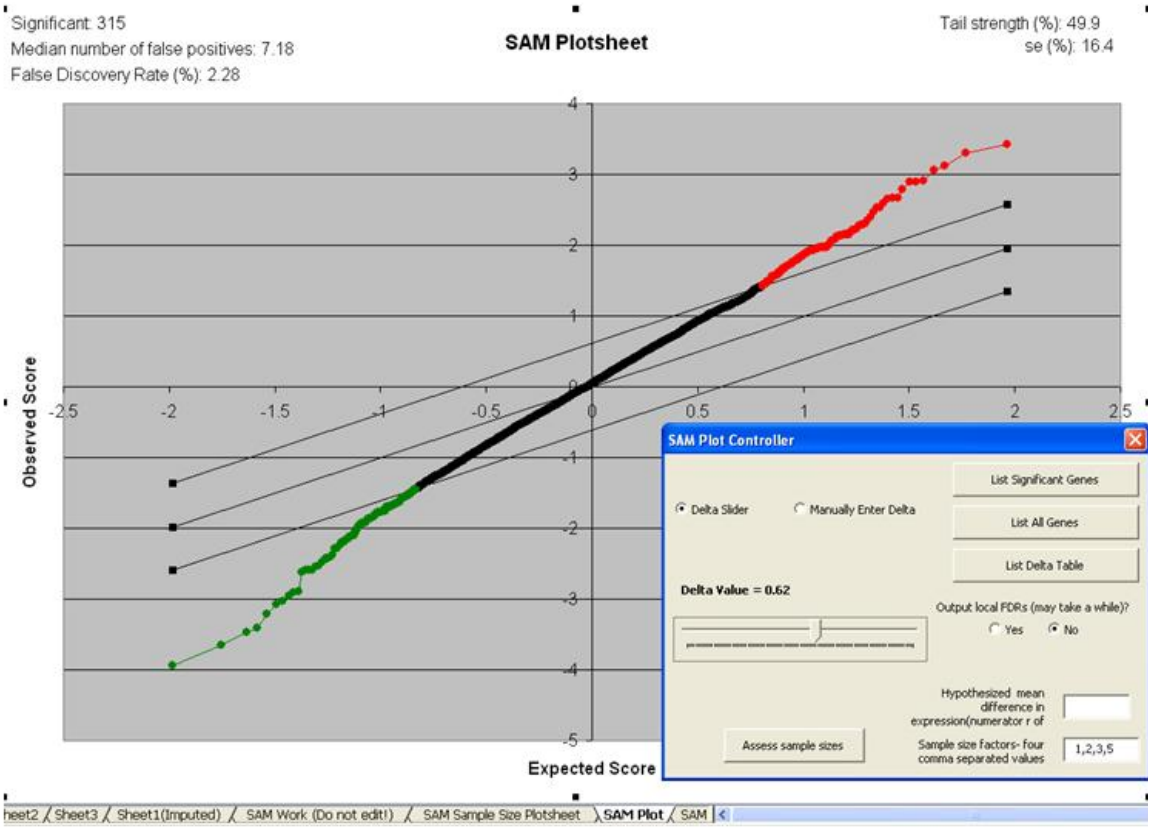


Figura 10. gráfico interactivo de SAM donde se observan los puntos del microarreglo hibridizado con los puntajes observados (eje Y) y los puntajes esperados (eje X).

Los genes significativamente diferenciales se ubican por fuera del valor delta (δ), estos puntos rojos y verdes equivalen a los genes inducidos y reprimidos respectivamente. El usuario elije

en la subventana de la parte inferior-derecha, el valor delta (δ) en el cual el porcentaje de FDR sea < 10% al igual que la mediana de falsos positivos, dando como resultado el número de genes significativos (parte superior-izquierda). Una vez el usuario elije el valor delta (δ) mas adecuado, presiona los botones de la subventana donde está la lista de los genes apareciendo en otro sheet llamado SAM Output.

2.7.3.3 Métodos de agrupamiento y visualización de los datos

El análisis de agrupamiento o *Clustering* de la matriz de expresión consiste en reunir genes basándose en la similitud de su perfil de expresión. Existen métodos no supervisados y supervisados basándose en datos previos para concentrar los patrones de expresión relacionados. Entre los métodos no supervisados el más empleado es "k-media" y es apto para organizar datos exploratorios exhaustivos. "K-media" es un algoritmo de partición que divide los ítems en k-grupos de manera que la suma de las distancias al centro del grupo sea mínima. Por otro lado los métodos supervisados requieren un grupo de experimentos que los entrene (*training set*) para generar reglas que puedan hacer predicciones o clasificar datos a testear (*testing set*). Entre ellos podemos mencionar a los basados en redes neuronales de aprendizaje. Los esquemas resultantes son de fácil visualización y altamente informativos.

3 RESULTADOS

3.1 Extracción de ARN total y síntesis de ADNc

Con el método de extracción de ARN total de Cloruro de Litio (Chang et al. 1993) se obtuvieron ARNs de alta calidad y excelente concentración suficiente para llevar a cabo los trabajos propuestos en el estudio (Figura 11)

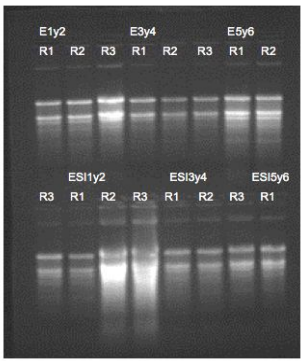


Figura 11. ARNs extraídos con el método de Cloruro de Litio. "E" corresponde a Ecu 72 infestado y "ESI" a Ecu 72 sin infestar, en cada tiempo y cada réplica biológica.

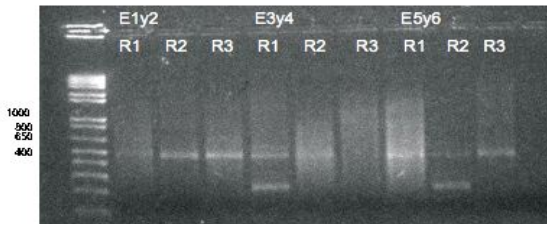


Figura 12. ADNc amplificados con el kit *SMART*^{TM} *PCR cDNA synthesis* CLONTECH. "E" corresponde a Ecu 72 infestado en cada tiempo y cada réplica biológica.

3.2 Hibridización sustractiva

Con el fin de iniciar la caracterización molecular del fenómeno de resistencia de la yuca a la mosca blanca *A. socialis* se decidió realizar un estudio transcripcional de los elementos expresados por plantas resistentes durante la respuesta de defensa. Se emplearon dos técnicas de hibridización sustractiva: la DSC (*Differential Substraction Chain*) descrita por Luo *et al.* (1999), y la SSH (*Suppression Subtraction Hibridization)* (Diatchenko et al. 1996) para la construcción de una librería sustractiva a partir de la variedad resistente MEcu 72.

Se pretende identificar secuencias únicas de ARN mensajero entre dos poblaciones, así la generación de amplicones también es un concepto útil para las sustracciones de ADNc por dos razones: a) Las técnicas de hibridación sustractiva surgidas a partir del concepto de Lisitsyn & Wigler (1993) aprovechan los adaptadores de los amplicones como 'marcas' que se pueden utilizar al final del procedimiento para amplificar sólo las secuencias diferenciales. b) Es ampliamente aceptado que el uso de PCR para generar los amplicones tiene un efecto 'normalizador' en las representaciones del ADNc, esto es, que se elimina la amplia variación en la abundancia de los ARNm individuales (Luo et al. 1999). Aún con todas las ventajas que el uso de amplicones puede ofrecer para la realizacion de hibridizaciones sustractivas, es necesario tener en cuenta que los tratamientos necesarios para su obtención probablemente presentan algunas desventajas que no permiten cubrir completamente el transcriptoma. Por ejemplo, la digestión inicial puede pasar por alto secuencias que no contienen los sitios de restricción para la endonucleasa utilizada o, por el contrario, puede que otras secuencias presenten un exceso de tales sitios de reconocimiento; en el primer caso, nunca se generaría un amplicón de tal ADNc y, en el segundo, los fragmentos obtenidos serían tan pequeños que se perderían en las purificaciones y tratamientos subsiguientes. Para evitar dichas situaciones, el uso de enzimas como *Dpn*II y *Rsa*I, que reconocen cuatro pares de bases y producen extremos cohesivos al cortar, parece la mejor elección. Estas enzimas cortan, en promedio, cada 256 pb lo que permite estimar que la mayoría de los ADNc serán cortados al menos dos veces. Naturalmente, los resultados variarán dependiendo de la composición de bases del transcriptoma de cada organismo. La ligación de adaptadores también puede tener un efecto crítico porque, de no ser efectiva, se perderá el efecto normalizador del PCR; así, en una ligación ineficiente habrá menos moléculas con adaptador de los transcritos poco abundantes lo que disminuye la probabilidad que se amplifiquen y estén presentes en el conjunto final de

amplicones. Por último, el PCR mismo también puede influenciar la generación de las representaciones; a pesar de ser una técnica robusta es bien conocida la variabilidad de los resultados cuando se alteran las condiciones. Por lo tanto, se tomó una elección cuidadosa de la *Taq* polimerasa (se utilizó Taq Advantage, de CLONTECH), las concentraciones de reactivos y los tiempos y temperaturas de amplificación adecuadas para generar un barrido uniforme y repetible. El grado de sustracción deseado en nuestra aplicación particular es una consideración importante, ya que según Kempema et al. (2007) en el caso de la interacción compatible *Arabidopsis-Bemisia tabaci* el porcentaje de genes inducidos por esta especie de mosca blanca en un arreglo de 14815 clones, fue 11.8% (1256 genes) y en el caso de genes inducidos por áfidos (otro floemófago) en sorgo (Zhu-Salzman et al. 2004) fue de 672 genes, no se conoce un estimativo del número de genes inducidos por un floemófago en una interacción incompatible como es el caso de MEcu 72-*A. socialis.* En nuestro caso en cuanto a la librería obtenida por DSC, a partir de la tercera ronda de sustracción se empezaron a notar diferencias cualitativas (Figura 13).

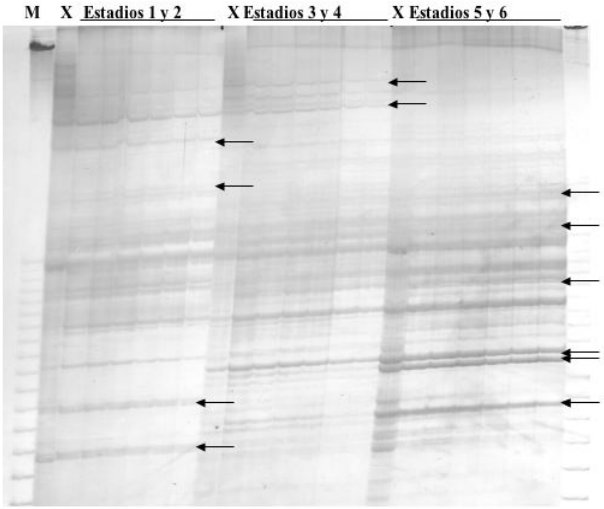


Figura 13. Gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata, donde las flechas muestran las diferencias en los productos de PCR obtenidos a partir de las tres rondas de hibridaciones sustractivas con el método DSC.

Resistente infestado vs. el resistente sin infestar (E y ESI) en los tiempos 1y2 (adulto y huevo), 3y4 (ninfa I y II) y 5y6 (ninfa III y IV).

En cuanto a la librería obtenida por SSH, esta técnica solo tiene dos rondas de hibridización y dos PCR, el segundo de los cuales es "anidado" y permite la amplificación de los insertos enriquecidos en las rondas de hibridización. Se pueden notar las diferencias cualitativas en la segunda ronda (Figura 14)

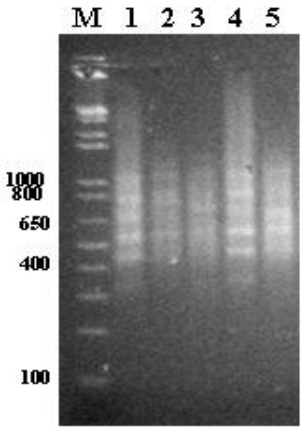


Figura 14. PCR "anidado" a partir de dos rondas de hibridización sustractiva obtenidos con el método SSH.

M: marcador de tamaño molecular 1 kb plus (Invitrogen). (1) MEcu 72 (1 y 2) infestado sin sutraer. (2) MEcu 72 (1 y 2) sustraído con MEcu 72 sin infestar. (3) MEcu 72 (1 y 2) sustraído con CMC 40 infestado. (4) MEcu 72 sin infestar, sin sutraer. (5) Reversa de la anterior sustracción, MEcu 72 sin infestar sustraído con MEcu 72 infestado.

Se obtuvo una librería de 8 placas de 384 pozos, correspondientes a los dos métodos de sustracción (DSC y SSH) y a las diferentes comparaciones, incluyendo sustractivas forward y reverse (en las cuales el *"tester"* pasa a ser el *"driver"* y viceversa) y las librerías sin sustraer, para un total de 3072 clones, 1152 para DSC y 1920 clones para SSH (Tabla 5).

Tabla 5**:** Nombre de las librerías sustractivas construidas con los métodos DSC y SSH, cada una corresponde a una placa de cultivo de 384 pozos, para un total de 3072clones.

Número de la librería	Nombre de la librería
WF 1	Ecu infestado (R) vs. CMC infestado (S) DSC
WF 2	Ecu infestado vs. Ecu Sin Infestar DSC
WF 3	Ecu infestado, Ecu Sin Infestar, CMC infestado. Sin sustraer DSC
WF 4	Ecu infestado (R) vs. CMC infestado (S) SSH
WF 5	Ecu infestado vs. Ecu Sin Infestar SSH
WF 6	Ecu infestado (R) vs. CMC infestado (S) Reversa
WF 7	Ecu infestado vs. Ecu Sin Infestar Reversa
WF 8	Ecu infestado, Ecu Sin Infestar, CMC infestado. Sin sustraer SSH

3.2.1 Amplificación de insertos de los clones recombinantes por PCR

Con las metodologías DSC y SSH se obtuvieron fragmentos de 200-800 pares de bases (Figura 15).

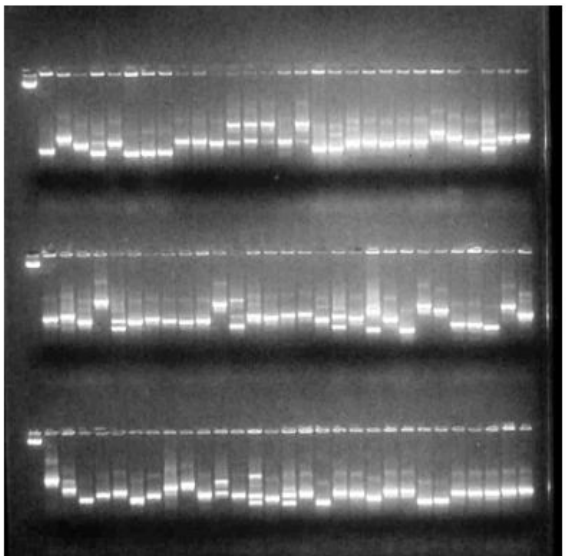


Figura 15. Gel de agarosa en el que se muestran productos de PCR obtenidos a partir de algunas librerías Sustractivas, escogidos al azar.

3.2.2 Secuenciación y análisis bioinformático de la librería sustractiva

Con el objetivo de ubicar las secuencias en el genoma de yuca y conocer cuantas correspondían a secuencias únicas, 384 clones escogidos al azar de las librerías sustractivas fueron secuenciados y analizados utilizando un script de PERL, con el cual se mapearon en el genoma de yuca (versión 4.1 http://www.jgi.doe.gov/CSP, la cual cubre ~70% de las 760-Megabases del genoma de yuca y virtualmente todas las regiones génicas de la misma). Estas secuencias mapeadas fueron sometidas a una búsqueda en Genbank y TAIR utilizando MEGABLAST (Rodríguez, comunicación personal).

De los 384 clones secuenciados, 192 correspondían a la librería DSC y 192 a la SSH. Las secuencias corresponden aproximadamente al 12% de los clones de la librerías sustractivas, de estos clones, 38 y 42 (SSH y DSC respectivamente) secuencias fueron descartadas por baja calidad (datos no mostrados). Trescientas cuatro (304) fueron mapeadas y dieron hit significativo utilizando MEGABLAST. Finalmente, de estas 304 secuencias se obtuvieron 125 secuencias únicas (32.5% del total de 384), y las 179 restantes fueron redundantes. De estas 125 secuencias únicas, 98 correspondieron a la librería SSH y solo 27 a la librería DSC. Esta librería presentó un porcentaje mayor de redundancia (64%) comparado con la SSH (29%). Si extrapolamos ese 12% de clones secuenciados al total de clones obtenidos en la librería (3072), de los cuales 1152 corresponden a DSC, podríamos tener una idea de cuantos clones aproximadamente tendrían secuencias únicas en esta librería, los cuales serían ~161, menos las descartadas por baja calidad (~253), el resto (~737 clones) serían redundantes. En el caso de la librería SSH, de la cual se tienen 1920 clones, obtendríamos ~979 secuencias únicas, ~384 no significativas y ~556 redundantes.

Los resultados anteriores nos muestran claramente, que la eficiencia para obtener un porcentaje alto de secuencias únicas y un porcentaje bajo de redundancia, fue mejor en las librerías construidas con el método SSH, esto hace de esta técnica una excelente herramienta para identificar genes. A pesar que el porcentaje de secuencias de baja calidad fue casi el mismo en ambas librerías, sorprende la diferencia en el número de secuencias únicas. Esto va de acuerdo a muchos trabajos reportados donde han utilizado exitosamente esta metodología (Lukyanov et al. 1994; Gurskaya et al. 1996; Diatchenko et al. 1996), la cual en este estudio

se siguió estrictamente según las indicaciones del fabricante (ver Modelo Metodológico).

El mayor porcentaje de clones redundantes correspondió a secuencias relacionadas con fotosíntesis, resultados que se mostrarán más adelante en este documento. Porcentajes altos de clones redundantes es un resultado que se ha observado en muchos trabajos que utilizan este tipo de metodologías, por ejemplo, López et al, (2004) reportaron una redundancia del 80% con el método DSC. Este es un resultado que demuestra que varias rondas de sustracción favorecen el enriquecimiento en las librerías de transcritos específicos. Long-Ling et al. (2009) utilizando SSH construyeron una librería sustractiva para detectar diferencias fisiológicas y morfológicas entre gametófitos machos y hembras de *Laminaria japonica*, obtuvieron una tasa de redundancia de 69.74%. Jia et al. (2006) utilizando también el método SSH, contruyeron una librería sustractiva en *Euphorbia esula* para identificar genes diferencialmente expresados en dormancia y crecimiento de yemas, obtuvo una tasa de redundancia del 85%.

3.2.2.1 Secuencias diferencialmente inducidas por *A. socialis* en yuca

En las librerías sustractivas fueron encontrados algunas secuencias similares a genes que hacen parte de las respuestas de defensa de la planta al ataque de patógenos y plagas, genes que probablemente actúan en el reconocimiento de la plaga, otros que participan en el desarrollo de estrés oxidativo que muy probablemente activan la HR, otros que pueden activar vías completas de señalización como la vía de JA ET y SA. En la Tabla 2 se muestran las secuencias con función única, número de accesión en GenBank, descripción, puntajes y valor E, todos estos datos arrojados por GenBank utilizando el algoritmo MEGABLAST y clasificados en términos de GO (Figura 16).

Tabla 6**:** Mejores hit encontrados en GenBank utilizando el algoritmo MEGABLAST de las secuencias obtenidas en las librerías sustractivas y mapeadas en el genoma de yuca.

Se muestra de cual librería fue obtenida la secuencia, EyESI y EyC corresponden a las sustraídas, SS corresponde a las librerías sin sustraer y "reverse" corresponde las librerías sustractivas reversas. * corresponde a las secuencias ubicadas en mas de una categoría funcional por GO. En la categoría Defensa se señalan los genes inducidos o que participan en la biosíntesis y/o señalización o inducción por JA, ET y SA.

Proceso Biologic	Libreria	Asección	Ubicacion genoma Yu	Descripción	Max pun	E value
Defensa						
SA	EyESI	AT3G01500.3	cassava4.1_011848m	CA1 (CARBONIC ANHYDRASE 1); carbonate dehydratase [Arabid	442	e-124
	EyESI	AT3G12490.1	cassava4.1_019957m	cysteine protease inhibitor, putative / cystatin,	793	0
JA, ET	EyESI	AT3G12500.1	cassava4.1_011797m*	ATHCHIB (ARABIDOPSIS THALIANA BASIC CHITINASE); chi	418	e-116
JA	EyESI	AT3G22400.1	cassava4.1_001506m*	LOX5; electron carrier/ iron ion binding / lipoxygenase/ metal ion bin	424	e-118
JA	EyESI	AT4G26850.1	cassava4.1_007450m	VTC2 (vitamin c defective 2); GDP-D-glucose phosphorylase/	438	e-122
JA, ET	EyESI	AT2G14580.1	cassava4.1_017950m	ATPRB1;	539	e-153
JA, ET	EyESI	AT4G13040.1	cassava4.1_015207m	AP2 domain-containing transcription factor family protein [Arabidop	811	0
	EyESI	AT5G10530.1	cassava4.1_021217m	lectin protein kinase, putative; KOG3839;	85.5	2E-15
	EyESI	NP_192237.1		cytochrome b6-f complex iron-sulfur, putative [Arabidopsis thaliana]	56	1E-06
	EyESI, SS	AT2G03440.1	cassava4.1_018733m	nodulin-related;	509	e-144
	EyC	AT1G47710.1	cassava4.1_009293m	serpin, putative / serine protease inhibitor, putative;	42	0.003
Estres Oxidativo						
	EyESI	BAD30454.1		putative calreticulin interacted protein [Oryza sativa subsp. Japonica]	84	2E-15
	EyESI	AT4G35090.1	cassava4.1_006302m	CAT2 (CATALASE 2); catalase; CAT2;	192	1E-48
	EyESI	AT3G22400.1	cassava4.1_001506m*	LOX5; electron carrier/ iron ion binding / lipoxygenase/ metal ion bin	424	e-118
	EyC	AAM65092.1		protein-methionine-S-oxide reductase [Arabidopsis thaliana]	242	3E-94
	EyC	ABZ88803.1		glutaredoxin [Hevea brasiliensis]	64	7E-09
	reverse	AT4G33010.1	cassava4.1_000718m	AtGLDP1 (Arabidopsis thaliana glycine decarboxylase P-protein 1)	278	1E-74
	reverse	AT1G12900.1	cassava4.1_008965m	GAPA-2 (GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGEN	856	0
	SS	AT4G25130.1	cassava4.1_014167m	peptide methionine sulfoxide reductase, putative;	170	4E-42
Metabolismo de Carbohidratos y Fotosintesis	EyESI	AT1G61520.1	cassava4.1_013684m	LHCA3; chlorophyll binding; LHCA3; K08909;	813	0
	EyESI	AT3G61470.1	cassava4.1_013916m	LHCA2; chlorophyll binding; LHCA2; K08908;	176	3E-44
	EyESI	AT5G54270.1	cassava4.1_014117m	LHCB3 (LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL B-BINDING PR	636	0
	EyESI	AT5G38430.1	cassava4.1_017243m	ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1B /	563	e-160
	EyESI	AT5G38410.2	cassava4.1_018735m	ribulose bisphosphate carboxylase small chain 3B /	226	5E-59
	EyESI	AT1G79040.1	cassava4.1_018756m	PSBR (photosystem II subunit R); PSBR;	696	0
	EyESI	AT2G30570.1	cassava4.1_019040m	PSBW (PHOTOSYSTEM II REACTION CENTER W); PSBW;	476	e-134
	EyESI	AT1G54780.1	cassava4.1_012916m	thylakoid lumen 18.3 kDa protein; PF04536;	617	e-176
	EyESI	AT2G39730.2	cassava4.1_007872m	RCA (RUBISCO ACTIVASE); ADP binding / ATP binding /	375	e-103
	EyESI, SS	AT5G66570.1	cassava4.1_013817m	PSBO1 (PS II OXYGEN-EVOLVING COMPLEX 1)[Arabidopsis th	573	e-163
	Todas	AT1G67090.1	cassava4.1_017170m	RBCS1A (RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL	735	0
	EyESI, rev	AT2G34430.1	cassava4.1_014040m	LHB1B1; chlorophyll binding; LHB1B1;	389	e-108
	EyESI, rev	AT2G39730.2	cassava4.1_006803m	RCA (RUBISCO ACTIVASE); ADP binding / ATP binding / enzym	912	0
	EyC	AT2G20260.1	cassava4.1_018492m	PSAE-2 (photosystem I subunit E-2); catalytic; PSAE-2;	640	0
	EyC	AT4G05180.1	cassava4.1_015521m	PSBQ-2; calcium ion binding; PSBQ-2;	577	e-164
	EyC, rever	AT1G52230.1	cassava4.1_018595m	PSAH2 (PHOTOSYSTEM I SUBUNIT H2); PSAH2;	434	e-121
Proteolisis						
	EyESI	AT1G70170.1	cassava4.1_012291m	MMP (MATRIX METALLOPROTEINASE); metalloendopeptidase	385	e-106
	EyESI	AT3G58040.1	cassava4.1_012440m	SINAT2 (SEVEN IN ABSENTIA OF ARABIDOPSIS 2); protein	38	0.036
	EyC	AT5G05740.2	cassava4.1_005317m	EGY2; metalloendopeptidase; EGY2;	565	e-161
	EyC	AT1G67690.1	cassava4.1_014845m	metalloendopeptidase; PACid:17963401	34	0.65
	reverse	AT2G20580.1	cassava4.1_001470m	RPN1A (26S PROTEASOME REGULATORY SUBUNIT S2 1A); b	797	0
Modificacion y Biosintesis de pared celular	EyESI	AT3G12500.1	cassava4.1_011797m*	ATHCHIB (ARABIDOPSIS THALIANA BASIC CHITINASE); chi	418	e-116
	EyESI	AT3G59010.1	cassava4.1_004607m	pectinesterase family protein;	404	e-112
	EyC	AT2G21140.1	cassava4.1_008259m	ATPRP2 (PROLINE-RICH PROTEIN 2); ATPRP2;	472	e-132
	EyC	AT3G06260.1	cassava4.1_027013m	GATL4 (Galacturonosyltransferase-like 4);	34	0.53

continuacion tabla 2…

Proceso Biologic	Libreria	Asección	Ubicacion genoma Yu	Descripción	Max pun	E value
Respuesta a						
Estres/estimulos	EyESI	AT1G07930.1;	cassava4.1_007545m	elongation factor 1-alpha / EF-1-alpha;	783	0
	EyESI	AT1G06040.1	cassava4.1_015258m	STO (SALT TOLERANCE); DNA binding / protein binding	325	9E-89
	EyESI	AT3G44110.1;	cassava4.1_013775m	ATJ3; protein binding; ATJ3;	474	e-133
	EyESI	AT1G32220.1	cassava4.1_032951m	binding / catalytic/ coenzyme binding;	89.4	2E-16
	EyESI, SS	XP_002519375.1*		NAC domain-containing protein [Ricinus communis]	122	4E-26
	SS	AT4G38970.1;	cassava4.1_009143m	fructose-bisphosphate aldolase, putative;	1116	0
	SS	AT4G26530.1	cassava4.1_010561m	fructose-bisphosphate aldolase, putative;	672	0
	SS	AT5G63160.1	cassava4.1_018206m	BT1 (BTB AND TAZ DOMAIN PROTEIN 1); protein binding /	74	1E-12
	SS	AT5G65430.1	cassava4.1_014556m	GRF8 (GENERAL REGULATORY FACTOR 8); protein binding	442	e-124
	SS	AT3G44110.1;	cassava4.1_013783m	ATJ3; protein binding; ATJ3;	182	5E-46
	reverse	AT3G62410.1	cassava4.1_019184m	CP12-2; protein binding; CP12-2;	533	e-151
	EyC	AAX84677.1		Auxin-repressed protein-like protein ARP1 - Manihot esculenta	332	2E-31
	EyC	AT1G60470.1	cassava4.1_011281m	AtGolS4 (Arabidopsis thaliana galactinol synthase 4);	771	0
	EyC	AT5G50720.1	cassava4.1_018619m	ATHVA22E; HVA22E; PTHR12300; PF03134;	32	1.2
Senales de						
Transduccion	EyESI	AT4G13040.1	cassava4.1_015207m	AP2 domain-containing transcription factor family protein [Arabidop	811	0
	EyESI	AT5G48940.1	cassava4.1_025296m	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase,	36	0.32
	EyESI	AT2G02800.1	cassava4.1_008540m	APK2B (PROTEIN KINASE 2B); ATP binding / kinase/ protein	40	0.012
	EyESI	AT2G46500.1	cassava4.1_004256m	phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein /	34	0.33
	EyESI	AT3G53570.1	cassava4.1_007876m	AFC1 (ARABIDOPSIS FUS3-COMPLEMENTING GENE 1); ATP	32	1.4
	EyESI	AT3G59440.1	cassava4.1_018011m	calcium-binding protein, putative;	628	e-179
	EyESI	ACH73166		CONSTANS-like protein [Prunus persica]	200	4E-50
	EyESI, Ey	AT1G77280.1;	cassava4.1_002273m	protein kinase family protein; KOG1187;	34	0.79
	EyC	ACA24496.1.		putative transcription factor [Cucumis sativus]	63	2E-12
	EyC	AT5G02810.1	cassava4.1_002119m	PRR7 (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7); transcription	587	e-167
	EyC	AT2G26940.1	cassava4.1_022792m	zinc finger (C2H2 type) family protein;	36	0.24
	reverse	AT1G32220.1	cassava4.1_000590m	protein binding / zinc ion binding [Arabidopsis thaliana]	418	e-116
	reverse	AT2G27230.1	cassava4.1_002532m	LHW (LONESOME HIGHWAY); protein homodimerization	741	0
	reverse	AT2G37520.1	cassava4.1_001456m	PHD finger family protein;	527	e-149
	reverse	AT1G72970.1	cassava4.1_004024m	HTH (HOTHEAD); FAD binding / aldehyde-lyase/	34	0.54
	SS	AT5G47080.1	cassava4.1_013605m	CKB1; protein kinase regulator; CKB1;	559	e-159
	SS	AT5G63160.1	cassava4.1_018206m	BT1 (BTB AND TAZ DOMAIN PROTEIN 1); protein binding /	74	1E-12
	SS	NP_564045.1*		protein phosphatase 2C (PP2C), putative [Arabidopsis thaliana]	179	7E-44
Metabolismo	SS	AT4G17190.1	cassava4.1_011120m	FPS2 (FARNESYL DIPHOSPHATE SYNTHASE 2)	84	6E-16
Secundario	EyESI, SS	XP_002519375.1*		NAC domain-containing protein [Ricinus communis]	122	4E-26
Transporte						
	EyESI, SS	AT5G57940.1	cassava4.1_002441m	ATCNGC5 (CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL 5); calm	34	0.51
	EyESI	AT4G38250.1	cassava4.1_008196m	amino acid transporter family protein;	355	1E-97
	EyESI	AT2G01320.1	cassava4.1_002526m	ABC transporter family protein; KOG0061;	32	1.4
	EyESI	AT1G60030.1	cassava4.1_005046m	xanthine/uracil permease family protein; NAT7;	34	0.52
	EyESI	YP_001718422.1		ATP synthase CF1 alpha subunit [Manihot esculenta]	608	e-172
	EyC	AT5G03450.1	cassava4.1_009733m	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein;	36	0.25
	EyC	AT5G38710.1	cassava4.1_028293m	proline oxidase, putative / osmotic stress-responsive	36	0.15
	reverse	AT1G44750.2	cassava4.1_010312m	ATPUP11; purine transmembrane transporter [Arabidopsis thaliana]	636	0

continuacion tabla 2…

Proceso Biologic	Libreria		Asección	Descripción	Max pun	E value
Metabolismo y						
Mantenimiento	EyESI	AT5G62310.1	cassava4.1_024039m	IRE (INCOMPLETE ROOT HAIR ELONGATION); kinase/ protein	34	0.73
celular	EyESI, Ey	AT4G37300.1	cassava4.1_017664m	MEE59 (maternal effect embryo arrest 59); MEE59;	620	e-177
	EyESI, Ey	AT5G02380.1	cassava4.1_019963m	MT2B (METALLOTHIONEIN 2B); copper ion binding; MT2B;	482	e-135
	SS	AT3G09390.1	cassava4.1_020537m	MT2A (METALLOTHIONEIN 2A); copper ion binding; MT2A;	460	e-129
	SS	NP_567755.1		glycerophosphodiester phosphodiesterase/ kinase [Arabidopsis thaliar	242	9E-63
	reverse	AT1G12900.1	cassava4.1_008965m	GAPA-2 (GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGEN/	856	0
	reverse	AT3G21160.1	cassava4.1_011906m	mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase,	36	0.31
Traduccion						
	EyESI	AT2G40435.1	cassava4.1_030263m	unknown protein; PACid:17964119	115	2E-24
	SS	XP_002526873.1		60S acidic ribosomal protein P0, putative [Ricinus communis]	334	1E-89
Estrucura						
	EyESI	AT5G12250.1	cassava4.1_011440m	TUB6 (BETA-6 TUBULIN); structural constituent of	486	e-137
	EyESI	AT2G30620.1	cassava4.1_013410m	histone H1.2; PTHR11467; PF00538;	68	3E-11
Funcion						
desconocida	EyESI	AT2G18740.1	cassava4.1_020283m	small nuclear ribonucleoprotein E, putative / snRNP-E,	254	2E-67
	EyESI	AT4G17520.1	cassava4.1_009956m	nuclear RNA-binding protein, putative;	712	0
	EyESI	AT5G55660.1	cassava4.1_004030m	unknown protein; KOG2266; PTHR13468;	599	e-171
	EyESI	AT2G15020.1	cassava4.1_005474m	unknown protein; PACid:17963125	640	0
	EyESI	AT5G06220.1		unknown protein [Arabidopsis thaliana] contain LETM1-like protein		
	EyESI	AT4G01150.1	cassava4.1_017927m	unknown protein; PACid:17975688	392	e-109
	EyESI		cassava4.1_020460m	PACid:17961638	32	1.5
	EyESI	AT3G61050.1	cassava4.1_005819m	NTMC2T4; lipid binding; NTMC2T4; PTHR10774;	313	3E-85
	EyESI	AT1G76010.1	cassava4.1_014369m	nucleic acid binding; KOG2567; PTHR13516;	32	2.2
	EyESI	AT3G10260.3	cassava4.1_014754m	reticulon family protein; KOG1792;	676	0
	EyESI		cassava4.1_025353m	PACid:17972334	56	1E-07
	EyESI, rev	AT2G34510.1	cassava4.1_012235m	unknown protein; PF04862; PACid:17972257	36	0.14
	EyC	|NF00491102		nitrite extrusion protein [Amycolatopsis mediterranei]		
	EyC	AT2G01050.1	cassava4.1_031347m	nucleic acid binding / zinc ion binding;	36	0.15
	EyC	AT4G01150.1	cassava4.1_017773m	unknown protein; PACid:17978534	281	1E-75
	SS	AT3G26935.1	cassava4.1_007455m	zinc finger (DHHC type) family protein;	1005	0
	SS	AT3G01680.1	cassava4.1_002622m	unknown protein; ; PTHR13871:SF2; PF11594;	973	0
	SS	AT1G45688.1	cassava4.1_022075m	unknown protein; PACid:17985421	38	0.041
	SS	Q3HVK6		Drm3-like protein n=1 Tax=Solanum tuberosum	103	1E-20
	reverse	AT5G25270.1	cassava4.1_011827m	unknown protein; KOG0005; PTHR15204;	36	0.075
	reverse	AT1G60060.1	cassava4.1_029411m	unknown protein; PTHR13902:SF3;		

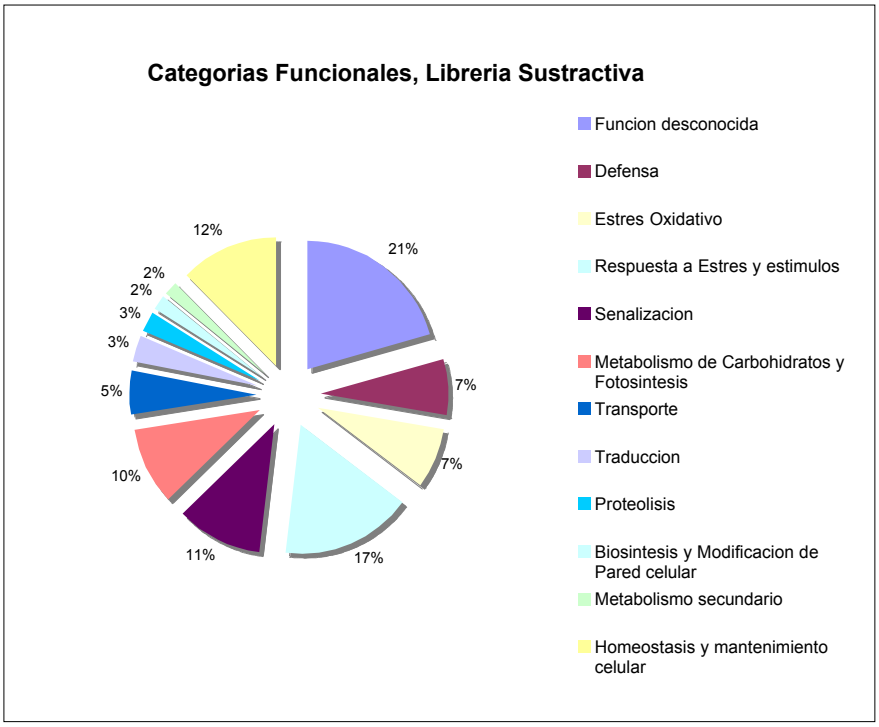


Figura 16. Diagrama de torta en el que se muestran la clasificación de los genes por categorías funcionales inferidas por GO, obtenidos en la librería sustractiva en respuesta al ataque de *A. socialis.*

3.2.2.1.1 Librerías sin sustraer

La librería sin sustraer es un control que se utiliza para tener la certeza que la sustracción funciona y que realmente los genes regulados por *A. socialis* son sustraídos. En esta librería sin sustraer se encuentra toda la población de amplicones obtenidos a partir del ADNc, es sometida al mismo proceso de las sustraídas, digestión con las enzimas *Dpn*II y *Rsa*I (utilizadas por DSC y SSH, respectivamente), adición de adaptadores, pero sin ser sometida al proceso de hibridización. Sirve para visualizar en los geles de agarosa y acrilamida, como el proceso de sustracción va ocurriendo a medida que se realizan las rondas de sustracción (Figuras 13 y 14).

En la librería sin sustraer se obtuvieron 17 secuencias, 12 de SSH y cinco de DSC. De estas, seis fueron aisladas también en las sustractivas, las que correspondieron a similar a *NAC domain-containing protein* (XP_002519375), *protein kinase family protein* (AT1G77280.1), *nodulin-related* (AT2G03440.1), *ATCNGC5 (CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL 5), PSBO1,* y *RBCS1A (RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN),* las dos últimas relacionadas con fotosíntesis. Esta última secuencia fue el transcrito más abundante en SSH, (26 veces). Las secuencias obtenidas a partir de las librerías sin sustraer fueron clasificadas por GO en las categorías funcionales de estrés oxidativo, metabolismo de carbohidratos y fotosíntesis, respuestas a estrés y/o estímulos, señales de transducción, y mantenimiento celular en general. No se ubicaron en las categorías relacionadas con defensa [excepto la secuencia *nodulin-related* (AT2G03440.1), que también se obtuvo en la sustractiva], proteólisis y modificación/biosíntesis de pared celular. En estas últimas tres categorías se podrían ubicar a los posibles genes candidatos implicados en la respuesta de defensa de la yuca a *A. socialis.*

3.2.2.1.2 Librerías reversas

Las librerías reversas son las que corresponden a las sustracciones en las que el "tester" pasa a ser el "driver". En este caso MEcu 72 sin infestar y CMC 40 infestado pasan a ser sustraídos por MEcu 72 infestado. Estas librerías también son utilizadas como control de la calidad y eficiencia de la sustracción, ya que se espera que la mayoría de secuencias obtenidas utilizando ambas estrategias sean diferentes. Es decir, si obtenemos la misma secuencia en la MEcu 72 infestada y en la sin infestar después de la sustracción normal y reversa, quiere decir que muy seguramente este gen no está implicado en la respuesta de defensa de la yuca contra *A. socialis*, y que probablemente por artefactos en la técnica o por su relativa abundancia fue sustraído.

Diecisiete secuencias se obtuvieron en las librerías sustractivas reversas, de las cuales 13 fueron únicas y cuatro se compartieron con las sustraídas y las sin sustraer. De nuevo una de estas secuencias compartidas fue la *RBCS1A,* que en las reversas estuvieron repetidas tres

veces. Las otras secuencias compartidas fueron *RCA (RUBISCO ACTIVASE),* la *LHB1B1; chlorophyll binding*, la *PSAH2 (PHOTOSYSTEM I SUBUNIT H2),* todas relacionadas con fotosíntesis. Fueron clasificadas por GO en todas las categorías funcionales a excepción de defensa y modificación/biosíntesis de pared celular.

3.2.2.1.3 Librerías sustractivas

Treinta y nueve secuencias fueron únicas para la sustractiva de la comparación EyESI, y para esta comparación otras 11 secuencias fueron compartidas tanto con la comparación EyC como con las reversas y las sin sustraer. Con la comparación EyC se obtuvieron 15 secuencias únicas y ocho compartidas con las demás librerías. En total fueron 16 secuencias las que se compartieron entre las sustractivas, reversas y sin sustraer. Entre estas se encuentran algunas de las más abundantes en las librerías obtenidas por DSC y por SSH. Entre estas encontramos algunas de las que participan en fotosíntesis y metabolismo celular (Tabla 6).

En la discusión consideraremos solo las secuencias aisladas a partir de las librerías sustractivas, que son las diferencialmente inducidas por *A. socialis*. En la sustracción diferencial se observó que la mayor cantidad de secuencias obtenidas provenían de la comparación EyESI, comparada con EyC (MEcu 72 resistente infestado vs. CMC 40 suceptible infestado). Esto sugiere que con la sustracción se pudo obtener un buen resultado en la obtención de la cascada de respuesta de defensa, ya que las secuencias aisladas en EyESI (el "driver" no estaba infestado) es el resultado del asentamiento y alimentación por *A. socialis*. Por el contrario en la comparación EyC (el "driver" que es suceptible, estaba infestado) de la cual esperábamos obtener las secuencias que respondían al ataque del insecto y que solo se encontraban en el genotipo resistente, no fue tan exitosa. Lo que sugiere que la estrategia empleada con estas técnicas de sustracción en el caso de la comparación del resistente vs. susceptible no fue la mejor.

Apoyando lo anterior, se puede observar (Tabla 6) que la mayoría de las secuencias relacionadas con defensa, proteólisis y modificación/biosíntesis de pared celular fueron aisladas en la librería sustractiva de la comparación EyESI. Entre estas secuencias se encuentran las que dieron similar a algunos genes que han sido reportados que cumplen un papel importante en las respuestas de defensa de las plantas a patógenos y plagas, como son *AP2 domain-containing transcription factor,* el cual tiene un papel crucial en la señalización y cruce de las vías de JA y ET (Pré et al. 2008), *LOX5*, la cual es una lipoxigenasa que participa en la biosíntesis de JA (Schaller, 2001), *VTC2* (*Vitamin C Defective 2*), la cual está involucrada en respuesta de defensa a bacterias y responde al estímulo por JA (Müller-Moulé, 2008), *ATPRB1* (AT2G14580.1) *(Basic PR1-like protein,*) gen de respuesta de defensa regulado por JA/ET (Santamaría et al. 2001), *CA1* (*Carbonic Anhydrase 1*, sinónimo de *AtSABP3*) proteína de ligación a SA, la cual es requerida contra la infección por patógenos como bacterias e interacciones incompatibles de hongos (Wang et al. 2009). También se obtuvo una secuencia similar a *ATHCHIB (ARABIDOPSIS THALIANA BASIC CHITINASE, PR-3*) la cual es una quitinasa básica involucrada en vías de señalización mediada por JA/ET durante la resistencia sistémica adquirida, basados en trabajos de expresión (Pulla et al. 2011; Fan et al. 2007). Pertenece a la *Glycoside hydrolase family 19.* Las quitinasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los ligamientos de la beta-1,4-N-acetyl-D-glucosamina en los polímeros de quitina.

En la librería sustractiva se aislaron secuencias similares a *cysteine protease inhibitor, putative / cystatin*, otra similar a *serpin, putative / serine protease inhibitor,* la cual es un inhibidor de *metacaspase-9 cysteine protease* y por último una secuencia similar a *lectin protein kinase, putative* (AT5G10530.1). Entre los mecanismos de defensas activas contra patógenos y plagas se encuentran las proteínas de defensa, las cuales han sido clasificadas en cinco grupos de acuerdo a su función. El primer grupo consiste en proteínas involucradas en compuestos antimicrobiales y metabolitos secundarios tóxicos. El segundo grupo consiste en carbohidrolasas dentro de las cuales se encuentran las glucanasas y las quitinasas. El tercer grupo contiene proteínas llamadas Defensinas (Broekaert et al. 1995) y proteínas ricas en Cisteína como los inhibidores de proteasa (PI). Los PI que comprenden varias clases de proteasas digestivas en el intestino del insecto, han sido estudiados por su papel en las

respuestas de defensa activas (Green & Ryan 1972; Ryan 1990). La inhibición de las proteasas del intestino del insecto por PI resulta en deficiencias en amino ácidos que afectan negativamente el crecimiento y desarrollo del herbívoro (Lison et al. 2006; Zabala et al. 2004). Lectinas y quitinasas de plantas pueden tener como blanco los componentes del intestino del insecto que contienen carbohidratos (Lawrence & Novak 2006; Peumans & Vandamme 1995). Las enzimas oxidativas tales como las polifenol oxidasas (PPO) y lipoxigenasas (LOX) modifican la proteína dietaria a través de la producción de *o*-quinonas y peróxidos lípidos, respectivamente (Constabel et al. 1995; Felton et al. 1994; Wang & Constabel 2004). Estos PI, lectinas y quitinasas podrían jugar un papel importante como genes efectores, que finalmente ocasionan la muerte de las ninfas de *A. socialis* cuando se alimenta de yuca.

En la categoría de biosíntesis y modificación de pared celular se aislaron dos secuencias que fueron similares a genes envueltos en este proceso, los cuales se han implicado en respuesta de defensa contra patógenos y plagas, estos son, la *ATCHIB*, mencionada anteriormente, y la secuencia similar a *pectinesterase family protein* (AT3G59010.1) la cual actúa en la modificación de la pared celular mediante la dimetil-esterificación de la pectina presente en la pared, está envuelta en la inhibición de patógenos microbianos (Koizumi et al. 2009).

Se aislaron varias secuencias similares a genes que codifican para proteasas, entre estas la *MMP* (*Matrix Metalloproteinase*, NP_177174) la cual es responsable de la proteólisis de la matriz extracelular y de las moléculas de la superficie celular, jugando un papel crucial en morfogénesis, migración celular, reparación de tejido y apoptosis entre otros. Aunque los sustratos naturales de las *MMP* en plantas son desconocidos estos juegan un importante papel en procesos fisiológicos como los anteriormente mencionados, asi como también en defensa contra patógenos, Liu et al. (2001), aislaron el gen *GmMMP2* en soya y demostraron que es activado en respuesta a la infección de patógenos Oomicetos y bacterianos, y Schiermeyer et al. (2009), demostraron que una *MMP1* de tabaco era inducida por patógenos bacterianos. Una *MMP* fue aislada de una librería sustractiva en yuca en el estudio de la interacción yuca-

Xanthomonas (un patógeno bacteriano) (Soto 2003). Este autor sugiere que esta metaloproteinasa en esa interacción podría cumplir funciones similares a las propuestas para *GmMMP2* en soya, sin embargo al igual que en este estudio, es necesario realizar más experimentos sobre esta proteína para comprobar esta hipótesis.

Como puede observarse, estos proteínas de defensa se encuentran entre las frecuentemente implicadas como efectores que finalmente matan al insecto y disminuyen el daño que estos inflingen en la planta hospedera, y al ser encontradas en la librería sustractiva podrían sugerir un papel importante en la respuesta de defensa de MEcu 72 a *A. socialis*.

En cuanto a las secuencias aisladas que fueron similares a genes implicados en estrés oxidativo, se obtuvieron tres de la comparación EyESI y dos de la comparación EyC. En cuanto a las tres de EyESI se encuentran la anteriormente mencionada *LOX5*, por su participación la hidroperoxidación de lípidos en la vía octadecanoide (Schaller et al. 2005). También encontramos la *CAT2 (CATALASE 2*) (AT4G35090.1) y en la EyC una *Glutaredoxin* (ABZ88803). Con el fin de prevenir daños ocasionados por ROS los organismos aeróbicos poseen enzimas que rápidamente los degradan, una de ellas es la catalasa, esta enzima protege la célula del H_2O_2 y de otros ROS por conversión del H_2O_2 en agua y oxígeno molecular durante una reacción catalítica (Apel & Hirt 2004).

Se ha demostrado que la catalasa juega un importante papel en las respuestas de defensa en plantas en contra de un amplio rango de patógenos (Yi et al. 1999). Una de las más rápidas respuestas de defensa seguidas al reconocimiento del patógeno la constituye la producción de ROS, se ha sugerido que el aumento de ROS representa una vía de señalización para el inicio de la HR y SAR (Grant & Loake 2000). Para que los compuestos con oxígeno reactivo se acumulen en la célula es necesaria la inhibición de la enzima calatasa, la cual mantiene la homeostasis. El SA es el encargado de inhibir tanto la transcripción como la actividad enzimática de la catalasa (Yi et al. 1999). Así, la acumulación de SA inhibe la catalasa, su dispersión a través de la planta induce SAR y paralelamente se acumula ROS (Ryals et al. 1996), esta evidencia sugiere que la activación de SAR se realiza por distintas vías de

señalización mediadas por SA y ROS. Plantas transgénicas de tabaco expresando genes con orientación antisentido de dos familias de catalasa que se unen a SA (*CAT1* y *CAT2*) mostraron el desarrollo de HR, inducción de genes PR de la familia *PR1* y el aumento de la resistencia al Virus del Mosaico del Tabaco (Chamnongpol et al. 1998). Aparentemente la yuca se protege a sí misma del estrés oxidativo generado por la producción de ROS en la etapa seguida al reconocimiento del herbívoro, uno de los mecanismos de protección lo constituye la expresión de *CAT2*, el otro lo hace a través de la síntesis de Glutarredoxina, una óxido-reductasa que participa, entre otros, en el plegamiento y regulación de proteínas, y en la reparación de proteínas que han sido afectadas por el estrés oxidativo (Apel & Hirt 2004).

3.2.2.2 RT-PCR de genes implicados en defensa

El análisis *in silico* de las secuencias permitió identificar algunos potenciales genes candidatos. Sin embargo la expresión de estos genes candidatos debe ser estudiada *in vivo* para validar su papel en la respuesta de defensa de la yuca a la alimentación por *A. socialis*. Para evaluar la relativa adundancia de transcritos en algunos de estos genes supuestamente involucrados en defensa, el RT-PCR fue llevado a cabo en plantas resistentes y suceptibles infestadas con *A. socialis*, y plantas resistentes sin infestar. Se escogieron dos de estos genes, el *ATPRB1* y *LOX5*, ambos regulados por las vias del JA/ET. Como gen endógeno se utilizó el *G3PDH*. Se encontró que a los 30 ciclos los dos genes estaban incrementados en todos los tiempos evaluados en el genotipo resistente infestado (Figura 17). *LOX5* no se incrementó en ninguno de los tiempos del suceptible infestado (CMC 40) ni del resistente sin infestar. Lo que puede interpretarse como una clara inducción de este gen por la alimentación por *A. socialis*. En el caso del *ATPRB1* solo se observa una leve inducción en el tiempo 1y2 del suceptible (CMC 40). Esto puede indicar que en el genotipo suceptible el insecto puede inducir la acumulación de este trancrito pero no lo suficiente, y que es incapaz de hacerlo en los tiempos siguientes.

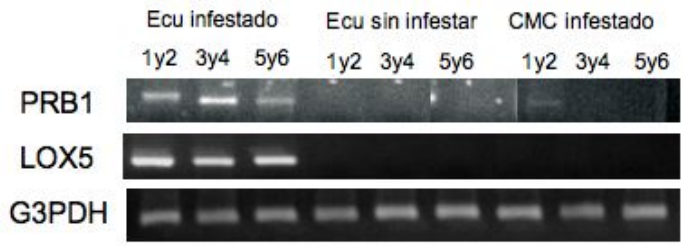


Figura 17. Análisis RT-PCR de las secuencias de genes implicados en defensa.

ADNc de los genotipos Ecu infestado, Ecu sin infestar y CMC infestado con *A. socialis* a través de los tiempos 1y2 (5h y 7 días), 3y4 (14 y 18 d), 5y6 (20 y 27 d). G3PDH (gen endógeno), PRB1 (ATPRB1), LOX5.

3.3 Microarreglos

Sobre el Cassava Unigene Microarray se hibridizaron las muestras presentadas en la tabla 2 de la metodología. Se corrieron tres replicas técnicas (3 slides) por cada tiempo y cada réplica biológica para un total de 54 hibridizaciones.

3.3.1 Normalización de los datos

Para identificar los genes que estaban significativamente inducidos por *A. socialis*, los datos fueron preprocesados utilizando el software *VersArray Analyzer® ChipReader*. Después de hacer la corrección del "background", la Tabla de datos obtenida con este software (Figura 18) fue convertida a MsExcel, donde se seleccionan las columnas de los promedios de intensidad neta (*Net Intensity mean*). Estas intensidades netas fueron las utilizadas para normalizar. Después de normalizar con la función Locfit (LOWESS), MIDAS® arrojó los resultados en unos archivos con extensión *.tav los cuales pueden ser abiertos en MsExcel. Estos resultados se expresan como el logaritmo en base 2 (Log_2) de la razón entre el valor R*i* (rojo, muestra tratamiento) y el valor G*i* (verde, muestra control). Estos son los datos de entrada a SAM para el análisis de genes diferenciales.

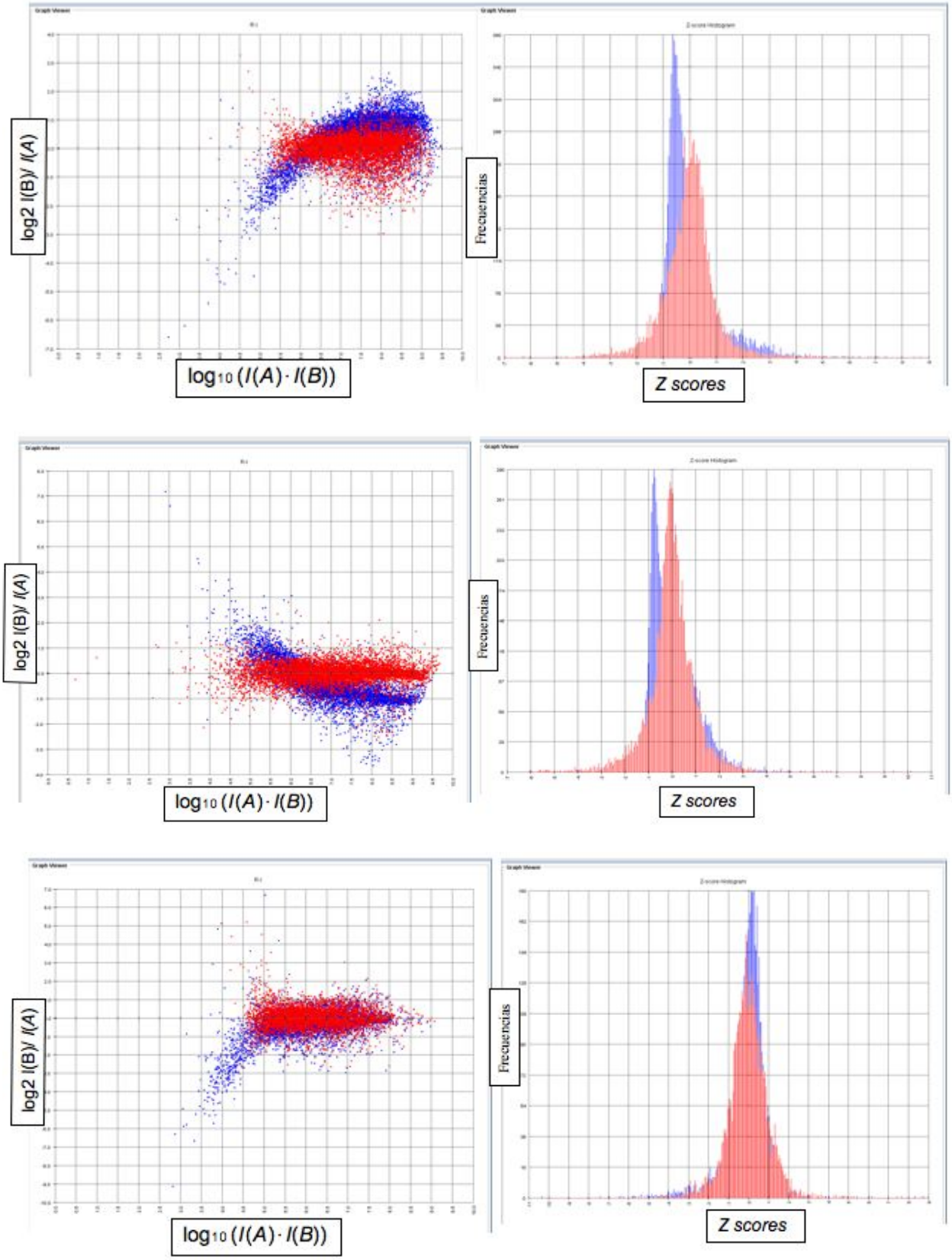
Data table

File Options Tools

	Array Row	Array Col	meta row	Meta col	Row	Column	Raw intensity (mean) (Einl_5y6_...	Raw intensity (mean) (ESI_5y6_R1)	low	MB_Library_plate_name	Net intensity (mean) (Einl_5y6_R1)	Net intensity (mean) (ESI_5y6_...	Background (mean) (Einl_5y6_...	Background (mean) (ESI_5y6...	Background (st.dev.) (Einl_5y6_...	Background (st.dev.) (ESI_5y6...	log_raz_net	Log_int_net
1	1	1	1	1	1	1	14917.142857	11567.437500	☐	EyC(1y2)11_P1	14667.142857	11322.437500	419.753731	393.492537	698.855621	612.571859	0.3734...	27.307197
2	1	2	1	1	1	2	25323.267857	21601.321429	☐	EyC(1y2)11_L19	25054.267857	21279.321429	1387.925373	1246.738806	3246.952326	2568.660667	0.2356...	28.989933
3	1	3	1	1	1	3	507.461039	1852.909091	☑	EyC(1y2)11_L13	270.461039	1542.909091	588.506494	2586.759740	754.451957	4547.356036	-2.512...	18.670714
4	1	4	1	1	1	4	14008.321429	3989.357143	☐	EyC(1y2)11_L7	13736.321429	3763.357143	1116.701493	440.604478	2986.841914	738.297595	1.8679...	25.623513
5	1	5	1	1	1	5	10594.699219	4613.125000	☐	EyC(1y2)11_L1	10400.699219	4405.125000	233.191860	255.354651	175.954085	240.921615	1.2394...	25.449360
6	1	6	1	1	1	6	15810.907643	3021.853503	☐	EyC(1y2)11_H19	15624.907643	2850.853503	209.750000	214.661458	118.732927	225.116340	2.4543...	25.408738
7	1	7	1	1	1	7	16515.805195	29671.519481	☐	EyC(1y2)11_H13	16245.805195	29336.519481	1703.818182	3209.305195	3381.196189	5928.139218	-0.852...	28.828190
8	1	8	1	1	1	8	22487.299363	31044.248408	☐	EyC(1y2)11_H7	22245.299363	30818.248408	395.760417	567.718750	511.211573	920.133950	-0.470...	29.352710
9	1	9	1	1	1	9	20335.824841	28804.691083	☐	EyC(1y2)11_H1	20103.824841	28582.691083	328.140625	431.390625	350.725062	629.330849	-0.507...	29.098037
10	1	10	1	1	1	10	15709.464844	2972.968750	☐	EyC(1y2)11_D19	15466.464844	2793.968750	490.947674	259.831395	816.142505	292.370170	2.4687...	25.364956
11	1	11	1	1	1	11	51510.885350	28809.385350	☐	EyC(1y2)11_D13	51243.885350	28507.385350	2167.296875	1526.046875	5002.528336	2867.697327	0.8460...	30.444140
12	1	12	1	1	1	12	35876.925781	34737.691406	☐	EyC(1y2)11_D7	35538.925781	34359.691406	1574.540698	1693.947674	2142.744904	2223.463226	0.0486...	30.185542
13	1	13	1	1	1	13	29734.778846	16886.716346	☐	EyC(1y2)11_D1	29404.778846	16663.716346	395.542683	308.652439	282.051759	331.581276	0.8193...	28.868186
14	2	1	1	1	2	1	25330.326923	5095.432692	☐	EyC(1y2)11y12_L7	24913.326923	4817.432692	992.243902	391.865854	1097.676957	396.116571	2.3705...	26.838679

Figura 18. Tabla de datos obtenida del procesamiento de los datos con *VersArray Analyzer®*

El programa MIDAS® realiza varios análisis para normalizar como se mencionó en el modelo metodológico en el capítulo 1 de este documento. Se puede navegar por el panel de investigación, el cual permite visualizar los datos antes y después de ser normalizados y arroja varios tipos de gráficas, así como también los resultados en formato PDF. Con los gráficos se puede ver de manera intuitiva los datos de microarreglos analizados. Uno de estos es el gráfico *RI graph (.prc file)*, el cual grafica el $\log_2 I(B)/I(A)$ vs. Log_{10} $(I(A)\mathbf{x}I(B))$, donde *I(A)* es la intensidad del canal A (Cye5) de cada punto del microarreglo y *I(B)* es la intensidad del canal B (Cye3). Otro tipo de gráfico es el histograma de frecuencias *Z-score.* Con estos gráficos se pueden ver en color los puntos correspondientes a los clones del microarreglo antes y después de normalizar y a simple vista notar la diferencia. A continuación, se mostrará este tipo de gráficos para una réplica técnica (un slide) escogida al azar de cada uno de los tiempos analizados en Cassava Unigene Microarray.


log2 I(B)/ I(A)
log10 (I(A) · I(B))
Frecuencias
Z scores
log2 I(B)/ I(A)
log10 (I(A) · I(B))
Frecuencias
Z scores
log2 I(B)/ I(A)
log10 (I(A) · I(B))
Frecuencias
Z scores

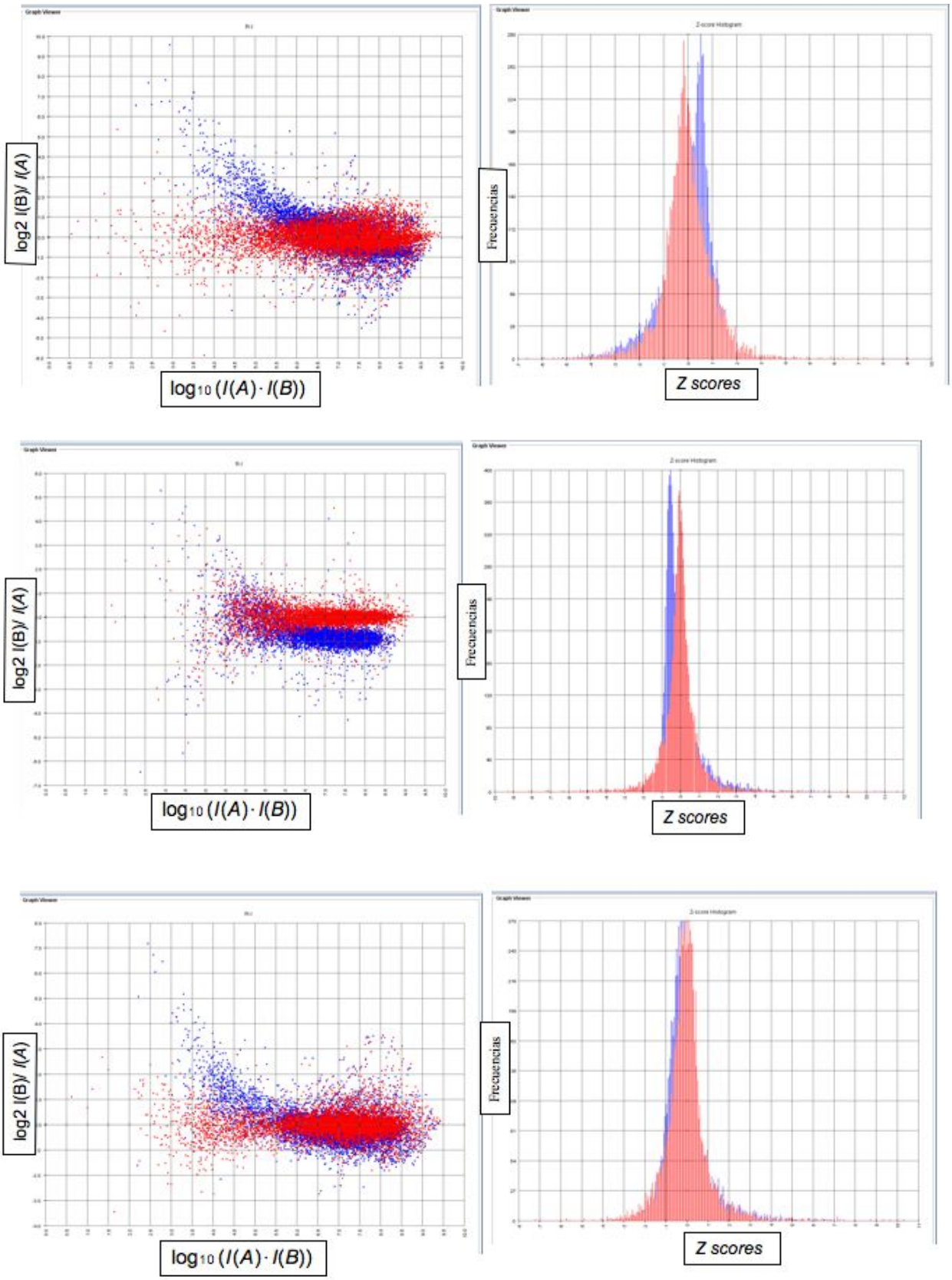

log2 I(B)/ I(A)
log10 (I(A) · I(B))
Frecuencias
Z scores
log2 I(B)/ I(A)
log10 (I(A) · I(B))
Frecuencias
Z scores
log2 I(B)/ I(A)
log10 (I(A) · I(B))
Frecuencias
Z scores

Figura 19. Gráficos *RI* a la derecha e Histograma de frecuencias a la izquierda, de las comparaciones (de arriba hacia abajo) EyESI(1y2), (3y4), (5y6) y EyC(1y2), (3y4), (5y6).

Se observa la distribución de los puntos antes (azul) y después de normalizar (rojo).

3.3.2 Identificación de los genes diferenciales en el Cassava Unigene Microarray

Para comparar con los resultados de SAM, se hizo un análisis t Student (T-test, Welch, 1947; Dudoit et al. 2000) utilizando el software MeV™ (*Multi experiment Viewer version 4.4*), teniendo en cuenta los siguientes parámetros: solo se consideraron genes con una proporción de expresión ≥ 1.5 y ≤ -1.5 y un *P value* < 0.05 (Datos no mostrados). Los valores delta (δ) y las resulltados de SAM para cada tiempo son mostrados en los Anexos (I). Para SAM los criterios de selección que se tuvieron en cuenta son:

-Un umbral de expresión (*Fold-change*) para los genes inducidos ≥1.5 y para los genes reprimidos ≤-1.5

-Una FDR (tasa de descubrimiento de falsos positivos, en inglés *False discovery rates*) < 10%.

Después de esta comparación solo se consideraron como diferenciales los genes que cumplieran con los parámetros dados por los dos análisis.

3.3.3 Genes regulados por *A. socialis* en el Cassava Unigene Microarray

En este estudio cambios en el perfil de transcritos de yuca fueron examinados a través del ciclo de vida de *A. socialis,* estos cambios en los ARNs de los genes de defensa ocurren en las plantas cultivadas en respuesta a adultos y a estadios ninfales. Los resultados obtenidos aquí provienen de las tres réplicas biológicas las cuales tenían seis plantas por tratamiento y cuyos ARNs fueron marcados, unidos e hibridizados en dos réplicas técnicas del Cassava Unigene Microarray (López et al. 2004), como se explicó en el capítulo 1 en el Modelo Metodológico.

El programa SAM identificó 280 genes significativamente regulados en los seis tiempos de colecta y en las dos comparaciones EyESI (Ecu infestado vs. Ecu sin infestar) y EyC (Ecu infestado vs. CMC40 infestado) (Figura 20). De los cuales 204 fueron inducidos y 76 reprimidos.

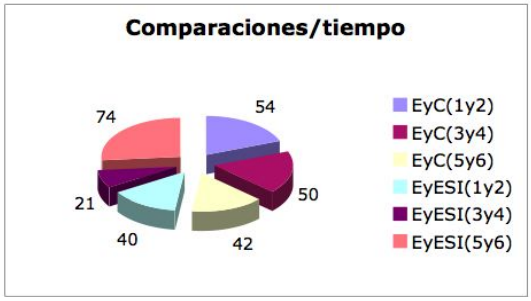


Figura 20. Gráfico de torta donde se clasifica el número de genes regulados en cada comparación y tiempo.

Como se puede observar en la Figura 20, ambas comparaciones utilizadas en este estudio tuvieron aproximadamente el mismo número de genes regulados. Ciento cuarenta y cuatro (144) genes fueron regulados en la comparación EyC (Resistente infestado vs. Susceptible infestado), lo que corresponde al 51,4% del total de genes regulados por *A. socialis*. En la comparación EyESI (Resistente infestado vs. Resistente sin infestar) fueron regulados los restantes 136 genes, correspondientes al 48.6%. Sorprende la proporción de genes inducidos respecto a los reprimidos, la cual es casi de 3:1. Lo que sugiere que *A. socialis* induce tres veces más genes de los que reprime en el perfil de transcripción de la yuca. También es notable la diferencia en el comportamiento de los genes regulados en ambas comparaciones (Figura 21).

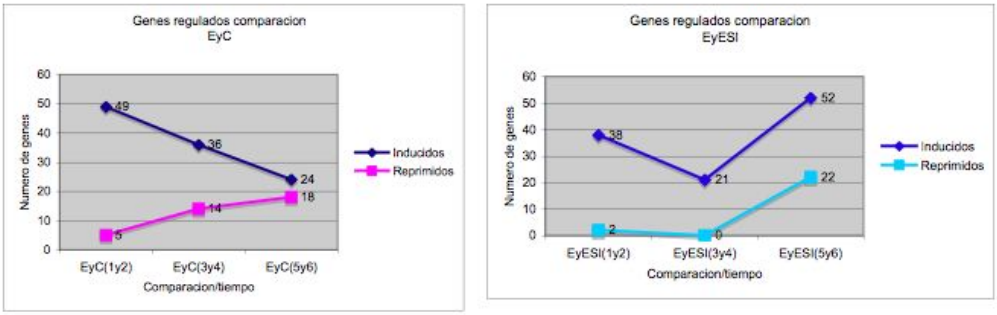


Figura 21. Genes regulados en las dos comparaciones EyC y EyESI a través de los diferentes tiempos en que *A. socialis* se alimenta sobre yuca.

Se observa que en el caso de EyC a medida que pasa el tiempo en que la planta es atacada por *A. socialis*, el número de genes inducidos disminuye y por el contrario los reprimidos aumentan. En el caso de la comparación EyESI en los tiempos tempranos hay una casi ausencia de genes reprimidos y hay una disminución en el número de genes inducidos en el tiempo 3y4 y vuelven a aumentar en el tiempo 5y6. También se encontró que ambas comparaciones tenían genes únicos y compartían algunos, como se observa en el diagrama de Venn, de los 280 genes inducidos, 31 se compartieron entre las dos comparaciones (Figura 22).

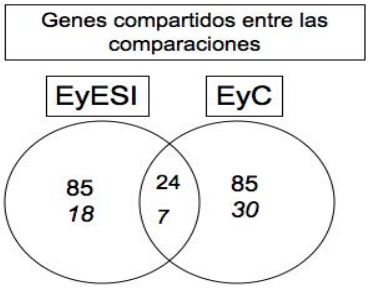


Figura 22. Diagrama de Venn donde se muestran el número total de genes regulados para cada comparación y los genes que fueron regulados en ambas. Los genes reprimidos se muestran en letra itálica.

3.3.3.1 Clasificación de los genes regulados por *A. socialis* en al Cassava Unigene Microarray

La anotación de estas secuencias fue hecha utilizando la herramienta GOMP (Rodriguez et al, unpublished), la cual toma las secuencias de los ESTs del Cassava Unigene Microarray, las compara con secuencias de proteínas conocidas (*The Arabidopsis Information Resource*, TAIR) y las clasifica en términos de Gene Ontology (GO) y KEGG pathways utilizando el algoritmo BLASTX (Figura 23).

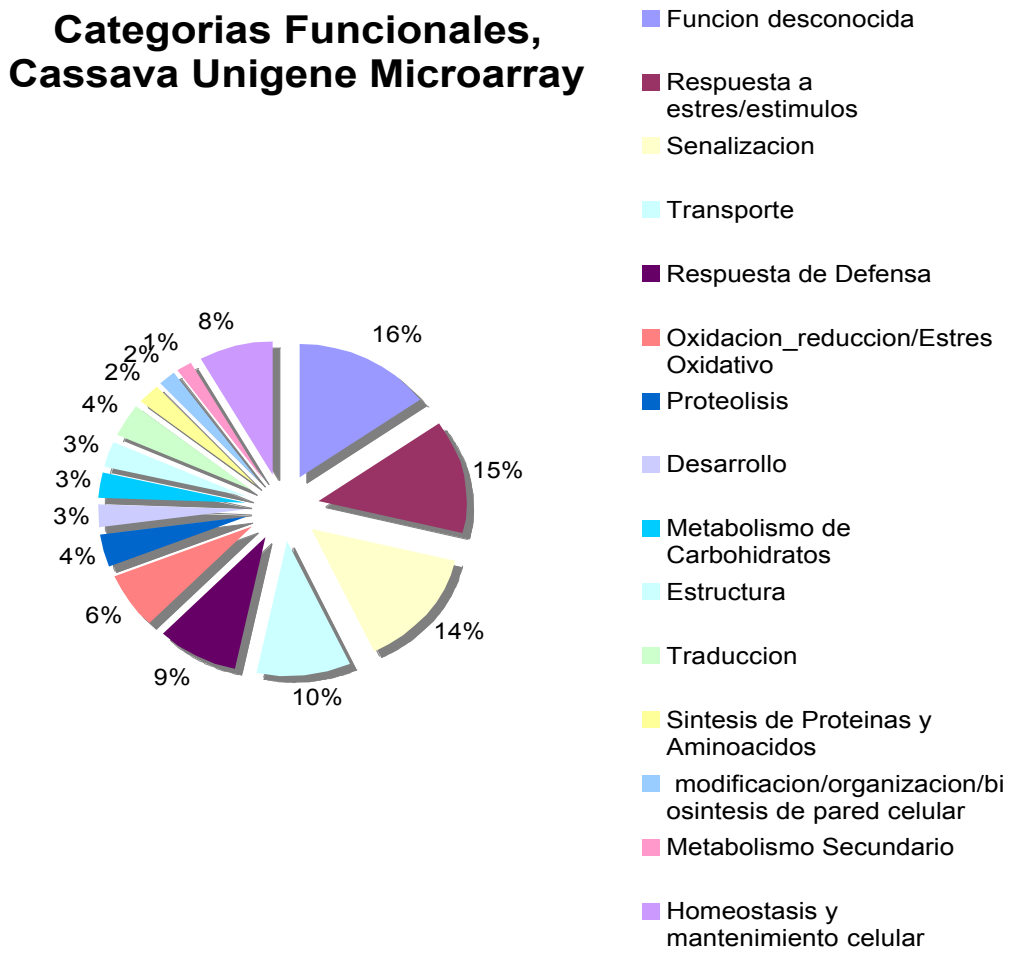


Figura 23. Diagrama de torta en el que se muestran la clasificación de los genes regulados en el Cassava Unigene Microarray, por categorías funcionales inferidas por GO.

Treinta y ocho genes fueron de función desconocida, esto corresponde al 16%; GO los identificó como genes de función desconocida "Unknown function", como proteínas expresadas y en algunos casos las identificó pero se desconoce que proceso biológico tiene. En las siguientes secciones se mostrarán los resultados obtenidos para cada categoría funcional, la Tabla 7 muestra la supuesta función resultado de la anotación hecha en los ESTs que conforman el Cassava Unigene Microarray. Estas proteínas son codificadas por los genes envueltos en defensa, estrés oxidativo, señalización, biosíntesis y modificación de pared celular, metabolismo de carbohidratos y fotosíntesis. Estas respuestas están frecuentemente reguladas en respuestas de defensa a insectos (Kempema et al. 2007; Thompson & Goggin, 2006). También se muestran las categorías funcionales que tienen que ver con metabolismo secundario, transporte, proteólisis, respuesta a estrés y estímulos, biosíntesis de proteínas y aminoácidos, traducción, estructura, una categoría correspondiente a silenciamiento de genes (que se discutirá mas adelante), categorías correspondientes a la homeostasis y mantenimiento celular y los genes con función desconocida.

Tabla 7**:** Listado de genes regulados por *A. socialis* en yuca, clasificados por categorías funcionales diferencialmente expresados en el Cassava Unigene Microarray.

Se observa en cual comparación fue regulado, la función encontrada en TAIR y Genbank, el puntaje y el porcentaje de FDR (tasa de descubrimiento de falsos positivos) o *q-value* dados por SAM. Los genes reprimidos aparecen subrayados. Algunos genes aparecen en mas de una categoría funcional. En la categoría Defensa se muestra cuales genes participan en la biosíntesis, o son inducidos por las vías de SA, JA, ET y ABA.

Proceso Biologico	Comparacion	EST id	Supuesta funcion (TAIR y RefSeq)	*Puntaje*	FDR%
Defensa					
	EyESI, EyC	CK643827	peroxiredoxin type 2, putative [Arabidopsis thaliana]	5	0
	EyESI	CK649737	ATP-dependent Clp protease	4	0
	EyC	CK652485	ATP-dependent Clp protease ClpB protein-related	3.8	0
	EyESI	CK643796	CB5-D (CYTOCHROME B5 ISOFORM D);	2.3	0
JA	EyESI	CK644117	CEV1 (CONSTITUTIVE EXPRESSION OF VSP 1);	3.8	4
JA, ABA	EyESI	CK645183	Myc Transcription factor (Regulation of Defense response to insect)	4.2	5
JA, ET	EyESI, EyC	CK648834	AP2 erf domain-containing transcription factor	4	5
	EyESI	CK644493	ATP-dependent Clp protease	3.2	5
	EyC	CK643217	HSP81-2 (HEAT SHOCK PROTEIN 81-2); ATP binding	3	8
JA	EyC	CK652060	VTC2 (vitamin c defective 2); GDP-D-glucose phosphorylase	2.2	8
	EyESI	CK650618	DCL2 (DICER-LIKE 2); ATP binding / ATP-dependent helicase/ [Arabidopsis thaliana]	3.8	9
	EyESI	CK652623	ATNSI (NUCLEAR SHUTTLE INTERACTING); N-acetyltransferase	1.5	9
JA	EyESI	CK644758	galactolipase/ phospholipase [Arabidopsis thaliana]	3.3	10
	EyC	CK643135	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor, putative [Ricinus communis]	3	10
JA	EyESI	CK645537	ATCNGC4 (CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CATION CHANNEL 4); calmodulin	3	10
ET, JA	EyESI	CK641344	EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE 2); transporter	1.5	10
SA	EyC	CK642553	NLA (nitrogen limitation adaptation); ubiquitin-protein ligase	-6	0
	EyESI	CK651135	AFB2 (AUXIN SIGNALING F-BOX 2); auxin binding / ubiquitin-protein ligase	-3.6	0
	EyESI	CK641429	PSBO1 (PS II OXYGEN-EVOLVING COMPLEX 1); oxygen evolving/ poly(U) binding	-2.5	1.8
	EyESI	CK645640	ERD15 (EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15)[Arabidopsis thaliana]	-1.8	3.6
	EyESI	CK641741	cysteine protease inhibitor, putative / cystatin, putative	-2	7
SA	EyESI	CK652300	WHY3 (WHIRLY 3); DNA binding	-2	8
Estres Oxidativo					
	EyC	CK641770	VPS2.3	5	0
	EyC	CK644215	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	5	0
	EyESI	CK643765	Cytochrome P450, putative [Ricinus communis]	4	0
	EyESI	CK642445	cytochrome P450 like-TBP [Nicotiana tabacum]	4	0
	EyC	CK647962	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	5	3
	EyC	CK645026	NDA1 (ALTERNATIVE NAD(P)H DEHYDROGENASE 1); NADH dehydrogenase	2.4	5
	EyC	CK652338	Peroxiredoxin. PRX like-2	2.4	5
	EyESI	CK643734	CYP714A1 Cytochrome P450	4.4	8
	EyESI	CK643531	NADPH putative Ricinus	3.8	8
	EyESI	CK643412	DEFECTIVE chloroplast and leaves protein-related [Arabidopsis thaliana]	3.3	8
	EyESI	CK650853	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	2	8
	EyESI	CK644331	BR6OX2 (BRASSINOSTEROID-6-OXIDASE 2) monooxygenase/ [Arabidopsis thaliana]	3	10
	EyESI	CK641577	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	1.5	10
	EyESI	CK643520	CYP82C2; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase	1.5	10
	EyESI	CK645498	MT3 (METALLOTHIONEIN 3); copper ion binding	-3	0
	EyESI	CK642468	G6PD6 (GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE 6)	-2	7
	EyC	CK651436	CYP707A1; (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase/ oxygen binding [Arabidopsis thaliana]	-3.8	8
	EyC	CK642477	ALDH2B7; 3-chloroallyl aldehyde dehydrogenase/ aldehyde dehydrogenase (NAD)	-3	10
Biosintesis y modificacion de Pared Celular	EyESI	CK647714	ATPME1; pectinesterase	7	0
	EyESI	CK644117	CEV1 (CONSTITUTIVE EXPRESSION OF VSP 1);	3.8	4
	EyESI	CK641892	COB (COBRA) [Arabidopsis thaliana]	3.4	8
	EyESI	CK644988	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative	1.8	8
	EyESI	CK652711	UGE2 (UDP-D-glucose/UDP-D-galactose 4-epimerase 2) [Arabidopsis thaliana]	3.2	10
	EyESI	CK643857	ATEXPA1 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A4) [Arabidopsis thaliana]	3	10
	EyC	CK645466	chitinase	-2.5	6
Metabolismo Secundario	EyESI	CK644310	CYSC1 (CYSTEINE SYNTHASE C1); L-3-cyanoalanine synthase[Arabidopsis thaliana]	5	0
	EyESI	CK643563	COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1)ubiquitin-protein ligase	3.7	0
	EyESI	CK644988	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative	1.8	8
	EyC	CK645466	chitinase	-2.5	6
Metabolismo de Carbohidratos y Fotosintesis	EyC	CK644123	beta-glucosidase putative [Ricinus communis]	6.8	0
	EyC	CK652045	LGT8 (GLUCOSYL TRANSFERASE FAMILY 8);	3.7	0
	EyC	CK643223	GSA2 (glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase 2);	3	0
	EyESI	CK642919	Galactokinase	2	0
	EyC	CK650590	BGAL3 (beta-galactosidase 3); beta-galactosidase[Arabidopsis thaliana]	2.7	8
	EyESI	CK642650	LPA1 (LOW PSII ACCUMULATION 1); binding [Arabidopsis thaliana]	3.9	9
	EyESI, EyC	CK641470	LHCB2.1; chlorophyll binding	-3.8	0
	EyESI	CK641579	LHCB2.3; chlorophyll binding	-2.8	0
	EyESI	CK641429	PSBO1 (PS II OXYGEN-EVOLVING COMPLEX 1)	-2.5	1.8
	EyESI	CK642795	CAB1 (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1); chlorophyll binding	-4	4
	EyC	CK643315	alpha-galactosidase, putative / melibiase, putative [Arabidopsis thaliana]	-3.7	10

..continuacion Tabla 3

Proceso Biologico	Comparacion	EST id	Supuesta funcion (TAIR y RefSeq)	*Puntaje*	FDR%
Se–ales de					
Transduccion	EyESI, EyC	CK642250	leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana]	7.7	0
	EyESI	CK652819	14-3-3 protein, putative [Ricinus communis]	6	0
	EyESI, EyC	CK644209	endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	4.9	0
	EyESI, EyC	CK642897	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein [Arabidopsis thaliana]	4	0
	EyESI	CK644304	ATARFA1E (ADP-ribosylation factor A1E); GTP binding / phospholipase activator/	4	0
	EyESI, EyC	CK651987	ATRANGAP1 (RAN GTPASE-ACTIVATING PROTEIN 1)	4	0
	EyESI	CK643232	ankyrin repeat	3.4	0
	EyC	CK651492	ATARFA1B (ADP-ribosylation factor A1B); GTP binding / phospholipase activator	2.8	2
	EyESI	CK649589	C2 domain-containing protein	1.8	3.5
	EyC	CK652473	nascent polypeptide associated complex alpha subunit, putative	3	5
	EyC	CK652390	ATP binding protein, putative [Ricinus communis]	3.2	6
	EyC	CK642786	IAA8; transcription factor	3	7
	EyESI	CK646024	ATP binding protein, putative [Ricinus communis]	2.7	7
	EyESI, EyC	CK652118	r2r3-myb transcription factor Ricinus	1.8	7
	EyESI	CK643504	PAP3 (PURPLE ACID PHOSPHATASE 3)	1.8	7
	EyESI	CK652352	TAF4 (TBP-ASSOCIATED FACTOR 4); transcription initiation factor	1.6	7
	EyESI	CK646656	NF-YC11 (NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT C11); transcription factor	1.4	7
	EyC	CK643633	acid phosphatase class B family protein	2.6	8
	EyESI	CK643815	Conserved hypothetical protein (TFIIIB' DNA-binding domain) [Ricinus communis]	3.2	8
	EyESI	CK652354	RF2A Transcription factor (Autophagy protein 16, bZip) Ricinus	2	8
	EyESI	CK652155	Transcription factor putative (C5HC2 zinc finger) Ricinus	2	8
	EyESI	CK643552	Transcriptional corepressor LEUNIG	2	8
	EyESI	CK643516	AHK2 (ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 2); cytokinin receptor	2	8
	EyC	CK647939	MIRO1 (Miro-related GTP-ase 1)GTP binding [Arabidopsis thaliana]	3.7	10
	EyC	CK644733	SIP3 (SOS3-INTERACTING PROTEIN 3) [Arabidopsis thaliana]	3.5	10
	EyC	CK649587	BLH6 (BELL1-LIKE HOMEODOMAIN 6)transcription factor [Arabidopsis thaliana]	2.8	10
	EyC	CK642921	ARF10 (AUXIN RESPONSE FACTOR 10)transcription factor [Arabidopsis thaliana]	2.7	10
	EyESI	CK652271	ATMPK13; MAP kinase/ kinase	1.5	10
	EyC	CK644332	CKI1 (CASEIN KINASE I); kinase/ protein serine/threonine kinase	-4.8	0
	EyESI	CK645499	GRF2 (GENERAL REGULATORY FACTOR 2)	-2.7	0
	EyESI	CK649323	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-3	0
	EyESI	CK641111	DNA binding putative [Ricinus communis]	-2	0
	EyESI, EyC	CK642277	CRK (CDPK-related kinase); ATP binding / calcium ion binding	-2.5	1.8
	EyC	CK647160	Hypothetical protein (AUX/IAA family) [Populus trichocarpa]	-3.4	3
	EyC	CK652307	PPCK2; kinase/ protein serine/threonine kinase	-3	3
	EyC	CK643040	scarecrow transcription factor family protein	-2.3	8
Transporte					
	EyC	CK643768	ARPN (PLANTACYANIN); copper ion binding / electron carrier	6	0
	EyC	CK645033	Chloroplast-targeted COPPER CHAPERONE copper chaperone	5	0
	EyC	CK642331	coatomer protein complex, subunit beta 2 (beta prime), putative [Arabidopsis thaliana]	5	0
	EyC	CK642743	VHS domain-containing protein / GAT domain-containing protein	4	0
	EyC	CK648793	secretory carrier membrane protein (SCAMP) family protein	3.7	0
	EyESI	CK645858	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein / cell division protein-related	3	0
	EyC	CK641770	VPS2.3	4.6	2
	EyESI, EyC	CK649657	transport protein, putative	2.2	4
	EyC	CK641166	transporter, putative [Ricinus communis]	4	5
	EyC	Ck652244	CCT motif	4	6
	EyC	CK641654	OEP7 OUTER ENVELOPE MEMBRANE OF CHLOROPLASTS 33)	5	7
	EyESI, EyC	CK642586	ATFD3 (ferredoxin 3); 2 iron, 2 sulfur cluster binding [Arabidopsis thaliana]	3.6	7
	EyESI, EyC	CK645056	PIP1A (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1A); water channel	3	7
	EyC	CK648047	nucleotide-sugar transmembrane transporter/ [Arabidopsis thaliana]	3.7	9
	EyC	CK641197	nonchlatrin coat protein zeta1-COP [Solanum lycopersicum]	3.7	9
	EyC	CK642519	MATE efflux family protein [Arabidopsis thaliana]	3.4	9
	EyESI	CK642577	Coatomer subunit epsilon-1	1.7	9
	EyC	CK641412	PDLP7 (PLASMODESMATA-LOCATED PROTEIN 7) [Arabidopsis thaliana]	3	10
	EyESI	CK642456	PIN1 (PIN-FORMED 1) transporter [Arabidopsis thaliana]	2.8	10
	EyESI	CK646329	Vesicle-fusing ATPase	1.5	10
	EyC	CK642577	Coatomer subunit epsilon-1	-8	0
	EyC	CK648563	AVP1; ATPase/ hydrogen-translocating pyrophosphatase	-6	0
	EyC	CK642771	transporter, putative [Ricinus communis]	-4	6
	EyC	CK646135	AVP2; ATPase/ hydrogen-translocating pyrophosphatase	-2.5	7
	EyC	CK643416	NIP1;2 (NOD26-LIKE INTRINSIC PROTEIN 1;2)[Arabidopsis thaliana]	-3.8	8

..continuacion Tabla 3

Proceso Biologico	Comparacion	EST id	Supuesta funcion (TAIR y RefSeq)	*Puntaje*	FDR%
Respuesta a estres/estimulos					
Respuesta a estres	EyC	CK649819	ozone-responsive stress-related protein, putative	5	0
Respuesta a sal	EyESI	CK641467	CBS domain-containing protein [Arabidopsis thaliana]	3	0
Resp. a estimulo por brasinoester	EyESI	CK645100	BRH1 (BRASSINOSTEROID-RESPONSIVE RING-H2)	2	4
Respuesta a estimulo por auxina	EyESI	CK646145	auxin-responsive family protein [Arabidopsis thaliana]	3.8	0
Respuesta a estimulo por auxina	EyESI, EyC	CK652145	auxin-responsive family protein [Arabidopsis thaliana]	2.8	7
Respuesta a heridas	EyC	CK651776	wound-responsivefamily protein [Arabidopsis thaliana]	3.8	8
Respuesta a estres	EyESI, EyC	CK649878	DEAD box atp-dependent RNA helicase, putative [Ricinus communis]	3.3	8
Respuesta a estimulo por auxina	EyC	CK643381	HBT (HOBBIT); binding	2.6	8
Respuesta a ion cadmio	EyC	CK653959	glycyl-tRNA synthetase/ glycine--tRNA ligase [Arabidopsis thaliana]	3.5	9
Respuesta a frio	EyESI	CK651019	SKIP4 (SKP1 INTERACTING PARTNER 4)	-2	5
Respuesta a deficiencia de P	EyC	CK643153	SQD1; UDPsulfoquinovose synthase/ sulfotransferase	-4	8
Respuesta a estimulo por ABA	EyC	CK646906	ATDI21 (ARABIDOPSIS THALIANA DROUGHT-INDUCED 21)	-3	10
Proteolisis					
	EyESI, EyC	CK643831	Protein binding protein (Trypsin-like Serine Protease Ricinus	6	0
	EyC	CK652150	PROTEIN PHOSPHATASE 2A SUBUNIT A2	5	0
	EyESI	CK649737	ATP-dependent Clp protease	4	0
	EyC	CK645360	UBP2 (UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 2) [Arabidopsis thaliana]	3.7	0
	EyESI	CK645189	WD-40 repeat family protein	3.4	0
	EyESI, EyC	CK643792	prolyl oligopeptidase family protein [Arabidopsis thaliana]	4.5	5
	EyESI	CK644493	ATP-dependent Clp protease	3.2	5
	EyESI, EyC	CK645194	RHF1A (RING-H2 GROUP F1A); protein binding	2	5
	EyC	CK648698	aspartyl protease family protein [Arabidopsis thaliana]	3	6
	EyC	CK648448	IAAR3 (IAA-ALANINE RESISTANT 3) metallopeptidase	3.4	8
	EyESI	CK646536	UBC10 (UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME 10)	1.7	8
	EyC	CK640893	oligopeptidase A, putative [Ricinus communis]	3.4	9
	EyC	CK646669	F-box protein AFR	2	10
	EyESI	CK648516	scpl20 (serine carboxypeptidase-like 20); serine-type carboxypeptidase	-2.8	0
Traduccion					
	EyC	CK650472	40S ribosomal protein S7 (RPS7B)	4	2
	EyESI	CK646808	APUM5 (Arabidopsis Pumilio 5); RNA binding	2	3.5
	EyESI	CK650002	acidic ribosomal protein P0-related	3	5
	EyESI	CK649579	60S ribosomal protein L7A (RPL7aB)	1.8	7
	EyC	CK644000	Ribosomal protein S12 [Manihot esculenta]	3	8
	EyESI, EyC	CK643794	translation initiation factor 3 (IF-3) family protein [Arabidopsis thaliana]	2.7	8
	EyC	CK645425	RPL18 (RIBOSOMAL PROTEIN L18)	2.7	8
	EyC	CK645426	40S ribosomal S4 protein	2.7	8
	EyESI	CK645535	ribosomal protein S2 [Manihot esculenta]	-2.4	1.8
	EyC	CK646300	PAB8 (POLY(A) BINDING PROTEIN 8) translation initiation factor	-2.4	4
	EyC	CK650776	elongation factor 1B-gamma, putative / eEF-1B gamma, putative	-2.5	6
	EyESI, EyC	CK641421	PAB8 (POLY(A) BINDING PROTEIN 8) translation initiation factor	-1.8	7
Estructura					
	EyC	CK641265	HMGB (HIGH MOBILITY GROUP) transcription factor	5	0
	EyC	CK641112	tubulin beta-chain, putative [Ricinus communis]	5	0
	EyC	CK641354	Beta tubulin	3	0
	EyESI, EyC	CK650643	ADF6 (ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR 6); actin binding	3	0
	EyESI	CK641265	histone h1/h5, putative [Ricinus communis]	1.8	7
	EyC	CK642530	ARPC1A (ACTIN-RELATED PROTEIN C1A) [Arabidopsis thaliana]	4	8
	EyESI	CK643545	Conserved hypothetical protein (Forming Homology 2 Domain)	3.7	8
	EyC	CK649519	HMGB3 (HIGH MOBILITY GROUP B 3) transcription factor	-4	7
Sintesis de Proteinas y Aminoacidos	EyESI, EyC	CK645185	inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase, putative	3.5	0
	EyC	CK645116	AT-IE; phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase	2.6	8
	EyESI	CK646577	glycosyl transferase family 14 protein [Arabidopsis thaliana]	3	10
	EyC	CK648854	AK3 (ASPARTATE KINASE 3); aspartate kinase	-3	3

..continuacion Tabla 3

Proceso Biologico	Comparacion	EST id	Supuesta funcion (TAIR y RefSeq)	*Puntaje*	FDR%
Metabolismo de N					
	EyC	CK642251	Nitrite transporter	3.4	0
	EyESI	CK642844	catalytic/ glutamate-ammonia ligase	1.5	10
	EyC	CK642553	NLA (nitrogen limitation adaptation); ubiquitin-protein ligase	-6	0
Silenciamiento de Genes	EyESI	CK648748	SAS 10, putative [Ricinus communis]	2.4	0
Homeostasis y Mantenimiento celular	EyESI, EyC	CK649243	ORP3C (OSBP(OXYSTEROL BINDING PROTEIN)-RELATED PROTEIN 3C)	5.5	0
	EyESI, EyC	CK645195	long-chain-fatty-acid--CoA ligase family protein (LACS8)	4	0
	EyESI, EyC	CK646958	GDP-fucose protein O-fucosyltransferase	4	0
	EyESI	CK642534	Glucose-6-phosphate isomerase	4	0
	EyESI, EyC	CK643441	CYCD1;1 (CYCLIN D1;1); cyclin-dependent protein kinase regulator	4.6	2
	EyESI	CK643167	unknown protein [Arabidopsis thaliana]	1.8	3.5
	EyC	CK644730	MEE59 (maternal effect embryo arrest 59)	4	6
	EyESI	CK643957	ATRZ-1A; RNA binding / nucleotide binding	1.8	7
	EyC	CK651237	DNA repair ATPase-related [Arabidopsis thaliana]	4	8
	EyC	CK648892	CRL, CRUMPLED LEAF	2.8	8
	EyESI, EyC	CK652753	ATAPRL4 (APR-like 4)	2	8
	EyESI	CK645762	DNA repair ATPase-related [Arabidopsis thaliana]	1.7	8
	EyC	CK649653	NAP1;3 (NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN 1;3); DNA binding	3.8	9
	EyC	CK644977	haloacid dehalogenase-like hydrolase familiy protein [Ricinus communis]	3.6	9
	EyESI, EyC	CK641558	Bystin	-2.8	0
	EyC	CK651004	PRMT3 (PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE 3)	-2.8	4
	EyESI	CK641019	GAPA (GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE A SUBUN	-2.2	5
	EyESI	CK641681	aminomethyltransferase, putative	-2	7
	EyC	CK650916	PCNA2 (PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN 2); DNA binding	-2.4	8
	EyC	CK649981	pin2-interacting protein x1, putative [Ricinus communis]	-4	8
	EyESI	CK642468	G6PD6 (GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE 6)	-1.8	10
Genes de Funcion desconocida	EyC	CK644349	dormancy/auxin associated family protein [Arabidopsis thaliana]	8	0
	EyC	CK652664	EXO (EXORDIUM)	5	0
	EyESI	CK645594	Unknown protein (DUF789)	5	0
	EyESI, EyC	CK643829	Conserved hypothetical protein Ricinus comunis	4.5	0
	EyC	CK650641	smb (small nuclear ribonucleoprotein associated protein b)	4	0
	EyC	CK652611	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein [Arabidopsis thaliana]	4	0
	EyESI	CK652554	Conserved hypothetical protein Ricinus comunis	4	0
	EyESI	CK649605	adenosine diphosphatase, putative [Ricinus communis]	3.7	0
	EyC	CK642383	small rubber protein [Hevea brasiliensis]	3	0
	EyESI	CK644143	Conserved hypothetical protein Ricinus comunis	2	3.5
	EyESI	CK645550	protein N-terminal asparagine amidohydrolase [Arabidopsis thaliana]	2	4
	EyESI	CK641540	Protein-L-isoaspartate	3.5	4
	EyESI	CK650438	RNA binding protein putative [Ricinus communis]	4	5
	EyC	CK650863	DIN3/LTA Dark inducible 3	2.6	5
	EyC	CK652242	Unknown protein [Arabidopsis thaliana]	2.4	5
	EyESI	CK645851	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein [Arabidopsis thaliana]	3	7
	EyESI	CK643963	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein, putative [Ricinus communis]	2.8	7
	EyESI	CK644119	jacalin lectin family protein [Arabidopsis thaliana]	2.7	7
	EyC	CK652486	hypothetical protein [Ricinus communis]	2.4	7
	EyC	CK646247	Conserved hypothetical protein Ricinus comunis	2.3	7
	EyC	CK648446	hypothetical protein [Populus trichocarpa]	2.3	7
	EyESI	CK646334	Conserved hypothetical protein Ricinus comunis	4	8
	EyC	CK648732	Chloroplast lumen common family protein [Arabidopsis thaliana]	3	8
	EyC	CK650555	conserved hypothetical protein (SNARE) [Ricinus communis]	2.8	8
	EyC	CK651253	RNA binding protein (Agenet domain) putative [Ricinus communis]	2	8
	EyESI	CK646576	ATP binding protein (KIP1-like protein) [Ricinus communis]	3	10
	EyESI	CK643560	Conserved hypothetical protein (tic20) [Ricinus comunis]	1.4	10
	EyC	CK650866	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase, putative [Ricinus communis]	-7.6	0
	EyC	CK646308	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	-5	0
	EyESI	CK642374	Arginine serine rich splicing	-4	0
	EyC	CK641962	Transmembrane and coiled-coil domains protein [Ricinus communis]	-4	0
	EyC	CK652494	hypothetical protein [Ricinus communis]	-3.8	0
	EyESI	CK643402	Hydrolase, hydrolysing O-glucosyl compounds [Ricinus communis]	-3.5	0
	EyESI	CK641578	pollen specific protein C13 precursor, putative [Ricinus communis]	-2	7
	EyC	CK645546	pentatricopeptide repeat-containing protein, putative [Ricinus communis]	-4.4	8
	EyC	CK642773	ATP binding protein, putative [Ricinus communis]	-4.4	8
	EyC	CK645620	5'-AMP-activated protein kinase-related [Arabidopsis thaliana]	-3	10

3.3.3.2 Metabolismo de carbohidratos y fotosíntesis

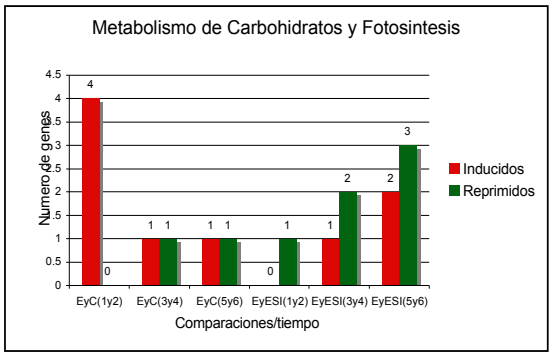


Figura 24. Gráfico de barras donde se muestra la distribución de los genes regulados por *A. socialis* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en metabolismo de carbohidratos y fotosíntesis.

Se observó una represión general de los genes de fotosíntesis en la comparación EyESI donde cinco genes fueron fuertemente reprimidos similar a lo que se ha obtenido en tratamientos con estreses abióticos, bióticos y otras interacciones herbívoro-planta (Figura 24, Tabla 7; De Vos et al. 2005; Kempema et al. 2007). Por el contrario en la comparación EyC solo dos genes fueron reprimidos moderadamente en tiempos tardíos (3y4 y 5y6). Es interesante notar que en esta comparación en el tiempo temprano EyC1y2 los genes involucrados en esta categoría fueron inducidos. La supresión de la fotosíntesis por JA ha sido establecida (Creelman & Mullet 1997), y una correlación inversa entre fotosíntesis y la regulación de genes relacionados con defensa ha sido observada en plantas retadas por infección por hongos, tratamientos con inductores y herbivoría por insectos (Hermsmeier et al. 2001). Esta respuesta presumiblemente permite una redistribución de la energía hacia las respuestas de defensa, con la subsiguiente supresión de funciones menos importantes, durante el ataque de insectos y patógenos.

3.3.3.3 Metabolismo de Nitrógeno

En cuanto al metabolismo de Nitrógeno, solo tres genes fueron regulados, dos inducidos, el que codifica para *Nitrite transporter* y el *catalytic/glutamate ammonia ligase* inducidos en tiempos tardíos EyC5y6 y EyESI5y6 respectivamente (20 días post-infestación Tabla 7). Uno reprimido *NLA (nitrogen limitation adaptation)* tanto en tiempo temprano EyC1y2 (7 días post-infestación) (FDR 0%) como en tardío EyC5y6 (FDR 5%). Esta modesta respuesta a nivel de ARN, sorprende un poco por el hecho que estos insectos se alimentan del floema y una más profunda regulación de estos procesos metabólicos era esperada.

3.3.3.4 Genes de defensa

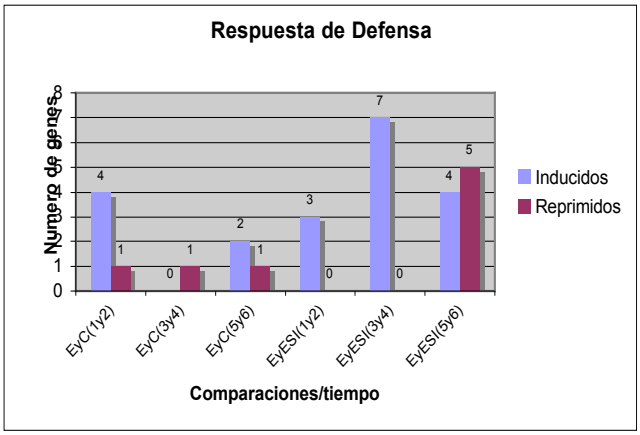


Figura 25. Gráfico de barras donde se muestra la distribución de los genes regulados por *A. socialis* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en respuesta de defensa.

Veintidos genes relacionados con respuesta de defensa en plantas a patógenos (bacterias, hongos, virus) y herbívoros, fueron obtenidos a través de las diferentes comparaciones y tiempos (Figura 25, Tabla 7). Es notable la diferencia entre la inducción ocurrida entre las comparaciones como se puede ver. Se encontraron mas genes regulados en la comparación EyESI (21 genes) que en la EyC (9 genes) lo que sugiere que con microarreglos pudimos detectar mejor la inducción de genes relacionados con defensa por alimentación de los adultos y las ninfas de *A. socialis* que los genes inducidos por el genotipo resistente respecto al suceptible infestados por *A. socialis.* Entre los genes están, el que codifica para la proteína

peroxiredoxin type 2 fuertemente inducido en EyC1y2 y EyESI3y4, el cual a pesar de su implicación en respuesta de defensa, se discutirá en la sección de estrés oxidativo. Se encuentran varias proteasas, como dos *ATP-dependent Clp protease*, fuertemente inducidas (FDR 0 y 5%) en EyESI1y2 y una en EyC5y6. Se identificaron además un *CB5-D (CYTOCHROME B5 ISOFORM D)* en EyESI34 y EyESI5y6 cuyo proceso biológico es clasificado en GO como respuesta de defensa a bacterias. También se identificó el gen que codifica para *Glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor*, inducido en EyC1y2, la cual es una glicosil hidrolasa, clasificada por GO en respuesta de defensa y modificación de pared celular, al igual que el gen que codifica para una *HSP81-2 (HEAT SHOCK PROTEIN 81-2)*, la cual es una chaperona molecular involucrada en resistencia mediada por el gen *RPM1*, en el desarrollo floral y de hojas y respuesta a estreses abióticos como calor, sal y deshidratación. Otro gen implicado en defensa fue el que codifica para la *DCL2 (DICER-LIKE 2),* la cual juega un papel esencial en el silenciamiento de ARN antiviral (Waterhouse & Fusaro 2006). En cuanto a los genes reprimidos en EyESI5y6 (20 y 27 dias post-infestación) se encontran entre otros, el que codifica para *AFB2 (AUXIN SIGNALING F-BOX 2),* componente del complejo *SCF(SKP1-cullin-Fbox)* E3-ubiquitin ligasa la cual media la ubiquitinación y subsecuente degradación de las proteínas por el proteasoma; está implicada en respuesta de defensa a bacterias y señalización mediada por auxinas (Devoto & Turner 2005). El gen que codifica para la *ERD15 (EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15),* la cual es una proteína hidrofílica que pierde residuos de cisteínas y es expresada en respuesta a estrés por sequía, luz y bacterias. El gen que codifica para la *cysteine protease inhibitor*, la cual es una proteína con actividad de inhibidor de proteinasa cisteína y probablemente este envuelta en regulación de procesos endógenos y defensa contra plagas y patógenos. Por último el gen que codifica para *WHY3 (WHIRLY 3),* la cual es un regulador transcripcional implicado en respuesta de defensa. Se puede observar que a este nivel estos genes importantes en la respuesta de defensa aparecen reprimidos.

3.3.3.4.1 Regulación de genes de defensa inducidos por JA, ET y SA

Se ha demostrado que las vías metabólicas de SA, JA y ET tienen un importante papel en respuestas de defensa para estreses bióticos en plantas (Kessler & Baldwin 2002; Rojo et al. 2003). El áfido *Myzus persicae* induce ambas vías en Arabidopsis, aunque los ARNs de los genes de defensa regulados por JA se acumulan en bajos niveles (Moran et al. 2002). La mosca blanca *Bemisia tabaci* induce los genes de defensa regulados por SA y reprime los genes de respuesta a JA en Arabidopsis. En ambos casos se trataba de interacciones planta susceptible-plaga. En nuestro caso la interacción es con una planta resistente, por esta razón es de esperarse que la respuesta varíe respecto a las interacciones mencionadas anteriormente. De hecho se identificaron cuatro genes de defensa inducidos y uno reprimido, regulados por JA, uno inducido, regulado por JA y ácido abscícico (ABA), dos por JA y etileno (ET), y un gen fuertemente reprimido, regulado por SA. En el caso de los genes inducidos regulados por JA, los genes que codifican para *CEV1 (CONSTITUTIVE EXPRESSION OF VSP 1), galactolipase/ phospholipase, ATCNGC4 (CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CATION CHANNEL 4)* y *VTC2 (vitamin c defective 2)*, fueron inducidos en los tiempos EyC5y6, EyESI1y2 y EyESI3y4, tiempos tardíos para la comparación EyC y tempranos para la EyESI. Esto es relevante porque se ha demostrado que *CEV1* funciona en los tempranos pasos de las vías del JA y ET, como reguladores de estas vías (Ellis & Turner 2001), este gen codifica para una celulosa sintasa (*CESA3*) involucrada en la formación de pared celular primaria. También están los regulados por JA y ET, *EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE 2)*, *AP2 erf domain-containing transcription factor* y el gen regulado por JA y ABA *Myc Transcription factor.* El gen que codifica para *EIN2* es el factor central en las vías de señalización reguladas por ET y está envuelto en muchos procesos incluyendo desarrollo, senesencia y defensa en plantas, está además implicado en el cruce entre las vías del JA y ET. El *AP2/ERF (APETALA2 y ethylene responsive element)* son activadores transcripcionales de genes de defensa en plantas (Pré et al. 2008). El *MYC2* es un activador transcripcional de ABA y JA. Estos tres genes fueron regulados en EyC1y2, EyESI3y4 y EyESI5y6. En el caso del *AP2/ERF* y el *MYC2* fueron inducidos fuertemente (FDR 5% para ambos) por la alimentación de las ninfas I y II, el *MYC2* siguió inducido por las ninfas III y IV, pero menos fuerte (FDR 10%) al igual que el *EIN2*. *AP2/ERF* fue inducido moderadamente por adulto y huevos (FDR 8%). Los genes *CEV1, AP2/ERF, MYC2* y *EIN2* son eslabones importantes en la vía del JA/ET que conduce a respuestas de defensa contra patógenos y plagas (Ellis & Turner 2001; Pré et al. 2008; Chini

et al. 2007) y el gen *galactolipase/ phospholipase* está involucrado en la biosíntesis basal de JA porque libera los ácidos grasos precursores del JA a partir de los lípidos de la membrana. En cuanto al gen *ATCNGC4* que codifica para una calmodulina, es inducido por tratamientos con MeJA (metil jasmonato) y ET y produce una repuesta hipersensible (HR) al ataque de patógenos. El gen *NLA (nitrogen limitation adaptation)*, está fuertemente reprimido en EyC1y2 yEyC5y6 (FDR 0 y 5% respectivamente). Este gen está implicado en la acumulación de SA en plantas con limitación de nitrógeno (Yaeno & Iba 2008).

3.3.3.5 Estrés oxidativo

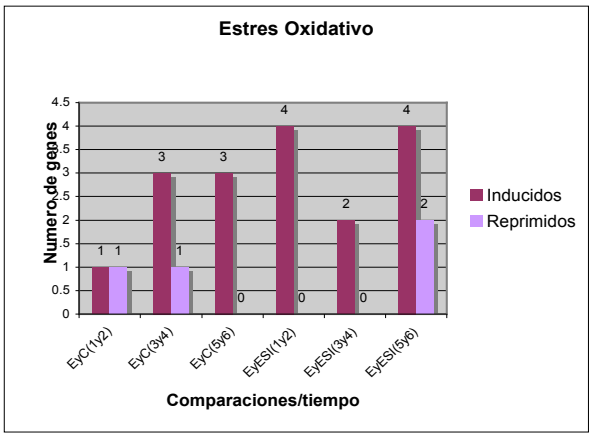


Figura 26. Gráfico de barras donde se muestra la distribución de los genes regulados por *A. socialis* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en estrés oxidativo.

Todos los organismos aeróbicos usan el O_2 como aceptor final en la cadena de transporte de electrones de la respiración, en este proceso el O_2 puede ser reducido para formar especies con oxígeno reactivo, ROS (del inglés, *Reactive Oxygen Species*), tales como el radical superóxido (O -), el 2 peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo (OH). Los principales componentes celulares son susceptibles al daño por radicales libres ya que estos tienen gran efecto sobre proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (Apel & Hirt 2004). ROS juega un papel central en la defensa de las plantas contra patógenos. Durante esta respuesta ROS son producidos por las células de la planta por la vía del realce de las NADPH-oxidasas de la membrana plasmática, peroxidasas de la pared celular y amino-

oxidasas en el apoplasto (Hammond-Kosack & Jones 2000). Bajo estas condiciones, concentraciones superiores a 15 µM de H_2O_2 pueden ser producidas directamente o como resultado de la superóxido dismutasa. En contraste a la acción de la superóxido, el H_2O_2 puede difundirse dentro de las células y activar muchas defensas, incluyendo PCD (*Programmed Cell Death*, muerte celular programada) (Dangl & Jones 2001). Durante la interacción planta-patógeno, la actividad y los niveles de ROS son detoxificados por enzimas como Catalasas, Ascorbato peroxidasas y Glutaredoxinas las cuales son reprimidas por la acción de SA y del óxido nítrico (NO) (Klessig et al. 2000). Debido a que durante la respuesta de defensa la planta simultáneamente produce más ROS mientras disminuye su capacidad de detoxificar, la acumulación de ROS y la activación de PCD ocurren. La represión de los mecanismos de detoxificación de ROS es crucial para que ocurra PCD. La sola producción de ROS en el apoplasto sin la represión de los mecanismos de detoxificación , no resulta en la inducción de PCD. Estudios al respecto han indicado un absoluto requerimiento de la producción coordinada de ROS y la represión de los mecanismos de detoxificación de ROS. La inducción de PCD potencialmente limita la dispersión del patógeno desde el sitio de la infección. Durante las reacciones incompatibles, cuando un patógeno es detectado como un enemigo, las respuestas de defensa son inducidas incluyendo PCD, la producción de H_2O_2 ocurre de una manera bifásica. Una inicial y muy rápida acumulación de H_2O_2 es seguida por una segunda y prolongada explosión de producción de H_2O_2. Durante las interacciones compatibles, cuando un patógeno sobrepasa las líneas de defensa y sistémicamente infecta a la planta hospedera, solo un primer pico de acumulación de H_2O_2 ocurre (Mittler et al.1999). Se conoce que la saliva de los áfidos y de algunos lepidópteros produce enzimas salivares capaces de generar ROS (Miles 1999; Musser et al. 2002), sin embargo no se conoce suficiente sobre la composición de la saliva de las moscas blancas. Estudios han demostrado que ROS juega un importante papel en defensa debido a su actividad anti-microbiana, es importante porque altera la calidad de las proteínas de la dieta del insecto, organización de la pared celular y como señal de defensa (Bi & Felton 1995).

SAM identificó 18 genes significativos para la categoría funcional implicada con ROS y estrés oxidativo (Tabla 7, Figura 26). Catorce genes fueron inducidos y cuatro reprimidos, con FDR que van de cero a 10%. Como puede observarse en esta figura, se incrementaron desde

los tiempos tempranos en la comparación EyESI y en esta comparación no hubo represión sino hasta los tiempos tardíos, donde dos genes fueron reprimidos, esto sugiere que hay una acumulación y detoxificación de ROS durante el ataque de *A. socialis*. Esto sugiere que la alimentación de este insecto podría inducir ROS en yuca y esta acumulación podría estar influyendo en el asentamiento y sobrevivencia de *A. socialis* en la planta.

Entre los genes regulados implicados en ROS encontramos NADPH oxidasas y deshidrogenasas, Citocromos P450 relacionados con los complejos de oxidación-reducción, oxidoreductasas, el gen SDR (*short-chain dehydrogenase/reductase*) y el *peroxiredoxin type 2, putativ*e el cual fue inducido en EyC1y2 y EyESI3y4. Este gen pertenece a la familia de antoxidantes Glutaredoxina, las cuales reducen el peróxido de hidrógeno y muchas están implicadas en defensa contra bacterias. Su alta expresión empieza en tiempos tempranos (1y2 cuando adulto y huevo están alimentándose sobre yuca) en la comparación EyC y en tiempos más tardíos (3y4 cuando ninfas I y II están alimentándose sobre yuca) en la comparación EyESI. En ambas comparaciones se observa una alta producción y respuesta a estrés oxidativo (Figura 26).

3.3.3.6 Señales de transducción

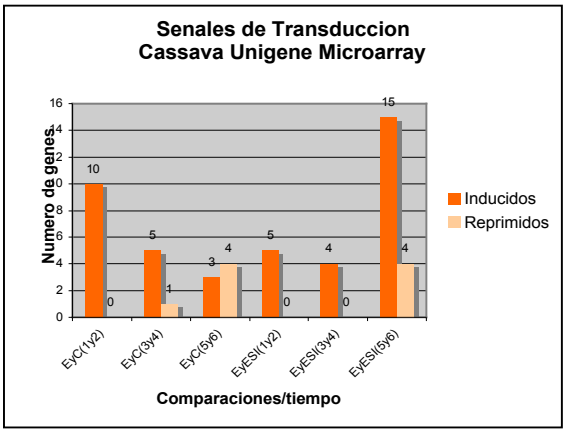


Figura 27. Gráfico de barras donde se muestra la distribución de los genes regulados por *A. socialis* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en señales de transducción.

Los datos de microarreglos indican que un conjunto de genes que codifican potenciales componentes de señales de transducción, incluidas kinasas, fosfatasas, factores de transcripción, receptores kinasas, fue regulado después de la infestación con *A. socialis* (Tabla 7, Figura 27). Treinta y nueve genes fueron regulados y como se observa en la Figura y la Tabla, la mayoría de genes son inducidos. Es importante resaltar el caso del gen que codifica para la *leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana]*. Este gen fue diferencialmente regulado en los tiempos 1y2 y 3y4 de ambas comparaciones, cabe resaltar que fue fuertemente inducido en la comparación EyESI3y4 (FDR 0%). Existen aproximadamente 200 genes de repeticiones ricas en Leucina (*Leu-rich repeat LRR*) en Arabidopsis (Dangl & Jones 2001). Mientras que algunos dominios LRR son importantes en interacciones proteína-proteína, un subconjunto de estos genes funcionan como genes de resistencia en respuesta a patógenos, nemátodos y áfidos (Kaloshian 2004). Hasta el presente muchas de estas proteinas LRR tienen función biológica desconocida.

3.3.3.6.1 Factores de transcripción

El papel de los factores de transcripción (TF) en las respuestas a estrés biótico y abiótico ha sido estudiado desde algunos años con resultados productivos respecto a su identificación en las respuestas de defensa. La inducción de la expresión génica en respuesta a un estrés ocurre inicialmente a nivel de la transcripción, regular los patrones de expresión temporal y espacial de aquellos genes es una de las principales tareas de la planta en la respuesta a un tipo determinado de estrés (Hammond-Kosack & Parker 2003; Libault et al. 2007). Hasta el momento en Arabidopsis se han identificado 2290 TF distribuidos en 64 familias (http://datf.cbi.pku.edu.cn). En la categoría funcional de señales de transducción fueron incluidos varios TF pertenecientes a varias familias, entre ellas MYB, AP2-EREBP, bHLH, NAC, Whirly, AUX-IAA, bZIP, GRF, C3H (Zinc Finger), GRAS, ARF entre otros. Algunos de estos TF están implicados en defensa como es el caso de *AP2/ERF*, *MYC2* (un bHLH) y *Whirly.* Es interesante notar que la alimentación de *A. socialis* no reguló algunos de los TF implicados en resistencia mediada por *genes R* como el *AtWRKY70* que regula las vías de

señalización activadas por SA y reprime las del JA (Li et al. 2006), y otros *WRKY* implicados en resistencia contra insectos, tanto masticadores como chupadores (Skibbe et al. 2008; Wang et al. 2007). Sin embargo, los TF regulados por *A. socialis* también fueron regulados por el áfido *Acyrthosiphon kondoi* en alfalfa (*Medicago truncatula*) (Gao et al. 2010).

3.3.3.6.2 Flujo de iones calcio (Ca^{2+}) y proteínas kinasas Mitogen-activated (MAPK)

Relativamente poco es lo que se conoce acerca de las vías de transducción de señales que conectan los inductores específicos de los insectos a las repuestas de las plantas que ellos provocan. El ión calcio (Ca^{2+}) ha sido implicado como un segundo mensajero en muchas vías de señalización en plantas, incluyendo respuestas a la herbivoría (Maffei et al. 2007). Bajo condiciones normales, el contenido de Ca^{2+} citosólico es varios órdenes de magnitud más bajo que en el fluido apoplástico y en las organelas. Incrementos en los niveles de Ca^{2+} citosólico activan la calmodulina y otras proteínas sensibles al calcio que seguidamente promueven eventos de señalización corriente abajo, incluyendo fosforilación de proteínas y respuestas transcripcionales. Existen evidencias de su implicación en la modulación de la respuesta a la herbivoría en trabajos con ácaros y áfidos (Arimura et al. 2000; Levy et al. 2005). En este estudio se identificó el gen que codifica para *CRK (CDPK-related kinase calmodulin-like protein domain kinase),* el cual es reprimido en tiempos tardíos (EyC5y6 y EyESI5y6). Los *R genes* mediando resistencia a patógenos y a otras respuestas de estreses ambientales en las plantas envuelven cascadas de señalización llamadas *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (Hamel et al. 2006). Aunque hasta el momento no ha sido identificada una vía MAPK completa que lleve a resistencia a insectos, existe evidencia que tales vías juegan un papel en algunas interacciones planta-insecto. Trabajos hechos con los insectos *Manduca sexta* y *Nilaparvata lugens* en *Nicotiana attenuata* y arroz así lo demuestran, en los cuales las MAPK son inducidas tanto por alimentación por estos insectos como por las hormonas JA y SA *(*Wu et al. 2007; You et al. 2007). En este estudio se identificó el gen que codifica para *ATMPK13; MAP kinase/ kinase,* el cual es reprimido en tiempo tardío de EyESI5y6 (Tabla 7).

3.3.3.7 Biosíntesis y modificación de pared celular

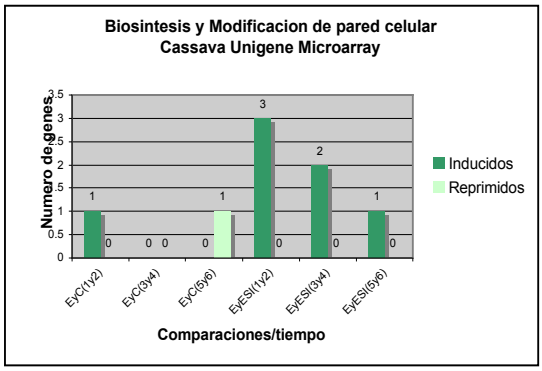


Figura 28. Gráfico de barras donde se muestra la distribución de los genes regulados por *A. socialis* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en biosíntesis y modificación de pared celular.

La pared celular provee una importante barrera para patógenos y plagas. Los estreses bióticos inducen genes para reforzar estas barreras de defensa constitutiva por alteración en la composición de pectina y modificación de las proteínas y constituyentes químicos de la pared celular. Después de la alimentación por *A. socialis*, fueron regulados algunos genes que codifican proteínas que modifican la pared celular. Seis genes fueron inducidos y un solo gen fue reprimido. Esto no se observó de manera fuerte en la comparación EyC, donde un gen fue débilmente inducido, el gen que codifica para *Glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor*, en el tiempo 1y2. El gen reprimido, el cual codifica para una *chitinase* fue en esta comparación en el tiempo 5y6. Por el contrario en la comparación EyESI se observaron varios genes implicados en esta función. En EyESI1y2 se inducieron los genes *CEV1* (mencionado en Defensa), el cual como se mencionó arriba codifica para una celulosa sintasa; un gen α-Expansina, el cual codifica para *ATEXPA1 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A4)*. Estas α-Expansinas tienen un papel establecido en la rápida extensión o relajación por estrés de la pared celular de la planta, asi como importantes funciones en desarrollo (Cosgrove 2000). Sumado a esto se identificó un gen que influencia la integridad y modificación de la pectina, este es el *ATPME1* el cual codifica para una pectinesterasa, la cual puede estar envuelta en la inhibición de patógenos. Está fuertemente inducida en el tiempo EyESI3y4

(FDR 0%). En este tiempo también fueron inducidos otros dos genes, uno implicado en la biogénesis de la pared celular, el *UGE2*, que codifica para una epimerasa y el otro *COB (COBRA),* el cual está involucrado en la organización de las microfibrillas de celulosa y en la determinación de la expansión celular. En el tiempo EyESI5y6 fue inducido el gen que codifica para la *caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase* la cual es una enzima clave de la vía de los Fenil propanoides, en la cual es importante en la biosíntesis de coumarinas y lignina. Está involucrada en el reforzamiento de la pared celular de las plantas y en la respuesta a daño mecánico y patógenos, incrementando la formación de polímeros de ácido ferúlico en la pared celular (Ye et al. 2001).

3.3.3.8 Metabolismo secundario

Investigaciones hechas con numerosas especies de plantas han revelado una gran variedad de pequeñas moléculas con efectos tóxicos o anti-alimentarios a los insectos herbívoros. Una clase de metabolitos secundarios de plantas bien estudiados con propiedades defensivas incluye a los glucósidos cianogénicos. En una herida, los tejidos de yuca emiten el ácido cianhídrico (HCN), proceso llamado cianogénesis que resulta particularmente de la acción de la enzima endógena (ß-glucosidasa), linamarasa (Conn 1980). La cianogénesis al permitir la liberación de una molécula tóxica constituye un sistema de protección de la yuca contra las plagas; sin embargo, tal protección no ha sido claramente demostrada (Hruska 1988). En las raíces, la cianogénesis constituye una defensa de la yuca contra la chinche de la viruela *Cyrtomenus bergi* (Castaño et al. 1985; Bellotti & Riis 1994). En este estudio SAM encontró (Tabla 3) cuatro genes significativamente regulados que codifican para proteínas involucradas en metabolismo secundario, entre estos se identificó el gen que codifica para *CYSC1 (CYSTEINE SYNTHASE C1),* fuertemente regulado en EyESI3y4, la cual está involucrada en el proceso metabólico del cianuro y en detoxificación de compuestos de nitrógeno (Hatzfeld et al. 2000). En la comparación EyESI también fue regulado el gen que codifica para *COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1),* una ubiquitina ligasa, esta enzima está involucrada en la represión del proceso de fotomorfogénesis y en el proceso metabólico de las antocianinas (Vandenbussche et al. 2007). En la comparación EyC solo un

gen fue regulado que codifica una *chitinase* la cual fue reprimida en el tiempo 5y6 (Tabla 7). Este gen tiene un dominio conservado que codifica para un hidrolasa glucósida familia 19 dominio quitinasa, fue clasificado tanto en la categoría de Modificación de pared celular como en Metabolismo secundario, ya que su función biológica tiene que ver con catabolismo de macromoléculas de pared celular y tiene un importante papel en la biosíntesis de lignina, hecho que en estudios recientes ha sido demostrado (Hossain et al. 2010). Estos autores encontraron que mutaciones en el gen que codifica las quitinasas, ocasiona la acumulación de lignina en hipocotilos en Arabidopsis.

3.3.3.9 Proteólisis

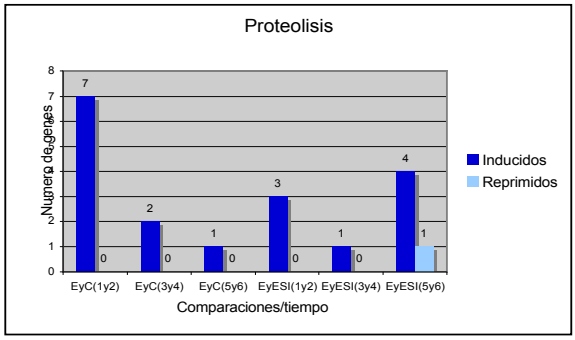


Figura 29. Gráfico de barras donde se muestra la distribución de los genes regulados por *A. socialis* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en proteólisis.

La degradación selectiva de proteínas es un mecanismo empleado para activar una variedad de señales de transducción en plantas superiores (Callis &Vierstra 2000). Esta degradación de proteínas intracelulares se realiza a través del complejo de ubiquitinas presentes en los eucariotas. Las ubiquitinas se unen covalente y específicamente a las proteínas que van a ser destinadas a la degradación a través de una vía dependiente de ATP. Se ha demostrado que el Proteasoma está envuelto en respuestas de defensa en algunas especies de plantas (Ellis et al. 2002; Sun & Callis 1997). El trabajo realizado por Karrer et al. (1998) demuestra que el sistema de ubiquitinas participa en el desarrollo de HR en tabaco. En el presente estudio, se encontró una fuerte inducción de estos genes en tiempos tempranos y

una inducción moderada en los demás tiempos (Tabla 7). Se obtuvieron 13 genes inducidos y un gen reprimido, este último en EyESI5y6 (Figura 29). Entre los genes se encuentran proteasas ubiquitin específicas, aspartyl proteasas, serina proteasas y metallopeptidasas. La función biológica de las Serinas proteasas ha sido descrita para algunas Subtilasas, carboxipeptidasas y peptidasas tipo DegPs y ClpPs.

3.3.3.10 Traducción y síntesis de proteínas y aminoácidos

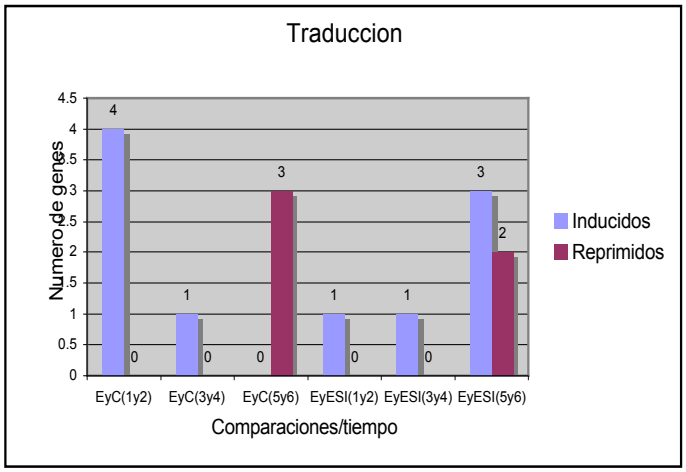


Figura 30. Gráfico de barras donde se muestra la distribución de los genes regulados por *A. socialis* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en traducción.

Una de las maneras de eliminar las células infectadas e impedir la dispersión del patógeno consiste en inducir apoptosis. Esta muerte celular programada está determinada en parte por la presencia de ROS (Mittler et al. 1998). La inhibición de la síntesis proteica es un componente crítico para la inducción de la apoptosis. Para esta categoría funcional 10 genes fueron inducidos y dos reprimidos (Figura 30, Tabla 7).

3.3.3.11 Respuestas a diferentes clases de estrés y estímulos

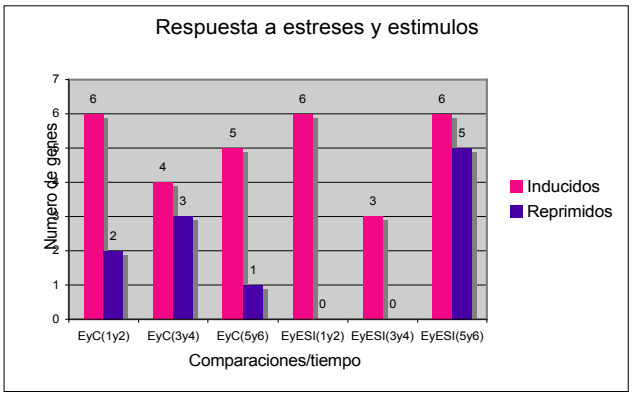


Figura 31. Gráfico de barras donde se muestra la distribución de los genes regulados por *A. socialis* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en respuesta a estreses y estímulos.

En esta categoría se agruparon todos los genes que responden a estímulos por hormonas, estreses bióticos y abióticos. Se agruparon 43 genes, de los cuales 32 fueron inducidos y 11 reprimidos. Se puede observar que las comparaciones a través de los diferentes tiempos presentaron un comportamiento similar, alta regulación en los tiempos tempranos, disminuye cuando las ninfas empiezan a alimentarse y vuelve a aumentar en los tiempos tardíos (Figura 31). La infestación con *A. socialis* regula genes de respuesta a estreses abióticos y respuestas a estímulos por hormonas como JA, SA, ABA, auxinas y brasinoesteroides. Algunos genes fueron clasificados por GO con función biológica "respuesta a estrés" en general. Se observó también que los genes de respuesta a JA fueron inducidos, y un gen de respuesta a SA fue reprimido (estos genes fueron mencionados en la sección de defensa, ya que también fueron clasificados en esa categoría por GO).

Los Brasinosteroides (BRs) son compuestos poli-hidroxilados derivados del esterol que están presentes en todas las plantas y se encuentran ampliamente involucrados en la regulación de numerosos genes que controlan los procesos de crecimiento y desarrollo así como también están involucrados en la respuesta a estrés biótico y abiótico, incluyendo estrés por salinidad, temperaturas extremas y ataque de patógenos (Clouse & Sasse 1998). Se ha demostrado con evidencia experimental el importante papel de los BRs en el desarrollo de

resistencia a enfermedades en plantas (Nakashita et al. 2003). Plantas silvestres de tabaco fueron tratadas con un Brasinólido (un tipo de BRs) y mostraron alta resistencia a TMV, al patógeno bacteriano P*seudomonas syringae* pv. tabaci y al hongo *Oidium* sp. también demostraron que el desarrollo de la resistencia por BRs no requiere biosíntesis de SA y es independiente SAR y de la resistencia inducida por heridas. También comprobaron la resistencia inducida por BRs contra *Magnaporthe grisea* y *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae en arroz. *A. socialis* indujo el gen *BRH1* en la comparación EyESI, este gen responde a estímulo por brassinoesteroides y a quitina (Molnár et al. 2002).

3.3.3.11.1 Respuestas a estreses abióticos

La infestación con *A. socialis* regula genes de respuesta estreses abióticos como sequía, sal, temperatura, ion cadmio, deficiencia a fósforo. Esto implica que ABA y genes regulados por ABA juegan un papel en la respuesta de la yuca al ataque de *A. socialis*. Se conoce que ABA no tiene una función directa en señales de transducción de heridas, pero puede ayudar a mantener las condiciones fisiológicas saludables cercanas al sitio donde ocurre el daño (Birkenmeier & Ryan, 1998). Existe evidencia que la alimentación por áfidos (otro floemófago) disminuye el potencial de agua de la hoja (Cabrera et al. 1994; Zhu-Salzman et al. 2004), esa deshidratación resulta de la alimentación del floemófago y puede estar llevando a forzar la inducción de estos genes de respuesta a sequía. Un estudio hecho con microarreglos mostró que muchos genes inducidos por heridas, fueron también inducidos por sequía en Arabidopsis lo que apoya la hipótesis del papel de ABA inducido por daño es una respuesta a estrés por sequía (Raymond et al. 2000). Es interesante el caso del gen que codifica para la *CYP707A1* es una enzima ácido abscícico 8'-hidroxilasa, envuelta en catabolismo de ABA, esta enzima juega un papel importante en determinar los niveles de ABA en la planta. Su sobreexpresión lleva a una disminución en los niveles de ABA. Este gen está reprimido en el EyC3y4, cuando las ninfas empiezan a alimentarse, lo que significa que en este momento para esta comparación hay inducción de ABA, muy seguramente para contrarrestar la pérdida de agua por parte de la planta al ser sometida a la alimentación de este floemófago chupador. Las auxinas están involucradas en muchos aspectos del desarrollo y

crecimiento de las plantas, *A. socialis* regula la expresión de genes envueltos en la vía de estas hormonas.

3.3.3.12 Transporte y tráfico de proteínas

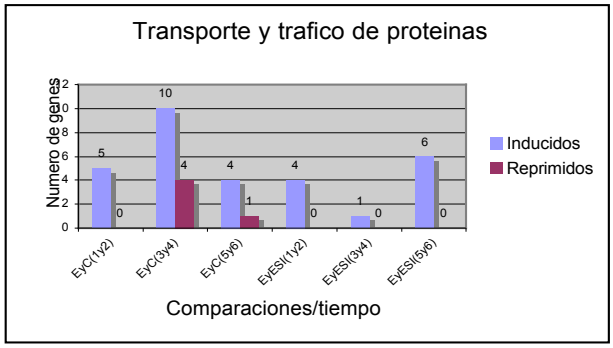


Figura 32. Gráfico de barras donde se muestra la distribución de los genes regulados por *A. socialis* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en transporte y tráfico de proteínas.

Durante las respuestas de defensa a patógenos y plagas las plantas activan el tráfico de proteínas relacionadas con patogenicidad y fortalecimiento de la pared celular entre otras. Estas proteínas son sintetizadas en el Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) y dirigidas vía tráfico vesicular a compartimentos específicos intra celulares o a la matriz extracelular (Jellito-Van Dooren et al. 1999). Está demostrado que cuando la planta es sometida a estrés o atacada por un patógeno se acumulan una serie de proteínas residentes en RER con el fin de asistir el plegamiento, ensamblaje y formación de puentes disulfuro en las proteínas recién sintetizadas (Cunnea et al. 2003; Kurisu et al. 2003). Entre estas proteínas se encuentran las chaperonas y las proteínas residentes en RER las cuales están relacionadas con el apropiado plegamiento proteico y su transporte a través de RER. *A. socialis* reguló 30 genes relacionados con transporte, de los cuales 25 fueron inducidos y 5 reprimidos (Figura 32, Tabla 7). Este diverso conjunto de genes relacionados con transporte, uno de ellos el *DnaJ,* sugiere una posible participación durante la síntesis de proteínas que responden al ataque de *A. socialis* con el fin de hacer más eficiente la respuesta de defensa de la yuca en contra de

este insecto. Como ya se ha visto, durante la interacción yuca-*A. socialis* son sintetizados un diverso tipo de proteínas, entre ellas de unión a calcio, de reforzamiento de la pared, de degradación proteica etc., todo esto muestra que durante el ataque por *A. socialis* la síntesis, procesamiento y transporte de proteínas se aumenta rápidamente, de allí la necesidad de tener controladores de estos procesos como las proteínas obtenidas en este estudio.

Otras secuencias relacionadas con el transporte de proteínas, aunque no existe literatura que las involucre en las respuestas de defensa su presencia en la sustracción sugieren una posible participación en defensa y resistencia. Una de ellas es la *Vesicle-fusing ATPase* inducida en el EyESI5y6, su papel en la formación de vesículas ha sido demostrado (Jin et al. 2001). Otro gen inducido fue el que codifica para la proteína *COP1* y otras que hacen parte del complejo coatómero, que están involucradas en el transporte vesicular de proteínas hacia la membrana celular (Harter et al. 1996). La *VHS domain-containing protein* involucrada en transporte mediado por vesículas intra aparato de Golgi, etc. Es interesante el caso del gen que codifica para *ARPN (PLANTACYANIN),* una proteína de unión al ion cobre, envuelta en desarrollo de anteras, la cual fue fuertemente inducida en el tiempo EyC5y6, y que aparentemente no tendría relación con la respuesta de defensa a *A. socialis*, sin embargo se encuentra en el grupo de proteínas relacionadas con ROS/redox que hacen parte del floema y que potencialmente pueden estar envueltas en reacciones de defensa (Kehr 2006). No obstante, es necesario realizar experimentos adicionales para confirmar su participación en las respuestas de defensa de la yuca.

3.3.3.13 Genes regulados implicados en metabolismo celular, glicólisis, desarrollo, estructura

Un gran número de cambios metabólicos están asociados con las respuesta de defensa, y muchos de ellos no han sido aún caracterizados (Laxalt et al. 1996). Por ejemplo, se ha observado la expresión de genes relacionados con la glucólisis en las respuesta a estrés abiótico (Yang et al. 1993). También se han demostrado cambios en la expresión de estos

genes cuando la planta es infectada y su relación con el aumento en la tasa de respiración (Laxalt et al. 1996). Una de las enzimas cuya expresión es modificada durante los procesos de infección es la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*). Estudios han mostrado que *GAPDH* se acumula durante la infección por *Phytophthora infestans* en papa. En este trabajo atribuyen dos posibles explicaciones a la acumulación de *GAPDH* durante la infección teniendo en cuenta que la acumulación de ROS (característica de las primeras etapas de infección) inhibe la actividad de *GAPDH*: (1) puesto que la acumulación de ROS inactiva a *GAPDH*, es necesario incrementar su tasa de transcripción con el fin de mantener los niveles de la glicólisis y (2) la inducción de *GAPDH* se hace con el objetivo de aumentar la respiración en las células infectadas. Aparentemente este aumento en el metabolismo se presenta con el fin de aumentar la capacidad energética y biosintética para responder efectivamente al ataque del patógeno y poder sobrevivir cuando este termina. Scheideler, et al. (2002) reportaron la expresión de *GAPDH* 10 min. y 24 horas después de la inoculación con una cepa avirulenta de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst)* en *Arabidopsis thaliana*. En este trabajo se concluyó que existe un cambio en la expresión de los genes constitutivos en respuesta al ataque del patógeno. *A. socialis* reguló varios genes implicados en metabolismo de la glucosa y glicólisis (Tabla 7), la presencia de estos genes sugiere un posible papel en el aumento y mantenimiento de la glicólisis durante la interacción yuca-*A. socialis.*

3.3.3.14 Silenciamiento de genes

Utilizando la herramienta GOMP, el EST (CK648748) no arrojó hit significativo con la base de datos de Arabidopsis, entonces se hizo la búsqueda utilizando BLASTX, y el mejor hit (puntaje 109, valor e 1e-22) fue contra gen que codifica para *SAS 10 (something about silencing protein sas 10, putative [Ricinus communis]),* el cual es esencial en el silenciamiento de genes, contiene elementos que hacen parte del complejo U3 ribonucleoproteínas.

4 DISCUSIÓN GENERAL

Tomando como base la evidencia biológica de la resistencia del genotipo MEcu 72 a mosca blanca *A. socialis* probada en trabajos anteriores y los resultados obtenidos en el presente trabajo, trataremos de explicar la resistencia en la yuca. El modelo presentado en este trabajo es hipotético y trata de explicar la cascada de eventos que ocurren cuando es atacada por la plaga mosca blanca.

4.1 Evidencia biológica de la resistencia de MEcu 72 a *A. socialis*

Arias (1995) y Gómez (2004), reportan una alta mortalidad de las ninfas cuando estas se alimentan sobre el genotipo MEcu 72. Esta mortalidad se manifiesta casi inmediatamente emerge la ninfa I y va aumentando con los días (Figuras 33 y 34).

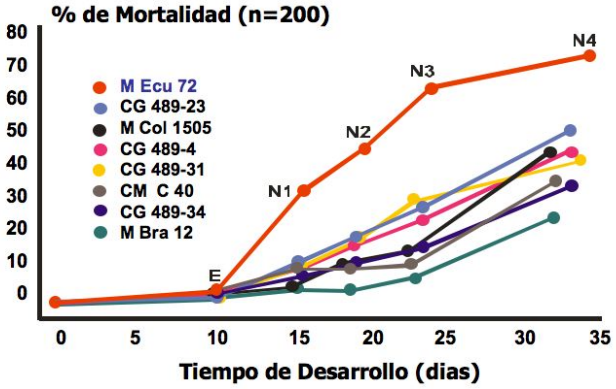


Figura 33. Porcentaje de mortalidad de ninfas y tiempo de desarrollo de *A. socialis* sobre diferentes genotipos de yuca, entre estos MEcu 72 y CMC 40. E (Egg, huevo), N1, N2, N3 y N4 los estadíos ninfales. (Tomado de Bellotti & Arias, 2001).

Sumado a esto, Gómez (2004) encontró que el mayor porcentaje de mortalidad en ninfa I se debió a lo que el describe como "muerte por levantamiento *in situ*". Esto debido, talvez, a

la incapacidad de la ninfa I de encontrar un sitio donde asentarse y alimentarse; posiblemente por la alta densidad de tricomas que posee el genotipo MEcu 72. Esta alta densidad de tricomas posiblemente le impide a la ninfa I (único estadío ninfal móvil) "acomodarse" adecuadamente para introducir su estilete en la hoja e iniciar su prolongada alimentación (Bellotti & Arias, 2001; Arias, 1995). A pesar de esta limitación, un gran porcentaje de las ninfas I logran asentarse. El mismo autor también reporta que el porcentaje de ninfas muertas "adheridas y momificadas" se incrementa a medida que los instares ninfales avanzaban, siendo por ende, menor en ninfa I y mayor en ninfa IV (NI 3.8%, NII 75%, NIII 28%, NIV 73.3%) (Figura 34). Estos autores, entonces, concluyen que la mortalidad de los instares ninfales, además del alargamiento del ciclo de vida del insecto, observado también en estos estudios, son manifestaciones de una clara antibiosis, y concluyen que sería de gran importancia caracterizar los factores responsables esta mortalidad; sobretodo la que se observa como "adheridas y momificadas" en la figura 34.

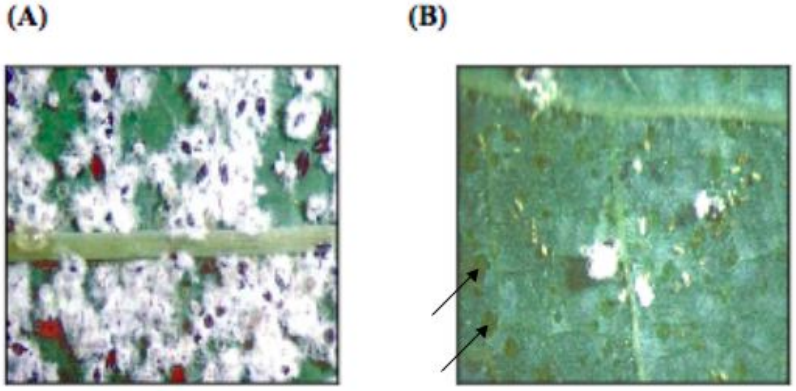


Figura 34. Detalle de las hojas infestadas donde se muestran las diferencias en la población de ninfas de instar III de *A. socialis* sobre genotipos de yuca, (A) CMC 40 y (B) MEcu 72.

Las flechas indican las ninfas muertas "adheridas y momificadas", de estadíos anteriores (Tomado de Gómez, 2004).

Retomando la discusión de los resultados del presente trabajo, surgen las preguntas: ¿Qué puede estar ocasionando esa alta mortalidad en las ninfas? ¿Qué es lo que hace antibiótica a

MEcu 72? En esta discusión trataremos de aproximarnos a contestar esta pregunta biológica. Con este fin se analizarán las dos comparaciones estudiadas y los resultados obtenidos.

4.2 Regulación de genes durante la interacción yuca- *Aleurotrachelus socialis*

La complejidad de las interacciones planta-insecto hace difícil determinar qué características anatómicas, fisiológicas o metabólicas limitan la infestación de la yuca por moscas blancas y floemófagos en general. El campo de la genómica provee herramientas poderosas para identificar estos factores involucrados en la respuesta inmunológica de la planta, facilitando el análisis funcional de genes implicados tanto en resistencia como en susceptibilidad. Así como las cascadas de señalización y las vías metabólicas son elucidadas en las plantas modelo y en especies cultivadas, genes regulatorios claves son el blanco para estudios del papel de estas vías en las interacciones planta-insecto utilizando silenciamiento y sobreexpresión. Las técnicas que analizan los perfiles de transcritos permiten un examen simultáneo de miles de genes y pueden ser utilizadas para estudios de cambios en expresión génica que son transcripcionalmente regulados. El análisis de microarreglos está entre una de las más comunes herramientas de análisis de transcritos. Sin embargo, otras técnicas tales como la hibridización sustractiva (SSH) es también muy útil para identificar y caracterizar previamente transcritos desconocidos que son diferencialmente regulados entre grupos de tratamientos. Estos dos enfoques fueron utilizados en este estudio para identificar los cambios en el perfil de transcripción de la yuca cuando es atacada por *A. socialis*.

Los insectos floemófagos son las mayores plagas que afectan la agricultura y horticultura en el mundo. Sin embargo, aún existe un conocimiento limitado particularmente a nivel molecular acerca de cómo las plantas responden al ataque de estos insectos (Macedo et al. 2003; Girousse et al. 2005). El conocimiento que se tiene hasta ahora está basado principalmente en estudios con diferentes especies de áfidos en interacciones con Arabidopsis, *Nicotiana attenuata*, sorgo y tomate (Kaloshian & Walling 2005; Thompson & Goggin 2006). Muy pocos estudios han examinado interacciones con otros hemípteros a nivel

molecular, como el caso de Arabidopsis-*Bemisia tabaci* (Kempema et al. 2007; Zarate et al. 2007). En este estudio presentamos un análisis a nivel de transcriptoma, en el cual estudiamos la expresión y respuesta de defensa de la yuca al ataque de otro floemófago: la mosca blanca *Aleurotrachelus socialis*.

En este estudio se identificaron 405 secuencias asociadas al ataque en todos los estadíos del desarrollo de *A. socialis*. De las 405 secuencias obtenidas, 280 se mostraron diferencialmente significativas en el Cassava Unigene Microarray y 125 correspondieron a secuencias únicas obtenidas a partir de las librerías sustractivas desarrolladas en este estudio. Algunos de estos genes tienen funciones biológicas que son típicamente reguladas en respuesta a estreses bióticos tales como defensa, pared celular, estrés oxidativo, proteólisis, metabolismo secundario y metabolismo de carbohidratos y fotosíntesis. Tanto en el análisis de microarreglos como en las librerías sustractivas se encontraron diferencias importantes en el número y clase de secuencias obtenidas en las dos comparaciones analizadas, la EyESI y la EyC, presentándose resultados mas significativos a nivel de respuesta de defensa en la comparación EyESI. En microarreglos presentaron casi el mismo número de genes regulados (144 para EyC, 136 para EyESI), sin embargo los genes que por su supuesta función están relacionados con defensa, fueron expresados más en la comparación EyESI (tabla 7). En el caso de la sustracción diferencial, se observó una mayor diferencia entre las comparaciones, de las 125 secuencias únicas obtenidas, 48 fueron en EyESI y solo 15 fueron aisladas en EyC, y ambas compartieron 11 secuencias.

Esta sección es una revisión detallada de los procesos en los cuales están potencialmente involucradas las secuencias aisladas y analizar su significado bioquímico y fisiológico en el contexto particular de la resistencia de defensa de la yuca a la alimentación de *A. socialis*. La metodología empleada en este trabajo permite en parte hacer distinciones temporales entre cada uno de los elementos, el orden en el que se llevará a cabo esta revisión busca simular la sucesión hipotética de eventos de las respuestas de defensa (el modelo general se muestra al final de la discusión en la Figura 38).

4.2.1 Reconocimiento: ¿qué percibe la yuca en la mosca blanca para disparar la respuesta de defensa?

4.2.1.1 Fuente de inductores en interacciones Planta-Mosca blanca

Los insectos que usan el modo de alimentación perforando y chupando tienen una íntima y larga interacción con las células de la planta. Utilizando su estilete para perforar las células, estos herbívoros consumen grandes cantidades de fluidos como fuente nutricional (Walling 2000). Los sitios de alimentación varían, muchos áfidos y moscas blancas deben atravesar la cutícula, epidermis y las células del mesófilo para establecer los sitios de alimentación en las venas del floema (Miles 1999; Raven 1983) (Figura 35). El estilete de los perforadores chupadores que se alimentan de floema está en continuo contacto con las células de la planta. Una vez los sitios de alimentación son establecidos, estos pueden ser usados por horas o semanas. En esta larga interacción pueden existir varios tipos de inductores provenientes del insecto que estén elicitando la respuesta de defensa en la planta. Entre estos se encuentran los inductores salivares y otras moléculas provenientes del insecto como los PAMPs.

4.2.1.1.1 Inductores salivares

Las señales generadas por herbívoros, las cuales atraviesan las células de las plantas para remover líquidos como fuente nutricional, son complejas. Algunas señales, como las que activan la expresión de genes PR, son probablemente compartidas por muchos herbívoros (moscas blancas, áfidos y ácaros). Durante la introducción del estilete en el sitio de la alimentación, los floemófagos podrían inadvertidamente dañar las células a lo largo del sitio por donde entra el estilete y liberar señales almacenadas en las plantas que estimulan la expresión de genes de defensa como los PR. Alternativamente, el movimiento del estilete entre las células, el cual trastorna el contacto esencial célula-célula, o la perforación de las células en el sitio de alimentación y consumo de líquidos podrían ser percibidos como un estrés físico generando señales que activan la expresión de genes. Tanto las señales eléctricas

como las hidraúlicas están implicadas en la expresión de genes de respuesta a herida (Rhodes et al. 1999). Un componente de la saliva del herbívoro es probablemente el inductor para muchos genes PR (Walling 2000). Los insectos que consumen líquidos, como los áfidos y las moscas blancas, secretan dos tipos de saliva a lo largo del canal de entrada del estilete y en el sitio de alimentación: una saliva envolvente que rápidamente se gelifica y una saliva líquida digestiva (Figura 35) (Miles 1999). La composición de estas salivas ha sido caracterizada en un pequeño número de insectos hemipteros. La saliva envolvente está compuesta principalmente de proteínas, fosfolípidos y carbohidratos conjugados (Miles 1999). Cuando es segregada, la saliva envolvente se polimeriza alrededor del flexible estilete para formar una barrera protectora, limitando así el contacto directo del estilete con el apoplasto de la planta. No se sabe si los materiales envolventes no polimerizados podrían ser los inductores de la respuesta de defensa en la planta. La composición de la saliva líquida digestiva es más compleja y variable, conteniendo una amplia variedad de enzimas que incluyen pectinasas, celulasas, amilasas, proteasas, lipasas, fosfatasas alcalina y ácida y peroxidasas (Miles 1999). Los inductores generales y especie-específicos podrían ser uno de los constituyentes salivares conocidos o podría ser un constituyente sin caracterizar. El quitosán en ácaros (Bronner et al. 1989), los oligogalacturónidos generados por pectinasas y ROS generados por peroxidasas (en insectos masticadores) son inductores conocidos de vías de señalización de defensa y/o heridas. Estos inductores podrían ser sintetizados directamente por el insecto o podría ser producto de una bacteria endosimbionte (Douglas 1998). En el presente estudio se aislaron algunas secuencias similares a genes involucrados en estrés oxidativo y ROS (Tablas 6 y 7). Esta generación de ROS puede ser el resultado de la inducción por uno o varios de estos componentes de la saliva de la mosca blanca, sin embargo, esto es algo meramente hipotético ya que hasta el momento no se ha comprobado el papel directo de algún componente salivar en la inducción de respuesta de defensa en floemófagos, siendo un campo aún inexplorado.

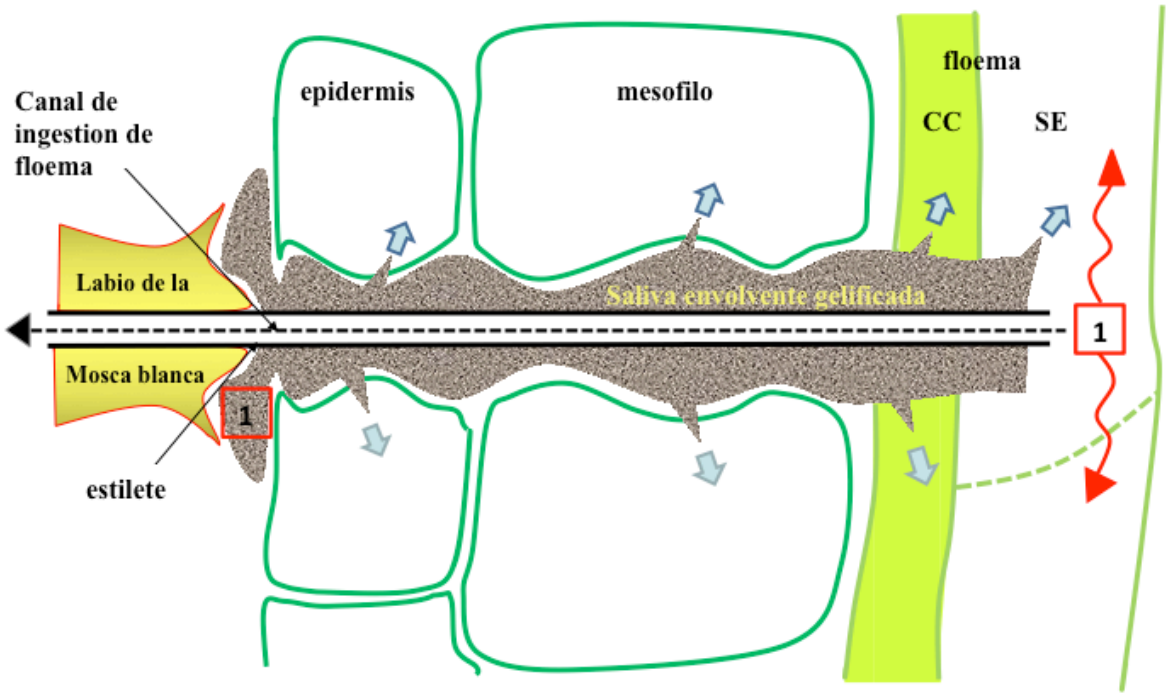


Figura 35. Representación esquemática de la ingestión de floema por la mosca blanca.

La mosca blanca introduce su estilete a través de la epidermis y el mesófilo hasta alcanzar el floema en la hoja, Se observa la formación de saliva envolvente gelificada alrededor del estilete, lo cual parece protegerlo de la acción de enzimas. Las flechas azules indican saliva líquida digestiva, la cual entra en contacto con el apoplasto, las células del mesófilo y la epidermis. CC (companion celulas) y SE (elementos de la savia) son partes del floema. Se sugiere que un/unos componentes de la saliva envolvente o la saliva líquida (1) liberados en la epidermis, el apoplasto y el floema pueden ser los inductores que disparan la respuesta de defensa en la planta. (Esquema hipotético basado en el modelo de áfidos, Tjallingii 2006).

4.2.1.1.2 Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs): La quitina

Como parte de su immunidad innata, las plantas reconocen a sus invasores por medio de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, en inglés). Estas son moléculas

provenientes del patógeno, tales como la flagelina (Zipfel et al. 2004) y varios oligosacáridos, incluyendo quitina. El reconocimiento por parte de la planta de estas moléculas resulta en la inducción de varias vías de defensa en las plantas. El reconocimiento de tales inductores de patógenos y plagas por la planta puede inducir a una muerte celular y de una manera general a una reacción hipersensible y a la síntesis de moléculas antimicrobiales como las fitoalexinas (Heath 2000). Por ejemplo, la volicitina (Schmelz et al. 2003) y la flagelina (Zipfel et al. 2004) activan las vías mediadas por JA y ET. La activación de estas vías resulta en la síntesis de una variedad de proteínas PR que tienen un importante papel en respuesta de defensa. Una de esas PR es la quitinasa, la enzima que cataliza la hidrólisis de los polímeros de quitina, encontrados en las paredes celulares de hongos patogénicos y en el exoesqueleto de insectos y nemátodos (Shibuya & Minami 2001). En el presente trabajo se aisló una secuencia similar a quitinasa básica (*CHIB* ó *PR-3*) probablemente inducida por la vía del JA/ET. La aplicación exógena en plantas de oligómeros de quitina purificados activan los genes PR y la síntesis de fitoalexinas, y en trabajos con microarreglos se han obtenido un gran número de genes de Arabidopsis inducidos por quitina (Shibuya & Minami 2001; Zhang et al. 2002). Varias proteínas de ligación a quitina asociadas a membrana, presumiblemente receptores de quitina han sido identificados en varias especies de plantas como la soya (Day et al. 2001) y arroz (Kaku et al. 2006). En nuestro estudio se encontró una proteína de ligación similar al gen *BRH1* (*BRASSINOSTEROID- RESPONSIVE RING-H2*) el cual se ha encontrado que se acumula por la presencia de quitina en Arabidopsis (Molnàr et al. 2002). Libault et al. (2007) utilizando microarreglos de ADNc y RT-PCR encontraron 118 factores de transcripción en Arabidopsis que respondían a la inducción por quitina. Una de las familias de estos factores de transcripción mayormente representadas fue la *AP2/ERE,* lo cual indica que esta familia está implicada en la respuesta de defensa de la planta y son específicamente inducidas por quitina. Una secuencia similar a una isoforma de este factor de transcripción fue encontrada en la librería sustractiva del presente trabajo, y otra fue diferencialmente expresada en el Cassava Unigene Microarray (Tablas 6 y 7). También se encontró diferencialmente expresado en los microarreglos el activador transcripcional *MYC2* el cual tiene un dominio *bHLH* (*basic helix-loop-helix Zip*). En estudios realizados por Lorenzo et al. (2004) se mostró que *MYC2* tiene un papel central dentro de la vía de señalización de JA, regula la respuesta de defensa a insectos y responde a la inducción por quitina. Sumado a esto, Lyou et al. (2008) demostraron

que el gen *AtLEC* de Arabidopsis que codifica para una proteína lectina es inducido por múltiples estímulos incluyendo herida, JA/ET y quitina. En el presente trabajo se aisló una secuencia similar a un receptor kinasa *lectin-domain containing receptor kinase IX.1 (LecRK-IX.1),* en la sección C-terminal pertenece a la superfamilia de proteínas kinasas y familia de proteínas kinasas Ser/Thr. En la sección N-terminal pertenece a la familia de las lectinas leguminosas. A pesar de no haber encontrado un receptor de quitina en el presente trabajo, talvez debido a que es una expresión muy temprana, los resultados anteriores sugieren que la quitina presente en el exoesqueleto de la mosca blanca es probablemente un candidato a inductor de la respuesta de defensa en yuca.

4.2.2 Después de la inducción es disparada la respuesta de defensa

4.2.2.1 Eventos tempranos: despolarización de membrana, flujo de iones calcio y proteínas kinasas Mitogen-activated (MAPK)

El ión calcio (Ca^{2+}) ha sido implicado como un segundo mensajero en muchas vías de señalización en plantas, incluyendo respuestas a la herbivoría (Maffei et al. 2007). Bajo condiciones normales, el contenido de Ca^{2+} citosólico es varios órdenes de magnitud más bajo que en el fluido apoplástico y en las organelas. Incrementos en los niveles de Ca^{2+} citosólico activan la calmodulina y otras proteínas sensibles al calcio que seguidamente promueven eventos de señalización corriente abajo, incluyendo fosforilación de proteínas y respuestas transcripcionales. En el presente trabajo en las librerías sustractivas se aislaron secuencias similares a *ATCNGC5 (CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL 5)* y una proteína de ligación a calcio; en los microarreglos una *ATCNGC4,* y una *CRK (CDPK-related kinase*) proteína de ligación a calcio. Los *ATCNGC* son canales catiónicos de nucleótidos cíclicos cerrados que son componentes de señalización corriente abajo que llevan a la resistencia, son permeables a sodio y potasio de una manera dependiente de nucleótidos cíclicos (cAMP o cGMP). Son inducidos por ET y JA y su función molecular es la de transporte transmembrana y como proteína de ligación a calmodulina (Balagué et al. 2003). Las *calcium-dependent*

protein kinase (CDPKs) y las calmodulinas son sensores de iones calcio que están involucrados en muchas vías de señalización que tienen que ver con desarrollo y estrés (DeFalco et al. 2010).

Hasta el momento no ha sido totalmente descrita una vía *MAPK* completa que lleve a la resistencia a insectos en plantas, existe evidencia que vías como esta juegan un papel en algunas interacciones planta-insecto. En tomate *Solanum lycopersicum*, el gen *Mi-1* media resistencia que fue atenuada cuando la expresión de ciertas *MAPK y MAPKK* fueron reducidas por silenciamiento de genes utilizando el método VIGS (Li et al. 2006). Los estudios hechos con VIGS en tomate han mostrado que al menos tres *MAPKs* son requeridas para la respuesta de defensa mediada por *sistemin* al gusano del tabaco *(Manduca sexta*) (Kandoth et al. 2007). FACs en secreciones orales de *M. sexta* incrementa la expresión de *MAPK* inducidas por SA y *MAPK* inducidas por daño mecánico en *N. attenuata (*Wu et al. 2007). En arroz silvestre *Oryza minuta*, la expresión de una supuesta *MAPKK (OmMKK1*), es inducida por la alimentación del saltahojas del café *(Nilaparvata lugens*), así como también por tratamientos con JA y SA (You et al. 2007). En el presente trabajo, en el Cassava Unigene Microarray se identificó una secuencia similar a una *MAPK13* expresada diferencialmente. Con los resultados anteriores podemos hipotetizar que después del reconocimiento de *A. socialis* por parte de la planta, se activa una despolarización de la membrana por la apertura de canales iónicos, se aumentan las concentraciones de Ca^{2+} se inducen los sensores de Ca^{2+} calmodulina y CDPKs, se activa una MAPK y la fosfolipasa A2, paso inicial de la vía de transducción de las oxilipinas (Ryan 2000). Este último paso será explicado posteriormente.

4.2.2.2 *Aleurotrachelus socialis* induce en yuca, enzimas que están envueltas en la generación y detoxificación de ROS

Es probable que componentes de las secreciones orales de las moscas blancas generen una producción local y sistémica de especies de oxígeno reactivo (ROS) como se ha observado en otros floemófagos como los áfidos (Tjallingii 2006). Sumado a esto, las plantas responden a muchas formas de estreses bióticos generando ROS que participan en señalización defensiva

y potencian una respuesta hipersensible (HR) en el sitio de la infección (Lamb & Dixon 1997). Algunas enzimas que participan en ROS pueden romper el equilibrio redox del artrópodo. Perturbaciones en el equilibrio redox del intestino puede causar la proliferación de radicales de oxígeno que dañan las proteínas, lípidos y el AND (Walling 2000). Enzimas que producen radicales superóxido (como la *NADPH* oxidasa) o peróxido de hidrógeno (peroxidasas) pueden funcionar como proteínas defensivas en el intestino del herbívoro (Moran et al. 2002). En el caso de la interacción yuca-*A. socialis* se encontró que la infestación indujo la expresión de ciertas enzimas antioxidantes, mientras reprimió otras (Tablas 6 y 7). Entre los genes regulados implicados en ROS encontrados en las librerías sustractivas y en los microarreglos, encontramos *NADPH* oxidasas y deshidrogenasas, citocromos P450 relacionados con los complejos de oxidación-reducción, oxidoreductasas, el gen *SDR* (*short-chain dehydrogenase/reductase*) y el *peroxiredoxin type 2* los cuales fueron inducidos a lo largo de los tiempos de colecta. En general la yuca parece enfrentar el reto de balancear entre generar ROS como mecanismo de defensa y producir enzimas detoxificantes para contrarrestar su propio daño oxidativo, igual a lo observado en otras interacciones con áfidos (Zhu-Salzman et al. 2004). Sin embargo, según Divol et al. (2005), las respuestas dentro del floema aparecen a favor de la detoxificación, como observamos en nuestro estudio. *A. socialis* induce la expresión de enzimas antioxidantes glutaredoxinas y catalasas, las cuales tienen un papel importante en la detoxificación de ROS.

4.2.2.3 *Aleurotrachelus socialis* induce las vías de JA/ET en yuca

En los estudios hechos hasta el momento con insectos floemófagos, se hace evidente que estos inducen las vías del SA y JA/ET. Sin embargo estas pueden variar entre especies de plantas y entre interacciones compatibles e incompatibles (Ellis et al. 2002; Moran et al. 2002; Voelckel et al. 2004; Zhu-Salzman et al. 2004; De Vos et al. 2005; Kempema et al. 2007).

Se ha encontrado que a pesar de las diferentes historias de vida de la mosca blanca *B. tabaci* y los áfidos, las respuestas de defensa de Arabidopsis a estos floemófagos es similar.

Los áfidos y *B. tabaci* activan en Arabidopsis las vías dependientes del SA (ácido salicílico) (Ellis et al. 2002; Moran et al. 2002; De Vos et al. 2005; Kempema et al. 2007). Kempema et al. (2007), encontraron muchos genes de esta vía, probablemente debido a la prolongada interacción de *B. tabaci* en la planta (21 días) que fue en el tiempo en que se realizaron las colectas de tejido foliar. También encontraron que con respecto a los cambios en expresión global de los áfidos y moscas blancas en Arabidopsis, estos dos tipos de floemófagos solo compartían el 17% de los genes inducidos. Lo que sugiere que las respuestas de defensa pueden variar según la especie a pesar de estar implicadas las mismas vías de señalización. Los datos encontrados en Arabidopsis muestran que la mosca blanca *B. tabaci* podría evitar las defensas efectivas contra insectos inducidas por JA evitando daño al tejido o introduciendo efectores que suprimen estas defensas mediadas por JA (Zarate et al. 2007). En el presente trabajo, se encontraron genes que la literatura reporta como inducidos por SA como *CA1* (*Carbonic Anhydrase 1)* secuencia aislada en la librería sustractiva, y el *NLA (nitrogen limitation adaptation)* y *WHY3 (WHIRLY 3)* ambos reprimidos y obtenidos diferencialmente significativos con los microarreglos. Sin embargo, no se encontraron genes de la vía de señalización ni de biosíntesis de esta fitohormona, a diferencia de estudios hechos en Arabidopsis-*B. tabaci* donde esta especie de mosca blanca indujo genes de esta vía (Kempema et al. 2007; Zarate et al. 2007). En general en las plantas la acumulación de estas tres hormonas (SA, JA, ET) disparan la activación de la cascada de respuesta de defensa a insectos. Sin embargo el resultado final en la respuesta de defensa es influenciado por la producción, tiempo y composición de la mezcla de hormonas (De Vos et al. 2005; Leon-Reyes et al. 2010). Aunque hay excepciones, en general las defensas dependientes de SA son activadas en contra de patógenos biótrofos, mientras que las defensas dependientes de JA/ET son activadas en contra de patógenos necrótrofos y contra insectos herbívoros (Norman-Setterblad et al. 2000; Kessler & Baldwin 2002; Glazebrook 2005). Recientes avances en investigación en señalización de defensa revelan que SA, JA y ET funcionan como una compleja red de vías de señalización interconectadas (Pieterse et al. 2009). Interacciones entre estas vías provee a la planta un poderoso potencial regulatorio, que permitiría a la planta tener una respuesta de defensa a la medida del invasor que la ataque (Reymond & Farmer 1998; Bostock 2005). Un ejemplo bien estudiado de cruce entre vías, es la interacción antagónica entre la señalización de SA y JA, muchos estudios han demostrado que la acumulación

endógena de la una, suprime inmediatamente la expresión de la otra (Bostock 1999; Thaler et al. 2002). La interacción entre JA y ET es uno de los ejemplos mejor estudiados de interacción de señales de defensa sinérgicas (Adie et al. 2007). Estudios previos han indicado que el JA/ET actúan concertadamente para regular la expresión de un gen PR (*osmotin*) en tabaco y una defensina (*PDF1.2*) de Arabidopsis (Xu et al. 1994; Penninckx et al. 1998). Santamaria et al. (2001) encontraron que la expresión del gen *AtPRB1* en raíces de Arabidopsis era inducida por JA/ET y reprimida por SA en respuesta a patógenos necrótrofos, y Norman-Settlerblad et al. (2000) demostraron que la acción concertada de JA/ET inducía la expresión de genes de defensa (*Hevein, Basic chitanase ATCHIB, PDF1.2* y *VSP*) contra el patógeno necrótrofo *Erwinia carotovora* en Arabidopsis. Sin embargo, en el caso de la respuesta a herida en Arabidopsis, una interacción antagónica entre JA y ET en la activación de respuestas locales ha sido descrita (Rojo et al. 1998). Sumado a esto recientemente, Leon-Reyes et al. (2010) demostraron que la inducción simultánea de las vías de JA y ET da como resultado la insensibilidad de la planta a futuras supresiones mediadas por SA, de las defensas dependientes de JA, lo cual podría priorizar la vía JA/ET sobre la vía SA durante interacciones de la planta con múltiples atacantes.

En el presente estudio se encontraron evidencias que sugieren un papel central de las defensas mediadas por JA/ET en la resistencia de la yuca a *A. socialis*. El hallazgo de secuencias similares a genes implicados en estas vías tanto en la sustracción como en los microarreglos y los resultados obtenidos en el RT-PCR, son una clara muestra de su participación en la respuesta de defensa (tablas 6 y 7, Figura 17). A continuación se detallarán paso a paso las secuencias aisladas implicadas en biosíntesis, señalización, regulación de JA y ET y su posible papel en la interacción yuca-*A. socialis*.

4.2.2.3.1 Secuencias similares a genes implicados en biosíntesis de JA

Se aislaron secuencias similares a genes implicados en biosíntesis de JA como la fosfolipasa encontrada como diferencialmente expresada en los microarreglos y *LOX5* aislada en las librerías sustractivas (Tablas 6 y 7). La fosfolipasas están involucradas en biosíntesis

basal de JA porque liberan los ácidos grasos precursores de la membrana celular (Schaller et al. 2005). El primer indicio del ácido linolénico como precursor en la síntesis del JA fue obtenido por Farmer & Ryan (1992), quienes mostraron que al aplicar este ácido graso sobre hojas de tabaco se iniciaba la respuesta contra herbivoría que induce la síntesis de inhibidores de proteasas (Creelman & Rao 2002). Todas las unidades de membrana, especialmente las membranas del cloroplasto, son una fuente rica de ácidos linoleico (18:2) y linolénico (18:3) esterificados en forma de fosfoglicéridos; estos ácidos pueden ser liberados de las membranas a través de la hidrólisis catalizada por fosfolipasas dando así inicio a la síntesis del JA (Howe & Schilmiller 2002). En plantas la activación de la fosfolipasa constituye frecuentemente el paso inicial en la generación de mensajeros lipídicos secundarios (Wang & Granados 2001). Existen cinco clases de fosfolipasas (PL D, PL C, PL A2, PL A1 y PL B), divididas según el sitio del fosfoglicérido donde realizan la hidrólisis; estas clases a su vez se dividen en subfamilias según la secuencia de los genes que las codifican o diferencias bioquímicas entre sus proteínas (Wang & Granados 2001). En respuestas a daño mecánico se ha reportado aumento en la actividad de las PL A, PL C y PL D tanto en hojas sometidas a este estímulo como en hojas sanas bajo inducción sistémica (Creelman & Rao 2002). La fosfolipasa encontrada como diferencialmente expresada en este trabajo es similar a la *AtPLA1* de Arabidopsis, la cual está involucrada en biosíntesis basal de JA en respuesta al hongo necrótrofo *Botrytis cinerea* (Yang et al. 2007).

El paso siguiente en la biosíntesis del JA es la oxidación de los ácidos linoleico y linolénico en hidroperóxidos. Este paso es catalizado por las lipoxigenasas (*LOX*), las cuales catalizan preferencialmente la unión de oxígeno a los carbonos 9 ó 13, respectivamente, de la cadena de 18 carbonos en estos ácidos grasos. La especificidad relativa de estas dos enzimas y la cascada de reacciones y compuestos que cada una produce permite dividir el metabolismo de las oxilipinas en las vías *LOX 9* y *LOX 13*, en donde el hidroperóxido correspondiente es metabolizado por reacciones coordinadas de enzimas pertenecientes a la familia de las citocromo P450. Las distintas isoformas de lipoxigenasa pueden tener patrones de expresión y localización subcelular diferentes, lo cual puede incidir en la regulación de la vía de las oxilipinas (Schaller et al. 2005) (Figura 36). El RT-PCR evidenció la posible acumulación de transcritos de *LOX5* en las plantas de MEcu 72 infestadas con *A. socialis* (Figura 17), lo que

también sugiere que en estas plantas resistentes infestadas posiblemente hay acumulación de JA.

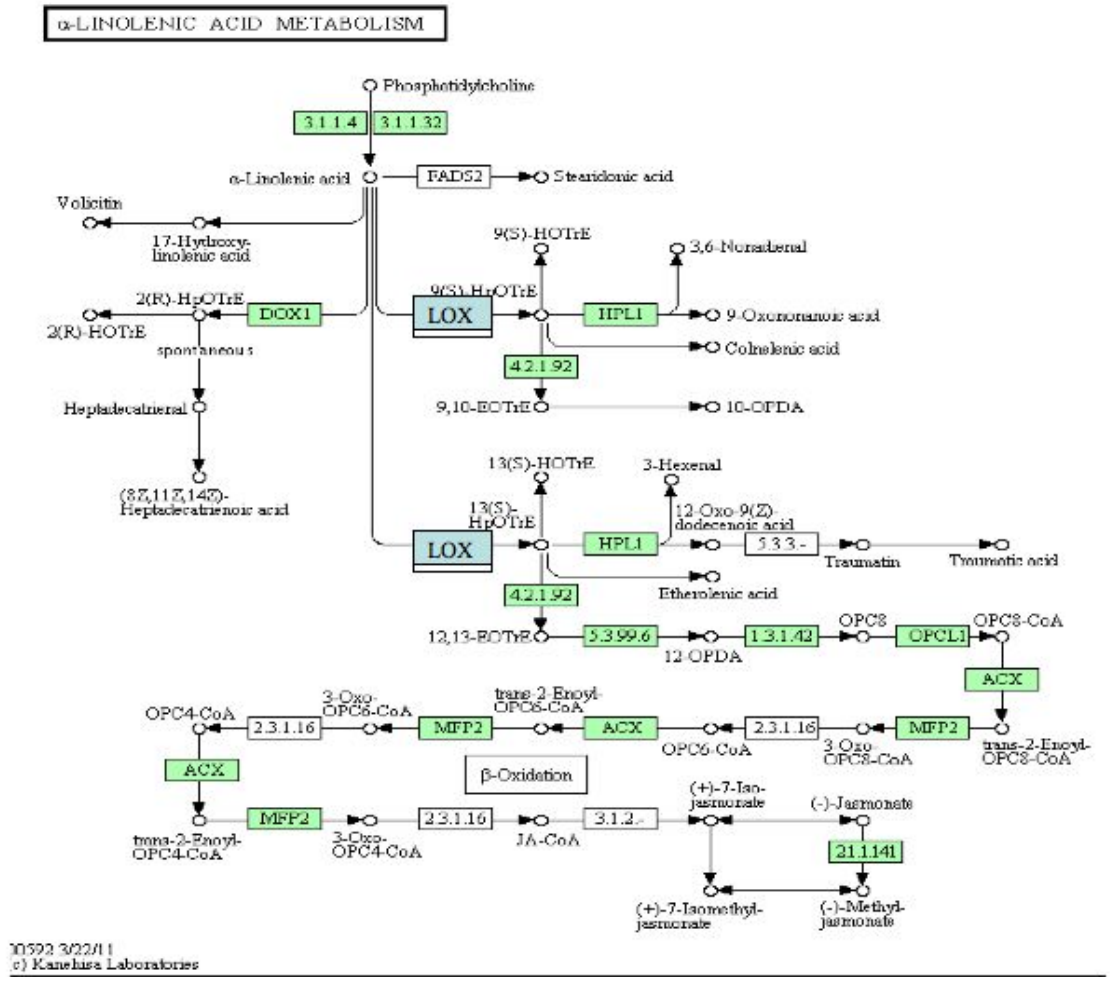


Figura 36. Esquema que muestra la vía metabólica del ácido α-linolénico precursor del ácido jasmónico.

En la casilla azul se puede observar la enzima *LOX* (lipoxigenasa) implicada en la dioxigenación de estos ácidos grasos poliinsaturados, aislada en la librería sustractiva. Las casillas verdes corresponden a las enzimas implicadas en el proceso (tomado de KEGG).

4.2.2.3.2 Secuencias similares a genes involucrados en regulación y señalización de JA y ET

4.2.2.3.2.1 CEV1 (CONSTITUTIVE EXPRESSION OF VSP 1)

También *A. socialis* indujo secuencias similares a genes involucrados en la regulación y señalización tanto de ET como de JA. Una de estas secuencias, obtenidas en los microarreglos fue *CEV1*. Este gen codifica para un isómero de la celulosa sintasa *CESA3*, la cual es la subunidad catalítica requerida para la cristalización de microfibrillas beta-1,4-glucano, el mayor mecanismo de formación de pared celular. Está involucrada en formación de pared celular primaria, sobretodo en raíces (Ellis et al. 2002). Ellis & Turner (2001), probaron que el mutante *cev1* en Arabidopsis producía plantas que eran más pequeñas, tenían una expresión constitutiva de genes relacionados con defensa como *VSP1, Thi2.1, PDF1.2 y CHIB* y realzaba la resistencia a enfermedades. Encontraron que este mutante requería tanto de *COI1*, un componente esencial de la vía de señalización de JA y de *ETR1* un receptor de ET. Concluyendo que el mutante *cev1* estimula las vías de señalización de JA y ET y que *CEV1* es un regulador de los tempranos pasos en las vías de defensa de Arabidopsis. Con esos resultados estos autores proponen que la pared celular podría estar mediando la respuesta de defensa dependiente de JA y ET. *CEV1* podría actuar como regulador de los niveles de JA y ET o como regulador del flujo a través de sus vías de señalización. Esta caracterización incrementaría nuestro entendimiento en los pasos tempranos en respuesta de defensa en plantas. Esta secuencia se encontró en los tiempos tempranos de la comparación EyESI(1y2) cuando *A. socialis* se encuentra en etapa adulta y está alimentándose y ovipositando, sugiriendo que la alimentación por el adulto puede disparar la expresión de *CEV1* en yuca, promoviendo la acumulación de transcritos y la señalización de las vías de JA y ET, las cuales posiblemente son reguladas durante todo el período de interacción entre la yuca y *A. socialis*.

4.2.2.3.2.2 EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE 2)

Con microarreglos se encontró una secuencia similar al gen *EIN2* diferencialmente expresado. *EIN2* es una proteína integral de membrana con una limitada similaridad en la porción N-terminal al transportador de metales *NRAMP* de mamíferos. Los 850 amnioácidos de la porción C-terminal de *EIN2* es conservada en todos sus homólogos conocidos en las angiospermas (Varma Penmetsa et al. 2008). Interesantemente, la expresión de una porción del C-terminal (*EIN2-CEND*) es suficiente para activar constitutivamente las respuestas a estrés y ET en Arabidopsis (Alonso et al. 1999). Actúa corriente abajo de los receptores de ET y corriente arriba de los factores de transcripción regulados por ET, además se ha visto implicado en el cruce entre las vías de ET y JA (Glazebrook 2005) (Figura 37). Análisis fenotípicos, epistáticos y bioquímicos ubican a *EIN2* como el factor central de las vías de señalización reguladas por ET y está envuelto en muchos procesos que incluyen desarrollo, senescencia, tropismos y defensa (Johnson & Ecker 1998; Guo & Ecker 2003). Recientemente, Qiao et al. (2009), demostraron que *EIN2* es una proteína de corta vida media y acaba rápidamente por la degradación mediada por el complejo proteasoma. Ellos identificaron dos proteínas *F-Box* (*ETP1* y *ETP2*) las cuales promovían la degradación de *EIN2* en ausencia de ET y cuando el ET estaba presente, la expresión de *ETP1* y *ETP2* era reducida, permitiendo la acumulación de *EIN2*. Esos resultados sugieren que las respuestas mediadas por ET son específicamente moduladas en una manera dependiente de *EIN2*, revelando una compleja interacción entre ET, la regulación de *ETP1/ETP2* y la subsecuente degradación de *EIN2* como esencial para disparar las respuestas de defensa mediadas por ET. *EIN2* es otro regulador importante que encontramos inducido por *A. socialis*, que nos sugiere que a pesar de no haber aislado ninguna secuencia similar a genes que participan en la biosíntesis de ET, su hallazgo nos permite inferir la participación de esta vía en la respuesta de defensa de la yuca.

4.2.2.3.2.3 La vía de señalización de JA tiene dos ramas antagónicas corriente abajo de *COI1*, reguladas por *MYC2* y *ERF*

Lorenzo et al. (2004), demostraron que en Arabidopsis, *JIN1 (JASMONATE INSENSITIVE 1*) codificaba para un factor de transcripción localizado en el núcleo de la clase *bHLHzip* (*basic helix-loop-helix-leucine zipper*) llamado *AtMYC2* que diferencialmente

regula las dos ramas de la vía de señalización de JA. Una de esas ramas positivamente reguladas por *MYC2*, induce la expresión de genes envueltos en respuesta a herida (mecánica o biótica) como *VSP1, TAT, LOX y JR1*. Dombrecht et al. (2007) mostraron que estos genes respondían y eran efectivos contra insectos herbívoros masticadores como *Helicoverpa armigera*, concluyendo que *MYC2* regula positivamente la resistencia a estos herbívoros que causan daño mecánico considerable en la planta. La otra rama de la vía de señalización de JA es regulada negativamente por *MYC2*, y es requerida para la expresión de genes de defensa contra patógenos necrótrofos e insectos (*PDF1.2, PRB1*). Sumado a esto encontraron que esta rama era regulada positivamente por *ERF1 (ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR 1*) y la primera rama era negativamente regulada por este mismo factor de transcripción. Esta interacción negativa entre *MYC2* y *ERF1* podría explicar a nivel molecular, como las plantas seleccionan la respuesta correcta a diferentes (aunque relacionados estreses) como, ataque de patógenos, herbivoría por insectos masticadores o por floemófagos y por herida.

MYC2 también se encuentra mediando el cruce entre la señalización de JA-ABA y JA-SA; a esto se suma un nuevo papel que implica a *MYC2* en transporte de auxinas, indicando que *MYC2* es un punto clave de unión en una amplia red que envuelve múltiples vías de señalización de hormonas (Dombrecht et al. 2007). Estas regulaciones pueden ser positivas o negativas, los efectos diferenciales de *MYC2* en las diferentes respuestas de JA pueden ser debidas al hecho de que una precisa coordinación de estas respuestas son requeridas para manejar los recursos durante la adaptación a estreses bióticos y/o abióticos. Por esto, aunque tanto patógenos como insectos estimulan la biosíntesis de JA, muchos cambios en la expresión de genes de respuesta a JA ocurren dependiendo del atacante (De Vos et al. 2005), sugiriendo que las plantas invierten sus limitados recursos de la mejor manera posible.

Leon-Reyes et al. (2010) demostraron que el factor de transcripción *AP2/ERF* (gen llamado *ORA59*) jugaba un papel dominante en la inhibición mediada por ET del antagonismo entre JA y SA, contarrestando ese efecto negativo de SA sobre la expresión de genes regulados por JA. Esta proteína regulatoria pertenece a un subgrupo, conocido como *ERF* family, de la superfamilia mas grande específica de plantas *APETALA2/ETHYLENE*

RESPONSE FACTOR (AP2/ ERF) (Nakano et al. 2006). Se ha demostrado que muchos genes *ERF* son regulados por una gran variedad de estímulos relacionados con estreses, tales como herida, JA, ET, SA o infección por diferentes tipos de patógenos (Gutterson & Reuber 2004; McGrath et al. 2005). Leon-Reyes et al. (2010) también demostraron que *AP2/ERF* integraba las señales de JA y ET para regular la expresión de genes de defensa tales como *PLANT DEFENSIN1.2 (PDF1.2)* y *BASIC CHITINASE (CHIB)* que confieren resistencia a patógenos necrotrófos como *Botrytis cinerea* y *Alternaria brassisicola* en Arabidopsis.

En el presente estudio se encontró una secuencia diferencialmente expresada en los microarreglos, en respuesta a *A. socialis*, similar a *MYC2* (AT1G32640.1). Según *Gene Ontology* (GO), este gen está involucrado en 13 procesos biológicos que incluyen entre otros, vía de señalización mediada por JA, regulación de la transcripción, regulación de la respuesta de defensa a insectos, respuesta a estímulo por ABA y respuesta a quitina. También con microarreglos encontramos una secuencia diferencialmente expresada similar a un factor de transcripción *AP2/ERF* (AT2G33710.1). Según la base de datos de *TAIR,* este gen codifica para un miembro de *ERF (ethylene responsive factor*) subfamilia B-4 de la familia de factores de transcripción *AP2*/*ERF*. La proteína contiene un dominio *AP2* y hay 7 miembros en la subfamilia. Participa en los procesos biológicos de regulación de la transcripción y respuesta a quitina. En la librería sustractiva se aisló una secuencia similar a otro miembro de la misma familia *AP2/ERF* (AT4G13040.1) la cual actúa como activador transcripcional al ligarse al elemento promotor GCC-box relacionado con patogénesis. Está involucrado en la regulación de expresión de genes por factores de estrés y por componentes de señales de transducción de estrés. Contiene un dominio de ligación a ADN *AP2/ERF*.

En nuestro estudio tanto *MYC2* como *AP2/ERF* estuvieron inducidos diferencialmente en los microarreglos a pesar de ser antagonistas en la señalización de JA/ET. Esta contradicción aparentemente sería díficil de explicar, sin embargo, podríamos aproximarnos teniendo en cuenta los genes de defensa que finalmente fueron aislados en la librería sustractiva y los tiempos en los cuales todas estas secuencias fueron encontradas durante la interacción yuca-*A. socialis*. Con microarreglos se encontró *MYC2* diferencialmente expresado en la comparación

EyESI en los tiempos (3y4) y (5y6) es decir durante la alimentación de los cuatro estadíos ninfales. *AP2/ERF* fue encontrado diferencialmente expresado en la comparación EyC tiempos 1y2 (adulto y huevo) y en la comparación EyESI tiempos 3y4. En la librería sustractiva *AP2/ERF* fue aislado en la comparación EyESI durante la alimentación de los cuatro estadíos ninfales. Esto sugiere que la inducción de *AP2/ERF* puede estar ocurriendo en etapas tempranas de la interacción, y es una respuesta del genotipo resistente (MEcu 72), ya que se indujo en la comparación EyC cuando tanto el resistente como el suceptible estaban infestados por *A. socialis*. Se desconoce si esta inducción ocurre durante la alimentación del adulto o la oviposición. Durante los estadíos ninfales es probable que la alimentación sostenida induzca constantemente tanto a *MYC2* como a *AP2/ERF*, y su mutua regulación negativa dependa de las necesidades de la planta al momento de responder al estrés ocasionado por *A. socialis*. Esto dependería de los niveles de producción, tiempo y composición de la mezcla de hormonas como ocurre en otras interacciones (De Vos et al. 2005; Leon-Reyes et al. 2010). Sin embargo, las secuencias similares a genes de defensa aisladas de la librería sustractiva, apuntan a una inducción preferentemente hacia *AP2/ERF*, ya que los genes *PRB1, CHIB* son activados por factores de transcripción pertenecientes a esta familia.

4.2.2.4 Activación de genes de defensa

4.2.2.4.1 Proteínas inducibles por artrópodos: ataque directo al intestino del insecto

El intestino del insecto está frecuentemente cubierto por una capa protectora conocida como matriz peritrófica, la cual está compuesta de quitina y una proteína matriz. Esta matriz peritrófica protege el epitelio del intestino del insecto contra alimentos abrasivos, toxinas, estrés oxidativo y microorganismos y además mantiene la compartimentalización de las enzimas digestivas. La ruptura de la matriz peritrófica podría interferir con las funciones digestivas y de absorción normales y predisponer al insecto a patógenos y toxinas (Zhu-Salzman et al. 2008). Las lectinas son un importante grupo de proteínas que se unen a ciertos

dominios de azúcares con alta especificidad. Las lectinas que son resistentes a proteólisis y poseen un sitio de unión GlcNAc, frecuentemente tienen actividad anti insectos (Zhu-Salzman et al. 1998). Estas lectinas pueden unirse a componentes de quitina de la matriz peritrófica y romper su morfología (Fitches & Gatehouse 1998; Zhu-Salzman et al. 1998). Por ejemplo, la ingestión de aglutinina de trigo por el insecto *Ostrinia nubilalis*, causa hipersecreción de una matriz peritrófica desorganizada en el interior del lumen del intestino, desintegración del microvilli del epitelio y cese de la alimentación (Hopkins & Harper 2001). Sumado a esto, la ruptura de la matriz peritrófica permitiría el paso de partículas de alimento dentro del espacio ectoperitrófico y penetraría también dentro de los bordes microvilli amenazando la integridad del epitelio. En nuestro estudio, se encontró en los microarreglos una secuencia similar a *jacalin lectin family protein* (AT1G19715.3) de Arabidopsis, que pertenece a la superfamilia de lectinas de unión a mannosa. Este dominio se ha encontrado en proteínas inducidas por estrés por salinidad en arroz. En las librerías sustractivas se aisló un receptor kinasa como lectina (*LecRKs*). Estos receptores kinasas como lectinas (*LecRKs*) son una clase de proteínas originalmente descritas en Arabidopsis (Hervé et al. 1996). Tienen una estructura similar a otros receptores kinasas (*RLKs*; Cock et al. 2002) con un dominio N-terminal para la señal blanco, un dominio extracelular, un dominio transmembrana (*TM-spanning helix*) y un dominio kinasa citosólico. Los *RLKs* de plantas pueden ser agrupados dentro de mas de 21 clases estructurales basados en sus dominios extracelulares (Shiu & Bleecker 2001). Las *LecRKs* representan una de tales clases en la cual el dominio extracelular está relacionado con lectinas de leguminosas. El genoma de Arabidopsis contiene al menos 42 secuencias *LecRK* que han sido agrupadas en tres clases (A-C) más nueve secuencias adicionales de lectinas solubles relacionadas (Barre et al. 2002). Las lectinas de leguminosas tienen un dominio de unión a carbohidratos no catalítico. Los ligandos de las lectinas no se conocen *in vivo*, pero podrían ser glicanos mas complejos sumados a los azúcares simples (Navarro-Gochicoa et al. 2003). Debido a su homología a lectinas de leguminosas, es razonable suponer que *LecRKs* pueden estar envueltos en el reconocimiento y transducción de señales de sacáridos. Las plantas reconocen y responden a una gran variedad de glicanos de origen tanto endógeno (moléculas derivadas de la pared celular) como exógeno (patógenos de plantas, insectos herbívoros y simbiontes). Estas señales han sido denominadas oligosacáridos, que incluyen fragmentos de quitina e inductores de glucanos derivados de patógenos y oligosacáridos de

pectina y xiloglucanos derivados de pared celular (Creelman & Mullet 1997). Hasta la fecha, los receptores de muy pocas de estas moléculas han sido clonados. Estudios de la regulación de uno de estos genes de Arabidopsis, sugiere que está involucrado en el desarrollo de plantas y también en procesos adaptativos tales como heridas (Riou et al. 2002).

4.2.2.4.1.1 Cysteine proteinase inhibitor 6 (CYS6)

La alimentación por insectos dispara la expresión de proteínas de defensa en la planta, las cuales ejercen efectos directos sobre el atacante. Los inhibidores de proteasas (PI) que comprenden varias clases de proteasas digestivas en el intestino del insecto, han sido estudiadas por su papel en las respuestas de defensa activas (Green & Ryan 1972; Ryan 1990). La inhibición de las proteasas del intestino del insecto por PI resulta en deficiencias en amino ácidos que afectan negativamente el crecimiento y desarrollo del herbívoro (Lison et al. 2006; Zavala et al. 2004). La efectividad de PI como defensa es a menudo frustrada por la habilidad adaptativa del insecto para expresar proteasas digestivas que son insensibles a los PI de la planta hospedera, o los inactivan (Bayes et al. 2005). La diversidad y rápida evolución de ciertas familias de genes de PI podrían reflejar la evolución de adaptaciones del insecto que ha llevado a la carrera de armas químicas entre plantas y herbívoros (Talyzina & Ingvarsson 2006). Las cisteínas proteinasas *papain-like* son inhibidas por *Cystatin.* Estudios han mostrado que la sobreexpresión de *Cystatin* en cultivos celulares de Arabidopsis bloquean la muerte celular en respuesta a bacterias avirulentas y óxido nítrico (Belengui et al. 2003). Todo esto apunta que *Cystatin* tiene un papel clave en la defensa de las plantas no solo por su actividad de cisteína proteasa sino también por los inhibidores de proteasa endógenos que contrabalancean la acción de las proteasas. Kiggundu et al. (2009) realizaron unos bioensayos de tejido de banano (*Musa* spp.) infiltrados con *Cystatin*, produciendo una disminución del crecimiento larval del gorgojo del banano *Cosmopolites sordidus*. Un número de proteínas recombinantes con propiedades pesticidas, antidigestivas o antialimentarias han sido identificadas los últimos años para el desarrollo de cultivos resistentes a insectos plaga por medio de la transformación genética (Gatehouse 2008; Zhu-Salzman et al. 2008). Líneas de banano transformado con el gen de arroz inhibidor de proteasa cisteína *oryzacystatin I (OC-I*), mostraron una alta resistencia a nemátodos (Atkinson et al. 2004). Muchos trabajos

publicados han evaluado la efectividad de las *Cystatin* de plantas contra insectos herbívoros, como los de la familia Coleoptera, con resultados conclusivos en algunos casos (Alvarez-Alfageme et al. 2007; Ninkovic et al. 2007), pero algunos resultados no son los esperados debido a la habilidad de los insectos blanco para eludir y contrarrestar los efectos antidigestivos de los PI (Zhu-Salzman et al. 2003; Koo et al. 2008).

En el presente trabajo en la librería sustractiva se aisló una secuencia similar a un inhibidor de proteinasa Cisteína 6 (*CYS6,* AT3G12490.1), y en los microarreglos una secuencia diferencialmente expresada que correspondió al mismo gen de Arabidopsis *Cystatin*. El *CYS6* probablemente está involucrado en la regulación de procesos endógenos y en defensa contra plagas y patógenos. Pertenece a la familia *Cystatin*, subfamilia *Phytocystatin*. Recientemente, una isoforma de *CYS6* ha sido implicada en regulación de la germinación de semilla y crecimiento en Arabidopsis (Hwang et al. 2009).

Es razonable sugerir que el papel de las lectinas y del PI (*Cystatin*) en la respuesta de defensa de la yuca a *A. socialis*, dada la evidencia que existe, es la de actúar directamente sobre el intestino de la mosca, perturbando su morfología (en el caso de la lectina) o inhibiendo las proteasas del insecto, impidiendo que este digiera el alimento, causando desnutrición y finalmente la muerte. Sin embargo, se desconoce si las moscas blancas han desarrollado mecanismos que contrarresten estos PI, como se ha observado en los trabajos discutidos arriba, donde muchos tipos de insectos herbívoros han desarrollado mecanismos para eludir y contrarrestar estos efectos antidigestivos. Estudios en genómica funcional y proteómica podrían revelar las identidades de estas proteínas que contrarrestan la respuesta de defensa y que facilitan la adaptación del insecto a los cambios en la dieta. Factores de transcripción que interactúan con los elementos cis de estas proteínas contrarrestantes podría ser un adecuado enfoque en control de insectos basado en biotecnología. La inhibición de estos reguladores corriente arriba podrían potencialmente ser mas efectivos, ya que controlan la expresión de un gran subconjunto de genes envueltos en contrarrestar la defensa en el insecto (Zhu-Salzman et al. 2008).

4.2.2.4.2 Proteínas relacionadas con Patogenicidad (PR)

Varias especies de artrópodos no masticadores como los ácaros y los insectos floemófagos incrementan los niveles de proteínas PR (Proteínas relacionadas con patogenicidad). Incrementos en la actividad de 1,3-glucanasas o quitinasas han sido observados después de infestaciones con moscas blancas, áfidos y ácaros (Broderick et al. 1997; Bronner et al. 1991; Mayer et al. 1996; van der Westhuizen et al. 1998; Antony & Palaniswani 2006). El incremento en la actividad de estas enzimas está correlacionada con el incremento en estas proteínas, también incrementos en proteínas *PR-2, PR-4* y *PR-10* son detectados (Broderick et al. 1997; Mayer et al. 1996). Al igual que en las interacciones incompatibles de las interacciones planta-patógeno, las proteínas PR y sus actividades se incrementan más rápidamente cuando los insectos se alimentan sobre los genotipos resistentes (Bronner et al. 1991; van der Westhuizen et al. 1998). La alimentación por ninfas de la mosca blanca de invernadero *Trialeurodes vaporarorium* y de *B. tabaci* biotipo B activan las vías dependientes de SA y JA/ET en tomate (Walling 2000), sin embargo los ARNs de los genes PR no se incrementan local ni sistémicamente en respuesta a adultos. Transcritos de genes PR regulados por JA/ET, isoformas vacuolares básicas de 1,3- glucanasa básica, quitinasa básica (*CHIB*), y *PR-1* básico (*PRB1*), se acumulan en tomate, en más altos niveles que los ARNs regulados por SA (1,3- glucanasa ácida, quitinasa ácida, y *PR-1* ácido) (Chao et al. 1999; Walling 2000; van Kan et al. 1995). Antony & Palaniswani (2006) demostraron que la alimentación de *B. tabaci* induce PR con actividades β-1, 3 glucanasa, peroxidasa y quitinasa en yuca, utilizando ensayos colorimétricos para determinación de proteínas totales midiendo la actividad de cada una de estas enzimas en plantas infestadas y sin infestar con *B. tabaci*.

En nuestro estudio fueron aisladas secuencias similares a dos PR: *PRB1* y *PR3 (CHIB)* en sus isoformas básicas. Como se mencionó arriba, su ubicación celular es en la vacuola, lo que sugiere que durante la interacción yuca-*A. socialis* hay actividad de tráfico de proteínas y protones dentro de la célula y entre las organelas y compartimentos celulares. Esto es soportado por el hallazgo de varias secuencias identificadas en los microarreglos, similares a genes que codifican proteínas de transporte en Arabidopsis, (según la base de datos de TAIR),

como el *AVP2* (*Vacuolar H+ pyrophosphatase 2*) involucrado en transporte de protones y ubicado en el aparato de Golgi y en la vacuola; varias proteínas del complejo coatómero y el *VHS domain-containing protein*, implicados en transporte de proteínas intracelulares y transporte mediado por vesículas. La proteína *SCAMP (secretory carrier membrane family protein*) involucradas en tráfico de membranas. La *protein transport Sec23*, que media el transporte de vesículas del Retículo Endoplasmático al aparato de Golgi. La proteína *VPS2.3 (Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein 2.3*), la cual está involucrada en transporte mediado por vesículas. Este gen contiene un dominio *Snf7* que pertenece a una familia involucrada en clasificación y transporte de proteínas del endosoma hacia las vacuolas/lisosomas. Estas organelas juegan un importante papel en la degradación de lípidos y proteínas de la célula, conteniendo numerosas hidrolasas. Como ya se ha visto, durante la interacción yuca-*A. socialis* son sintetizadas proteínas PR, de unión a calcio, de reforzamiento de la pared, de degradación proteica etc. Todo esto muestra que durante el ataque por *A. socialis* la síntesis, procesamiento y transporte de proteínas se aumenta rápidamente, de allí la necesidad de tener controladores de estos procesos como las proteínas mencionadas arriba.

4.2.2.4.2.1 Quitinasa básica (*CHIB* o *PR-3*)

En el presente estudio se aislaron de las librerías sustractivas secuencias similares a PRs como *ATCHIB,* también conocida como Endoquitinasa B ó PR-3 de Arabidopsis. Según GO pertenece a la familia *glycosyl hydrolase 19* y a la subfamilia *Chitinase class I*. Está implicada en defensa contra hongos e insectos, hidrolizando los enlaces (1-4)-beta-D-glucosamina de la quitina de la pared celular de hongos y la matriz peritrófica del intestino de insectos. Se ha visto implicada particularmente en resistencia a patógenos inducida por JA, tales como *A. brassisicola* en Arabidopsis. Está ubicada en la vacuola y está constitutivamente expresada en raíces, donde se encuentra en altos niveles. El ET induce altos niveles de expresión sistémica de esta quitinasa básica y la expresión se incrementa con la edad de la planta. Es inducida local y sistémicamente por JA y patógenos. No es inducida por herida. Esta PR ha sido muy bien caracterizada tanto en su función como en su señalización. El papel de las quitinasas en defensa contra herbívoros no ha sido bien establecido, sin embargo, plantas de tomate transformadas con una quitinasa inducible de *Populus* spp. *WIN6,* mostraron actividad contra

el escarabajo *Leptinotarsa decemlineata* (Lawrence & Novak 2006), posiblemente por acción directa sobre la matriz peritrófica del intestino del insecto. En nuestro estudio *CHIB* fue aislada en la comparación EyESI en el tiempo 3y4, cuando las ninfas en estadío I y II estaban alimentándose sobre yuca. En estos estadíos empieza la mortalidad cuando se alimenta sobre MEcu 72, siendo el estadío de ninfa II el que presenta el mas alto porcentaje de mortalidad (75%) (Gomez 2004). Esa mortalidad podría ser explicada por la acción de esta quitinasa, la cual podría tener un efecto sobre las ninfas similar al caso anterior (actúa sobre la matriz peritrófica del intestino de *A. socialis)*. Puede considerarse como un potencial candidato a gen de defensa efector contra *A. socialis*, a pesar de no haber sido probada aún en insectos floemófagos.

4.2.2.4.2.2 PR-1 básica (*PRB1*)

En las librerías sustractivas también fue aislada una secuencia similar a *AtPRB1* de Arabidopsis, cuyo dominio *SCP_PR-1_like: SCP-like extracellular protein domain* podría tener función endopeptidasa. También tiene un dominio *CRISPs*, una proteína secretora rica en cisteínas y un dominio similar a el alergeno 5 de veneno de avispa. Es acumulada después de la infección con patógenos, y puede actuar como un agente anti-fungal o estar envuelta en pérdida de pared celular. Esta isoforma básica responde a estímulos por JA y ET. La estructura de un miembro de la familia *PR-1* (*PR1-b* de tomate) fue resuelto por resonancia magnética nuclear y se encontró que presenta una arquitectura molecular única. La proteína contiene 4 α-hélices y 4 cadenas β , tienen un arreglo antiparalelo entre las hélices. Esta estructura en forma de sandwich (α−β−α) resulta en una estructura molecular compacta, bipartita, la cual es estabilizada por interacciones hidrofóbicas y múltiples puentes de hidrógeno (Fernández et al. 1997). Esta estructura compacta probablemente determina la alta estabilidad de los PRs y su insensibilidad a las proteasas (Edreva 2005). Hasta ahora se desconoce la función de la familia *PR-1*, la más abundante de los PRs. Se han demostrado con experimentos *in vitro* e *in vivo* los efectos inhibitorios directos de la *PR-1* básica de tomate y miembros de la familia *PR-1* en fríjol contra oomicetos y hongos (*Phytophthora infestans* y *Uromyces fabae*, respectivamente) (Niderman et al. 1995; Rauscher et al. 1999), pero el modo de acción así como también los blancos moleculares y celulares de las proteínas *PR-1* son aún

desconocidos. Estudios filogenéticos de proteínas tipo *PR-1* en varios taxa de plantas, indican que esta familia es altamente conservada en plantas (Van Loon 2001). Más aún, está relacionada a secuencias presentes en levadura, insectos y vertebrados. Las proteínas correspondientes en insectos (mencionado arriba) son el mayor alergeno venenoso dirigido a otro organismo. Se ha especulado que el dominio relacionado con la secuencia en vertebrados, codifica para enzimas líticas y tiene actividad antimicrobial. La amplia ocurrencia de la familia *PR-1* sugiere que estas proteínas comparten un origen evolucionario y poseen actividades esenciales para el funcionamiento y sobrevivencia de los organismos vivientes (Van Loon 2001). Recientemente se encontró que entre los alergenos de plantas identificados, 23% pertenecían al grupo de los PRs. Alergenos derivados de plantas han sido identificados con similaridades a familias PR 2, 3, 4, 5, 10 y 14 (Hoffmann-Sommergruber 2001). Esta propiedad podría conferir funciones defensivas desplegadas por las plantas en ambientes hostiles.

A pesar de no haber sido probado directamente el efecto inhibitorio de estos genes en insectos, es interesante el hecho que se registre su actividad enzimática en plantas de yuca infestadas con *B. tabaci*, como se mencionó en el trabajo de Antony & Palaniswani (2006) y se acumulen en tomate infestado con *B. tabaci*, transcritos de estos genes en los trabajos reportados por Chao et al. (1999), Walling (2000) y van Kan et al. (1995). El hallazgo de las secuencias similares a estos genes y a genes que participan en las vías de señalización que los producen en la librería sustractiva y microarreglos, y el resultado del RT-PCR, nos sugiere que estos genes de defensa son probablemente los implicados en la mortalidad de las ninfas. Además las secuencias fueron aisladas en la comparación EyESI en los tiempos (3y4, 5y6) cuando las ninfas están alimentándose sobre MEcu 72, y que Bellotti & Arias (2001) registraron con un porcentaje tan alto de mortalidad (Figura 33). Además podría explicar la causa de muerte de lo que se observó como "adherida y momificada" por Gomez (2004) (Figura 34).

Tanto en las librerías sustractivas como en los microarreglos se obtuvieron secuencias similares a genes implicados en todos los procesos biológicos del metabolismo de la planta,

sin embargo, es interesante el hecho que algunos de los genes de defensa efectores (*PRB1, CHIB*) solo fueron detectados en las librerías y no en los microarreglos. Esto podría deberse al hecho que las secuencias de ESTs del Cassava Unigene Microarray fueron obtenidas a partir de la interacción yuca-*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (CBB) además de otros genotipos relacionados con contenido de almidón (López et al. 2004). Se conoce que en general los patógenos y los insectos disparan las vías de respuesta relacionadas con SA, JA y ET como se mencionó arriba, pero estas respuestas varían dependiendo del atacante (Vos et al. 2005). Es muy probable que los genes de defensa efectores que finalmente responden al ataque de CBB sean diferentes o pertenezcan a isoformas distintas (*PR-1* y *PR-3* ácidos) mas relacionados con defensa a patógenos, que las que responden al ataque del floemófago *A. socialis* en yuca, a pesar de estar implicadas las mismas vías de señalización, y por esto estas secuencias no se encuentren en el Cassava Unigene Microarray. Todas las secuencias aisladas de las librerías sustractivas y las diferencialmente expresadas en el Cassava Unigene Microarray, de la interacción yuca-*A. socialis* fueron ubicadas en el genoma de yuca, se hizo predicción de los genes y además se diseñaron primers específicos (Rodríguez, comunicación personal) para la posterior validación de estos genes utilizando PCR en tiempo real. Para este tiempo se está adelantando la ubicación y predicción en el genoma de yuca (http://genome.jgi-psf.org/cassava/cassava.home.html) de los ~13000 ESTs que generaron los 5700 unigenes del Cassava Unigene Microarray.

Basado en los resultados obtenidos en el presente trabajo, en la figura 37 se esquematiza la suceción hipotética de eventos que desencadenan la inducción de las vías hormonales de JA y ET, cuando *A. socialis* se desarrolla y se alimenta sobre el genotipo MEcu 72 .

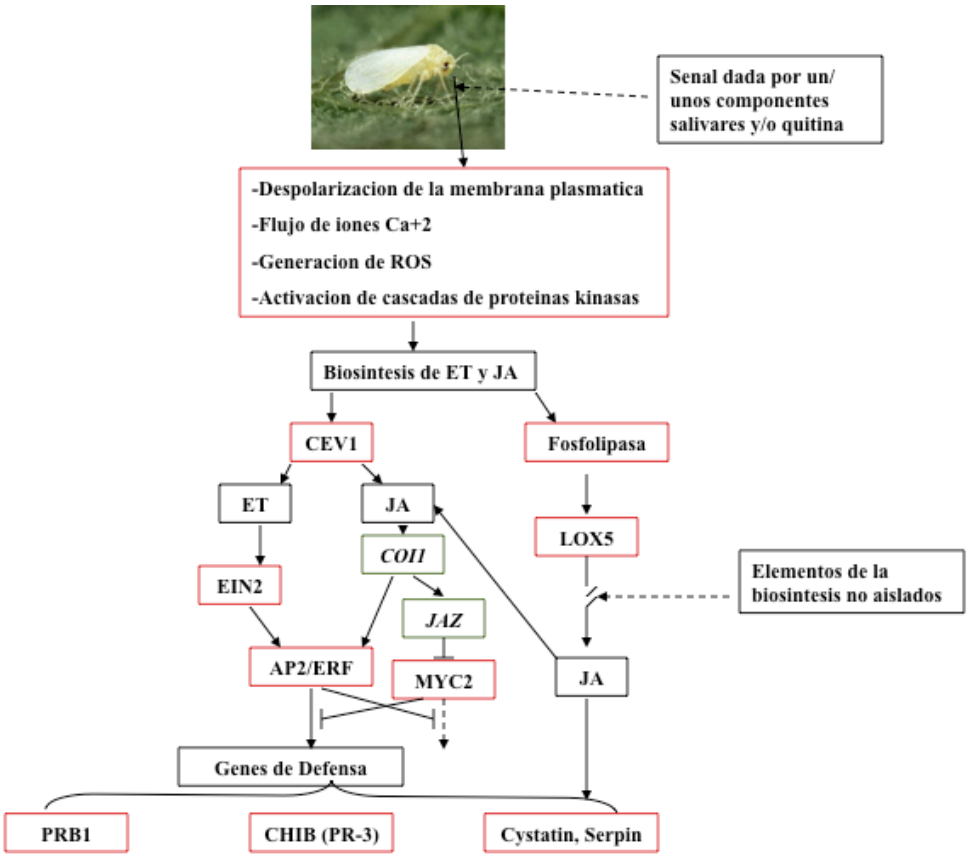


Figura 37. Modelo hipotético del papel de las vías metabólicas JA/ET en la respuesta de defensa de la yuca a *A. socialis.*

Este modelo esta basado en la similaridad de las secuencias encontradas en yuca utilizando librerías sustractivas y Microarreglos, a genes de Arabidopsis analizados funcionalmente (excepto Lectinas en alfalfa y *Cystatin* en tomate). Las casillas rojas corresponden a las secuencias encontradas en la interacción yuca-*A. socialis.* Las flechas indican inducción positiva, las barras indican regulación negativa. *CEV1* (Ellis & Turner, 2001). *LOX5* (Schaller, 2005). *AP2/ERF* (Lorenzo et al, 2002; Pré et al, 2008; Leon-Reyes et al. 2010). *MYC2* (Lorenzo et al. 2004; Chini et al. 2007). *PRB1* (Santamaria et al. 2001). *CHIB* (*PR-3*, Norman-Setterblad et al. 2000; Ellis & Turner, 2001). Lectinas (Navarro-Gochicoa et al. 2003). *Cystatin* (Lison et al. 2006). Las secuencias similares a los genes *COI1* y *JAZ* en casilla verde no fueron aisladas ni significativamente expresadas. En el modelo *JAZ* es un regulador negativo de *MYC2* y este a su vez se regula negativamente con *AP2/ERF* (Chini et al. 2007; Leon-Reyes et al. 2010).

4.2.2.5 *Aleurotrachelus socialis* induce remodelación de pared celular en yuca?

Una característica común entre los perfiles de transcritos estudiados hasta el momento fue la identificación de genes que codifican proteínas que alteran la estructura de la pared celular. Genes que codifican para pectin metilesterasas fueron típicamente inducidos en plantas infestadas con áfidos (Moran et al. 2002; Voelckel et al. 2004; Divol et al. 2005; Qubbaj et al. 2005). En la interacción yuca-*A. socialis* hubo una fuerte inducción de este gen a los 14 y 18 días de infestación cuando los estadíos ninfales I y II estaban alimentándose. También fue aislado de la librería sustractiva EyESI en estos tiempos. La pectinestarasa puede contribuir a la rigidez de la pared celular ensamblando y desensamblando la red de pectina (Willats et al. 2001). También se encontró inducción de genes que codifican celulosa sintasa y expansinas (*CEV1* y *ATEXPA1*) y una proteína *COBRA* que tiene que ver con organización de microfibrillas de celulosa, en tiempos tempranos de la interacción (entre las 5 horas y 7 días post-infestación, cuando son adulto y huevo), y la inducción de genes como *GALT4, caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, proline-rich protein*, muestran claros indicios de modificación estructural de la pared celular, que disuaden la herbivoría por el reforzamiento de barreras que probablemente le impiden o dificultan a la mosca introducir su estilete dentro de los tejidos de la planta.

4.2.2.6 El metabolismo primario de la yuca es influenciado por *A. socialis*

Aún en bajas poblaciones, los floemófagos en general pueden reducir significativamente las tasas fotosintéticas de sus hospederos (Macedo et al. 2003). Los perfiles de transcritos han revelado que la infestación por floemófagos reprime la expresión de genes relacionados con metabolismo de carbohidratos y fotosíntesis, tales como los requeridos para la síntesis de Rubisco (Zhu-Salzman et al. 2004; Voelckel et al. 2004; Qubbaj et al. 2005; Kempema et al. 2007). Respuestas similares son inducidas por insectos con otros tipos de alimentación, esto representa un cambio en la asignación de recursos del crecimiento hacia defensa (Heidel &

Baldwin 2004). Esto va de acuerdo con los resultados obtenidos en la interacción yuca-*A. socialis* en los cuales se observa una clara represión de estos genes (Tablas 6 y 7).

Los floemófagos también modifican los contenidos de agua dentro de la planta, debido a que extraen grandes volúmenes de la savia del floema para obtener adecuadas cantidades de nitrógeno (Douglas 2006). La baja en los niveles de azúcar en los sitios de alimentación del floemófago crean un debilitamiento metabólico induciendo genes envueltos en asimilación y movilización de carbono (Moran & Thompson 2001; Moran et al. 2002; Zhu-Salzman et al. 2004). *A. socialis* regula metabolismo de azúcares y asimilación de carbono con inducción de genes como *G3PDH, Glucose 6 phosphate isomerase*, y *Carbonic Anhydrase 1* (ver tablas 6 y 7), y genes de respuesta estrés osmótico como la prolina oxidasa. La infestación con áfidos reduce el potencial de agua foliar (Cabrera et al. 1994) e inducen genes que codifican para Acuaporinas, proteínas intrínsecas de membrana y otros transcritos asociados con estrés por agua. Es muy probable que *A. socialis* al tener el mismo modo de alimentación ocasione este mismo estrés en yuca, al regular genes de este tipo, como *PIP1A (Plasma membrane intrinsec protein 1A), NIP1;2* (*NOD26-like Intrinsec Protein 1;2)* encontrados en este trabajo (tablas 6 y 7).

Los floemófagos también modifican la asignación del nitrógeno disponible en sus hospederos, compitiendo con la planta y alterando la composición de aminoácidos de la savia del floema (Heidel & Baldwin 2004; Voelckel et al. 2004; Girousse et al. 2005). *A. socialis* indujo y reprimió varios genes relacionados con metabolismo de nitrógeno, *Nitrite transporter* y el *catalytic/glutamate ammonia ligase* y el *NLA (nitrogen limitation adaptation)*. También al igual que los áfidos (Moran et al. 2002; Divol et al. 2005) induce genes que codifican para enzimas requeridas en la síntesis de aminoácidos, como *AK3, Inosine-uridine nucleoside hydrolase, AT-IE phosphoribosyldiphosphatase* envuelto en biosíntesis de histidina (tabla 7). Estas respuestas pueden beneficiar a *A. socialis* al realzar los contenidos de aminoácidos en la savia del floema. Sin embargo, a diferencia de los trabajos de Moran et al. (2002) y Divol et al. (2005) en áfidos, no se observó la inducción de genes requeridos para la síntesis de aminoácidos esenciales como triptófano, lo que sugiere que la

dieta de *A. socialis* puede ser reducida en el contenido de estos aminoácidos y esto puede contribuir al reducido tamaño observado en las ninfas alimentadas sobre el genotipo resistente y al alargamiento de su ciclo de vida (Bellotti & Arias 2001; Gómez 2004). Por esto es necesario con trabajos posteriores, determinar si los cambios inducidos por *A. socialis*, en asimilación y asignación de Carbono y Nitrógeno, inducción de aminoácidos esenciales y el balance de agua contribuyen a la suceptibilidad del hospedero, o la represión es un mecanismo de defensa, o es un mecanismo de la planta para compensar el daño producido por el insecto.

4.2.2.7 Degradación de proteínas en las respuestas de defensa

Las plantas están equipadas con cientos de genes que codifican proteasas y una gran maquinaria proteolítica que irreversiblemente regula el destino de las proteínas. Esta maquinaria generalmente ha sido vista con un papel constitutivo y de mantenimiento celular, que sirve para remover proteínas no-funcionales y libera aminoácidos para reciclaje. Sin embargo, las proteasas también parecen tener un papel clave en la regulación de procesos biológicos en las plantas, tales como el reconocimiento de patógenos y plagas y la inducción de respuestas de defensa efectivas. Indicaciones del papel de las proteasas de plantas en defensa vienen de las observaciones con *subtilisin-like proteases P69* las cuales se acumulan en plantas de tomate infectadas con virus (Tornero et al. 1996), y el incremento de la actividad de la *acidic leucine aminopeptidase (LapA)* durante la alimentación por insectos (Pautot et al. 1993). Asociaciones entre la inducción de genes de proteasas en defensa también han sido encontradas para genes que codifican para metallo, aspártica y cisteína proteasas (Liu et al. 2001). La degradación selectiva de proteínas es un mecanismo empleado para activar una variedad de señales de transducción en plantas superiores (Callis & Vierstra 2000). Esta degradación de proteínas intracelulares se realiza a través del complejo de ubiquitinas presentes en los eucariotas. Las ubiquitinas se unen covalente y específicamente a las proteínas que van a ser destinadas a la degradación a través de una vía dependiente de ATP. Fuertes evidencias sugieren que muchas respuestas a estrés abiótico y resistencia a patógenos son activadas y mediadas por degradación proteica (Ellis et al. 2002; Sun & Callis

1997). El trabajo realizado por Karrer et al. (1998) demuestra que el sistema de ubiquitinas participa en el desarrollo de HR en tabaco.

En los microarreglos de encontraron diferencialemente expresadas dos secuencias que codifican para la poliubiquitina 10 (*UBC10 UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME 10*) y la poliubiquitina 12 (*UBP2 UBIQUITIN SPECIFIC-PROTEASE 2*), y en las librerías sutractivas una *RPN1A (26S Proteasome regulatory subunit S21A). UBQ10* se expresa en respuesta a cambios ambientales (Sun & Callis 1997). *RPN1A* actúa como subunidad reguladora del Proteasoma 26S, el cual está envuelto en la degradación de proteínas ubiquitinadas dependientes de ATP. Es requerido para el crecimiento óptimo de la planta y respuesta a estrés (Wang et al. 2009). El resultado sugiere que el sistema ubiquitina podría estar involucrado en la activación de vías de señalización mediadas por lisis proteica para responder al ataque por *A. socialis.* Probablemente la planta utiliza simultáneamente las vías de señalización mediadas por ROS y la degradación de proteínas por ubiquitinas. Sin embargo, es necesario adicionar a estos análisis genéticos, estudios a nivel post-transcripcional de interacción entre componentes proteicos con el fin identificar sustratos específicos de ubiquitinas y poder comprobar esta hipótesis.

Estudios han mostrado el papel de las proteinasas como un activo mecanismo de defensa en contra del ataque por hongos, virus y bacterias, y la inducción de su expresión en respuesta a estrés abiótico (Liu et al. 2001). Los mecanismos utilizados por las proteinasas para impedir el ataque del patógeno son muy diversos, por ejemplo, la activación de algunas señales de transducción para responder a la infección es trabajo de las ubiquitinas. Sin embargo, la planta puede expresar proteinasas como compuestos antimicrobianos que atacan de manera directa al patógeno, a este grupo pertenecen las proteinasas defensinas como tioninas e inhibidores de proteinasas (PI, discutidas en una sección anterior) que causan lisis a la membrana plasmática de hongos invasores impidiendo su crecimiento (Thomma et al. 2002). Aparte de las defensinas otras proteínas proteolíticas participan en las respuestas de defensa, entre estas están las Metaloproteinasas (Liu et al. 2001). Delorme et al. (2000) clonaron la secuencia completa de ADNc de una metaloproteinasa (*Cs1-MMP*) en pepino (*Cucumis sativus*),

sugirieron que *Cs1-MMP* estaba involucrada en el desarrollo de senescencia y muerte celular programada y que podría participar en la degradación de la matriz extracelular. En el estudio realizado por Liu et al. (2001) proponen que la metaloproteinasa *GmMMP2* aislada en soya está involucrada en un nuevo mecanismo de defensa de la planta en contra de la infección por patógenos. Los niveles de transcripción de *GmMMP2* incrementan rápidamente durante la interacción compatible (desarrollo de la enfermedad) o incompatible (producción de resistencia) con el oomiceto *Phytophthora sojae* y la bacteria *Pseudomonas syringae*, sin embargo *GmMMP2* también se acumula durante el estrés por deshidratación y herida, además su expresión es independiente de la presencia de los SA y JA y no está correlacionada con la inducción de HR. Varias funciones fueron sugeridas para *GmMMP2*: (1) regular indirectamente la biosíntesis de fitoalexinas una proteína relacionada a patogenicidad, (2) liberar una serie de sustancias antimicrobianas que retardan el crecimiento del patógeno y (3) regular vías de señalización diferentes a las reguladas por SA y JA. En la librería sustractiva fueron aisladas secuencias similares a varias Metaloproteinasas. Entre estas están la *EGY2* la cual pertenece a la familia M50, los cuales clivan dominios transmembrana de proteínas sustratos, regulando la proteólisis intramembrana de diversos mecanismos de señales de transducción. Miembros de proteasas de esta familia M50 utilizan su actividad proteolítica dentro de la membrana para transferir información a través de las membranas para integrar la expresión génica con estreses fisiológicos que ocurren en otro compartimiento celular. En células eucariotas ellas regulan procesos tales como metabolismo de lípidos y esteroles y respuestas a estrés en el retículo endoplasmático. Otra secuencia aislada fue la *MATRIX METALLOPROTEINASE*, la cual es responsable de la proteólisis de la matriz extracelular y de las moléculas de la superficie celular, jugando un papel crucial en morfogénesis, migración celular, reparación de tejido y apoptosis entre otros. Esta secuencia fue reportada por Soto (2003) expresándose en la interacción yuca-*Xanthomonas.* Su papel en la interacción yuca-*A. socialis* se desconoce pero esta metaloproteinasa podría cumplir funciones similares a las propuestas para *GmMMP2* en soya, sin embargo, es necesario realizar más experimentos sobre esta proteína para comprobar esta hipótesis.

4.3 Modelo hipótetico propuesto (Figura 38)

Cuando la mosca blanca *A. socialis* se alimenta sobre hojas del genotipo MEcu 72, introduce su estilete y un inductor derivado del insecto (un/unos componentes salivares y/o quitina) son reconocidos por un receptor en la planta. En el caso de la quitina, está comprobado que la familia de factores de transcripción (TF) *AP2/ERF* son inducidos por este oligosacárido componente del exoesqueleto de los insectos. A su vez este TF es inducido por la cascada de señalización que empieza con la despolarización de la membrana plasmática y flujo de iones Ca^{2+}, después son activadas las cascadas de señalización por MAP kinasas y la subsecuente inducción de las vías de fitohormonas como JA/ET. Se ha probado que TF de la familia *AP2/ERF* son los potenciales mediadores del proceso de inducción sinérgica entre JA y ET, los cuales a su vez inducen genes de defensa como las proteínas vacuolares básicas *PRB1, CHIB (PR-3),* ademas de lectinas e inhibidores de proteinasas, los cuales envenenan al insecto, pueden tener como blanco los componentes del intestino del insecto que contienen carbohidratos, inhiben la acción de sus proteasas impidiendo que digieran bien el alimento, muriendo de desnutrición. La respuesta de defensa es compleja y abarca todos los procesos del metabolismo celular, algunos de los cuales en sí mismos pueden ser mecanismos efectores que estén controlando al atacante. Entre estos se encuentra la generación de ROS, la cual produce enzimas que pueden afectar la dieta del insecto o inducir las vías de señalización de fitohormonas mencionadas arriba. La modificación de pared celular, la cual puede dificultar la alimentación del insecto y puede también mediar la respuesta de defensa regulada por JA/ET y por último la maquinaria de degradación proteica en la cual se encuentran diversas proteasas con diferentes papeles algunos implicados en defensa contra patógenos. Al mismo tiempo la planta reprime (flechas punteadas) su metabolismo primario y la fotosíntesis, reasignando los recursos de C y N hacia la defensa.

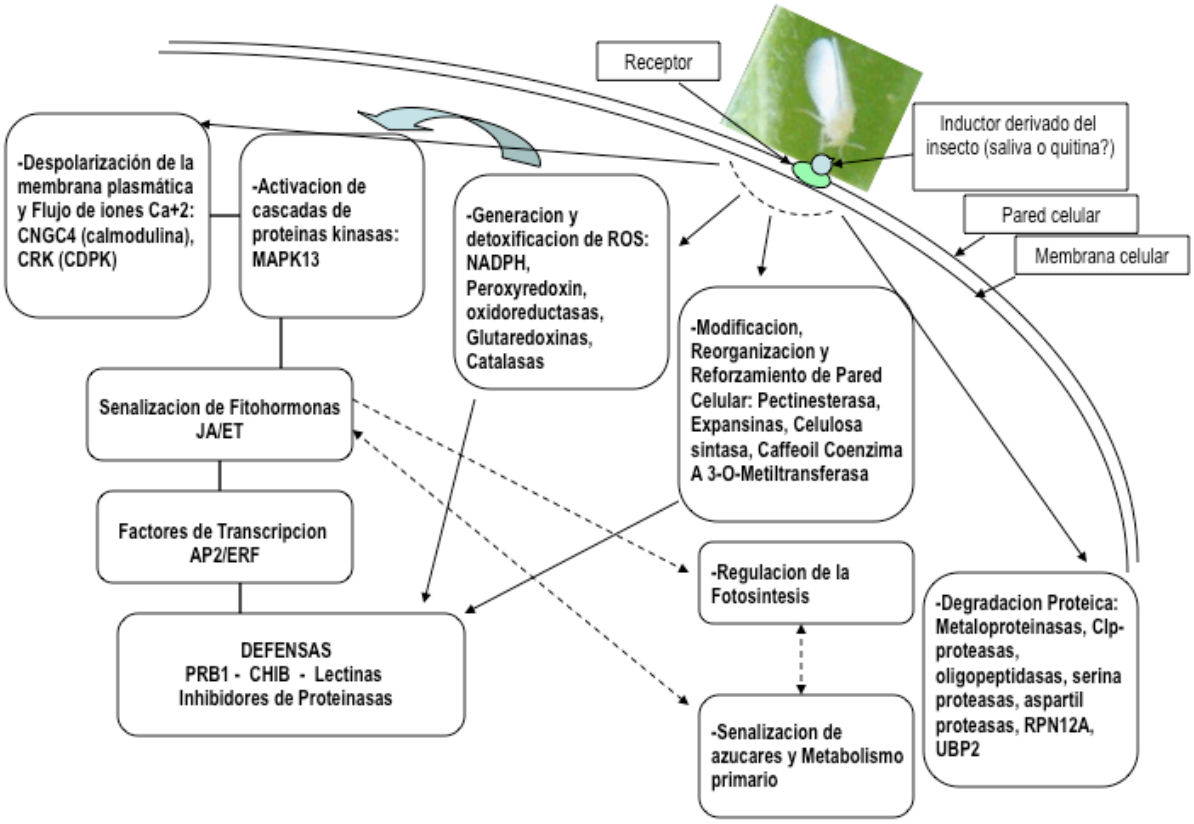


Figura 38. Modelo hipotético de la respuesta de defensa de MEcu 72 cuando es atacada por *A. socialis*, basado en los transcritos aislados en las librerías sustractivas e identificados en los microarreglos.

5 CONCLUSIONES

5.1

En el pasado, las interacciones planta-herbívoro han sido ampliamente estudiadas desde diversas perspectivas de la biología (ecología, entomología, evolución) pero sólo en tiempos recientes se han incorporado estudios de biología molecular que investiguen los mecanismos determinantes en el fenotipo de resistencia. La mayoría de las aproximaciones genómicas sobre estas interacciónes han sido realizados en el ataque de insectos masticadores. Hasta el momento los trabajos de perfiles de expresión en plantas después del ataque por moscas blancas son muy escasos y aunque realizados en la planta modelo Arabidopsis (Kempema et al. 2007) cuyos recursos genómicos son abundantes, el conocimiento que se tiene de estas respuestas de defensa es incompleto. El presente estudio aporta nuevo conocimiento al entendimiento de estas interacciones, en una planta cultivada y de importancia económica, es un sistema de interacción incompatible y real (yuca es un hospedero natural de *A. socialis*) no artificial, ni es una interacción compatible como Arabidopsis-*B. tabaci*. Conocer los cambios en el transcriptoma causados por el ataque de *A. socialis* en el genotipo resistente MEcu 72 constituye una aproximación molecular global que permite acercarnos a los procesos celulares y bioquímicos que conllevan al fenotipo de resistencia. Los microarreglos y la construcción de librerías sustractivas son estrategias rápidas y eficientes para detectar este tipo de alteraciones. En este trabajo se utilizaron estas estrategias para detectar transcritos únicamente expresados en plantas expuestas a *A. socialis* por medio de la eliminación exponencial de secuencias expresadas en común con plantas no infestadas. También se pretendió detectar los transcritos expresados en el genotipo resistente infestado por medio de la eliminación exponencial de secuencias expresadas en común con plantas del genotipo suceptible infestado. Dada la ausencia completa de datos experimentales sobre los procesos fisiológicos, celulares o bioquímicos que se llevan a cabo en la yuca durante su interacción con la mosca blanca, se optó por colectar muestras a través de todo el período en el que, en condiciones naturales, la planta y el insecto permanecen en contacto. El único indicio fenotípico sobre los procesos que median esta interacción consistía en los tiempos en que las ninfas presentan una

mayor mortalidad al alimentarse de la variedad resistente (Arias 1995; Gomez 2004). Debido a que MEcu 72 presenta mecanismos de resistencia tanto de antibiosis (afectación de la biología del insecto), como de antixenosis (afectación de la conducta del insecto, el adulto no prefiere ni alimentarse, ni ovipositar en ese genotipo) se decidió hacer las colectas de tejido de hojas durante todo el ciclo de vida de *A. socialis*, desde adulto hasta ninfa IV. Adicionalmente, la ausencia de una pauta fenotípica en la planta, que indique la ejecución de una respuesta de defensa, como la HR en el ataque de patógenos, nos impidió establecer un rango más pequeño para la colección. Pese al largo período de muestreo (desde las 5 horas hasta 27 dias post-infestación), los resultados indican que la respuesta de la yuca a *A. socialis* incluye elementos que en otros sistemas se expresan en tiempos mucho más cortos, como en áfidos (Zhu-Salzman et al. 2004; De Vos et al. 2005), en los cuales van desde las primeras horas de daño hasta tres días después. Nuestro sistema experimental permitió conocer con exactitud cuantas horas han transcurrido desde que los dos organismos entran en contacto, por tanto la abundancia de secuencias de expresión temprana podría interpretarse como la activación de respuestas de defensa independientes por los múltiples ataques locales de los adultos y de las ninfas en la zona de la hoja donde se ubicó la jaula-pinza, a lo largo del período de infestación. Adicionalmente, es importante notar que la sustracción y los microarreglos fueron realizados a partir de diferentes pools de los ARN correspondientes a los distintos tiempos, lo cual permite realizar consideraciones sobre la cinética de expresión de los elementos aislados en MEcu 72. El diagnóstico de la función proteica por medio de técnicas de genómica funcional, proporciona un vehículo para la comparación de los sistemas metabólicos entre organismos diferentes. La comparación de los elementos aislados en la interacción yuca-*A. socialis* con otros sistemas planta-patógeno y planta-insecto permitieron formular hipótesis acerca de los posibles sucesos que hacen parte de la respuesta de defensa. En el proceso de asignación de funciones putativas en yuca se escogieron secuencias con un umbral exigente de similitud estructural utilizando algoritmos como MEGABLAST, utilizando la base de datos de Arabidopsis (TAIR), además de herramientas de bioinformática que permitieron ubicar las secuencias aisladas y las diferencialmente expresadas en el genoma de yuca (como script de PERL) y que permitieron asignar su función en términos de Gene Ontology, como GOMP. Esta última herramienta particularmente fue de gran utilidad porque permitió la asignación de las funciones a cientos de secuencias de una manera rápida y

eficiente, y a su vez el resultado que arroja para cada secuencia tiene links a varias bases de datos además de TAIR, como KEGG.

Durante la discusión de este capítulo se prestó especial atención a las evidencia de silenciamiento o mutagénesis, con el fin de poder pronosticar el efecto de la ausencia de estos elementos sobre la capacidad de resistencia contra *A. socialis*. La modulación de los elementos que componen las vías de defensa puede suceder tanto por regulación transcripcional como por modificaciones postranscripcionales (p.ej. alteraciones en su concentración, vida media, localización y fosforilación, entre otros); sin embargo, la técnica empleada en este estudio sólo permite aislar secuencias cuya expresión sea inducida durante el fenómeno de resistencia.

5.2

Con las secuencias aisladas de la sustracción y los microarreglos podemos proponer una hipótesis de la manera como el genotipo resistente MEcu 72 responde al ataque de la mosca blanca *Aleurotrachelus socialis*. Es posible que durante la interacción de yuca-*A. socialis*, el reconocimiento se dé a través de un inductor proveniente del insecto, puede ser un/unos componentes de la saliva o un PAMP como la quitina. Receptores en la yuca reconocerían estos inductores y dispararían la respuesta de defensa. Las secuencias que obuvimos nos permiten sugerir la participación de cascadas de MAPK y flujo de iones a través de la membrana plasmática, la generación y detoxificación de ROS, el cual como ya se mencionó, genera productos que pueden actúar como agentes anti-microbianos. Posteriormente la respuesta de defensa sigue con la inducción de biosíntesis de las fitohormonas JA y ET las cuales actúan sinérgicamente y son reguladas y señalizadas corriente arriba por *CEV1* y corriente abajo por factores de transcripción como *AP2/ERF*. Finalmente este factor de transcripción activa los genes de defensa, proteínas relacionadas con patogenicidad como las isoformas básicas de *PR-1* y *PR-3* (quitinasa), así como lectinas. La hormona JA induce la expresión de PI como *Cystatin*, el cual también puede ser uno de los posibles efectores que disminuyen la alimentación de la mosca y finalmente causan su muerte. La remodelación de pared celular surge como potencial respuesta de defensa contra *A. socialis*, además de su

posible papel en mediar esta respuesta regulada por JA/ET (Ellis & Turner 2001). El hallazgo de genes como la celulosa sintasa *CEV1*, las expansinas, la *caffeoyl*, y las pectin metilesterasas apoyan esta hipótesis.

5.3

La estrategia empleada en la sustracción y en los microarreglos, de comparar el genotipo resistente infestado contra el mismo sin infestar, arrojó los mejores resultados, ya que con esta estrategia se encontraron la mayoría de secuencias envueltas en procesos biológicos relacionados con respuesta de defensa, incluidos los genes envueltos en biosíntesis, regulación y señalización de JA y ET. Lo que nos indica que en este estudio estas estrategias genómicas pueden detectar los cambios en la fisiología de la planta ante la alimentación por la mosca y detectan menos los cambios cuando la comparación es a nivel del genotipo (resistente contra el susceptible, ambos infestados).

6 PERSPECTIVAS

6.1 Validación de los genes diferencialmente expresados

Existen varios caminos para validar la expresión diferencial de los genes encontrados en la librería y en los microarreglos. La metodología convencional son los "Northern blots", una técnica ampliamente conocida y aplicada. Se utilizarían ESTs de la librería sustractiva o aquellos identificados con lo microarreglos para hibridarlos contra el ARN total de plantas sanas e infestadas con *A. socialis.* Otro método de validación de la expresión diferencial que requiere menos cantidades de ARN, el cual se ha utilizado ampliamente es el RT-PCR (del inglés, Reverse Transcriptase PCR), en el presente estudio se diseñaron primers específicos para los genes de interés con algunos de los cuales se amplificó por PCR el ADNc sintetizado de plantas infestadas y sin infestar. Ya vimos como en el resultado inicial (Figura 17), los genes de defensa amplificaron sólo en las plantas infestadas con *A. socialis*. También se aplicará la técnica de PCR en tiempo real para validación de estos genes candidatos. Estas técnicas son altamente sensibles y pueden hacerse análisis cuantitativos de forma que sería posible estudiar la expresión de los genes diferencialmente expresados a través tiempo.

6.2 Identificación y caracterización de inductores en la mosca blanca

Aunque los cambios a nivel molecular y fisiológico que ocurren en las interacciones yuca-*A. socialis* están empezando a ser revelados, es claro que nuestro conocimiento de este fenómeno es muy poco. Hasta la fecha, no se conoce si todos los herbívoros inducen una o múltiples respuestas de sus hospederos. Hoy en día es clara la importancia de las proteínas salivares de los hemipteros en inducir o suprimir las respuestas de defensa de las plantas, pero se desconoce la naturaleza bioquímica de los inductores de estos insectos floemófagos. Se podrían emplear tecnologías actuales de proteómica y metabolómica en la caracterización bioquímica de la saliva de moscas blancas, estas tecnologías permitirían la identificación de

los componentes de la saliva que estimulan desórdenes en desarrollo, síntomas de infestación e inducen la resistencia. También se podrían identificar en la planta los receptores de unión a estos inductores provenientes del insecto.

6.3 Identificación y caracterización funcional de la señalización de defensa en la yuca

Complementario a los estudios anteriores, estarían los tendientes a explorar la complejidad de toda la red de señalización de defensa en la planta. Aunque se conoce que existe una oscilación entre las vías reguladas por SA y JA, los mecanismos integrativos con otras vías de señalización durante la interacción planta-insecto no han sido aún identificados. Los enfoques como el de *Systems Biology* que unirían nuestro conocimiento de la señalización de patógenos y plagas, serían críticos para entender las similaridades y distinciones entre patógenos e insectos. Los recursos de genómica hacia las plantas cultivadas ha aumentado en los últimos cinco años después del surgimiento de secuenciadores de segunda generación. Esto ha hecho que la secuenciación de genomas completos sea cada vez mas rápida y económica, como el caso del genoma de yuca. El acceso a tecnologías de última generación como *RNA-sequencing* que son mas precisas y confiables que los microarreglos, podrían revelar la dinámica de la señalización en defensa contra otras especies como *B. tabaci* en yuca. Como complemento a esos recursos genómicos, otros enfoques genéticos, como el uso de mutantes, silenciamiento de genes, estrategias de RNA de interferencia y expresiones ectópicas de productos de genes de defensa, revelarían las redes de señalización y los factores específicos de la resistencia en cultivos como yuca. Estos datos junto con adecuados y coordinados bioensayos que midan la ejecución del insecto sobre la planta, permitirían el desarrollo de estrategias para obtener materiales resistentes a mosca blanca.

6.3.1 Aplicación de genética reversa

Una vez se hayan identificado genes candidatos relacionados con defensa, podrían realizarse estudios para asignar sus funciones, determinar el punto exacto en las cascadas de

señalización en donde son determinantes y reconocer algún tipo de modificación fenotípica en su ausencia (disminución o pérdida de la resistencia). Algunos genes encontrados en las librerías sustractivas y en los microarreglos prometen ser futuros candidatos en estos análisis. Los genes relacionados con patogenicidad *PR-1* y *PR-3*, las lectinas, el gen de la pectinesterasa, la celulosa sintasa *CEV1,* los factores de transcripción *AP2/ERF* y *MYC2* entre otros, pueden ser sometidos a una más detallada caracterización de sus patrones de expresión y asignación de funciones específicas a través de genética reversa. Los recursos de genética reversa pueden resultar muy útiles en estudios futuros para la caracterización funcional de los genes diferencialmente expresados. Aprovechando los avances en transformación genética de yuca, podrían generarse líneas mutantes empleando la técnica de "Knockout". En principio, se realiza una transformación con transposones o secuencias de T-DNA mediada por *Agrobacterium.* Cuando se tiene una población grande de plantas transformadas la probabilidad de que se haya insertado el fragmento en un gen de interés es alta y puede ser medida. Lo que se hace es ejecutar PCR usando primers específicos del gen, el T-DNA o el transposón para identificar la inserción en el gen. Luego deben ser incluido algunos pasos de caracterización y aislamiento de un único mutante (identificación del gen por Southern blot y comprobación de su segregación), finalmente se establece una relación entre el genotipo y fenotipo de líneas mutantes y silvestres. De esta forma puede tenerse el gen aislado y caracterizado, y se pueden realizar sobre él cualquier tipo de comparaciones control v.s tratamiento teniendo en cuenta la línea mutante y las silvestres. Sin embargo, este enfoque aunque representa una gran utilidad y ha sido ampliamente aplicado en plantas modelo como *Arabidopsis,* maíz y arroz es una aplicación a largo plazo en yuca.

6.3.2 Silenciamiento del ARN

Existe, sin embargo, una aplicación de genética reversa que puede llevarse a cabo en mas corto plazo en el estudio de las respuestas de defensa de la yuca. Esta es la técnica de silenciamiento del ARN. En las dos últimas décadas han sido aprovechados los avances en el conocimiento de los procesos de infección por virus en plantas para realizar sofisticados análisis de funciones génicas utilizando técnicas de silenciamiento de ARN (Covey & Al-Kaff

2000; Tijsterman et al. 2002). La infección por virus en plantas activa un mecanismo de defensa mediado por ARN, lo que resulta en una progresiva disminución del virus en las células. Este mecanismo está relacionado con un silenciamiento génico post- transcripcional (SGPT) en el cual, la célula detecta la presencia de ARN de cadena doble (ARNdc) y activa su degradación. No se conocen a ciencia cierta los dcARN específicos que activan SGPT en el proceso de infección por virus. Sin embargo, la activación de SGPT por ARNdc es aprovechada para realizar silenciamiento génico. En principio, se inserta un gen de interés en el virus (por ejemplo, un gen relacionado con defensa), de forma que el ARN cargado al virus puede inducir silenciamiento de genes homólogos a través de SGPT en la célula hospedera. El procedimiento para construir virus vector ha sido ampliamente estudiado (Tijsterman et al, 2002). Angell & Baulcombe (1997) emplearon un VIGS (del inglés, virus-induced gene silencing) para hacer silenciamiento en papa, la producción de VIGS para estudiar la función de genes que han sido secuenciados pero no caracterizados ha sido muy empleada en los últimos años. La utilización de VIGS a corto plazo para realizar estudios de silenciamiento de genes que responden al ataque de *A. socialis* en yuca es una alternativa bastante posible actualmente. Podrían seleccionarse (después de realizar la respectiva validación) algunos clones diferencialmente expresados hallados en la librería sustractiva o en los microarreglos, se podría como primera medida enfocar el estudio en los factores de transcripción ya que es probable que estén regulando genes corriente abajo en las cascadas de señalización que generan la respuesta de defensa, convirtiéndolos en candidatos determinantes para realizar estudios de silenciamiento.

6.3.3 Identificación de marcadores moleculares y construcción de mapas genéticos

Para revelar los mecanismos genéticos de la resistencia a mosca blanca en yuca se utilizaría mapeo de QTLs y mapeo por asociación. Ya se ha establecido en campo una población F1 segregante, de mapeo para la resistencia a mosca blanca. Datos fenotípicos y genotípicos de esta población sería usado para identificar QTLs que confieren resistencia a mosca blanca. Con el conjunto de genes encontrado en el presente trabajo, se pretende identificar marcadores de tipo SSR (microsatélites) y SNP (single-nucleotide polymorphism,

polimorfismos de un solo nucleótido). En CIAT existe la plataforma para desarrollar este tipo de tecnologías ya que se cuenta con el BeadXpress® de ILLUMINA. Con estos marcadores se pretende construir un mapa de ligamiento robusto de 10-cM. Este mapa permitiría utilizar software de QTLs para determinar la ubicación de los genes implicados en la resistencia a mosca blanca y encontrar marcadores asociados a esta resistencia. Estos marcadores podrían ser utilizados para buscar en otras variedades y especies silvestres relacionadas con yuca, potenciales materiales para mejoramiento. Estos marcadores también podrían ser utilizados en programas de mejoramiento en selección asistida por marcadores (SAM) para obtener variedades de yuca agronómicamente mejoradas con resistencia a mosca blanca.

6.3.4 Transformación genética

Evidentemente, uno de los objetivos a alcanzar con el estudio de las bases moleculares del cultivo de la yuca es conseguir su mejoramiento a través de la transformación genética. Aprovechando los avances recientes en este campo para el cultivo, una vez se hayan identificado, usando las herramientas de la genómica funcional, genes candidatos determinantes en las respuestas de defensa de yuca, pueden ser utilizados para producir variedades transformadas y evaluar su comportamiento en campo.

La aplicación de genómica funcional en el estudio de las respuestas de defensa de la yuca abre una amplia gama de futuras aplicaciones a diferentes niveles, tanto *in silico* como experimental. Análisis de la expresión génica, construcción de mapas físicos y genéticos, análisis de secuencias genómicas, silenciamiento de genes y producción de organismos genéticamente modificados, son algunos de los proyectos que podrán se desarrollados en un futuro.

BIBLIOGRAFÍA

Adie B, Chico JM, Rubio-Somoza I, Solano R. 2007. Modulation of plant defenses by ethylene. J. Plant Growth Regul. 26:160-177.

Aharoni A, Jongsma MA, Bouwmeester HJ. 2005. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends Plant Sci*. 10:594–602

Alborn HT, Turlings TCJ, Jones TH, Stenhagen G, Loughrin JH, and Tumlinson JH. 1997. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science* 276:945-949

Alborn HT, Brennan EB, Tumlinson JH. 2003. Differential activity and degradation of plant volatile elicitors in regurgitant of tobacco hornworm (*Manduca sexta)* larvae. *J. Chem. Ecol*. 29:1357–72

Alborn HT, Hansen TV, Jones TH, Bennett DC, Tumlinson JH, et al. 2007. Novel disulfoxy fatty acids from the American bird grasshopper *Shistocerca americana* elicitors of plant volatiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 104:12976–81

Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR. 1999. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. Science 284: 2148–2152

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local Alignment Search Tool. *Journal Molecular Biology*. Vol. 215. No. 3: 403-410

Alvarez-Alfageme F, Martinez M, Pascual-Ruiz S, Castanera P, Diaz I, Ortego F. 2007. "Effects of potato plants expressing a barley cystatin on the predatory bug Podisus maculiventris via herbivorous prey feeding on the plant". Transgenic research. 16(1):1-13

Amirhusin B, Shade RE, Koiwa H, Hasegawa PM, Bressan RA, et al. 2007. Protease inhibitors from several classes work synergistically against *Callosobruchus maculatus. J. Insect Physiol.* 53:734–40

Antony B, & Palaniswani MS. 2006. *Bemisia tabaci* feeding induces Pathogenesis-Related proteins in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Indian Journal of Biochemistry & Biophysics. Vol. 43. Pp. 182-185.

Apel K, & Hirt H. 2004. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. Annu. Rev. Plant Biol. 55:373–99

Arias B. 1995. Estudio sobre el comportamiento de la mosca blanca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homóptera: *Aleyrodidae*) en diferentes genotipos de yuca *Manihot esculenta* Crantz. Tesis (Maestría en fitomejoramiénto). Universidad Nacional de Colombia, Palmira, CO. 181 p

Arias B, & Guerrero JM. 2000. Control de plagas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) por resistencia varietal. *In*: Simposio Avances en el Manejo de Plagas. Congreso Sociedad Colombiana de Entomología (27, 2000, Medellín Colombia). Memorias. Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN), Bogotá, CO. p. 243-259

Arimura G, Ozawa R, Shimoda T, Nishioka T, Boland W, Takabayashi J. 2000. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature* 406:512– 15

Arimura G, Huber DP, Bohlmann J. 2004. Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *deltoides*): cDNA cloning, functional characterization, and patterns of gene expression of (-)-germacrene D synthase, PtdTPS1. *Plant J.* 37:603–16

Atkinson HJ, Greenwood S, Johnston K, Gren J. 2004. Prototype demonstration transgenic resistant to the nematode Radopholus similis conferred on banana by a Cystatin. Transgenic Res. 13, 135-142

Balagopalan C. 2002. Cassava utilization in food, feed and industry. In: Hillocks JM, Thresh JM, Bellotti AC (eds) Cassava: Biology, Production and Utilization. CABI Publishing, Oxon, UK, pp 301-318

Balagué C, Lin B, Alcon C, Flottes G, Malmström S, Köhler C, Neuhaus G, Pelletier G, Gaymard F, Roby D. 2003. HLM1, an Essential Signaling Component in the Hypersensitive Response, Is a Member of the Cyclic Nucleotide–Gated Channel Ion Channel Family. The Plant Cell, Vol. 15, 365–379

Baldwin IT. 1998. Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 95:8113–18

Barre A, Herve C, Lescure B, Rouge P. 2002. Lectin receptor kinases in plants. Crit Rev Plant Sci 21: 379–399

Batista R, & Oliveira MM. 2009. Facts and fiction of genetically engineered food. *Trends in Biotechnology* 27: 277-286

Baxevanis AD. 2003. The Molecular Biology Database Collection: update. *Nucleic Acids Research*. Vol. 31. No. 1:1-12

Bayes A, Comellas-Bigler M, de la Vega MR, Maskos K, Bode W, et al. 2005. Structural basis of the resistance of an insect carboxypeptidase to plant protease inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 102:16602–7

Becerra JX. 2007. The impact of herbivore-plant coevolution on plant community structure. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 104:7483–88

Belenghi B, Acconcia F, Trovato M, Perazzolli M, Bocedi A, Poticelli F, Ascenzi P, Delledonne M. 2003. AtCYS1, a cystatin from Arabidopsis thaliana, suppresses hypersensitive cell death. Eur J Biochem, 270:2593-2604.

Bellotti AC, & Arias B. 2001. Host plant resistance to whiteflies with emphasis on cassava as a case study. *Crop Protection* 20:813-823

Bellotti AC. 2002. Arthropod pests. In "Cassava: Biology, Production and Utilization" (Eds. R.J Hillocks, J.M. Thresh and A.C. Bellotti). *CAB International* 2002. 209-235

Bellotti AC, Arias B, Vargas O, Reyes J, Guerrero JM. 2002. Insectos y Acaros dañinos a la yuca y su control. *In*: Ospina, B.; Ceballos, H. (eds.). La yuca en el tercer milenio. Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. p. 160-203

Bellotti AC, & Vargas O. 1986. Mosca blanca del cultivo de la yuca: Biología y control [Conjunto Audiotutorial]. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, CO. Diapositivas (color) + Guia de estudio

Bellotti AC, Smith L, Lapointe SL. 1999. Recent advances in cassava pest management. *Annual Review of Entomology* 44: 343-370

Bellotti AC, & Riis L. 1994. Cassava cyanogenic potential and resistance to pest and disease. *In:* International Workshop on cassava safety, Ibadan, Nigeria, marzo 1994. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 141-151

Bellotti AC, & Schoonhoven A.van. 1978. Mite and insect pests of cassava. *Annual Review of Entomology* 23(1): 39-67

Bi JL, & Felton GW. 1995. Foliar oxidative stress and insect herbivory: primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. J Chem Ecol 21: 1511–1530

Birkenmeier GF, & Ryan CA. 1998. Wound signaling in tomato plants: evi- dence that ABA is not a primary signal for defense gene activation. Plant Physiol 117: 687–693

Blair MW, Fregene MA, Beebe SE, Ceballos H. 2007. Marker-assisted selection in common beans and cassava. Marker-assisted selection: current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome: 81-115

Borror DJ, Triplehorn CA, Jhonson NF. 1992. An introduction to the study of insects. Harcourt Brace College Publishers. Sixth edition. Philadelphia (U.S.A) 825 p

Bostock RM. 1999. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. Physiol. Mol. Plant Pathol. 55:99-109.

Bostock RM. 2005. Signal Crosstalk and Induced Resistance: Straddling the Line Between Cost and Benefit. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:545–80

Bouchez D, & Hofte H. 1998. Functional Genomics in Plants. *Plant Physiology*. Vol. 118: 725-732

Boughton AJ, Hoover K, Felton GW. 2005. Methyl jasmonate application induces in- creased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum. J. Chem. Ecol.* 31:2211–16

Broderick K, Pittock C, Arioli T, Creaser EH, Weinman JJ, Rolfe BG. 1997. Pathogenesis-related proteins in Trifolium subterra- neum: A general survey and subsequent characterization of a protein inducible by ethephon and redlegged earth mite attack. Aust J Plant Physiol 24:819–829.

Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Osborn RW. 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. Plant Physiol 108: 1353–1358

Bronner R, Westphal E, Dreger F. 1989. Chitosan, a component of the compatible interaction between Solanum dulcamara L. and the gall mite Eriophyes cladophthirus Nal. Physiol Mol Plant Path 34:117–130.

Bronner R, Westphal E, Dreger F. 1991. Pathogenesis-related proteins in Solanum ducamara L. resistant to the gall mite Aceria caldophthirus (Nalepa) (syn Eriphyes cladophthirus Nal.). Physiol Mol Plant Path 38:93–104.

Brookes G, & Barfoot P. 2006. Global impact of biotech crops: Socio-economic and environmental effects in the first ten years or commercial use. *AgBioForum* 9: 131-151

Brown SM. 2000. Bioinformatics, A Biologist's Guide to Biocomputing and the Internet. A BioTechniques Books Publication. Eaton Publishing

Burow M, Muller R, Gershenzon J, Wittstock U. 2006. Altered glucosinolate hydrolysis in genetically engineered *Arabidopsis thaliana* and its influence on the larval development of *Spodoptera littoralis*. *J. Chem. Ecol*. 32:2333–49

Butler NS, Vir BK, Kaur G, Singh TH, Raheja RK. 1992. Bichemical basis of resistance to whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) in cotton. Trop. Agric. 69: 119-122.

Caballero R. 1992. Whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) from Central America and Colombia including slid–mounted pupal and field keys for identification, natural enemies and economic importance. Tesis (maestría). Kansas State University. Manhatan. USA. 200 p

Cabrera HM, Argandona VH, Corcuera LJ. 1994. Metabolic changes in barley seedlings at different aphid infestation levels. Phytochemistry 35: 317–319

Calatayud PA, Boher B, Nicole M, Geiger JP. 1996. Interactions between cassava mealybug and cassava: Cytochemical aspects of plant cell wal modifications. *Entomología experimentalis et applicata* 80: 242-245

Calatayud PA, & Munera DF. 2002. Defensas naturales de la yuca a las plagas de artrópodos. *In*: Ospina, B.; Ceballos, H. (eds.). La yuca en el tercer milenio. Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. p. 250-254

Callis J, & Vierstra RD. 2000. Protein degradation in signaling. Current Opinion in Plant Biology. Vol. 3. No. 5:381-386.

Callow M, Dudoit S, Gong EL, Speed TP, Rubin EM. 2000. Microarray Expression Profiling Identifies Genes with Altered Expression in HDL-Deficient Mice. *Genome Research*. Vol. 10: 2022-2029

Castaño O, Bellotti AC, Vargas O. 1985. Efecto del HCN y de cultivos intercalados sobre el daño cusado por la chinche de la viruela *Cyrtomenus bergi* Froeschner al cultivos de la yuca. *Revista Colombiana de Entomologia* 11(2): 24-26

Castillo J. 1996. Moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) y sus enemigos naturales sobre cultivos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en Colombia. Tesis (maestría) Universidad del Valle, Cali, CO. 174 p

Castrillón CE, & Perlaza JF. 2000. Caracterización del microclima de un invernadero y un cuarto de crecimiento (Area biotecnología) en el CIAT, mediante técnicas de instrumentación. Tesis (Ingeniería Electrónica). Universidad del Valle, Santiago de Cali, Co. 398 p.

Ceballos H, Iglesias CA, Perez JC, Dixon AGO. 2004. Cassava breeding: opportunities and challenges. *Plant Molecular Biology* 56: 503-516

Chamnongpol S, Willekens H, Moeder W, Langebartels C, Sandermann H, Van Montagu M, Inze D, Van Camp W. 1998. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H2O2 in transgenic tobacco. Proceedings of the National Academy of Science USA. Vol. 95. No.10: 5818-23.

Chang S, Puryear J, Cairney J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Molecular Biology Reporter 11: 113-116

Chao WS, Gu Y-Q, Pautot V, Bray EA, Walling LL. 1999. Leucine aminopeptidase RNAs, proteins and activities increase in re- sponse to water deficit, salinity and the wound signals—systemin, methyl jasmonate, and abscisic acid. Plant Physiol 120:979–992.

Chen H, Wilkerson CG, Kuchar JA, Phinney BS, Howe GA. 2005. Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 102:19237–42

Chen H, Gonzales-Vigil E, Wilkerson CG, Howe GA. 2007. Stability of plant defense proteins in the gut of insect herbivores. *Plant Physiol.* 143:1954–67

Chen MS. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science* 15: 101-114

Chini A, Fonseca S, Fernández G, Adie B, Chico JM. et al. 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448:666–71

Clouse SD, & Sasse JM. 1998. BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology. Vol. 49: 427–451.

Cock JM, Vanoosthuyse V, Gaude T. 2002. Receptor kinase signalling in plants and animals: distinct molecular systems with mechanistic similarities. Curr Opin Cell Biol 14: 230–236

Conn EE. 1980. Cyanogenic compounds. *Annual Review of Plant Physiology* 31: 433-451

Constabel CP, Bergey DR, Ryan CA. 1995. Systemin activates synthesis of wound- inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. P*roc. Natl. Acad. Sci.* USA 92:407–1

Cosgrove DJ. 2000. Expansive growth of plant cell walls. Plant Physiology and Biochemistry. Vol. 38. No. 1-2: 109-24.

Creelman RA, & Mullet JE. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48: 355–381

Creelman RA, & Rao MV. 2002. The oxylipin pathway in *Arabidopsis*. In *The Arabidopsis Book*, edited by Somerville, C. R. & Meyerowitz, E. M.

CPG. 2009. Cassava Genome Project. http://www.phytozome.net/cassava

Cui JP, Jander G, Racki LR, Kim PD, Pierce NE, Ausubel FM. 2002. Signals involved in Arabidopsis resistance to *Trichoplusia ni* caterpillars induced by virulent and avirulent strains of the phytopathogen *Pseudomonas syringae. Plant Physiol.* 129:551–64

Cui X, & Churchill GA. 2003. Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biology*. Vol. 4: 210.1-210.10

Cunnea PM, Miranda-Vizuete A, Bertoli G, Simmen T, Damdimopoulos AE, Hermann S, Leinonen S, Huikko MP, Gustafsson JA, Sitia R, Spyrou G. 2003. ERdj5, an endoplasmic reticulum (ER)-resident protein containing DnaJ and thioredoxin domains, is expressed in secretory cells or following ER stress. Journal in Biological Chemistry. Vol. 278. No. 2: 1059-1066.

Dalton R. 2006. Whitefly infestations - The Christmas invasion. *Nature* 443: 898-900

Dangl JL, & Jones JDG. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.* Vol. 411: 826–833

Day RB, Okada M, Ito Y, Tsukada K, Zaghouani H, Shibuya N, Stacey G. 2001. Binding site for chitin oligosaccharides in the soy- bean plasma membrane. Plant Physiol. 126:1162-1173.

Dayhoff MO, Schwartz RM, Orcutt BC. 1978. A model of evolutionary change in proteins, p. 345-352. *In* M.O. Dayhoff (Ed.), Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, Washington DC

DeFalco DA, Bender KW, Snedden WA. 2010. Breaking the code: Ca2+ sensors in plant signalling. Biochem. J. 425, 27–40

Delorme VG, McCabe PF, Kim DJ, Leaver CJ. 2000. A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumbe. Plant Physiology. Vol. 123. No. 3: 917- 927.

De Moraes CM, Mescher MC, Tumlinson JH. 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* 410:577–80

De Vos M, Van Oosten VR, Van Poecke RMP, Van Pelt JA, Pozo MJ. 2005. Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:923–37

De Ponti OMB, Romanow LR, Berlinger MJ. 1990. Whitefly plant relationships: plant resistance. In: Gerling, D. (Ed.), Whiteflies: Their Bionomics. Pest Status and Management. Intercept Ltd., Andover, Reino Unido. 348 p.

DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. 1997. Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene expression on a Genomic Scale. *Science*. Vol. 278: 680-686

Devoto A, Ellis C, Magusin A, Chang HS, Chilcott C. 2005. Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol. Biol*. 58:497–513

Devoto A, & Turner JG. 2005. Jasmonate-regulated Arabidopsis stress signalling network. *Physiol. Plant*. 123:161–72

Diatchenko L, Chris Lau Y, Campbell A, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov E. 1996. Supression Subtractive Hybridization: A method for generating differentiallly regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. 93: 6025-6030

Divol F, Vilaine F, Thibivilliers S, Amselem J, Palauqui J-C, Kusiak C, Dinant S. 2005. Systemic response to aphid infestation by Myzus persicae in the phloem of Apium graveolens. Plant Molecular Biology 57:517–540

Dixon AGO, & Ssemakula G. 2008. Prospects for cassava breeding in Sub-Saharan Africa in the next decade. *Journal of Food Agriculture & Environment* 6: 256-262

Doerge RW. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat Rev Genet* 3 (1):43-52

Dogimont C, Bendahmane A, Pitrat M, Burget-Bigeard E, Hagen L. 2007. U.S. Patent No. 20,070,016,977

Dombrecht B, Xue GP, Sprague SJ, Kirkegaard JA, Ross JJ, Reid JB, Fitt GP, Sewelam N, Schenk PM, Manners JM, Kazan K. 2007. MYC2 Differentially Modulates Diverse Jasmonate-Dependent Functions in Arabidopsis. The Plant Cell, Vol. 19: 2225–2245

Douglas AE. 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria Buchnera. Annu Rev Entomol 43:17–37.

Douglas AE. 2006. Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. Journal of Experimental Botany 57, 747–754.

Dudoit S, Yang YH, Callow MJ, Speed, T. 2000. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. Technical Report 2000, Statistics Dept., Univ. of California, Berkeley.

Duggan D, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent J. 1999. Expression Profiling using cDNA microarrays. *Nature genetics supplement*. Vol. 21: 10-14

Edreva A. 2005. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. GEN. APPL. PLANT PHYSIOLOGY, 31(1-2), 105-124

Eke-Okoro ON, Njoku DN, Madu A, Ezulike TO. 2009. Impact of global warming and crop factors on the growth and productivity of four cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars in Nigeria. *Scientific Research and Essays* 4: 955-960

Ellis C, & Turner JG. 2001. The Arabidopsis Mutant *cev1* has Constitutively Active Jasmonate and Ethylene Signal Pathways and Enhanced Resistance to Pathogens. The Plant Cell, Vol. 13, 1025-1033.

Ellis C, Karafyllidis I, Turner JG. 2002. Constitutive activation of jasmonate signaling in an Arabidopsis mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum, Pseudomonas syringae,* and *Myzus persicae. Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:1025–30

Engelberth J, Alborn HT, Schmelz EA, Tumlinson JH. 2004. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 101:1781–85

Fan J, Wang H, Feng D, Liu B, Liu H, Wang J. 2007. Molecular Characterization of Plantain Class I Chitinase Gene and its Expression in Response to Infection by *Gloeosporium musarum* Cke and Massee and other Abiotic Stimuli J Biochem 142(5): 561-570

FAO. 2010. Climate change and transboundary pests and diseases. www.fao.org/foodclimate

Farias ARN. 1994. Fluctuacão poblacional de *Aleurothrixus aepim* en mandioca, em São Miguel das Matas, Bahia (Brasil). *Rev. Bras. de Mandioca.* 13(2): 119-22

Farmer EE, & Ryan CA. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4 (2):129-134.

Felton GW, Bi JL, Summers CB, Mueller AJ, Duffey SS. 1994. Potential role of lipoxygenases in defense against insect herbivory. *J. Chem. Ecol*. 20:651–66

Fernández C, Szyperski T, Bruyère T, Ramage P, Mösinger E, Wütrich K, 1997. NMR solution structure of the pathogenesis-related protein p14a. J. Mol. Biol., 266, 576- 593.

Ferreira CF, Alves E, Pestana KN, Junghans DT, Kobayashi AK, Santos VD, Silva RP, Silva PH, Soares E, Fukuda W. 2008. Molecular characterization of Cassava with yellow-orange roots for beta-carotene improvement. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 8: 23-29

Fitches E, & Gatehouse JA. 1998. A comparison of the short and long term effects of insecticidal lectins on the activities of soluble and brush border enzymes of tomato moth larvae (Lacanobia oleracea). J Insect Physiol 44: 1213–1224

Fluhr R. 2001. Sentinels of disease. Plant resistance genes. *Plant Physiol* 127 (4): 1367- 1374

Fregene M, Angel F, Gomez R, Rodriguez F, Chavarriaga P, Roca W, Tohme J, Bonierbale M. 1997. A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theoretical and Applied Genetics*. Vol. 95. No. 3: 431-441

Frey M, Chomet P, Glawischnig E, Stettner C, Grun S. 1997. Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science* 277:696–99

Frost CJ, Appel HM, Carlson JE, De Moraes CM, Mescher MC, Schultz JC. 2007. Within-plant signalling via volatiles overcomes vascular constraints on systemic signalling and primes responses against herbivores. *Ecol. Lett.* 10:490–98

Gao LL, Anderson JP, Klingler JP, Nair RM, Edwards OR, Singh KB. 2007. Involvement of the octadecanoid pathway in bluegreen aphid resistance in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 82-93

Gao LL, Kamphuis LG, Kakar K, Edwards OR, Udvardi MK, Singh KB. 2010. Identification of potential early regulators of aphid resistance in Medicago truncatula via transcription factor expression profiling. New Phytologist 186: 980-994

Gatehouse JA. 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytol.* 156:145–69

Gatehouse JA. 2008. Biotechnological Prospects for Engineering Insect-Resistant Plants. *Plant Physiol.* 146: 881-887

Gill JR. 1990. The morphology of whiteflies in: Whiteflies their bionomics, pest status and management. Ed. Don Gerling. Departament of Zoology, the George S. Wise Faculty of Life Science. Tel Aviv University, Israel

Giri AP, Harsulkar AM, Deshpande VV, Sainani MN, Gupta VS, Ranjekar PK. 1998. Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinases. *Plant Physiol*. 116:393–401

Giri AP, Wunsche H, Mitra S, Zavala JA, Muck A. et al. 2006. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata.* VII. Changes in the plant's proteome. *Plant Physiol.* 142:1621–41

Girousse C, Moulia B, Silk W, Bonnemain JL. 2005. Aphid infestation causes different changes in carbon and nitrogen allocation in alfalfa stems as well as different inhibitions of longitudinal and radial expansion. Plant Physiology 137, 1474–1484.

Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*. 43:205–27

Gold CS. 1987. The morfology of whiteflies in: Whiteflies their bionomics, pest status and management. Ed. Don Gerling. Departament of Zoology, the George S. Wise Faculty of Life Science. Tel Aviv University, Israel

Gomez MJ. 2004. Caracterización de la resistencia a la mosca blanca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) en genotipos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia, Palmira. 103 p

Grant JJ, & Loake GJ. 2000. Role of Reactive Oxygen Intermediates and Cognate Redox Sinaling in Disease Resistance. Plant Physiology. Vol. 124: 21–29.

Green TR, & Ryan CA. 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* 175:776–77

Guo H, & Ecker JR. 2003. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. Cell 115: 667–677.

Gurskaya NG, Diachenko L, Chenchik A, Siebert PD, Khaspekov GL, Lukyanov K, Vagner LL, Ermolaeva OD, Lukyanov S, Sverdlov ED. 1996. The Equalizing cDNA Subtraction Based on Selective Suppression of Polymerase Chain Reaction: Cloning of the Jurkat Cells' Transcripts Induced by Phytohemaglutinin and Phorbol 12-myristate 13-acetate. Anal. Biochem. 240(1): 90-97. / PMID:8811883

Gutterson N & Reuber TL. 2004. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. Curr. Opin. Plant Biol. 7: 465–471.

Halitschke R, Schittko U, Pohnert G, Boland W, Baldwin IT. 2001. Molecular interac- tions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata.* III. Fatty acid-amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore-specific plant responses. *Plant Physiol*. 125:711–17

Halitschke R, Gase K, Hui D, Schmidt DD, Baldwin IT. 2003. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natu- ral host *Nicotiana attenuata.* VI. Microarray analysis reveals that most herbivore-specific transcriptional changes are mediated by fatty acid-amino acid conjugates. *Plant Physiol.* 131:1894–902

Halkier BA, & Gershenzon J. 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu.Rev. Plant Biol*. 57:303–33

Hamel LP, Nicole MC, Sritubtim S, Morency MJ, Ellis M. et al. 2006. Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends Plant Sci.* 11:192–98

Hammond-Kosack KE, & Jones JD. 1996. Plant disease resistence genes. *Annu Rev Plant Physiol* 48:575-607

Hammond-Kosack K, & Jones JDG. 2000. Responses to plant pathogens. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, eds. BB Buchanan, W Gruissem, RL Jones. pp. 1102–156. Rockville, MD: Am. Soc. Plant Physiol.

Hammond-Kosack KE, & Parker JE. 2003. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. Curr Opin Biotechnol 14: 177–193

Hardie J, Isaacs R, Pickett JA, Wadhams LJ, Woodcock CM. 1994. Methyl salicylate and (-)-(1R,5S)-myrtenal are plant-derived repellents for black bean aphid, Aphis fabae Scop. (Homoptera: Aphididae). J Chem Ecol 20:2847–2855.

Harfouche AL, Shivaji R, Stocker R, Williams PW, Luthe DS. 2006. Ethylene signaling mediates a maize defense response to insect herbivory. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:189–99

Harrington CA, Rosenow C, Retief J. 2000. Monitoring genes expression using DNA microarrays. *Current Opinion in Microbiology*. Vol. 3: 285-291

Harter C, Pavel J, Coccia F, Draken E, Wegehingel S, Tschochner H, Wieland F. 1996. Nonclathrin coat protein gamma, a subunit of coatomer, binds to the cytoplasmic dilysine motif of membrane proteins of the early secretory pathway. Proceedings of the National Academy of Science USA. Vol. 93. No. : 1902- 1906.

Hatfield GW, Hung S, Baldi P. 2003. Differential analysis of DNA microarrays gene expression data. *Molecular Microbiology*. Vol. 47. No. 4: 871-877

Hatzfeld Y, Maruyama A, Schmidt A, Noji M, Ishizawa K, Saito K. 2000. ß-Cyanoalanine Synthase Is a Mitochondrial Cysteine Synthase-Like Protein in Spinach and Arabidopsis. *Plant Physiology*, July, Vol. 123, pp. 1163–1171

Heath MC. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44: 321–334

Heidel AJ, & Baldwin IT. 2004. Microarray analysis of salicylic acid- and jasmonic acid-signalling in responses of *Nicotiana attenuata* to attack by insects from multiple feeding guilds. *Plant Cell Environ.* 27:1362–73

Heinz KM, & Zalom FG. 1995. Variation in trichome-based resistance to *Bemisia argentifolli* (Homoptera: Aleyrodidae) oviposition on tomatoes. *J. Econ. Entomol.* 88: 1494-1502

Henikoff S, & Henikoff JG. 1993. Performance evaluation of amino acid substitution matrices proteins: *Structure, Function Genetics*. *17*:49-61

Herms DA, & Mattson WJ. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Q. Rev. Biol*. 67:283–335

Hermsmeier D, Schittko U, Baldwin IT. 2001. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*: large-scale changes in the accumulation of growth and defense-related plant mRNAs. Plant Physiol 125: 683–700

Herve C, Dabos P, Galaud JP, Rouge P, Lescure B. 1996. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* gene that defines a new class of putative plant receptor kinases with an extracellular lectin-like domain. J Mol Biol 258: 778–788

Hieter P, & Bogusky M. 1997. Functional genomics: it's all how you read it. *Science*. Vol. 278: 601-602

Hilker M, & Meiners T. 2006. Early herbivore alert: Insect eggs induce plant defense. *J. Chem. Ecol.* 32:1379–97

Hillocks JM. 2002. Cassava in Africa. In: Hillocks JM, Thresh JM, Bellotti AC (eds) Cassava: Biology, Production and Utilization. CABI Publishing, Oxon, UK, pp 209-235

Hoffmann-Sommergruber K. 2001. Plant allergens and pathogenesis-related proteins. 6th International Workshop on PR-proteins. May 20-24, 2001, Spa, Belgium. Book of abstracts, p. 35.

Hopkins TL, & Harper MS. 2001. Lepidopteran peritrophic membranes and effects of dietary wheat germ agglutinin on their formation and structure. Arch Insect Biochem Physiol 47: 100–109

Horiuchi J, Arimura G, Ozawa R, Shimoda T, Takabayashi J, Nishioka T. 2001. Exogenous ACC enhances volatiles production mediated by jasmonic acid in lima bean leaves. *FEBS Lett.* 509:332–36

Hossain MA, Noh HN, Kim KI, Koh EJ, Wi SG, Bae HJ, Lee H, Hong SW. 2010. Mutation of the chitinase-like protein-encoding AtCTL2 gene enhances lignin accumulation in dark-grown Arabidopsis seedlings. *Journal of Plant Physiology;*167*:*650-658.

Howe GA, & Schilmiller AL. 2002. Oxylipin metabolism in response to stress. Curr Opin Plant Biol 5 (3): 230-236.

Howe GA. 2004. Jasmonates as signals in the wound response. *J. Plant Growth Regul.* 23:223–37

Hruska AJ. 1988. Cyanogenic glucosides as reference compounds: A Review of the evidence. *Journal of Chemical Ecology* 14: 2213-2217

Hudgins JW, & Franceschi VR. 2004. Methyl jasmonate-induced ethylene production is responsible for conifer phloem defense responses and reprogramming of stem cambial zone for traumatic resin duct formation. *Plant Physiol.* 135:2134–49

Hui DQ, Iqbal J, Lehmann K, Gase K, Saluz HP, Baldwin IT. 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. *Plant Physiol.* 131:1877–93

Hummelbrunner LA, & Isman MB. 2001. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *J. Agric. Food Chem.* 49:715–20

Hunt SP, & Livesey FJ. 2000. Eds. Functional Genomics. *Oxford University Press*.

Hwang JE, Hong JK, Je HJ, Lee KO, Kim DY, Lee SY, Lim, CO. 2009. Regulation of seed germination and seedling growth by an Arabidopsis phytocystatin isoform, AtCYS6. Plant Cell Reports Volume 28, Number 11, 1623-1632,

Inbar M, & Gerling D. 2008. Plant-mediated interactions between whiteflies, herbivores, and natural enemies. *Annual Review of Entomology* 53: 431-448

ISSAA 2010. China completes draft sequence of cassava genome Crop Biotech Update January 22, 2010: http://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/article/default.asp?ID=5335

Jelitto-Van Dooren E, Vidal S, Denecke J. 1999. Anticipating Endoplasmic Reticulum Stress: A Novel Early Response before Pathogenesis-Related Gene Induction. The Plant Cell. Vol. 11: 1935–1943.

Jennings DL, & Iglesias C. 2002. Breeding for Crop Improvement. In: Hillocks RJ, Thresh JM, Bellotti AC (eds) Cassava: biology, production and utilization. CABI Publishing, Wallingford, pp 149-166

Jia Y, Anderson JV, Horvath DP, Gu YQ, Lym RG, Chao WS. 2006. Subtractive cDNA libraries identify differentially expressed genes in dormant and growing buds of leafy spurge (Euphorbia esula). Plant Mol Biol. May;61(1-2):329-44.

Jin JB, Kim YA, Kim SJ, Lee SH, Kim DH, Cheong GW, Hwang I. 2001. A new dynamin-like protein, ADL6, is involved in trafficking from the trans-Golgi network to the central vacuole in Arabidopsis. The Plant Cell. Vol. 13. No. 7: 1511-1526.

Johnson PR, & Ecker JR. 1998. The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. Annu. Rev. Genet. 32: 227–254.

Jones JD, & Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323–29

Jongsma MA, Bakker PL, Peters J, Bosch D, Stiekema WJ. 1995. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 92:8041–45

Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N. 2006. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 18:11086-11091.

Kaloshian I, Kinsey MG, Ullman DE, Williams VM. 1997. The impact of *Mi1*-mediated resistance in tomato on longevity, fecundity and behaviour of the potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae. Entomol Exp Appl* 83:181–187

Kaloshian I. 2004. Gene-for-gene disease resistance: bridging insect pest and pathogen defense. *J. Chem. Ecol.* 30:2421–39

Kaloshian I, & Walling LL. 2005. Hemipterans as Plant Pathogens. *Annu. Rev. Phytopatology.* 43:491-521

Kang JH, Wang L, Giri A, Baldwin IT. 2006. Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Manduca sexta. Plant Cell* 18:3303–20

Kandoth PK, Ranf S, Pancholi SS, Jayanty S, Walla MD, et al. 2007. Tomato MAPKs LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 function in the systemin-mediated defense response against herbivorous insects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 104:12205–10

Karban R, & Baldwin IT. 1997. Induced Responses to Herbivory. Chicago, IL: Univ. Chicago Press

Karban R, Baldwin IT, Baxter KJ, Laue G, Felton GW. 2000. Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sage-brush. *Oecologia* 125:66–71

Karban R, Shiojiri K, Huntzinger M, McCall AC. 2006. Damage-induced resistance in sagebrush: Volatiles are key to intra- and interplant communication. *Ecology* 87:922–30

Karrer EE, Beachy RN, Holt CA. 1998. Cloning of tobacco genes that elicit the hypersensitive response. Plant Molecular Biology. Vol. 36. No. 5: 681-690.

Katou S, Yoshioka H, Kawakita K, Rowland O, Jones JDG, et al. 2005. Involvement of PPS3 phosphorylated by elicitor-responsive mitogen-activated protein kinases in the regulation of plant cell death. *Plant Physiol.* 139:1914–26

Kehoe D. 1999. DNA microarrays for studies of higher plants and other photosynthetic organisms. *Trends in Plant Science.* Vol.4. No. 1: 38-41

Kempema LA, Cui X, Holzer FM, Walling LL. 2007. Arabidopsis transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. *Plant Physiol* 143: 849-865

Kennedy GG. 2003. Tomato, pests, para- sitoids, and predators: Tritrophic interactions involving the genus *Lycopersicon*. *Annu. Rev. Entomol.* 48:51–72

Kerr MK, & Churchill GA. 2001. Experimental Design for Gene Expression Microarrays. Biostatistics. Vol. 2, Issue 2, Pp. 183-201.

Kessler A, & Baldwin IT. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291:2141–44

Kessler A, & Baldwin IT. 2002. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annu Rev Plant Biol* 53:299-328

Kessler A, Halitschke R, Baldwin IT. 2004. Silencing the jasmonate cascade: induced plant defenses and insect populations. *Science* 305:665–68

Kessler A, Halitschke R, Diezel C, Baldwin IT. 2006. Priming of plant defense responses in nature by airborne signaling between *Artemisia tridentata* and *Nicotiana attenuata. Oecologia* 148:280–92

Kiggundu A, Muchwezi J, Van der Vyver C, Viljoen A, Vorster J, Schlüter U, Kunert K, Michaud D. Deleterious effects of plant cystatins against the banana weevil Cosmopolites sordidus. Archives of Insect Biochemistry and Physiology Volume 73, Issue 2, pages 87–105,

Kim JH, & Jander G. 2007. *Myzus persicae* (green peach aphid) feeding on Arabidopsis induces the formation of a deterrent indole glucosinolate. *Plant J.* 49:1008–19

Klessig DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, et al. 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8849–55

Koch T, Krumm T, Jung V, Engelberth J, Boland W. 1999. Differential induction of plant volatile biosynthesis in the lima bean by early and late intermediates of the octadecanoid-signaling pathway. *Plant Physiol.* 121:153–62

Koizumi K, Yokoyama R, Nishitani K. 2009. Mechanical load induces upregulation of transcripts for a set of genes implicated in secondary wall formation in the supporting tissue of Arabidopsis thaliana. J Plant Res. Nov;122(6):651-9.

Knudsen SA. 2002. Biologist's Guide to Analysis of DNA Microarray Data. Wiley-Interscience. USA.

Koo YD, Ahn J-E, Salzman RA, Moon J, Chi YH, Yun D-J, Lee SY, Koiwa H, Zhu-Salzman K. 2008. Functional expression of an insect cathepsin B-like counter-defence protein. Insect Molecular Biology 17, 235–245.

Kurisu U, Honma A, Miyajima H, Kondo S, Okumura M, Imaizumi K. 2003. MDG1/ERdj4, an ER- resident DnaJ family member, suppresses cell death induced by ER stress. Genes to Cells. Vol. 8. No. 2: 189-202.

Lamb C, & Dixon RA. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. Annual Review in Plant Physiology & Plant Molecular Biology. Vol. 48: 251-275.

Lambert AL, Mcpherson RM, Espelie KE. 1995. Soybean host plant resistance mechanisms that alter abundance of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). *Environ. Entomol.* 24: 1381-1386

Lambrix V, Reichelt M, Mitchell-Olds T, Kliebenstein DJ, Gershenzon J. 2001. The Arabidopsis epithio specifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. *Plant Cell* 13:2793–807

Laska P, Betlach J, Hawrankova M. 1986. Variable resistance in sweet pepper, *Capsicum annum* to the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidade). *Acta Entomol. Bohemoslov.* 83: 347- 353

Lawrence SD, & Novak NG. 2006. Expression of poplar chitinase in tomato leads to inhibition of development in Colorado potato beetle. *Biotech. Lett.* 28:593–99

Laxalt AM, Cassia RO, Sanllorenti PM, Madrid EA, Andreu AB, Daleo GR, Conde RD, Lamattina L. 1996. Accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase RNA under biological stress conditions and elicitor treatments in potato. Plant Molecular Biology. Vol. 30. No. 5: 961-972.

Lemieux B, Aharoni A, Schena M. 1998. Overview Of DNA chip technology. *Molecular Breeding*. Vol. 4: 277-289

Leon-Reyes A, Du Y, Koornneef A, Proietti S, Körbes AP, Memelink J, Pieterse CMJ, Ritsema T. 2010. Ethylene Signaling Renders the Jasmonate Response of *Arabidopsis* Insensitive to Future Suppression by Salicylic Acid. MPMI Vol. 23, No. 2 , pp. 187–197.

Levy M, Wang Q, Kaspi R, Parrella MP, Abel S. 2005. Arabidopsis IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense. *Plant J.* 43:79–96

Li L, Zhao Y, McCaig BC, Wingerd BA, Wang J, et al. 2004. The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* 16:126–43

Li Q, Xie QG, Smith-Becker J, Navarre DA, Kaloshian I. 2006. Mi-1-mediated aphid resistance involves salicylic acid and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 19:655–64

Li C, Schilmiller AL, Liu G, Lee GI, Jayanty S, et al. 2005. Role of β-oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *Plant Cell* 17:971–86

Liang P, & Pardee AB. 1992. Differential display of eukariotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*. Vol. 257: 967-971

Libault M, Wan J, Czechowski T, Udvardi M, Stacey G. 2007. Identification of 118 Arabidopsis transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense Microbe Interact 20: 900–911

Liedl BE, Lawson DM, White KK, Shapiro JA, Cohen DE, Carson WG, Trumble JT, Mutschler MA. 1995. Acylsugars of wild tomato *Lycopersicon pennellii* alters settling and reduces oviposition of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Econ. Entomol.* 88: 742-748

Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M. 1993. Cloning the Differences Between Two Complex Genomes. Science. Vol. 259: 946-951.

Little D, Gouhier-Darimont C, Bruessow F, Reymond P. 2007. Oviposition by pierid butterflies triggers defense responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 143:784–800

Lison P, Rodrigo I, Conejero V. 2006. A novel function for the cathepsin D inhibitor in tomato. *Plant Physiol.* 142:1329–39

Liu BH. 1998. Statistical genomics. Linkage, mapping and qtl analysis. New York: CRC Press.

Liu Y, Dammann C, Bhattacharyya MK. 2001.The matrix metalloproteinase gene GmMMP2 is activated in response to pathogenic infections in soybean. Plant Physiology. Vol. 127. No. 4: 1788-1797.

Long-Ling O, Guang-Qin L, Zhen Y, Zhi-Gang Z. 2009. Bioinformatic Analysis of a Suppression Subtractive cDNA Library from the Male Gametophytes of Laminaria japonica Aresch. Bioinformatics and Biomedical Engineering. ICBBE 2009. 3rd International Conference on Issue Date: 11-13 June 2009

López C, Jorge V, Piégu B, Mba C, Cortes D, Restrepo S, Soto-Suárez M, Laudie M, Berger C, Cooke R, Delseny M, Tohme J, and Verdier V. 2004. A unigene catalogue of 5700 expressed genes in cassava. *Plant Molecular Biology* 56: 541–554

Lorenzo O, Chico JM, Sanchez-Serrano JJ. Solano R. 2004. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor es- sential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. Plant Cell 16:1938-1950.

Lucas JA. 1998. The Diseased Plant. Plant Pathology and Plant Pathogens. Blackwell Science, Ltd., Oxford

Lukyanov SA, Gurskaya NG, Lukyanov KA, Tarabykin VS, Sverdlov ED. 1994. Highly efficient subtractive hybridisation of cDNA. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 20 (6): 701-704.

Luo J, Puc J, Slosberg E, Yao Yao, Bruce J, Wright T, Becich M, Parsons R. 1999. Differential Subtraction Chain a method for identifying differences in genomic DNA and mRNA. *Nucleic Acids Research,* Vol. 27, #19: e24 1-8

Lyou SH, Park HJ, Jung C, Sohn HB, Lee G, Kim CH, Kim M, Choi YD, Cheong JJ. 2008. The Arabidopsis AtLEC Gene Encoding a Lectin-like Protein Is Up-Regulated by Multiple Stimuli Including Developmental Signal, Wounding, Jasmonate, Ethylene, and Chitin Elicitor. Mol. Cells *27*, 75-81

Macedo TB, Bastos CS, Higley LG, Ostlie KR, Madhavan S. 2003. Photosynthetic responses of soybean to soybean aphid (Homoptera: Aphididae) injury. Journal of Economic Entomology 96, 188–193

Maffei ME, Mithöfer A, Arimura G, Uchtenhagen H, Bossi S, et al. 2006. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. III. Membrane depolarization and in- volvement of hydrogen peroxide. *Plant Physiol*. 140:1022–35

Maffei ME, Mithöfer A, Boland W. 2007. Before gene expression: early events inplant- insect interaction. *Trends Plant Sci.* 12:310–16

Magoon ML, Krishnan R, Bai KV, 1969. Morphology of the pachytene chromosomes and meiosis in *Manihot esculenta* Crantz. *Cytologia* 34: 612-626

Major IT, & Constabel CP. 2006. Molecular analysis of poplar defense against herbivory: comparison of wound- and insect elicitor-induced gene expression. *New Phytol.* 172:617– 35

Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA. 2001. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics*. Vol. 26:403-406

Mann C. 1997. Reseeding the green revolution (vol 277, pg 1038, 1997). *Science* 277: 1593-1593

Marín Colorado JA, Ramírez H, Fregene M. 2009. Genetic mapping and QTL analysis for carotenes in a S1 population of cassava. *Acta Agronomica,* Universidad Nacional de Colombia 58: 15-21

Martin GB, Bogdanove AJ, Sessa G. 2003. Understanding the Functions of Plant Disease Resistance Proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:23–61

Mattson WJ. 1980. Herbivory in relation to plant nitrogen-content. *Annu. Rev. Ecol. System.* 11:119–61

Mayer RT, McCollum TG, McDonald RE, Polston JE, Doostdar H. 1996. Bemisia feeding induces pathogenesis-related proteins in tomato. In: Gerling D, Mayer RT, editors. Bemisia: 1995. Taxonomy, biology, damage, control and management. Andover: Intercept Ltd. p 179–188.

Mba REC, Stephenson P, Edwards K, Melzer S, Mkumbira J, Gullberg U, Apel K, Gale M, Tohme J, Fregene M. 2001. Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Survey of the Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Genome: Towards an SSR-Based Molecular Genetic Map of Cassava. *Theoretical and Applied Genetics Journal.* 102:21-31

McAuslane HJ, Weeb SE, Elmstron GW. 1996. Resistance in germplasm of *Cucurbita pepo* to silverleaf, a disorder associated with *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). *Fla. Entomol.* 79: 206-221

McGrath KC, Dombrecht B, Manners JM, Schenk PM, Edgar CI, Maclean DJ, Scheible WR, Udvardi MK, Kazan K. 2005. Repressor and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of Arabidopsis transcription factor gene expression. Plant Physiol. 139: 949–959.

Meagher RL, Smith CW, Smith WJ. 1997. Preference of *Gossypium* genotypes to *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Econ. Entomol.* 90: 1046-1052

Mewis I, Tokuhisa JG, Schultz JC, Appel HM, Ulrichs C, Gershenzon J. 2006. Gene

expression and glucosinolate accumulation in Arabidopsis thaliana in response to generalist and specialist herbivores of different feeding guilds and the role of defense signaling pathways. *Phytochemistry* 67:2450–62

Miles PW. 1999. Aphid saliva. *Biol Rev* 74:41–85

Mittler R, Herr EH, Orvar BL, van Camp W, Willekens H, et al. 1999. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen inter-mediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14165–14170

Mohan S, Ma PWK, Pechan T, Bassford ER, Williams WP, Luthe DS. 2006. Degradation of the *S. frugiperda* peritrophic matrix by an inducible maize cysteine protease. *J. Insect Physiol.* 52:21–28

Molnár G, Bancos S, Nagy F, Szekeres M. 2002. Characterisation of BRH1, a brassinosteroid-responsive RING-H2 gene from Arabidopsis thaliana. Planta 215: 127–133

Moran PJ, & Thompson GA. 2001. Molecular Responses to Aphid Feeding in Arabidopsis in Relation to Plant Defense Pathways. *Plant Physiology*, February, Vol. 125, pp. 1074–1085

Moran PJ, Cheng Y, Cassell JL, Thompson GA. 2002. Gene expression profiling of Arabidopsis thaliana in compatible plant–aphid interactions. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 51, 182–203.

Moran PJ, & Thompson GA. 2002. Molecular Responses to Aphid Feeding in Arabidopsis in Relation to Plant Defense Pathways. *Plant Physiology*, February, Vol. 125, pp. 1074–1085

Mori N, Alborn HT, Teal PEA, Tumlinson JH. 2001. Enzymatic decomposition of elicitors of plant volatiles in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea. J. Insect Physiol.* 47:749–57

Müller-Moulé P. 2008. An expression analysis of the ascorbate biosynthesis enzyme VTC2. Plant Mol Biol. Sep; 68(1-2): 31-41. Epub 2008 May 31.

Musser RO, Hum-Musser SM, Eichenseer H, Peiffer M, Ervin G, Murphy JB, Felton GW. 2002. Herbivory: Caterpillar saliva beats plant defences— a new weapon emerges in the evolutionary arms race between plants and herbivores. Nature 416: 599–600

Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H. 2006. Genome-wide analysis of the ERF gene

family in Arabidopsis and rice. Plant Physiol 140: 411–432

Nakashita H, Yasuda M, Nitta T, Asami T, Fujioka S, Arai Y, Sekimata K, Takatsuto S, Yamaguchi I, Yoshida S. 2003. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. Plant Journal. Vol. 33. No. 5: 887-898.

Navarro-Gochicoa MT, Camut S, Timmers ACJ, Niebel A, Hervé C, Boutet E, Bono JJ, Imberty A, Cullimore JV. 2003. Characterization of Four Lectin-Like Receptor Kinases Expressed in Roots of *Medicago truncatula*. Structure, Location, Regulation of Expression, and Potential Role in the Symbiosis with *Sinorhizobium meliloti. Plant Physiology*, Vol. 133, pp. 1893–1910

Nhassico D, Muquingue H, Cliff J, Cumbana A, Bradbury JH. 2008. Rising African cassava production, diseases due to high cyanide intake and control measures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 2043-2049

Niderman T, Genetet I, Bruyère T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, Fritig B, Mösinger E. 1995. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against Phytophthora infestans. Plant Physiol., 108, 17-27.

Ninković S, Miljuš-Đukić J, Radović S et al. 2007. *Phytodecta fornicata* Brügmm. resistance mediated by oryzacystatin II proteinase inhibitor transgenes. Plant Cell Tiss Organ Cult, 91:289- 294

Nombela G, Williamson VM, Muniz 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 Interact*. 16:645–49

Norman-Setterblad C, Vidal S, Palva ET. 2000. Interacting Signal Pathways Control Defense Gene Expression in Arabidopsis in Response to Cell Wall-Degrading Enzymes from Erwinia carotovora. MPMI Vol. 13, No. 4, pp. 430–438.

Ogunjobi AA, Fagade OE, Dixon AGO. 2006. Molecular variation in population structure of Xanthomonas axonopodis pv manihotis in the south eastern Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 5: 1868-1872

Paschold A, Halitschke R, Baldwin IT. 2007. Co(i)-ordinating defenses: NaCOI1 mediates herbivore-induced resistance in *Nicotiana attenuata* and reveals the role of herbivore movement in avoiding defenses. *Plant J.* 51:79–91

Pare PW, & Tumlinson JH. 1999. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol*. 121:325–31

Pautot V, Holzet FM, Reisch B, Walling LL. 1993. Leucine aminopeptidase: an inducible component of the defence response in Lycopersicon esculentum (tomato). Proc Natl Acad Sci USA, 90:9906-9910.

Peumans WJ, & Vandamme EJM. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109:347–52

Penninckx IAMA, Thomma BPHJ, Buchala A, Métraux J-P, Broekaert WF. 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. Plant Cell 10:2103-2113.

Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM. 2009. Networking by small-molecules hormones in plant immunity. Nature Chem. Biol. 5:308-316.

Pré M, Atallah M, Champion A, De Vos M, Pieterse CMJ, Memelink J. 2008.The AP2/ERF Domain Transcription Factor ORA59 Integrates Jasmonic Acid and Ethylene Signals in Plant Defense. *Plant Physiology* 147:1347-1357

Pulla R, Lee O, InJG, Parvin S, Kim YJ, Shim JS, Sun H, Kim YJ, Senthil K, Yang DC. 2011. Identification and characterization of class I chitinase in Panax ginseng. Molecular Biology Reports, Volume 38, Number 1, pp. 95-102(8)

Qiao H, Chang KN, Yazaki N, Ecker JR. 2009. Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in Arabidopsis. GENES & DEVELOPMENT 23:512–521

Quackenbush J. 2001. Computational analysis of microarray data. *Nature*. Vol. 2: 418-427

Quackenbush J. 2002. Microarray data normalization and transformation. Nature genetics supplement. Vol. 32: 496-501.

Qubbaj T, Reineke A, Zebitz CPW. 2005. Molecular interactions between rosy apple aphids, Dysaphis plantaginea, and resistant and susceptible cultivars of its primary host Malus domestica. Entomologia Experimentalis et Applicata 115, 145–152.

Ralph S, Oddy C, Cooper D, Yueh H, Jancsik S, et al. 2006. Genomics of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *deltoides)* interacting with forest tent caterpillars (*Malacosoma*

disstria): normalized and full-length cDNA libraries, expressed sequence tags, and a cDNA microarray for the study of insect-induced defences in poplar. *Mol. Ecol.* 15:1275–97

Rasmann S, Kollner TG, Degenhardt J, Hiltpold I, Toepfer S, et al. 2005. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* 434:732–37

Rauscher M, Adám AL, Wirtz S, Guggenheim R, Mendgen K, Deising HB, 1999. PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired re- sistant broad bean. Plant J., 19, 625-633.

Raven JA. 1983. Phytophages of xylem and phloem. Adv Ecol Res 13:135–234.

Reymond P, & Farmer EE. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. Curr. Opin. Plant Biol. 1:404-411.

Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12 (5):707-720

Reymond P, Bodenhausen N, Van Poecke RM, Krishnamurthy V, Dicke M, Farmer EE. 2004. A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell* 16:3132–47

Rhodes JD, Thain JF, Wildon DC. 1999. Evidence for physically distinct systemic signalling pathways in the wounded tomato plant. Ann Bot 84:109–116.

Riou C, Herve C, Pacquit V, Dabos P, Lescure B. 2002. Expression of an *Arabidopsis* lectin kinase receptor gene, *lecRK-a1*, is induced during senescence, wounding and in response to oligogalacturonic acids. Plant Physiol Biochem 40: 431–438

Rojo E, Titarenko E, Leon J, Berger S, Vancanneyt G, Sanchez- Serrano JJ. 1998. Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways in Arabidopsis thaliana. Plant J 13:153– 165.

Rojo E, Solano R, Sanchez-Serrano JJ. 2003. Interactions between signaling compounds involved in plant defense. J Plant Growth Regul 22: 82–98

Rossi M, Goggin FL, Milligan SB, Kaloshian I, Ullman DE, and Williamson VM. 1998. The nematode resistance gene mi of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (17): 9750-9754

Ryan CA. 1990. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*. 28:425–49

Ryan CA. 2000. The systemin signaling pathway: Differential activation of plant defensive genes. *Biochem Biophys Acta* 1477 (1-2): 112-121

Ryals JA, Neuenschwander HU, Willits MG, Molina A, Steinar HY, Hunt MD. 1996. Systemic acquired resistance. Plant Cell. Vol. 8: 1809-1819.

Santamaria M, Thomson CJ, Read ND, Loake GJ. 2001. The promoter of a basic *PR1*-like gene, *AtPRB1*, from *Arabidopsis* establishes an organ-specific expression pattern and responsiveness to ethylene and methyl jasmonate. *Plant Molecular Biology* 47: 641–652

Sakurai T, Plata G, Rodriguez-Zapata F, Seki M, Salcedo A, Toyoda A, Ishiwata A, Tohme J, Sakaki Y, Shinozaki K, Ishitani M. 2007. Sequencing analysis of 20,000 full-length cDNA clones from cassava reveals lineage specific expansions in gene families related to stress response. *Bmc Plant Biology* 7

Schaller F. 2001. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *Jpurnal of Experimental Botany.* Vol. 52, No. 354, Pp. 11-23

Schaller F, Schaller A, Stintzi A. 2005. Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *J. Plant Growth Regul.* 23:179–99

Scheideler M, Schlaich NL, Fellenberg K, Beissbart T, Hauser NC, Vingron M, Slusarenko AJ, Hoheisel JD. 2002. Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. Journal of Biological Chemistry. Vol. 277. No. 12:10555-2002.

Schiermeyer A, Hartenstein H, Mandal MK, Otte B, Wahner V, Schillberg S. 2009. A membrane-bound matrix-metalloproteinase from *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 is induced by bacterial pathogens. *BMC Plant Biology* 2, 9:83

Schilmiller AL, & Howe GA. 2005. Systemic signaling in the wound response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:369–77

Schilmiller AL, Koo AJ, Howe GA. 2007. Functional diversification of acyl-CoAoxidases in jasmonic acid biosynthesis and action. *Plant Physiol.* 143:812–24

Schmelz EA, Alborn HT, Tumlinson JH. 2003. Synergistic interactions between volicitin, jasmonic acid and ethylene mediate insect-induced volatile emission in *Zea mays. Physiol. Plant.* 117:403–12

Schmelz EA, Carroll MJ, LeClere S, Phipps SM, Meredith J, et al. 2006. Fragments of ATP synthase mediate plant perception of insect attack. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 103:8894–99

Schmelz EA, Leclere S, Carroll MJ, Alborn HT, Teal PEA. 2007. Cowpea (*Vigna unguiculata)* chloroplastic ATP synthase is the source of multiple plant defense elicitors during insect herbivory. *Plant Physiol.* 144:793–805

Schmidt S, & Baldwin IT. 2006. Systemin in *Solanum nigrum.* The tomato-homologous polypeptide does not mediate direct defense responses. *Plant Physiol.* 142:1751–58

Schnee C, Köllner TG, Held M, Turlings TC, Gershenzon J, Degenhardt J. 2006. The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 103:1129–34

Schoonhoven LM, Jermey T, van Loon JJA. 1998. Insect-Plant Biology: From Physiology to Evolution. London: Chapman & Hall

Schwachtje J, Minchin PE, Jahnke S, van Dongen JT, Schittko U, Baldwin IT. 2006. SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 103:12935–40

Scott GJ, Rosegrant MW, Ringler C. 2000. Roots and tubers for the 21st century. Trends, projections and policy options. International Food Policy Research Institute (IFPRI)/CIP (Centro Internacional de la Papa). Washington USA

Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K. 2001. Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell*. Vol. 13. No. 1: 61-72

Shibuya N, & Minami E. 2001. Oligosaccharide signaling for defense responses in plant. Physiol. Mol. Plant Pathol. 59:223-233.

Shiu SH, & Bleecker AB. 2001. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. Proc Natl Acad Sci USA 98: 10763–10768

Shulaev V, Silverman P, Raskin I. 1997. Airborne signalling bymethyl salicylate in plant pathogen resistance. Nature 385:718–721.

Skibbe M, Qu N, Galis I, Baldwin IT. 2008. Induced plant defenses in the natural environment: *Nicotiana attenuata* WRKY3 and WRKY6 coordinate responses to herbivory. Plant Cell 20: 1984–2000

Smith CM, & Boyko EV. 2007. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomol. Exp. Appl.* 122:1–16

Somerville C, & Somerville S. 1999. Plant Functional Genomics. *Science*, Vol. 285: 380-383

Soto M. 2003. Herramientas de Genómica Funcional: Análisis de ESTs, Librerías Sustractivas y Microarreglos de ADN, para avanzar en el conocimiento de las respuestas de defensa de la yuca a la infección por *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis. Tesis de grado para optar el título de Biólogo. Universidad Nacional de Colombia.

Spiteller D, Pohnert G, Boland G. 2001. Absolute configuration of volicitin, an elicitor of plant volatile biosynthesis from lepidopteran larvae. *Tetrahedron Lett.* 42:1483–85

Staswick PE, & Tiryaki I. 2004. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell* 16:2117–27

Stintzi A, Weber H, Reymond P, Browse J, Farmer EE. 2001. Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 98:12837–42

Sun CW, Griffen S, Callis JA. 1997. A model for the evolution of polyubiquitin genes from the study of Arabidopsis thaliana ecotypes. Plant Molecular Biology. Vol. 34. No. 5: 745-758.

Talyzina NM, & Ingvarsson PK. 2006. Molecular evolution of a small gene family of wound inducible Kunitz trypsin inhibitors in *Populus. J. Mol. Evol*. 63:108–19

Tan X, Calderon-Villalobos LI, Sharon M, Zheng C, Robinson CV, et al. 2007. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446:640–45

Tattersall DB, Bak S, Jones PR, Olsen CE, Nielsen JK, et al. 2001. Resistance to an herbivore through engineered cyanogenic glucoside synthesis. *Science* 293:1826–28

Thaler JS. 1999. Jasmonate-inducible plant defences cause increased parasitism of herbivores. *Nature* 399:686–88

Thaler JS, Karban R, Ullman DE, Boege K, Bostock RM. 2002. Cross-talk between jasmonate and salicylate plant defense path- ways: Effects on several plant parasites. Oecologia 131:227-235.

Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A. 2007. JAZ repressor proteins are targets of the SCFCOI1 complex during jasmonate signalling. *Nature* 448:661–65

Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K. 2002. Plant defensins. Planta. Vol. 216. No. 2: 193-202.

Thompson GA, & Goggin FL. 2006. Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects. *J Exp Bot* 57: 755-766

Tjallingii WF. 2006. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. Journal of Experimental Botany, Vol. 57, No. 4, pp. 739–745

Ton J, D'Alessandro M, Jourdie V, Jakab G, Karlen D, et al. 2007. Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *Plant J.* 49:16–26

Tooker JF, & De Moraes CM. 2005. Jasmonate in Lepidopteran eggs and neonates. *J. Chem. Ecol.* 31:2753–59

Tornero P, Conejero V, Vera P. 1996. Primary structure and expression of a pathogen-induced proteases (PR-P69) in tomato plants: similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. Proc Natl Acad Sci USA, 93:6332-6337.

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proceedings of the National Academy of Science USA. Vol. 98. No. 9: 5116-5121. 2001.

USDA. 2001. The United States Department of Agriculture. Whitefly web page [on line]. The Systematic Entomology Laboratory. Beltsville Agricultural Research Center. [Last updated: 5 de julio de 2001]. Available in: <http://www.sel.barc.usda.gov/whitefly/wfframe.htm>

Vandenbussche F, Habricot Y, Condiff AS, Maldiney R, Van der Straeten D, and Ahmad M. 2007. HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 49: 428–441

van de Ven WTG, LeVesque CS, Perring TM, Walling LL. 2000. Local and systemic changes in squash gene expression in response to silverleaf whitefly feeding. *Plant Cell* 12:1409–1423

van der Westhuizen AJ, Qian XM, Botha AM. 1998. Differential induction of apoplastic peroxidase and chitinase activities in susceptible and resistant wheat cultivars by Russian wheat aphid infestation. Plant Cell Reports 18:132–137.

Van Giessen WA, Mollema C, Elsey KD. 1995. Design and use of simulation model to evaluate germplasm for antibiotic resistance to the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* and the sweet potato whitefly *Bemisia tabaci*. *Entomol. Exp. Appl.* 76: 271-286

van Kan JAL, Cozijnsen T, Danhash N, de Wit PJGM. 1995. Induction of tomato stress protein mRNAs by ethephon, 2,6- dichloroisonicotinic acid and salicylate. Plant Mol Biol 27:1205–1213.

Van Loon LC, 2001. The families of pathogenesis-related proteins. 6th International Workshop on PR-proteins. May 20-24, 2001, Spa, Belgium. Book of abstracts, p. 9.

van Poecke RM, Dicke M. 2002. Induced parasitoid attraction by *Arabidopsis thaliana:* involvement of the octadecanoid and the salicylic acid pathway. *J. Exp. Bot.* 53:1793–99

Varma Penmetsa R, Uribe P, Anderson J, Lichtenzveig J, Gish JC, Nam YW, Engstrom E, Xu K, Sckisel G, Pereira M, et al. 2008. The Medicago truncatula ortholog of Arabidopsis EIN2, sickle, is a negative regulator of symbiotic and pathogenic microbial associations. Plant J. 55: 580–595.

Vargas HL, Rey BL, Arias VB, Bellotti AC. 2002. Nataima-31: Variedad de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) resistente a mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis* Bondar) para el valle cálido del alto Magdalena. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO; Corporación Colombiana de Investigación Agraria (CORPOICA), Bogotá, Colombia; Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Bogotá, Plegable divulgativo.

Vargas J. 2005. Identificación de marcadores moleculares asociados con el Gen(es) de resistencia a mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis* Bondar) en yuca (*Manihot esculenta*

Crant) utilizando AFLP, SSR, SSR-EST y RGA. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, p 82

Voelckel C, Weisser WW, Baldwin IT. 2004. An analysis of plant-aphid interactions by different microarray hybridization strategies. *Mol. Ecol*. 13:3187–95

von Dahl CC, Baldwin IT. 2007. Deciphering the role of ethylene in plant-herbivore interactions. *J. Plant Growth Regul.* 26:201–9

Walling LL. 2000. The myriad plant responses to herbivores. *J. Plant Growth Regul*. 19:195–216

Walling LL. 2001. Induced Resistance: from the basic to the applied. Meeting Report. In: *Trends in Plant Science*. Vol 6, No. 10. 445-447

Wang P, & Granados RR. 2001. Molecular structure of the peritrophic membrane (pm): Identification of potential pm target sites for insect control. *Arch Insect Biochem Physiol* 47 (2): 110-118.

Wang JH, & Constabel CP. 2004. Polyphenol oxidase overexpression in transgenic *Populus* enhances resistance to herbivory by forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria). Planta* 220:87–96

Wang H, Hao J, Chen X, Hao Z, Wang X, Lou Y, Peng Y, Guo Z. 2007. Overexpression of rice WRKY89 enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants. Plant Mol Biol 65: 799–815

Wang YQ, Feechan A, Yun BW, Shafiei R, Hofmann A, Taylor P, Xue P, Yang FQ, Xie ZS, Pallas JA, Chu CC, Loake GJ. 2009. S-Nitrosylation of AtSABP3 Antagonizes the Expression of Plant Immunity. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 284, NO.4, pp.2131–2137.

Wagner GJ, Wang E, Shepherd RW. 2004. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Ann. Bot.* 93:3–11

Waterhouse PM, & Fusaro AF. 2006. Viruses Face a Double Defense by Plant Small RNAs. SCIENCE VOL 313, 7 JULY.

Welch BL. 1947. The generalization of 'students' problem when several different population variances are involved. Biometrika 34: 28-35

Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox JP. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. Plant Molecular Biology 47, 9–27.

Wilson DF, Flint HM, Stapp BR, Parks NJ. 1993. Evaluation of cultivars, germplasm lines, and species of *Gossypium* for resistance to biotype "B" of sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Econ. Entomol*. 86: 1857-1862

Winterer J, & Bergelson J. 2001. Diamondback moth compensatory consumption of protease inhibitor-transformed plants. *Mol. Ecol.* 10:1069–74

Wu CH, Yeh RS, Suzek BE, Vinayaka CR, Zhang J, Barker WN. 2003.The Protein Information Resource. *Nucleic Acids Research*. Vol. 31. No. 1: 345-347

Wu J, Hettenhausen C, Meldau S, Baldwin IT. 2007. Herbivory rapidly activates MAPK signaling in attacked and unattacked leaf regions but not between leaves of *Nicotiana attenuata. Plant Cell* 19:1096–122

Xu Y, Zhu Q, Panbangred W, Shirasu K, Lamb C. 1996. Regulation, expression and function of a new basic chitinase gene in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Mol. Biol. 30: 387–401.

Yaeno T, & Iba K. 2008. BAH1/NLA, a RING-type ubiquitin E3 ligase, regulates the accumulation of salicylic acid and immune responses to Pseudomonas syringae DC3000. Plant Physiol. Oct;148(2):1032-41.

Yan Y, Stolz S, Chetelat A, Reymond P, Pagni M, et al. 2007. A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* 19:2470–83

Yang Y, Kwon HB, Peng HP, Shih MC. 1993. Stress responses and metabolic regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in Arabidopsis. Plant Physiology. Vol. 101. No. 1: 209- 216.

Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Nagai J, Speed TP. 2002. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. Nucleic Acids Research. Vol. 30. No. 4: e15 1-10.

Yang W, Devaiah SP, Pan X, Isaac G, Welti R, Wang X. 2007. AtPLAI Is an Acyl Hydrolase Involved in Basal Jasmonic Acid Production and Arabidopsis Resistance to Botrytis cinerea. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL.282, NO.25, pp.18116–18128,

You MK, Oh SI, Ok SH, Cho SK, Shin HY. 2007. Identification of putative MAPK kinases in *Oryza minuta* and *O. sativa* responsive to biotic stresses. *Mol. Cells* 23:108–14

Ye Z. H, Zhong R, Morrison WH 3rd, Himmelsbach DS. 2001. Caffeoyl coenzyme a o-methyltransferase and lignin biosynthesis. *Phytochemistry* 57 (7):1177-1185.

Zarate SI, Kempema LA, Walling LL. 2007. Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant Physiol* 143: 866-875

Zavala JA, Patankar AG, Gase K, Hui DQ, Baldwin IT. 2004. Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuata* demonstrates their function as antiherbivore defenses. *Plant Physiol*. 134:1181–90

Zhang B, Ramonell K, Somerville S, Stacey G. 2002. Characterization of early, chitin-induced gene expression in *Arabidopsis*. Mol. Plant Microbe Interact. 15:963-970.

Zhu-Salzman K, Shade RE, Koiwa H, Salzman RA, Narasimhan M, Bressan IA, Hasegawa PM, Murdock LL. 1998. Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of Griffonia simplicifolia lectin II. Proc Natl Acad Sci USA 95: 15123–15128

Zhu-Salzman K, Salzman RA, Ahn JE, Koiwa H. 2004. Transcriptional Regulation of Sorghum Defense Determinants against a Phloem-Feeding Aphid. *Plant Physiology*, January, Vol. 134, pp. 420–431

Zhu-Salzman K, Luthe DS, Felton GW. 2008. Arthropod-Inducible Proteins: Broad Spectrum Defenses against Multiple Herbivores. Plant Physiology, Vol. 146, pp. 852–858

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, et al. 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* 125:749–60

Anexo A: Extracción de ARN total a partir de hojas de yuca (Chang et al. 1993).

1) **Día 1:** Ponga el buffer de extracción con el mercaptoetanol (2% concentración final) agregado, a precalentar a 60°C.
2) Macere el tejido utilizando nitrógeno líquido en un mortero, hasta lograr un polvo fino. Utilice una cantidad generosa de nitrógeno líquido para prevenir que se humedezca y empiecen a actuar las ARNasas.
3) A un tubo estéril de 15 ml, adicionar 1 gr de tejido congelado. Guarde el tubo en nitrógeno líquido para prevenir que se humedezca.
4) Adicione 7,5 ml del buffer de extracción precalentado. Mezcle por vortex.
5) Adicione 7,5 ml de cloroformo y vuelva a mezclar por vortex y pase a un tubo estéril de 30 ml de centrífuga.
6) Centrifugue a 5000 rpm por 20 min a 4ºC.
7) Transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo y repita la extracción con cloroformo dos veces más.
8) Transfiera el sobrenadante a tubos de 2 ml, alicuotando 1.5 ml en cada uno. Trate de dejar un poco del sobrenadante para asegurarse de no tomar algo de las fases de abajo que contienen cloroformo.
9) Adicione 0.33 volúmenes de cloruro de litio (LiCl) 8M (0.5 ml por 1.5 ml de la muestra) e incube a 4°C toda la noche.
10) **Día 2:** Centrifugue a 12000 rpm a 4°C por 5 – 10 min.
11) Descarte el sobrenadante y disuelva el precipitado en 500 ml de agua tratada con DEPC (Dietil piro carbonato). Es buena señal si el precipitado es difícil de disolver.
12) Extraiga una vez con 1 volumen de fenol:cloroformo: isoamilalcohol (25:24:1), y una vez con cloroformo: isoamilalcohol (24:1) .
13) Transfiera el sobrenadante a un tubo nuevo y precipite con 0.25 volúmenes de NaCl 5M y 2 volúmenes de etanol absoluto por lo menos 30 min. a –80°C (por ejemplo: por cada 500 ml de muestra use 125 ml de NaCl 5M y 1250 ml de etanol).
14) Centrifugue a 13000 rpm por 20 min. a 4°C.
15) Descarte el sobrenadante, lave el precipitado con etanol al 70%, seque en el "speed vac" aproximadamente 5 min. Resuspenda el precipitado en 50-200 ml de agua destilada estéril libre de nucleasas y almacene a –80°C.

16) Chequear la calidad del ARN en un gel de agarosa y la concentración en el espectrofotómetro Nanodrop 1000 a una absorbancia de A_{260}/A_{280}.

Reactivos:

Buffer de Extracción:	para 500 ml
TrisHCl (pH 7.5)	100mM
NaCl	100mM
EDTA	25mM
SDS	1%
PVP K30 (360,000)	2%
mercaptoethanol	2%

70% etanol – preparado con agua DEPC. **Fenol ácido (pH 4.3)**

Anexo B: Tratamiento con DNAse I

Los ARNs extraídos son tratados con DNAse I para eliminar el ADN que puedan contener.

Tratamiento utilizando la *RQ1 RNAse-free DNAse* de PROMEGA:

Reactivo	Volumen (ul)
ARN (diluido a 1 ug/ul)	
RQ1 buffer 10X	1 ul
RQ1 DNAse	1 ul
Agua destilada	
Total	10 ul

Mezcle por pipeteo.

Incube a 37°C por 30 min.

Adicione 1 ul de Stop.

Incube a 65 ^{o}C por 5 min. para inactivar la enzima.

Almacene a –80°C.

Anexo C: Hibridización sustractiva de ADNc por el método de DSC

Digestión-ligación

1. Mezclar por cada reacción para un volumen final de 12.5 µl:

REACTIVO	Volumen (µl)
Bufer One-Phor-all 10X (Amersham)	1.25
DpnII (10 U/µl)	0.2
ADNc (300 ng)	x
Agua bi-destilada	hasta 12.5

2.Incubar a 37°C por 2 horas.

3.Inactivar la enzima por incubación a 65ºC durante 20 min.

4.Adicionar directamente a la reacción (para un volumen final de 25 µl):

REACTIVO	Volumen (µl)
Agua bi-destilada	6.25
Bufer One-Phor-all (10X)	1.25
ATP (5 mM)	1
Adaptadores (BamI ó BamII)* (5µM)	3
T4 DNA ligasa (2U/µl)	1

*BamI para ARN de plantas infestadas, BamII para el de plantas no infestadas

5.Incubar a 20°C durante 2 horas.

6.Diluír la reacción con 225 ul de TE, pH 8.0 (Dilución 1:10).

Generación de amplicones

Usar la ligación diluída como molde en la siguiente reacción de PCR:

REACTIVO	Concentración Inicial	Volumen (µl)
Agua bi-destilada	-	38.3
Bufer Advantage 2	10X	5
DNTPs	20mM	0.5
Primer BamI ó BamII	10 µM	1
Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH)		0.2
Productos de ligación	-	5

*BamI para ARN de plantas infestadas, BamII para el de plantas no infestadas

Revisar 5 µl de cada reacción en un gel de agarosa al 1.2 %. Limpiar el producto de PCR con el kit QIAquick PCR purification (QIAGEN).

Condiciones de Hibridación

1. Eliminar los adaptadores de los amplicones provenientes de plantas sin infestar por digestión con DpnII. Mezclar 10 µg de estos amplicones con 0,1 µg de amplicones provenientes de plantas infestadas y co-precipitar la muestra con etanol.

2. Resuspender en 32 µl del buffer de hibridación 1 (50 mM Hepes y 1 mM CTAB) o del buffer de hibridación 2 (3mM EDTA y 30mM EPPS).

3. Denaturar durante 5 minutos a 98 °C y adicionar 8 µl de NaCl 5M.

4. Incubar a 67ºC por 16 h.

Digestión de cadenas sencillas con la exonucleasa de Mung Bean 1.

1.Limpiar el ADN hibridizado con las columnas QIAquick (Qiagen) y eluírlo con 50 µl de agua bi-destilada.

2. Añadir 5.8 µl de Bufer 10X para la exonucleasa de Mung Bean (New England Biolabs) y 1 µl (10U) de la exonucleasa.

3.Incubar a 30°C por 30 minutos.

4.Inactivar la exonucleasa purificando de nuevo la muestra con el kit QIAquick PCR purification (QIAGEN)

Anexo D: Programa de amplificación de insertos de los clones recombinantes por PCR

1- 95°C por 10 min.
2- 95°C por 30 seg.
3- 54°C por 30 seg.
4- 72°C por 1 min.
5- 95°C por 30 seg.
6- 52°C por 30 seg.
7- 72°C por 1 min.
8- 35 veces desde el ciclo 5
9- 72°C por 10 min.

Anexo E: Listado de primers específicos para el RT-PCR

Secuencia	Nombre del primer
TCTCGGAGACCACCAGAACT	Metallothionein
GGATCCATGTCCATGTTCAG	
AAGTCTGTTTGCTCCAAGGC	Matrixin Metalloproteinase
GGGCAGGTACTCCAATTCTC	
CCTCCCCATCTCTATGTCCA	zinc finger (DHHC type) family protein
GATTAGCCGACCCATTTGAC	
GCACCCAGGCATACTTGAAT	EF1 alpha
CGCGAGGTTCTCGTAGATTT	
CGGTGATTTCCTCAGAGAGTG	EGY2
CCCTCTTGTGATATGGGCTT	
ATTGATCAGGCTTCACCACC	ATJ3
GTCCTACAGCAAAAGGAGCA	
CCCATCAGAGGCAAGAAAAC	Amino-acid transporter
GCCGAGGAGGATCATACAGT	
CAACCCTCTTGGGTTTGGTA	chlorophyll binding; LHCA3
GCTGTCCCTATCCCCAAATA	
CAAACCTTGACAGGGGAAGT	CKB1
GGCCGAGGTACTTAACAAAC	
GGACTGGTTGTAGCATTAGCAC	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
GGACTAAGAAGGGGGAAGGA	
AGGACTCCTCACCCAATGTG	GRF8 (GENERAL REGULATORY FACTOR 8)
AGCTGCTGCTGAGGATACAA	
CGCTGGAAACACAGAGATCA	protein kinase family protein
GCCACCGTTTCTCCTCTAAA	
TCGCATAACAACAGTCCTGG	Pectinesterase
GGAATTCGATTAGCGTGGTC	
AATCCACTTGGGGACTGTTG	AP2
CAGATCTCTTCTGCAACCCC	
GCTGATGCTAATGGAGATGG	Calcium-binding protein
TCCATGAGGGGAAAACGTAG	
TATCCTTCGCCCGTTATCTC	proline oxidase, putative / osmotic stress-responsive
GCAGGTACATGGGCTTTGAT	
ACAGGCAAGAGTTCCAGCAT	LOX5
AATGGAAGGACAGAGTTGGG	
GCGTAACTCGGTTCGCTTAG	ATPRB1
GCGGCCGAGGTACTTTTT	
CAATCTTTCTTGGGCGAAAC	ATP-depndent Clp protease
CCCGGGCAGGTACTTAATTT	

Anexo F: Marcaje Indirecto de sondas para microarreglos

Síntesis de sonda (Marcaje Indirecto)

Marcar una fracción de ADNc (el ADNc que se sintetizó con el método SMART) así:

1. Denaturar 3 min. a 95º C, 1 ug de la muestra de ADNc (máximo volumen de 5.4 ul) mezclado con 2.0 ul de primer aleatorio (Nonámero) 2.0 µl.
2. Conservar en hielo 2 min.
3. Adicionar, 1.2 ul de buffer Exo-nuclease free klenow 10X, 1.2 ul de dNTPs marcados con aminoalil, 1.2 ul de enzima Exo-nuclease free klenow.
4. Centrifugar para llevar contenido al fondo e incubar a 37º C por 1 hora.
5. Limpiar el producto con columnas (Wizard SV de Promega), resuspender en 50 ul de agua bi-destilada, concentrar en Speed vac hasta alcanzar 10 ul.
6. Acoplamiento: adicionar 0,5 ul de Carbonato de Sodio 1M pH: 9.0
7. Adicionar el ADNc con aminoalil anterior a una alicuota del NHS-ester Cy(5 o 3)-dUTP.
8. Incubar 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad.
9. Limpiar con columnas (PROMEGA), uniendo las muestras que se van a hibridizar, resuspender en 50 ul.
10. Adicionar 20 µg de ADN de esperma de salmón (1µl de 20 µg/µl) y 10 µg de Poly A^+ (2 µl de 10 µg/µl). Reducir el volumen de la anterior mezcla a menos de 25 µl en el "speed vac". (Mientras se marca la sonda y se reduce el volumen se debe prehibridizar los microarreglos que se van a utilizar).

Preparación y espoteo de las láminas de vidrio de Microarreglos

1. Ubique las láminas de vidrio cubiertas con poli-L-lisina (ERIE SCIENTIFIC COMPANY No.:C40-5257-M20) en el robot SPBIO II (Hitachi).
2. Marque las láminas de vidrio con un lápiz con punta de diamante en el extremo.
3. Inicie el espoteo de las sondas, las cuales son los PCR de las librerías sustractivas. Grabe la información con el software del SPBIO II.

Después de espotear todo el microarreglo, realice el siguiente tratamiento a las láminas de vidrio:

1. Denatúrelas 10 min a 95ºC (precalentar una lámina metálica sobre un termociclador 10 min antes).
2. Haga un cross-link de rayos ultravioleta a 410 milijulios en un Stratalinker.
3. Caliente las láminas por 2 horas a 70ºC, para secarlas.

Almacenar los microarreglos en lugar seco hasta la hibridización (los microarreglos pueden ser almacenados por un año sin que la hibridización pierda calidad).

Pre-hibridización

Preparar cada microarreglo para hibridización como sigue:

1. Lavar las láminas en SDS al 0.2%, sumergiendo y sacando vigorosamente las láminas, esto ayuda a remover moléculas que no han sido fijadas a la lámina.
2. Incubar las láminas a 55ºC durante 45 min en una solución que contiene BSA 1%, SSC 5X, SDS 0.1%.
3. Ubicar las láminas en una canastilla metálica y sumergirla en agua destilada sacudiendo vigorosamente hasta 20 veces, repetir esto 5 veces usando agua nueva cada vez.
4. Lavar las láminas una vez en isopropanol.
5. Secar las láminas centrifugando a 850 rpm por 5 min.
6. Hibridizar inmediatamente. La señal de la hibridización disminuye si las láminas son dejadas por mas de una hora.

Hibridización

1. Preparar el buffer de hibridización 2X, que contiene formamida al 50%, SSC 10X, SDS 0.2%.
2. El ADNc que se ha marcado debe estar a 25 ul de volumen, adicionarle 25 ul de buffer 2X.
3. Incubar por 3 min a 95ºC. Ponga en hielo y dar una centrifugada rápida. Homogenizar la solución mezclando con pipeta sin producir burbujas.
4. Ubique la lámina del microarreglo en una cámara de hibridización Corning® (Product #2551). Cubra la lámina con un cubreobjetos.

5. Adicionar la muestra denaturada suavemente en el borde del cubreobjetos, la solución debe entrar por capilaridad. Colocar una gota del buffer de hibridización 1X en el sitio señalado en la cámara, para mantener la humedad. Cerrar la cámara.
6. Incubar 14-16 horas a 42ºC.

Lavados

Lavar las láminas durante 5 min con constante agitación rápida (protegiendo todo el tiempo las láminas de la luz) en una solución precalentada a 55ºC que contiene SDS 1%, SSC 2X, luego otros 5 min en una solución que contiene SSC 1% y por ultimo 5 min en una solución que contiene SSC 0.1%. Seque las láminas centrifugando 5 min a 850 rpm. Escanear tan pronto como sea posible (los microarreglos pueden ser escaneados después de dos semanas, sin que pierdan señal significativamente).

Anexo G: Síntesis de ADNc

Para un volumen final de reacción de 100 µl, mezclar,

Reactivo	Concentración Final	Volumen x reacción
Agua deionizada		64 µl
Buffer Advantage™ 2 PCR 10X	1X	10 µl
dNTP's 10 mM	0.2 mM	2 µl
5' PCR Primer IIA 10 µM	0.2 µM	2 µl
Advantage™ 2 polymerase Mix		1 µl
Reacción de First-Strand		20 µl

Programa de amplificación

1-95°C por 1 min.
2-95°C por 15 seg.
3-65°C por 30 seg
4-68°C por 6 min.
5-X ciclos desde el 2

ANEXO H: Listados de genes diferencialmente expresados en el Cassava Unigene Microarray en cada uno de los tiempos y comparaciones estudiadas, y valor delta.

Anexo H.1: Comparación/tiempo EyC (1y2)

List of Significant Genes for Delta = 1.005

Funcion Biologica	EST id	Supuesta funcion (TAIR y RefSeq)	Puntaje	FDR%
Estres, Proteolisis	CK643831	Protein binding protein (Trypsin-like Serine Protease) Ricinus communis	6	0
Biosintesis de Esteroides	CK649243	ORP3C (OSBP(OXYSTEROL BINDING PROTEIN)-RELATED PROTEIN 3C)	5.5	0
Estres, Proteolisis	CK652150	PROTEIN PHOSPHATASE 2A SUBUNIT A2 protein phosphatase type 2A regulator	5	0
Estructura	CK649519	HMGB3 (HIGH MOBILITY GROUP B 3); DNA binding / chromatin binding	5	0
Biosintesis de Glicanos	CK646958	GDP-fucose protein O-fucosyltransferase	4	0
Defensa, Oxida	CK643827	peroxiredoxin type 2, putative [Arabidopsis thaliana]	4	0
Estres	CK649819	ozone-responsive stress-related protein, putative	4	0
Funcion desconocida	CK650641	smb (small nuclear ribonucleoprotein associated protein b)	4	0
Funcion desconocida	CK648732	Chloroplast lumen common family protein [Arabidopsis thaliana]	4	0
Metab. Acidos Grasos	CK645195	long-chain-fatty-acid--CoA ligase family protein / long-chain acyl-CoA synthetase family protein	4	0
Senalizacion	CK642897	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein [Arabidopsis thaliana]	4	0
Metab. Carbohidratos	CK650590	BGAL3 (beta-galactosidase 3); beta-galactosidase/ catalytic/ cation binding / sugar binding	3.7	0
Proteolisis	CK645360	UBP2 (UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 2); ubiquitin-specific protease [Arabidopsis thaliana]	3.7	0
Transporte	CK648793	secretory carrier membrane protein (SCAMP) family protein	3.7	0
Transporte	CK642586	ATFD3 (ferredoxin 3); 2 iron, 2 sulfur cluster binding / electron carrier	3.6	7
Proteolisis	CK648448	IAAR3 (IAA-ALANINE RESISTANT 3); IAA-Ala conjugate hydrolase/ metallopeptidase	3.4	8
Senalizacion	CK652390	ATP binding protein, putative [Ricinus communis]	3.2	6
Senalizacion	CK642250	leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana]	3.2	6
Defensa, Desarrollo	CK643217	HSP81-2 (HEAT SHOCK PROTEIN 81-2); ATP binding	3	8
Defensa, Pared celular	CK643135	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor, putative [Ricinus communis]	3	10
Defensa, Senalizacion	CK648834	AP2 erf domain-containing transcription factor	3	8
Estructura	CK641354	Beta tubulin	3	0
Estructura	CK650643	ADF6 (ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR 6); actin binding	3	0
Funcion desconocida	CK643829	Conserved hypothetical protein Ricinus comunis	3	0
Funcion desconocida	CK652611	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein [Arabidopsis thaliana]	3	8
Metab. Carbohidratos	CK643223	GSA2 (glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase 2);	3	0
Proteolisis	CK648698	aspartyl protease family protein [Arabidopsis thaliana]	3	6
Senalizacion	CK652473	nascent polypeptide associated complex alpha subunit, putative	3	5
Senalizacion	CK642786	IAA8; transcription factor	3	7
Traduccion	CK644000	Ribosomal protein S12 [Manihot esculenta]	3	8
Transporte	CK649657	transport protein, putative	3	6
Transporte	CK645056	PIP1A (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1A); water channel	3	8
Desarrollo	CK648892	CRL, CRUMPLED LEAF	2.8	8
Funcion desconocida	CK650555	conserved hypothetical protein (SNARE) [Ricinus communis]	2.8	8
Proteolisis	CK643792	prolyl oligopeptidase family protein [Arabidopsis thaliana]	2.8	8
Proteolisis, Regulacion Ciclo celular	CK645194	RHF1A (RING-H2 GROUP F1A); protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding	2.8	8
Senalizacion	CK649587	BLH6 (BELL1-LIKE HOMEODOMAIN 6); DNA binding / transcription factor	2.8	10
Desarrollo, Senalizacion	CK642921	ARF10 (AUXIN RESPONSE FACTOR 10); miRNA binding / transcription factor	2.7	10
Metab. Carbohidratos	CK652045	LGT8 (GLUCOSYL TRANSFERASE FAMILY 8);	2.7	8
Traduccion	CK643794	translation initiation factor 3 (IF-3) family protein [Arabidopsis thaliana]	2.7	8
Traduccion	CK645425	RPL18 (RIBOSOMAL PROTEIN L18); structural constituent of ribosome	2.7	8
Traduccion	CK645426	40S ribosomal S4 protein	2.7	8
Biosintesis de Proteinas y aminoacidos	CK645116	AT-IE; phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase/ phosphoribosyl-ATP diphosphatase	2.6	8
Regulacion Ciclo celular	CK643381	HBT (HOBBIT); binding	2.6	8
Senalizacion	CK643633	acid phosphatase class B family protein	2.6	8
Senalizacion	CK652118	r2r3-myb transcription factor Ricinus	2.6	8
Biosintesis de Proteinas y aminoacidos	CK645185	inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase, putative [Ricinus communis]	2.5	8
Defensa, Metabolismo de N	CK642553	NLA (nitrogen limitation adaptation); ubiquitin-protein ligase	-6	0
Estructura	CK641265	HMGB (HIGH MOBILITY GROUP); DNA binding / chromatin binding	-4	7
Funcion desconocida	CK645620	5'-AMP-activated protein kinase-related [Arabidopsis thaliana]	-3	10
Estres Oxidativo	CK642477	ALDH2B7; 3-chloroallyl aldehyde dehydrogenase/ aldehyde dehydrogenase (NAD)	-3	10
Respuesta a estimulo por ABA	CK646906	ATDI21 (ARABIDOPSIS THALIANA DROUGHT-INDUCED 21) [Arabidopsis thaliana]	-3	10
Transporte	CK641412	PDLP7 (PLASMODESMATA-LOCATED PROTEIN 7) [Arabidopsis thaliana]	-3	10

Anexo H.2: Comparación/tiempo EyC (3y4)

Funcion Biologica	EST id	Supuesta funcion (TAIR y RefSeq)	Puntaje	FDR%
Funcion desconocida	CK644349	dormancy/auxin associated family protein [Arabidopsis thaliana]	8	0
Metab. Carbohidratos	CK644123	beta-glucosidase putative [Ricinus communis]	6.8	0
Estres	CK649819	ozone-responsive stress-related protein, putative	5	0
Estres Oxidativo	CK641770	VPS2.3	5	0
Estres Oxidativo	CK644215	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	5	0
Estres Oxidativo	CK647962	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	5	3
Estructura	CK641112	tubulin beta-chain, putative [Ricinus communis]	5	0
Transporte	CK645033	Chloroplast-targeted COPPER CHAPERONE copper chaperone	5	0
Transporte	CK642331	coatomer protein complex, subunit beta 2 (beta prime), putative [Arabidopsis thaliana]	5	0
Transporte	CK641654	OEP7 OUTER ENVELOPE MEMBRANE OF CHLOROPLASTS 33); GTP binding	5	7
Funcion desconocida	CK652664	EXO (EXORDIUM)	5	0
Senalizacion	CK644209	endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	4.9	0
Metabolismo	CK643441	CYCD1;1 (CYCLIN D1;1); cyclin-dependent protein kinase regulator	4.6	2
Transporte	CK642022	secretory carrier membrane protein (SCAMP) family protein	4.6	2
Biosintesis de Acidos grasos	CK645195	long-chain-fatty-acid--CoA ligase family protein / long-chain acyl-CoA synthetase family protein (LACS8)	4	9
Proteolisis	CK645194	RHF1A (RING-H2 GROUP F1A); protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding	4	10
Senalizacion	CK642250	leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana]	4	9
Senalizacion	CK652473	nascent polypeptide associated complex alpha subunit, putative	4	10
Estructura	CK642530	ARPC1A (ACTIN-RELATED PROTEIN C1A); actin binding / nucleotide binding [Arabidopsis thaliana]	4	8
Traduccion	CK650472	40S ribosomal protein S7 (RPS7B)	4	2
Metabolismo	CK644730	MEE59 (maternal effect embryo arrest 59)	4	6
Metabolismo	CK651237	DNA repair ATPase-related [Arabidopsis thaliana]	4	8
Transporte	CK641166	transporter, putative [Ricinus communis]	4	5
Transporte	Ck652244	CCT motif	4	6
Estres	CK651776	wound-responsivefamily protein [Arabidopsis thaliana]	3.8	8
Metabolismo	CK649653	NAP1;3 (NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN 1;3); DNA binding	3.8	9
Senalizacion	CK647939	MIRO1 (Miro-related GTP-ase 1)GTP binding [Arabidopsis thaliana]	3.7	10
Transporte	CK648047	nucleotide-sugar transmembrane transporter/ sugar:hydrogen symporter [Arabidopsis thaliana]	3.7	9
Transporte	CK641197	nonchlatrin coat protein zeta1-COP [Solanum lycopersicum]	3.7	9
Metabolismo	CK644977	haloacid dehalogenase-like hydrolase familiy protein [Ricinus communis]	3.6	9
Estres	CK653959	glycyl-tRNA synthetase/ glycine--tRNA ligase [Arabidopsis thaliana]	3.5	9
Senalizacion, Estres	CK644733	SIP3 (SOS3-INTERACTING PROTEIN 3); ATP binding / kinase/ protein kinase	3.5	10
Proteolisis	CK640893	oligopeptidase A, putative [Ricinus communis]	3.4	9
Transporte	CK642519	MATE efflux family protein [Arabidopsis thaliana]	3.4	9
Funcion desconocida	CK642383	small rubber protein [Hevea brasiliensis]	3.4	10
Metab. Carbohidratos	CK643315	alpha-galactosidase, putative / melibiase, putative / alpha-D-galactoside galactohydrolase	-3.7	10
Estres Oxidativo	CK651436	CYP707A1; (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase/ oxygen binding [Arabidopsis thaliana]	-3.8	8
Transporte	CK643416	NIP1;2 (NOD26-LIKE INTRINSIC PROTEIN 1;2); arsenite transmembrane transporter/ water channel	-3.8	8
Transporte	CK642577	Coatomer subunit epsilon-1	-8	0
Metabolismo	CK649981	pin2-interacting protein x1, putative [Ricinus communis]	-7.6	0
Transporte	CK648563	AVP1; ATPase/ hydrogen-translocating pyrophosphatase	-6	0
Funcion desconocida	CK646308	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	-5	0
Senalizacion	CK644332	CKI1 (CASEIN KINASE I); kinase/ protein serine/threonine kinase	-4.8	0
Funcion desconocida	CK645546	pentatricopeptide repeat-containing protein, putative [Ricinus communis]	-4.4	8
Funcion desconocida	CK642773	ATP binding protein, putative [Ricinus communis]	-4.4	8
Defensa	CK641592	VTC2 (vitamin c defective 2); GDP-D-glucose phosphorylase	-4	0
Estres	CK643153	SQD1; UDPsulfoquinovose synthase/ sulfotransferase [Arabidopsis thaliana]	-4	8
Transporte	CK642771	transporter, putative [Ricinus communis]	-4	6
Funcion desconocida	CK650866	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase, putative [Ricinus communis]	-4	8

Anexo H.3: Comparación/tiempo EyC (5y6)

Funcion Biologica	EST id	Supuesta funcion (TAIR y RefSeq)	Puntaje	FDR%
Transporte	CK643768	ARPN (PLANTACYANIN); copper ion binding / electron carrier	6	0
Estres	CK649819	ozone-responsive stress-related protein, putative	4	0
Senalizacion	CK651987	ATRANGAP1 (RAN GTPASE-ACTIVATING PROTEIN 1); nucleic acid binding	4	0
Transporte	CK642743	VHS domain-containing protein / GAT domain-containing protein	4	0
Defensa, Estres, proteolisis	CK652485	ATP-dependent Clp protease ClpB protein-related	3.8	0
Senalizacion	CK644209	endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	3.8	0
Metabo. N, Transporte	CK642251	Nitrite transporter	3.4	0
Estres Oxidativo	CK644215	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	3	2
Funcion desconocida	CK642383	small rubber protein [Hevea brasiliensis]	3	0
Senalizacion	CK651492	ATARFA1B (ADP-ribosylation factor A1B); GTP binding / phospholipase activator	2.8	2
Funcion desconocida	CK650863	DIN3/LTA Dark inducible 3	2.6	5
Estres	CK652145	auxin-responsive family protein [Arabidopsis thaliana]	2.4	7
Estres Oxidativo	CK652338	Peroxiredoxin. PRX like-2	2.4	5
Estres Oxidativo	CK645026	NDA1 (ALTERNATIVE NAD(P)H DEHYDROGENASE 1); NADH dehydrogenase	2.4	5
Funcion desconocida	CK652242	Unknown protein [Arabidopsis thaliana]	2.4	5
Funcion desconocida	CK652486	hypothetical protein [Ricinus communis]	2.4	7
Funcion desconocida	CK646247	Conserved hypothetical protein Ricinus comunis	2.3	7
Funcion desconocida	CK648446	hypothetical protein [Populus trichocarpa]	2.3	7
Defensa	CK652060	VTC2 (vitamin c defective 2); GDP-D-glucose phosphorylase	2.2	8
Metabolismo de Carbohidratos	CK652045	LGT8 (GLUCOSYL TRANSFERASE FAMILY 8);	2.2	8
Estres	CK649878	DEAD box atp-dependent RNA helicase, putative [Ricinus communis]	2	10
Proteolisis	CK646669	F-box protein AFR	2	10
Metabolismo	CK652753	ATAPRL4 (APR-like 4)	2	8
Funcion desconocida	CK651253	RNA binding protein (Agenet domain) putative [Ricinus communis]	2	8
Funcion desconocida	CK641962	Transmembrane and coiled-coil domains protein [Ricinus communis]	-4	0
Funcion desconocida	CK652494	hypothetical protein [Ricinus communis]	-3.8	0
Funcion desconocida	CK643402	Hydrolase, hydrolysing O-glucosyl compounds (Carbohydrate BINDING X8 domain)	-3.5	0
Senalizacion	CK647160	Hypothetical protein (AUX/IAA family) [Populus trichocarpa]	-3.4	3
Biosintesis proteinas	CK648854	AK3 (ASPARTATE KINASE 3); aspartate kinase	-3	3
Senalizacion	CK652307	PPCK2; kinase/ protein serine/threonine kinase	-3	3
Metabolismo	Ck641558	Bystin	-3	3
Metabolismo	CK651004	PRMT3 (PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE 3); methyltransferase	-2.8	4
Defensa, Metab. N	CK642553	NLA (nitrogen limitation adaptation); ubiquitin-protein ligase	-2.6	5
Pared celular	CK645466	chitinase	-2.5	6
Traduccion	CK646300	PAB8 (POLY(A) BINDING PROTEIN 8); RNA binding / translation initiation factor	-2.5	5
Traduccion	CK650776	elongation factor 1B-gamma, putative / eEF-1B gamma, putative	-2.5	6
Transporte	CK646135	AVP2; ATPase/ hydrogen-translocating pyrophosphatase	-2.5	7
Metabolismo	CK650916	PCNA2 (PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN 2); DNA binding	-2.4	8
Senalizacion	CK643040	scarecrow transcription factor family protein	-2.3	8
Fotosintesis	CK641470	LHCB2.1; chlorophyll binding	-2.3	8
Senalizacion	CK642277	CRK (CDPK-related kinase); ATP binding / calcium ion binding	-2.2	8
Traduccion	CK641421	PAB8 (POLY(A) BINDING PROTEIN 8); RNA binding / translation initiation factor	-2	4

Anexo H.4: Comparación/tiempo EyESI (1y2)

List of Significant Genes for Delta = 1.04

Funcion Biologica	EST id	Supuesta funcion (TAIR y RefSeq)	Puntaje	FDR%
Estres, Senalizacion	CK652819	14-3-3 protein, putative [Ricinus communis]	6	0
Estres Oxidativo	CK643734	CYP714A1 Cytochrome P450	4.4	8
Defensa, Proteolisis	CK649737	ATP-dependent Clp protease	4	0
Estres Oxidativo	CK643765	Cytochrome P450, putative [Ricinus communis]	4	0
Estres Oxidativo	CK642445	cytochrome P450 like-TBP [Nicotiana tabacum]	4	0
Senalizacion	CK644304	ATARFA1E (ADP-ribosylation factor A1E); GTP binding / phospholipase activator/	4	0
Funcion desconocida	CK652554	Conserved hypothetical protein Ricinus comunis	4	0
Funcion desconocida	CK646334	Conserved hypothetical protein Ricinus comunis	4	8
Metabolismo Glucosa	CK642534	Glucose-6-phosphate isomerase	4	0
Defensa, Pared celular	CK644117	CEV1 (CONSTITUTIVE EXPRESSION OF VSP 1);	3.8	4
Estres	CK652145	auxin-responsive family protein [Arabidopsis thaliana]	3.8	0
Estres Oxidativo	CK643531	NADPH putative Ricinus	3.8	8
Funcion desconocida	CK649605	adenosine diphosphatase, putative [Ricinus communis]	3.7	0
Estructura	CK643545	Conserved hypothetical protein (Forming Homology 2 Domain) [Ricinus comunis]	3.7	8
Metabolismo Secundario	CK643563	COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1); protein binding / ubiquitin-protein ligase	3.7	0
Biosintesis de Proteinas	CK645185	inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase, putative [Ricinus communis]	3.5	0
Funcion desconocida	CK641540	Protein-L-isoaspartate	3.5	4
Proteolisis	CK645189	WD-40 repeat family protein	3.4	0
Pared celular, Estres	CK641892	COB (COBRA) [Arabidopsis thaliana]	3.4	8
Estres	CK649878	DEAD box atp-dependent RNA helicase, putative [Ricinus communis]	3.3	8
Estres Oxidativo	CK643412	DEFECTIVE chloroplast and leaves protein-related / DCL protein related [Arabidopsis thaliana]	3.3	8
Defensa, Proteolisis	CK644493	ATP-dependent Clp protease	3.2	5
Senalizacion	CK643815	Conserved hypothetical protein (SW13, ADA2, N-CoR and TFIIIB' DNA-binding domain)	3.2	8
Biosintesis de Proteinas	CK646577	glycosyl transferase family 14 protein / core-2/I-branching enzyme family protein	3	10
Traduccion	CK650002	acidic ribosomal protein P0-related	3	5
Pared celular	CK643857	ATEXPA1 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A4) [Arabidopsis thaliana]	3	10
Estres	CK641467	CBS domain-containing protein [Arabidopsis thaliana]	3	0
Funcion desconocida	CK645851	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein [Arabidopsis thaliana]	3	7
Funcion desconocida	CK646576	ATP binding protein (KIP1-like protein) [Ricinus communis]	3	10
Transporte	CK645858	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein / cell division protein-related	3	0
Transporte	CK645056	PIP1A (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1A); water channel [Arabidopsis thaliana]	3	7
Estres	CK646145	auxin-responsive family protein [Arabidopsis thaliana]	2.8	7
Funcion desconocida	CK643963	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein, putative [Ricinus communis]	2.8	7
Transporte	CK645456	PIN1 (PIN-FORMED 1) transporter [Arabidopsis thaliana]	2.8	10
Senalizacion	CK642250	leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana]	2.7	7
Senalizacion	CK646024	ATP binding protein, putative [Ricinus communis]	2.7	7
Funcion desconocida	CK644119	jacalin lectin family protein [Arabidopsis thaliana]	2.7	7
Funcion desconocida	CK642374	Arginine serine rich splicing	-4	0
Fotosintesis	CK642795	CAB1 (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1); chlorophyll binding	-4	4

Anexo H.5: Comparación/tiempo EyESI (3y4)

List of Significant Genes for Delta = 1.055

Funcion Biologica	EST id	Supuesta funcion (TAIR y RefSeq)	Puntaje	FDR%
Senalizacion	CK642250	leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana]	7.7	0
Pared celular	CK647714	ATPME1; pectinesterase	7	0
Defensa, Estres Oxidativo	CK643827	peroxiredoxin type 2, putative [Arabidopsis thaliana]	5	0
Metabolism Secundario	CK644310	CYSC1 (CYSTEINE SYNTHASE C1); L-3-cyanoalanine synthase/ cysteine synthase [Arabidopsis thaliana]	5	0
Funcion desconocida	CK645594	Unknown protein (DUF789)	5	0
Proteolisis	CK643792	prolyl oligopeptidase family protein [Arabidopsis thaliana]	4.5	5
Funcion desconocida	CK643829	Conserved hypothetical protein Ricinus comunis	4.5	0
Defensa	CK643796	CB5-D (CYTOCHROME B5 ISOFORM D);	4.3	5
Silenciamiento	CK648748	SAS 10, putative [Ricinus communis]	4.3	5
Defensa JA, ABA	CK645183	Myc Transcription factor	4.2	5
Defensa JA, ET	CK648834	AP2 erf domain-containing transcription factor	4	5
Funcion desconocida	CK650438	RNA binding protein putative [Ricinus communis]	4	5
Biosintesis de Glicanos	CK646958	GDP-fucose protein O-fucosyltransferase	4	5
Fotosintesis	CK642650	LPA1 (LOW PSII ACCUMULATION 1); binding [Arabidopsis thaliana]	3.9	9
Defensa	CK650618	DCL2 (DICER-LIKE 2); ATP binding / ATP-dependent helicase/ RNA binding / double-stranded RNA binding	3.8	9
Defensa JA	CK644758	galactolipase/ phospholipase [Arabidopsis thaliana]	3.3	10
Metabolismo	CK652711	UGE2 (UDP-D-glucose/UDP-D-galactose 4-epimerase 2) [Arabidopsis thaliana]	3.2	10
Defensa JA	CK645537	ATCNGC4 (CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CATION CHANNEL 4); calmodulin binding / cation channel	3	10
Estres Oxidativo	CK644331	BR6OX2 (BRASSINOSTEROID-6-OXIDASE 2) monooxygenase/ oxygen binding [Arabidopsis thaliana]	3	10
Senalizacion	CK643232	ankyrin repeat	3	10
Traduccion	CK643794	translation initiation factor 3 (IF-3) family protein [Arabidopsis thaliana]	3	10
Fotosintesis	CK641579	LHCB2.3; chlorophyll binding	-2.3	0
Fotosintesis	CK641470	LHCB2.1; chlorophyll binding	-2	0

Anexo H.6: Comparación/tiempo EyESI (5y6)

List of Significant Genes for Delta = 0.594

Funcion Biologica	EST id	Supuesta funcion (TAIR y RefSeq)	Puntaje	FDR%
Senalizacion	CK643232	ankyrin repeat	3.4	0
Metabolism Secundario	CK643563	COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1); protein binding / ubiquitin-protein ligase	2.6	0
Silenciamiento	CK648748	SAS 10, putative [Ricinus communis]	2.4	0
Defensa	CK643796	CB5-D (CYTOCHROME B5 ISOFORM D);	2.3	0
Transporte	CK649657	transport protein, putative	2.2	4
Estres	CK645100	BRH1 (BRASSINOSTEROID-RESPONSIVE RING-H2); protein binding / zinc ion binding	2	4
Estres Oxidativo	CK650853	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	2	8
Estres, Proteolisis	CK643831	Protein binding protein (Trypsin-like Serine Protease Ricinus	2	3.5
Proteolisis	CK645194	RHF1A (RING-H2 GROUP F1A); protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding	2	5
Senalizacion	CK643516	AHK2 (ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 2); cytokinin receptor/ osmosensor	2	8
Senalizacion	CK652354	RF2A Transcription factor (Autophagy protein 16, bZip) Ricinus	2	8
Senalizacion	CK652155	Transcription factor putative (C5HC2 zinc finger) Ricinus	2	8
Senalizacion	CK643552	Transcriptional corepressor LEUNIG	2	8
Metabolismo	CK649243	ORP3C (OSBP(OXYSTEROL BINDING PROTEIN)-RELATED PROTEIN 3C); oxysterol binding	2	0
Metabolismo	CK642468	G6PD6 (GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE 6); glucose-6-phosphate dehydrogenase	2	7
Metabolismo de Carbohidratos	CK642919	Galactokinase	2	0
Metabolismo de Carbohidratos	CK643223	GSA2 (glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase 2);	2	5
Traduccion	CK646808	APUM5 (Arabidopsis Pumilio 5); RNA binding	2	3.5
Pared celular, Metab. Secundario	CK644988	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative	1.8	8
Senalizacion	CK649589	C2 domain-containing protein	1.8	3.5
Senalizacion	CK643504	PAP3 (PURPLE ACID PHOSPHATASE 3); acid phosphatase/ protein serine/threonine phosphatase	1.8	7
Senalizacion	CK652118	r2r3-myb transcription factor Ricinus	1.8	7
Estructura	CK641265	HMGB (HIGH MOBILITY GROUP); DNA binding / chromatin binding	1.8	7
Metabolismo	CK643167	unknown protein [Arabidopsis thaliana]	1.8	3.5
Metabolismo	CK643957	ATRZ-1A; RNA binding / nucleotide binding	1.8	7
Metabolismo de acidos grasos	CK645195	long-chain-fatty-acid--CoA ligase family protein / long-chain acyl-CoA synthetase family protein (LACS8)	1.8	7
Traduccion	CK649579	60S ribosomal protein L7A (RPL7aB)	1.8	7
Proteolisis	CK646536	UBC10 (UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME 10); ubiquitin-protein ligase [Arabidopsis thaliana]	1.7	8
Metabolismo	CK645762	DNA repair ATPase-related [Arabidopsis thaliana]	1.7	8
Transporte	CK642577	Coatomer subunit epsilon-2	1.7	9
Proteolisis	CK645189	WD-40 repeat family protein	1.6	9
Senalizacion	CK652352	TAF4 (TBP-ASSOCIATED FACTOR 4); transcription initiation factor	1.6	7
Senalizacion	CK642898	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein [Arabidopsis thaliana]	1.6	10
Estructura	CK650643	ADF6 (ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR 6); actin binding	1.6	7
Defensa	CK652623	ATNSI (NUCLEAR SHUTTLE INTERACTING); N-acetyltransferase (interaction host-virus)	1.5	9
Defensa	CK645183	Myc Transcription factor	1.5	10
Defensa, Senalizacion	CK641344	EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE 2); transporter	1.5	10
Estres	CK646145	auxin-responsive family protein [Arabidopsis thaliana]	1.5	7
Estres Oxidativo	CK641577	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	1.5	10
Estres Oxidativo	CK643520	CYP82C2; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding	1.5	10
Senalizacion	CK646656	NF-YC11 (NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT C11); DNA binding / transcription factor	1.5	7
Senalizacion	CK652271	ATMPK13; MAP kinase/ kinase	1.5	10
Senalizacion	CK644209	endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	1.5	10
Senalizacion	CK651987	ATRANGAP1 (RAN GTPASE-ACTIVATING PROTEIN 1); nucleic acid binding	1.5	10
Metabolismo	CK643441	CYCD1;1 (CYCLIN D1;1); cyclin-dependent protein kinase regulator	1.5	10
Metabolismo	CK652753	ATAPRL4 (APR-like 4)	1.5	10
Metabolismo de N	CK642844	catalytic/ glutamate-ammonia ligase	1.5	10
Transporte	CK642586	ATFD3 (ferredoxin 3); 2 iron, 2 sulfur cluster binding / electron carrier/	1.5	10
Transporte	CK646329	Vesicle-fusing ATPase	1.5	10
Fotosintesis	CK641470	LHCB2.1; chlorophyll binding	-3.8	0
Defensa	CK651135	AFB2 (AUXIN SIGNALING F-BOX 2); auxin binding / ubiquitin-protein ligase	-3.6	0
Estres Oxidativo	CK645498	MT3 (METALLOTHIONEIN 3); copper ion binding	-3	0
Senalizacion	CK649323	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-3	0
Proteolisis	CK648516	scpl20 (serine carboxypeptidase-like 20); serine-type carboxypeptidase	-2.8	0
Fotosintesis	CK641579	LHCB2.3; chlorophyll binding	-2.8	0
Metabolismo	Ck641558	Bystin	-2.8	0
Senalizacion	CK645499	GRF2 (GENERAL REGULATORY FACTOR 2); protein binding	-2.7	0
Defensa	CK641429	PSBO1 (PS II OXYGEN-EVOLVING COMPLEX 1); oxygen evolving/ poly(U) binding	-2.5	1.8
Senalizacion	CK642277	CRK (CDPK-related kinase); ATP binding / calcium ion binding	-2.5	1.8
Traduccion	CK645535	ribosomal protein S2 [Manihot esculenta]	-2.4	1.8
Metabolismo	CK641019	GAPA (GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE A SUBUNIT)	-2.2	5
Defensa	CK641741	cysteine protease inhibitor, putative / cystatin, putative	-2	7
Defensa	CK652300	WHY3 (WHIRLY 3); DNA binding	-2	8
Estres	CK651019	SKIP4 (SKP1 INTERACTING PARTNER 4)	-2	5
Senalizacion	CK641111	DNA binding putative [Ricinus communis]	-2	0
Metabolismo	CK641681	aminomethyltransferase, putative	-2	7
Defensa	CK645640	ERD15 (EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15); protein binding [Arabidopsis thaliana]	-1.8	3.6
Estres	CK641421	PAB8 (POLY(A) BINDING PROTEIN 8); RNA binding / translation initiation factor	-1.8	7
Estres Oxidativo	CK642468	G6PD6 (GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE 6); glucose-6-phosphate dehydrogenase	-1.8	10