

Interacción planta-áfido-endosimbionte: estudio de las relaciones entre plantas del género *Solanum*, *Myzus persicae*, y *Buchnera aphidicola*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias

Cristina Renata Machado Assefh

Licenciada en Ciencias Biológicas - Universidad Nacional de Salta - 2008

Lugar de trabajo: Cátedra de Química Biológica-Facultad de Ciencias Naturales-
Universidad Nacional de Salta



FAUBA Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Adriana Elisabet Alvarez

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina)

MSc. En Biotecnología (Wageningen Agricultural University, Wageningen, Países
Bajos)

Doctora (PhD) (Wageningen University and Research Centre, Wageningen, Países
Bajos)

Consejero de Estudios

Fernando Carrari

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Dedicatoria

A mi familia, lo más grande que tengo. Mi sostén y refugio en la vida.

A mis viejos, Mirta y René

Agradecimientos

Las palabras que siguen tal vez resulten un poco extensas, pero constituyen una de las partes de ésta Tesis que más he disfrutado al escribir, por ser un pequeño intento de retribuir a tantísima gente que estuvo a mi lado durante estos casi 5 años.

A mi familia, por estar siempre conmigo, por creer en mí y apoyarme incondicionalmente en mis proyectos. Mirtita y René, gracias viejos por enseñarme a soñar, a tener metas, y a creer que con ganas, ¡todo se puede alcanzar! A mis hermanos, Andrea, Cecilia y Gabriel, gracias por ser mis pares en la vida, y miles de gracias porque junto con mis cuñadísimos, trajeron a mi vida, a Lucas, Facu, Morena, Enzo, Gonzalo, Fede y Thiago!

A mi Directora, Adriana Alvarez. Muchas gracias Adri por confiar en mí, por la paciencia y la guía constante, siempre permitiéndome aprender con independencia y autonomía. Gracias por invitarme a formar parte de tu proyecto de trabajo, y ayudarte a construir el grupo “Pulgón”. Por permitirme aprender tu forma de vivir y entender la ciencia, y mi más profundo GRACIAS por haber sido mi “jefa” (siempre lo vas a ser!) y una gran amiga para mí.

A Fernando Carrari, mi consejero de estudios y co-director de beca de CONICET. Por su apoyo, consejos y por la excelente predisposición con la que siempre me ayudo a lo largo de estos años.

A mi amiga y compañera de equipo, Guada. Gracias por apoyarme siempre, y compartir tantos momentos, experimentos, mates, y mucho más! Gracias por ser mi *co-equiper* en tantos proyectos. Ah!...y antes que me olvide, GRACIAS por disculpar mis abandonos de co-maternidad de nuestras hijas pulgonas!

A mis compañeros y amigos de la cátedra de Química Biológica: Julio, Inés, Noe, Rubén, José, Pao, Marce, Adri, Sabrina y demás! Gracias por haberme recibido en la cátedra con tanto cariño y generosidad. Por brindarme su ayuda, apoyo y amistad a lo largo de todos estos años. Les digo MIL GRACIAS porque en la cátedra de Química Biológica encontré más que un lugar de trabajo, encontré “mi lugar” en la UNSa!

A mis queridísimas amigas, las “mujeronas” que me acompañan y alegran la vida! Luly, Pame, Vale, Anita, Laly, Estefi, Caro, Dani, Mer, Silvina, Romi y Nati. Gracias por bancarme en el recorrido de este camino, y por tantos momentos compartidos. Por permitirme aprender de ustedes y compartirme un poquito de sus seres. Lala querida, GRACIAS amiga por haber estado del otro lado del charco junto a mí, tu compañía y la esperanza del reencuentro fueron mi alegría! Luisita, GRACIAS por estar, y por tu ayuda con el manuscrito!

A mis amigos, Mauricio, Gabi y Betito. Gracias por su amistad, por quererme, y por aguantarme! Maus y Gabi, gracias amigos porque a la distancia siempre me permitieron sentirlos muy pero muy cerquita!

A Judit, Jorge, Rosa y Miguel. Por abrirme las puertas de sus hogares, y ser mis “papás” durante mis largas estancias en Buenos Aires. GRACIAS!!

A Alejandro Lucatti, por haber sido parte de los inicios del grupo de trabajo y por su ayuda durante estos años.

To Georg Jander and the people at the Jander’s Lab in Boyce Thompson Institute. Thanks for welcoming me in your lab, and for allowing me to learn with you. A special thanks to Clare for your help and friendship!

¡Mi queridísima María! Mi amiga y compañera de estancia en BTI, solo puedo repetirte hasta el cansancio: GRACIAS por haber estado en Ithaca! ¡Ojalá pronto podamos tener una “aphids party”!

To my friends in Ithaca, Laura and Peter. Laura, a huge THANKS to you for inviting me to share a bit of your wonderful life! For welcoming in your home, for introducing me to Chloe and Barry, and for allowing me to become your friend. You were an angel to me in Ithaca!

To the people at the Plant Breeding Department in Wageningen University: Ben, Colette, Johan, Koen, and Xi. Thank you Ben for giving the chance of going to your lab, and for letting me feel part of your group. Thanks Colette, for all the confidence you gave me, for your support, help, and also for your friendship

To Freddy Tjallingii. For all the support with the EPG experiments, data analysis, and discussions of results. Freddy, it's been a honor working with you!

A mis queridísimos amigos en Wageningen: Aldana, Vanessa, Sara, Marine Marce, Rafa, Ire, Vicky, Sergio, Madelein, Victor y Charles. Muchas gracias por haber sido tan buenos conmigo, por haberme hecho sentir bienvenida en Wageningen, por su amistad y cariño. Gracias por brindarme un lugar es sus corazones, y sobre todo por haberse ganado un gran lugar en el mío!

Algunas personas a quienes agradecer por tanto, SIEMPRE: Graciela Collavino, Jorge Mariotti, Elsa Gilardón y Pablo Ortega.

A la escuela para graduados "Alberto Soriano" de la FAUBA. Por haberme provisto el marco en el cual desarrollar este doctorado. Y a todo el personal de la escuela, GRACIAS por su ayuda y apoyo a la distancia.

Seguramente me quedan muchos nombres en el camino, me disculpo y digo GRACIAS TOTALES a toda la gente que con su presencia, apoyo, consejos, sugerencias, hicieron posible que esta tesis y etapa de mi vida, estén llegando a su fin. Sin el sostén de tantas personas, hoy no estaría aquí.

Declaración

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.”

Financiamiento

Este trabajo de Tesis Doctoral se desarrolló en el marco de dos Becas Internas de Posgrado otorgadas por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) (2009-2014), en los laboratorios de la Cátedra de Química Biológica y Laboratorio de Marcadores Moleculares de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta

Se contó con el financiamiento de los siguientes subsidios:

- Proyecto de Investigación N° 1786/0 del CIUNSa: “Interacciones entre plantas, insectos y bacterias. Estudio de las relaciones entre *Solanum* sp., *Myzus persicae* y *Buchnera* sp”. Directora: Dra. Adriana Alvarez. 01/2009-12/2011.

- Proyecto CIUNSa de Investigación, Tipo C, N° 2038 “Interacción planta-áfido-endosimbionte: estudio del rol de *Buchnera aphidicola* en la interacción entre *Myzus persicae* y *Solanum* sp” 01/2012-01/2014. Directora. Lic. Cristina Machado Assefh.

Además, parte del trabajo experimental se desarrolló en el marco de pasantías en el laboratorio del Dr. Jander, en Boyce Thompson Institute, Ithaca, NY, EEUU (Abril a Julio de 2011) y en el laboratorio de *Plant Breeding* de Wageningen University and Research Centre, Wageningen, Países Bajos (Octubre 2012 a Mayo de 2013).

Publicaciones derivadas de esta Tesis

- **Machado Assefh, Cristina R., Lucatti, Alejandro F., Alvarez, Adriana E.** (2013). Induced senescence promotes the feeding activities and nymph development of *Myzus persicae* on potato plants. *Journal of Insect Science. En prensa.*

- **Machado Assefh, Cristina R.; Lopez Isasmendi, Guadalupe; Tjallingii, W. Fred; Jander, Georg; Alvarez, Adriana E.** Disrupting *Buchnera aphidicola*, the endosymbiotic bacteria of *Myzus persicae*, modifies aphid feeding behaviour and changes the expression of salivary genes. *Enviado.*

- **Machado Assefh, Cristina R.; Lopez isasmendi, Guadalupe; Alvarez, Adriana E.** The disruption of *Buchnera aphidicola*, the endosymbiotic bacteria of *Myzus persicae*, modifies the aphid feeding behavior on potato plants. *En preparación.*

- **Machado Assefh, Cristina R.; Broekgaarden, Colette, Lopez-Isasmendi, Guadalupe; Vosman, Ben; Alvarez, Adriana E.** Manipulation of plant defenses by the green peach aphid, *Myzus persicae*: Is the primary endosymbiotic bacteria of the aphid involved? *En preparación.*

Índice general

Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Declaración	vii
Financiamiento	viii
Publicaciones derivadas de esta Tesis.....	ix
Índice general	x
Índice de Figuras	xiv
Índice de Tablas	xvi
Abreviaturas	xvii
Resumen.....	xviii
<i>Abstract</i>	xx
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	22
1.1. Interacciones planta-insecto.....	23
1.2. La papa.....	24
1.3. <i>Myzus persicae</i> , el áfido verde del duraznero.....	26
1.4. Modo de alimentación y estudios de comportamiento alimenticio de los áfidos ..	26
1.5. Respuestas de las plantas a los áfidos.....	29
1.6. <i>Buchnera aphidicola</i> , el endosimbionte primario de los áfidos	31
1.7. Senescencia foliar: ¿Defensa de las plantas o beneficio para los áfidos?.....	33
1.8. Objetivos, hipótesis y estructura de la tesis	34
1.8.1. Objetivo general.....	35
1.8.2. Hipótesis de trabajo	35
1.8.3. Estructura de la tesis	36
CAPÍTULO 2: INTERACCION PLANTA-AFIDO	38
Resumen.....	39
2.1. Introducción.....	40
2.2. Materiales y métodos	43
2.2.1. Plantas y áfidos	43
2.2.2. Inducción de senescencia en plantas de papa	43

2.2.3.	Contenido de clorofila	44
2.2.4.	Desempeño de los áfidos en plantas con senescencia inducida.....	44
2.2.5.	Comportamiento alimenticio de los áfidos: Gráfico de penetración eléctrica, (<i>electrical penetration graph</i> , EPG).....	45
2.2.6.	Ondas de EPG, patrones de ondas y variables.....	47
2.2.7.	Análisis estadísticos.....	48
2.3.	Resultados.....	48
2.3.1.	Determinación de clorofilas.....	48
2.3.2.	Desempeño de los áfidos en plantas con senescencia inducida.....	49
2.3.3.	Comportamiento alimenticio de <i>M. persicae</i> en plantas con senescencia inducida.....	50
2.4.	Discusión	52
CAPÍTULO 3: INTERACCION AFIDO-ENDOSIMBIONTE		56
Resumen.....		57
3.1.	Introducción.....	58
3.2.	Materiales y Métodos	61
3.2.1.	Insectos	61
3.2.2.	Tratamiento con antibiótico y comparación entre clorotetraciclina y rifampicina.....	62
3.2.3.	Comportamiento alimenticio de <i>Myzus persicae</i> aposimbióticos en plantas de rabanito.....	63
3.2.4.	Diseño del experimento	64
3.2.5.	Ondas, patrones de onda y variables de EPG	64
3.2.6.	Evaluación de genes que se expresan en la glándula salival en <i>M. persicae</i> en aposimbiosis, por RT-qPCR	66
3.2.7.	Análisis estadísticos.....	67
3.3.	Resultados.....	70
3.3.1.	Tratamientos con antibiótico y comparación entre clorotetraciclina y rifampicina.....	70
3.3.2.	Comportamiento alimenticio de <i>Myzus persicae</i> aposimbióticos en plantas de rabanito.....	71

3.3.3. Evaluación de genes que se expresan en la glándula salival en <i>M. persicae</i> en aposimbiosis, por RT-qPCR	75
3.4. Discusión	77
CAPÍTULO 4: INTERACCION PLANTA-AFIDO-ENDOSIMBIONTE	84
Resumen.....	85
4.1. Introducción.....	86
4.2. Materiales y métodos.....	88
4.2.1. Insectos y plantas	88
4.2.2. Comportamiento alimenticio de áfidos aposimbióticos en plantas de <i>Solanum tuberosum</i> y <i>Solanum stoloniferum</i> , mediante la técnica de EPG	89
4.2.3. Ondas, patrones de onda y variables de EPG	90
4.2.4. Análisis estadísticos.....	91
4.3. Resultados.....	92
4.3.1. Comportamiento alimenticio de <i>Myzus persicae</i> aposimbióticos en plantas de <i>Solanum stoloniferum</i>	92
4.3.2. Comportamiento alimenticio de <i>Myzus persicae</i> aposimbióticos en <i>Solanum tuberosum</i>	93
4.4. Discusión	98
CAPÍTULO 5: INTERACCION PLANTA-AFIDO-ENDOSIMBIONTE	102
Resumen.....	103
5.1. Introducción.....	104
5.2. Materiales y métodos.....	107
5.2.1. Expresión de genes de <i>Solanum tuberosum</i> en respuesta a <i>Myzus persicae</i> aposimbióticos	107
5.2.2. Expresión de genes de <i>Arabidopsis thaliana</i> en respuesta a <i>Myzus persicae</i> aposimbióticos	111
5.2.3. Análisis estadísticos.....	114
5.3. Resultados.....	114
5.3.1. Expresión de genes de <i>Solanum tuberosum</i> en respuesta a <i>Myzus persicae</i> aposimbióticos	114

5.1.1. Expresión de genes de <i>Arabidopsis thaliana</i> en respuesta a <i>Myzus persicae</i> aposimbióticos	116
5.2. Discusión	117
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN GENERAL	121
6.1. Introducción y conclusiones de la Tesis	122
6.2. Efecto de la senescencia foliar inducida en la interacción planta-áfido	124
6.3. Efecto de la aposimbiosis en relación a la aceptación de la planta hospedante ..	125
6.4. Efecto de la aposimbiosis en relación a la percepción del ataque del insecto	127
6.5. Implicancias evolutivas, ecológicas y agronómicas del rol de <i>Buchnera aphidicola</i> en la interacción planta-áfido	129
6.6. Proyecciones de esta Tesis.....	132
BIBLIOGRAFÍA.....	134
ANEXO	145
- Protocolo para la preparación de dietas artificiales para <i>Myzus persicae</i>	145
- Resultados de expresión de genes que de las glándulas salivales	148
- Resultados de expresión de genes de <i>Solanum tuberosum</i> en respuesta a áfidos aposimbióticos	149
- Resultados de expresión de genes de <i>Arabidopsis thaliana</i> en respuesta a áfidos aposimbióticos	149

Índice de Figuras

Capítulo 1: Introducción general

Figura 1.1. Mecanismo de alimentación de los áfidos.....	28
Figura 1.2. Técnica de gráfico de penetración eléctrica, EPG. A) Fundamento de la técnica. B) Señales de EPG	30
Figura 1.3. Modelo de trabajo.....	35
Figura 1.4. Hipótesis de trabajo.....	36

Capítulo 2: Interacción planta-áfido

Figura 2.1. A) Plantas de <i>Solanum tuberosum</i> con inducción de senescencia (bolsa negra) y plantas control (bolsa blanca).....	46
Figura 2.2. Contenido de clorofila a, clorofila b, y clorofila total en el control frente a las hojas con senescencia inducida de <i>Solanum tuberosum</i>	49

Capítulo 3: Interacción áfido-endosimbionte

Figura 3.1. Diseño del experimento de EPG. Se monitoreó el comportamiento alimenticio <i>Myzus persicae</i> según los siguientes tratamientos, 1) áfidos aposimbióticos: tratados con rifampicina 50 µgml ⁻¹ por 4 días en dieta artificial; 2) áfidos control: tratados con dieta sin rifampicina por 4 días; y 3) áfidos normales: extraídos de una colonia de áfidos en rabanito.....	65
Figura 3.2: Expresión relativa del gen de <i>Buchnera aphidicola</i> , <i>GroEl</i> luego de 4 días de tratamiento con antibiótico clorotetraciclina o rifampicina.....	70
Figura 3.3: Variables de gráfico de penetración eléctrica (EPG) que difieren entre áfidos aposimbióticos versus áfidos control y áfidos normales, en plantas de rabanito.....	74
Figura 3.4. Variables de gráfico de penetración eléctrica (EPG) que difieren entre áfidos alimentados en dietas artificiales (áfidos aposimbióticos y áfidos control) versus áfidos normales, en plantas de rabanito.	75
Figura 3.5: Análisis de genes que se expresan en la glándula salival de <i>Myzus persicaes</i>	77

Capítulo 4: Interacción planta-áfido-endosimbionte

Figura 4.1. Variables de EPG que difieren entre *Myzus persicae*, aposimbóticos (Mp aposimbótico) y control (Mp control)..... 97

Figura 4.2. Variables de EPG que difieren entre *Myzus persicae*, aposimbóticos (Mp aposimbótico) y control (Mp control)..... 97

Capítulo 5: Interacción planta-áfido-endosimbionte

Figura 5.1. Diseño del experimento de evaluación de expresión de genes de *Solanum tuberosum* en respuesta a *Myzus persicae* aposimbóticos, control y normales..... 109

Figura 5.2. Diseño del experimento de evaluación de expresión de genes de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a *Myzus persicae* aposimbóticos, control y normales. Como control, también se utilizaron plantas libres de áfidos. 112

Figura 5.3. Expresión relativa de genes de *Solanum tuberosum* en respuesta a *Myzus persicae* aposimbóticos, áfidos control y áfidos normales..... 115

Figura 5.4. Expresión relativa de genes de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a *Myzus persicae* aposimbóticos, áfidos control y áfidos normales..... 116

Índice de Tablas

Capítulo 2: Interacción planta-áfido

Tabla 2.1. Tiempo de pre-reproductivo de *Myzus persicae* (en días) y la mortalidad de las ninfas por ciento, durante el período pre-reproductivo en las hojas apicales de plantas senescentes y control de *Solanum tuberosum*. 49

Tabla 2.2. Medias \pm EEM de variables de EPG de comportamiento alimenticio de *Myzus persicae* en plantas de *Solanum tuberosum* con senescencia inducida y plantas control..... 51

Capítulo 3: Interacción áfido-endosimbionte

Tabla 3.1. Genes de la glándula salival de *M. persicae* cuya expresión relativa fue evaluada por RT-qPCR en áfidos aposimbióticos y áfidos control..... 69

Tabla 3.2: Medias \pm EEM de variables de gráfico de penetración eléctrica (EPG) de *M. persicae* aposimbióticos, controles y normales 72

Capítulo 4: Interacción planta-áfido- endosimbionte

Tabla 4.1. Medias \pm EEM de variables de EPG de *Myzus persicae* aposimbióticos y controles en plantas de *Solanum stoloniferum* y *Solanum tuberosum*..... 95

Capítulo 5: Interacción planta-áfido- endosimbionte

Tabla 5.1. Detalle de genes de *Solanum tuberosum* que fueron evaluados por RT-qPCR en respuesta a infestación con áfidos aposimbióticos. 110

Tabla 5.2. Detalle de genes de *Arabidopsis thaliana* que fueron evaluados por RT-qPCR en respuesta a infestación con áfidos aposimbióticos..... 114

Anexo

Tabla S1: Expresión relativa de genes de la glándula salival de *Myzus persicae*.....149

Tabla S2: Expresión relativa de genes de *Solanum tuberosum* en respuesta a *Myzus persicae* aposimbióticos, áfidos control y áfidos normales.....150

Tabla S3: Expresión relativa de genes de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a *Myzus persicae* aposimbióticos, áfidos control y áfidos normales.....150

Abreviaturas

EPG: *electrical penetration graph*

SA: ácido salicílico

JA: ácido jasmónico

Et: etileno

PR: relacionado a la patogénesis

RT-qPCR: *retro transcript, quantitative polimerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa de retrotranscriptos

Resumen

Interacción planta-áfido-endosimbionte: estudio de las relaciones entre plantas del género *Solanum*, *Myzus persicae*, y *Buchnera aphidicola*

El áfido verde del duraznero, *Myzus persicae*, se asocia con la bacteria endosimbiótica *Buchnera aphidicola* que se localiza en el hemocele del áfido. *B. aphidicola* suplementa la dieta del áfido, aunque podría cumplir otros roles en la interacción planta-áfido. Las respuestas de las plantas a la infestación por *M. persicae*, muestran mayores similitudes con las respuestas a una infección bacteriana que al ataque de insectos masticadores, por ejemplo en la inducción de procesos relacionados a la senescencia. La hipótesis propuesta en este trabajo es que en la interacción planta-áfido están involucrados efectores, los cuales podrían ser sintetizados por el áfido o por su endosimbionte primario, *B. aphidicola*. Por esta razón en ésta Tesis se evaluó la participación de *B. aphidicola* y de la senescencia foliar inducida en la interacción planta-áfido, integrando estudios que involucran distintos aspectos de la interacción entre plantas, áfidos y el endosimbionte primario. Para estudiar el comportamiento alimenticio de los áfidos se utilizó la técnica de gráfico de penetración eléctrica (EPG), y para evaluar la expresión de genes se utilizó RT-qPCR. Se encontró que la inducción de senescencia foliar incrementó el tiempo de ingestión de savia y mejoró el desarrollo ninfal de los áfidos. Además se encontró que la interrupción de la simbiosis con *B. aphidicola*, afecta el comportamiento alimenticio y la expresión de genes de las glándulas salivales del áfido, siendo el efecto más evidente en una interacción planta-áfido compatible que en una interacción incompatible. Además, la interrupción de la simbiosis con *B. aphidicola* cambió la expresión de genes marcadores de las dos

principales vías de defensa en *Arabidopsis thaliana*. Estos resultados confirman la participación de *B. aphidicola* y de procesos similares a la senescencia foliar, en la interacción planta-áfido.

Palabras claves: papa, interacciones planta-áfido, endosimbiontes, senescencia, gráfico de penetración eléctrica,

Abstract

Plant-aphid-endosymbiont interactions: A study of the relationships among plants of the genus *Solanum*, *Myzus persicae* and *Buchnera aphidicola*

The green peach aphid, *Myzus persicae*, associates with the endosymbiotic bacteria *Buchnera aphidicola* that locates in the aphid's hemocoel. *B. aphidicola* supplements the aphid's diet, although it may play other roles in the plant-aphid interaction. The plant responses to *M. persicae*, show more similarities with the responses to a pathogen infection than to responses to chewing insects, such as induction of senescence like processes. There is an overlap in the responses to pathogens and responses to aphids. The hypothesis is that in the plant-aphid interaction, there are effectors involved that may be synthesized by the aphid or its primary endosymbiotic bacteria, *B. aphidicola*. In this thesis, the role of *B. aphidicola* and induced leaf senescence in the plant-aphid interaction was evaluated. Studies that integrate different processes of plant-aphid-endosymbiont interaction were conducted. The feeding behaviour of aphids was evaluated by means of the electrical penetration graph technique, (EPG), and gene expression was evaluated by RT-qPCR. Inducing foliar senescence was found to promote feeding activities and nymph development. The disruption of *B. aphidicola* endosymbiotic relation with *M. persicae*, affected aphid feeding behaviour and salivary genes expression, and the effect was stronger in a compatible plant-aphid interaction than in an incompatible interaction. Moreover, the disruption of *B. aphidicola* endosymbiotic relation with aphids affected the expression of JA and SA marker genes after aphid infestation in the model plant, *Arabidopsis*

thaliana. These results confirm the involvement of *B. aphidicola* and foliar senescence like processes in the plant-aphid interaction.

Keywords: potato, plant-aphid interactions, endosymbionts, senescence, electrical penetration graph, EPG

CAPÍTULO 1

Introducción general: Interacciones entre plantas, áfidos y sus
endosimbiontes

1.1. Interacciones planta-insecto

Existen cerca de un millón de especies de insectos en el planeta y casi la mitad de ellos se alimenta de plantas. Esto ha dado lugar a una “batalla” entre las plantas y los insectos que se viene desarrollando desde hace al menos 350 millones de años (Gatehouse 2002) y, durante ese tiempo, los insectos y las plantas han coevolucionado, dando lugar a una gran diversidad de estrategias para la interacción, tanto en los insectos como en las plantas.

Los insectos herbívoros pueden clasificarse en dos grupos, teniendo en cuenta el tipo de alimentación, el cual depende de la estructura de la boca: 1) Los que tienen mandíbulas en la forma ancestral, y pueden “morder” y masticar los tejidos de las plantas, como por ejemplo los saltamontes (orden: Ortoptera), escarabajos (orden: Coleoptera), y las larvas de polillas y mariposas (orden: Lepidoptera); y 2) Los que tienen aparatos bucales modificados, que les permiten perforar los tejidos de las plantas y succionar líquidos a partir de ellos, como por ejemplo los áfidos, las moscas blancas, los psílidos (orden: Hemiptera) y los trips (orden: Thysanoptera). El modo de alimentación de los insectos herbívoros es una característica de gran importancia en la interacción con la planta, ya que tendrá relación con su percepción y por lo tanto con las respuestas que generarán. Los insectos fitosuccívoros se considera que generan un daño menor en los tejidos vegetales, en comparación con los insectos masticadores, y por ello se ha propuesto que los mecanismos de defensa de las plantas serán diferentes en cada caso (Bonaventure 2012).

Las plantas, a pesar de ser organismos sésiles que no pueden trasladarse para escapar del ataque de los insectos, no se comportan como “víctimas” pasivas en la interacción sino que se defienden con una gran variedad de respuestas entre las que se incluyen la producción de compuestos tóxicos, proteínas de defensa, compuestos

volátiles que atraen a los predadores de los insectos, entre otros (revisado por Howe y Jander 2008; Wu y Baldwin 2010).

Entre los insectos herbívoros fitosuccívoros, los áfidos (Hemiptera: Aphididae) son un grupo de gran interés ya que poseen características poblacionales especiales, como por ejemplo tiempos de generación rápidos y solapamiento de generaciones (Blackman 1974), que han promovido que casi todos los cultivos de importancia sean hospedante de al menos una especie de áfido (Blackman y Eastop 2000). Además, debido a la cantidad de recursos genómicos que se han generado en los últimos años (The International Aphid Genomics Consortium 2010; Legeai *et al.* 2010) los áfidos constituyen un excelente modelo para el estudio de las interacciones planta-insecto.

Los áfidos comúnmente son controlados con insecticidas, pero su uso posee desventajas, no sólo para el ambiente sino también para el control efectivo de los áfidos ya que las poblaciones de áfidos rápidamente desarrollan resistencia a diversos tipos de insecticidas (Devonshire y Field 1991; Robert *et al.* 2000; Edwards *et al.* 2008). Esto dificulta el control de los áfidos, y surge la necesidad de encontrar alternativas para el control de esta plaga, como por ejemplo la resistencia de los hospedantes. Es en éste sentido, que la comprensión de los procesos de interacción planta-áfido a distintos niveles, permitirá un mayor aprovechamiento de los recursos genéticos de las plantas hospedantes. Un ejemplo de gran importancia es el cultivo de papa, cuya plaga con mayor prevalencia es el áfido verde del duraznero, *Myzus persicae*.

1.2. La papa

La papa es el tercer cultivo en importancia a nivel mundial, después del trigo y el arroz. Las especies cultivadas comprenden a *Solanum tuberosum* y otras seis especies andinas expandidas en menor medida. Argentina contribuye con un 14% a la

producción de papa de América del Sur, que en 2011 fue de aproximadamente 14.300.000 t (FAOSTAT, 2013). En la actualidad, se registra un aumento de la producción de papa andina, que se concentra principalmente en las provincias de Salta y Jujuy.

Solanum tuberosum es una especie nativa de América y fue introducida en Europa en el siglo XVI por los españoles. Existen dos centros de biodiversidad de especies silvestres de papa: la región Central de México y la región Andina que se extiende desde Perú hasta el Noroeste Argentino (Rousselle *et al.* 1999). El cultivo tiene una gran cantidad de especies silvestres emparentadas ya que de 235 especies de papa reconocidas, hay siete cultivadas y 228 silvestres distribuidas desde el suroeste de Estados Unidos hasta el extremo sur de los Andes (Claure 1996). Una característica importante del cultivo de papa es que se multiplica en forma clonal por medio de la propagación vegetativa de tubérculos llamados “papa semilla”.

La papa, al igual que otros cultivos, se ve constantemente amenazada por una gran variedad de enfermedades y plagas. Sin embargo, debido a que la papa se propaga vegetativamente, las virosis son particularmente importantes en este cultivo porque los virus pueden permanecer en los tubérculos causando que las virosis puedan persistir por mucho tiempo causando pérdidas severas por disminución del rendimiento o calidad (Edwards *et al.* 2008). Existen al menos 54 virus que pueden infectar a la papa (Brunt *et al.* 1996) pero los principales son: PVY (*Potato virus Y*) o Virus “Y” de la papa, causante del mosaico severo; PVX (*Potato virus X*) o Virus “X” de la papa, causante del mosaico latente y el PLRV (*Potato leaf roll virus*) o Virus del enrollamiento de la hoja de papa. Como ya se mencionó, *M. persicae*, es el vector más eficiente en la transmisión de virosis de la papa.

1.3. *Myzus persicae*, el áfido verde del duraznero

Myzus persicae (Sulzer) es una especie de áfido altamente polífaga, que puede infestar a una gran diversidad de plantas pertenecientes a más de 40 familias botánicas, entre las que se encuentran Solanaceae, Asteraceae, Malvaceae, Brassicaceae, Amaranthaceae, Rosaceae, Cucurbitaceae, entre otras (Blackman 1974). Este áfido puede causar múltiples daños, directamente por remoción de nutrientes y por secreción de saliva con compuestos bioactivos que afectan a la planta e indirectamente por secreción de melaza que favorece las infecciones fúngicas secundarias y por su capacidad para actuar como vector de virosis, siendo el vector más importante del PLRV y el PVY.

Myzus persicae, como la mayoría de los áfidos, posee un ciclo de vida complejo, que incluye alternancia de generaciones y formas, dependiendo de las condiciones ambientales y la disponibilidad de hospedantes. En condiciones ambientales óptimas y con disponibilidad de hospedantes secundarios, las poblaciones se constituyen en su totalidad por hembras partenogénicas que pueden ser ápteras o aladas, cuando la población necesita dispersión. Alternativamente, durante el invierno ocurren generaciones sexuales sobre el hospedante primario que es el duraznero (*Prunus persica*) (Dixon 1985).

1.4. Modo de alimentación y estudios de comportamiento alimenticio de los áfidos

Para seleccionar una planta huésped, los áfidos penetran el tejido vegetal insertando sus estiletes entre las paredes de las células de la epidermis y el mesófilo, atravesándolos en dirección al floema (Tjallingii y Hogen Esch 1993). En el trayecto hacia el floema, los áfidos salivan constantemente formando una vaina con saliva

gelificante que recubre a los estiletes (Miles 1999) y evita el contacto del áfido con las defensas extracelulares de la planta. Los áfidos mueven los estiletes por el apoplasto de las células, pero también pueden penetrar las células del mesófilo e incluso del floema, realizando pruebas cortas sin matar las células (Tjallingii 1985, 1988, 1995, Shwarkopf *et al.* 2013). Durante estas pruebas cortas, los áfidos ingieren contenido celular e inyectan saliva (Martin *et al.* 1997, Miles 1999, Tjallingii y Cherqui, 1999). La razón por la cual los áfidos realizan pruebas cortas es aún desconocida, aunque se ha demostrado que éstas pruebas cumplen un rol importante en la transmisión de virus no floemáticos (Martin *et al.*, 1997). El proceso de “prueba” de una planta consiste en la penetración de los tejidos de la planta, la punción de un tubo criboso y la salivación en el floema. Éste proceso puede durar varias horas, es decir que áfido y planta interactúan íntimamente antes de que el áfido comience a alimentarse (Pollard 1973; Tjallingii y Esch 1993; Martin *et al.* 1997; Miles 1999; Cherqui y Tjallingii 2000; Tjallingii 2006; Will y Van Bel 2006). Durante el proceso de prueba, la salivación cumple un rol fundamental. Además de la saliva gelificante, los áfidos producen saliva acuosa que está compuesta por una mezcla compleja de enzimas líticas y otros componentes (Harmel *et al.* 2008; Carolan *et al.* 2009; Will *et al.* 2009) y es secretada continuamente durante la interacción con la planta (Moreno *et al.* 2011). La salivación les permite a los áfidos contrarrestar las defensas de la planta que se inician en respuesta al daño de los elementos de tubo criboso y poder así mantener el flujo de savia (Tjallingii 2006; Walling 2008). (**Figura 1.1**).

La técnica de gráfico de penetración eléctrica o *electrical penetration graph* (EPG) es una técnica que permite estudiar la penetración de los tejidos de las plantas por los estiletes de los áfidos. Esta técnica fue introducida por McLean y Kinsey (1964) y desarrollada en mayor profundidad por Tjallingii (1978, 1985, 1988).

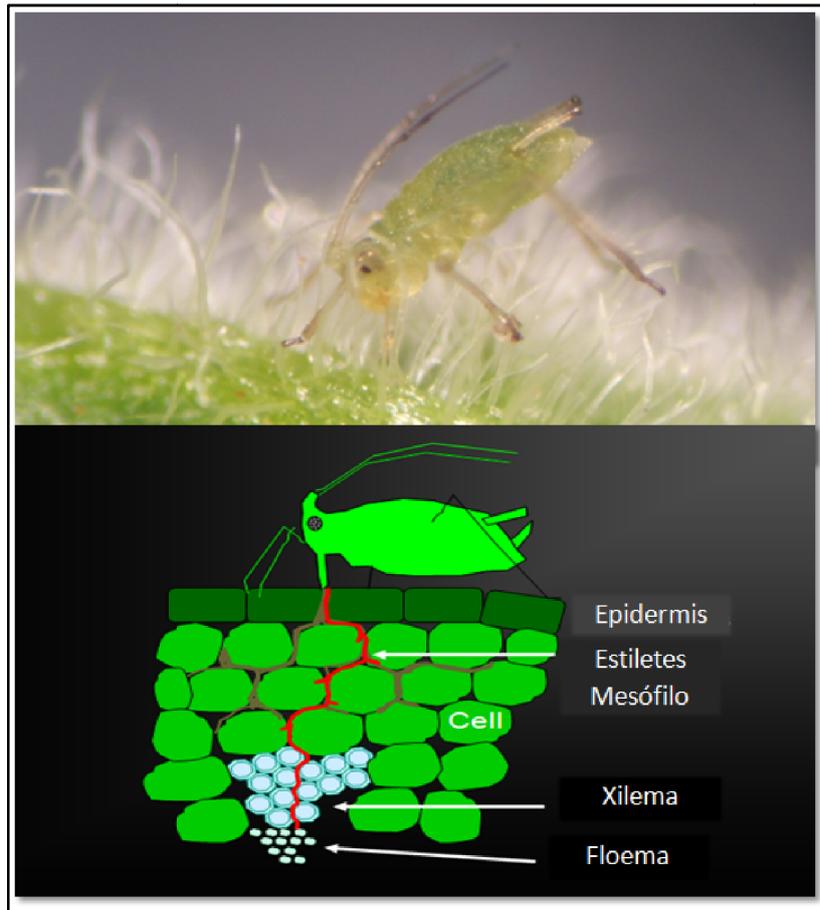


Figura 1.1. Mecanismo de alimentación de los áfidos. Fotografía de *Myzus persicae* en proceso de prueba y esquema. Con sus estiletes (aparato bucal) penetran los tejidos vegetales, pasando entre las células de la epidermis y el mesófilo, hasta alcanzar el floema, en el cual si es favorable, permanecerán por horas o días alimentándose. En el camino hacia el floema, pueden perforar las células para “probar” su contenido. Durante todo el proceso de “prueba” de una planta, los áfidos salivan constantemente con saliva acuosa y saliva gelificante.

El fundamento de ésta técnica (**Figura 1.2**) consiste en que la planta y el áfido son incorporados a un circuito eléctrico cerrado de bajo voltaje, colocando electrodos que en el sustrato de la maceta, y en el dorso del áfido. Cuando el áfido comienza a “probar” la planta (inserta los estiletes en el tejido vegetal), el circuito se cierra y se reciben señales eléctricas en un sistema de registro. Cuando el áfido comienza a probar la planta se reciben señales eléctricas referidas como ondas que resultan de las fluctuaciones del voltaje debido a las diferencias en las actividades de prueba de los áfidos en los tejidos de las plantas. Estas diferentes ondas se correlacionan con las

actividades del áfido y el tejido donde se encuentran los estiletes (Kimmins y Tjallingii 1985; Tjallingii 1978; 1988; Tjallingii y Hogen Esch 1993).

La técnica de EPG constituye una herramienta valiosa para estudiar las interacciones planta-áfidos a nivel inter e intracelulares y por ello ha sido utilizada ampliamente para estudiar distintos aspectos de la interacción. Por ejemplo, la inducción de susceptibilidad o resistencia de las plantas por parte de los áfidos (Prado y Tjallingii 2007), diferencias en comportamiento alimenticio entre diferentes especies de áfidos y diferentes formas dentro de la misma especie (Boquel *et al.* 2011) mecanismos de transmisión de virus por los áfidos (Martin *et al.* 1997; Fereres y Moreno 2009; Tjallingii *et al.* 2010) y efecto de las diferentes especies de plantas hospedantes en el comportamiento alimenticio de distintas especies de áfidos (Alvarez *et al.* 2006; Le Roux *et al.* 2007).

1.5. Respuestas de las plantas a los áfidos

Las respuestas de las plantas a los áfidos son complejas y se ha propuesto que su modo de alimentación tan especializado (**Figura 1.1**) genera respuestas diferentes a las generadas por insectos masticadores, probablemente por generar menos daño en el tejido. Las hormonas vegetales, además de regular el crecimiento y desarrollo de las plantas, actúan como una red de señalización en respuesta a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, y entre ellos, los áfidos. El ácido salicílico (*salicylic acid*, SA), el ácido jasmónico (*jasmonic acid*, JA) y el etileno (Et) son las fitohormonas que han sido más ampliamente estudiadas con respecto a su rol en la señalización de las defensas de la planta contra diversos estreses bióticos (Morkunas *et al.* 2011; Erb *et al.* 2012). Varios estudios han demostrado que la alimentación de los áfidos sobre las plantas, induce genes involucrados en la vía del SA, del JA y también ET (Moran y Thompson

2001; Zhu-salzman *et al.* 2004; Thompson y Goggin 2006; De Vos y Jander 2009; Alvarez *et al.* 2013).

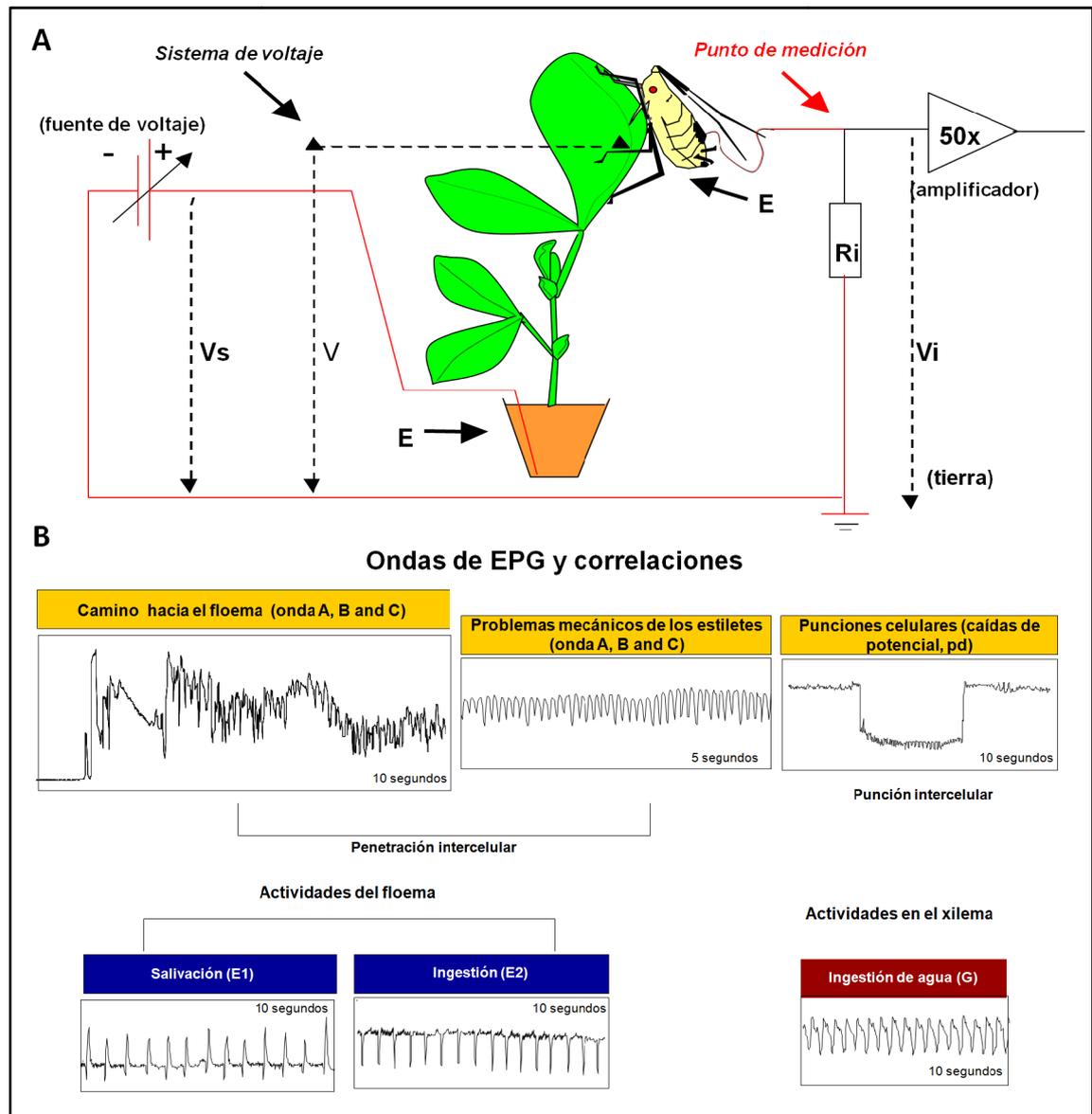


Figura 1.2. Técnica de gráfico de penetración eléctrica, EPG. A) Fundamento de la técnica. El áfido y la planta son incorporados a un circuito eléctrico de bajo voltaje, colocando electrodos en el sustrato de la maceta y en el dorso del áfido. Luego se incorpora al circuito, electricidad con una fuente de voltaje (V_s) y una resistencia (R_i). Se conecta un amplificador en el punto de medición entre el insecto y la resistencia. Cuando el áfido comienza a “probar” la planta (inserta los estiletes en el tejido vegetal), el circuito se cierra y se reciben señales eléctricas (de alrededor de 5 V) en un sistema de registro. E, potencial de los electrodos; V, potencial del circuito ($V_s + E + E$); V_i , potencial señal (señales de EPG) (Tjallingii, 2006). B) Señales de EPG referidas como ondas que resultan de las fluctuaciones del voltaje debido a las diferencias en las actividades de prueba de los áfidos en los tejidos de las plantas.

Además, se ha observado inducción de genes de proteínas relacionadas a la patogénesis (*pathogenesis related*, PR) (Moran *et al.* 2002; Alvarez *et al.* 2013) y genes implicados en la biosíntesis de compuestos importantes del metabolismo primario y secundario, lo que indicaría una reprogramación de metabolismo de las plantas (De Vos *et al.* 2005). Debido a que, tanto la inducción de la vía mediada por el SA, como la inducción de proteínas PR son procesos que están relacionados con la resistencia a organismos patógenos del tipo biotróficos (Walling 2000; Loon *et al.* 2006), se ha propuesto que la infestación por áfidos guarda similitud con una infección bacteriana biotrófica (Alvarez *et al.* 2007; De Vos y Jander 2009; Alvarez *et al.* 2013). Esta similitud, que también se ha observado en el caso de otros insectos hemípteros como por ejemplo moscas blancas (Zarate *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2013), podría estar relacionada con la percepción por parte de la planta, de los microorganismos para los que los insectos actúan como vectores (Sugio *et al.* 2011, revisado por Bonaventure 2012) o con las bacterias endosimbióticas de los insectos (Alvarez 2007; Goggin 2007).

1.6. *Buchnera aphidicola*, el endosimbionte primario de los áfidos

Myzus persicae, al igual que casi todos los áfidos, establece una simbiosis obligada con bacterias endosimbióticas. Éstas son γ -proteobacterias del género *Buchnera* (Munson *et al.* 1991) que se localizan en el hemocele del áfido dentro de células especializadas llamadas bacteriocitos (Buchner 1965). Estas bacterias se transmiten verticalmente por vía materna a los embriones, a través de las generaciones de los hospedantes, y la relación entre los áfidos y *B. aphidicola* es tan obligada que ninguno puede reproducirse de forma independiente. *Buchnera aphidicola*, como resultado de la coevolución con el áfido, ha reducido su genoma resultando completamente dependiente del hábitat intracelular del áfido. El pariente más cercano

de *B. aphidicola*, es *Escherichia coli*, pero su genoma es aproximadamente el 60% del tamaño del de *E. coli*. (Whitehead y Douglas 1993; Shigenobu *et al.* 2000; Shigenobu *et al.* 2001).

Además de *B. aphidicola*, los áfidos establecen relaciones con otros tipos de bacterias endosimbióticas que también se transmiten verticalmente y que colectivamente se denominan endosimbiontes secundarios (S-simbiontes) o endosimbiontes facultativos. Algunos de los S-simbiontes ocupan tejidos y células de forma inespecífica, mientras que otros se localizan en células especializadas, como micetocitos secundarios (S-micetocitos) y otras células (Tsuchida *et al.*, 2006, von Burg *et al.*, 2008, Vourburger *et al.*, 2010, revisado por Oliver *et al.*, 2010).

Los áfidos utilizan la savia como fuente exclusiva de alimento pero ésta es desbalanceada para los requerimientos nutricionales de los áfidos, debido a la naturaleza de su composición (grandes concentraciones de azúcar y baja concentración de aminoácidos con déficit de aminoácidos esenciales). Consecuentemente, la presencia de *B. aphidicola* es vital para *M. persicae* ya que le provee aminoácidos esenciales y vitaminas que complementan su dieta (Douglas y Prosser 1992; Douglas 1996; Douglas *et al.* 2001; Douglas 2003). En contraste, *B. aphidicola* carece de las vías de biosíntesis de aminoácidos no esenciales y, por lo tanto depende del áfido para obtener estos aminoácidos (Hansen y Moran 2011).

Actualmente se acepta que el rol de *B. aphidicola* es completar la dieta del áfido (Prosser y Douglas 1992; Douglas 1996). Sin embargo, se han encontrado evidencias acerca de otros posibles roles. Por ejemplo, un mismo clon de *M. persicae* alimentado en distintas plantas hospedantes posee en su hemocele distinta cantidad de proteínas de *B. aphidicola* (Francis *et al.* 2006), y un mismo clon de *Macrosiphum euphorbiae*, alimentado en 2 genotipos de tomate, tiene distintas cantidades de proteínas de *B.*

aphidicola en su cuerpo (Francis *et al.* 2010). Además, *B. aphidicola* favorece la viabilidad de virus persistentes para los que *M. persicae* actúa como vector, por medio de la secreción de una chaperona específica llamada *GroEL* (van den Heuvel *et al.* 1994; van den Heuvel *et al.* 1997).

Se ha sugerido que los cambios en la expresión de algunos genes en plantas atacadas por áfidos, que indican que la respuesta de estas plantas tiene cierta similitud a la respuesta a una infección bacteriana biotrófica (Alvarez 2007; De Vos y Jander 2009; Alvarez *et al.* 2013) podrían estar relacionados con *B. aphidicola*.

1.7. Senescencia foliar: ¿Defensa de las plantas o beneficio para los áfidos?

La senescencia foliar es un proceso de degradación programado que constituye la etapa final del desarrollo de las hojas (Buchanan-Wollaston 1997; Lim *et al.* 2007). Es un proceso activo y altamente regulado de decrecimiento de la fotosíntesis; y debido a la degradación de las estructuras de la hoja, se produce un reciclado y transporte de nutrientes hacia diferentes destinos dentro de la planta. Como resultado de la degradación de las proteínas, los aminoácidos son movilizados y enriquecen la savia floemática (Buchanan-Wollaston 1997; Page *et al.* 2001; Liu *et al.* 2008).

En las interacciones planta-áfido, la senescencia foliar es un proceso de gran interés y se ha propuesto que la inducción de senescencia confiere resistencia a los áfidos, tal como proponen Pegadaraju *et al.* (2005). Sin embargo, también es posible que un mayor contenido de aminoácidos en la savia floemática, estimule la ingestión y mejore la nutrición de los áfidos, favoreciéndolos. Alvarez *et al.* (2006; 2013) encontraron que en un cultivar de papa resistente a *M. persicae*, la resistencia disminuye con la edad de la planta, y que la susceptibilidad está relacionada con la aparición de

senescencia foliar ya que *M. persicae* no puede colonizar las hojas jóvenes de las plantas, pero puede sobrevivir y reproducirse en las hojas maduras senescentes.

Myzus persicae induce genes relacionados a la senescencia en plantas de papa (Alvarez *et al.* 2014) por lo que se ha propuesto que *M. persicae* podría inducir senescencia en su propio beneficio, manipulando la fisiología de planta y que *B. aphidicola* podría participar de éste proceso.

1.8. Objetivos, hipótesis y estructura de la tesis

En ésta Tesis se estudiaron las relaciones complejas y dinámicas que ocurren entre áfidos y plantas, utilizando el sistema *Solanum tuberosum-Myzus persicae* como modelo (**Figura 1.3**). Se eligió trabajar con éste modelo debido a la importancia económica del cultivo de papa y una de sus plaga más importantes, *M. persicae*. En particular, se estudió el rol del endosimbionte primario de *M. persicae*, *Buchnera aphidicola* y de la senescencia foliar en la relación planta-áfido. Además, trabajar con éstos tres organismos resulta muy conveniente ya que existen herramientas moleculares disponibles para los tres organismos. Tanto el genoma de la papa, como el de otras Solanaceas emparentadas con la papa de importancia económica como por ejemplo el tomate, están completamente secuenciados, existen bases de datos de EST, y de diversos marcadores moleculares (www.potatogenome.net , <http://solgenomics.net/>). También hay disponibles bases de datos del genoma y ESTs de áfidos (Ramsey *et al.* 2007; The International Aphid Genomics Consortium 2010; Legeai *et al.* 2010) (www.aphidbase.com). Por último, también se ha secuenciado el genoma de muchas cepas de *B. aphidicola* (Shigenobu *et al.* 2000) y que están disponibles de forma gratuita (<http://www.buchnera.org/>).

1.8.1. Objetivo general

Estudiar el rol de la senescencia foliar y del endosimbionte primario de los áfidos, *B. aphidicola*, en la interacción planta-áfido, en relación a la aceptación de la planta como huésped.

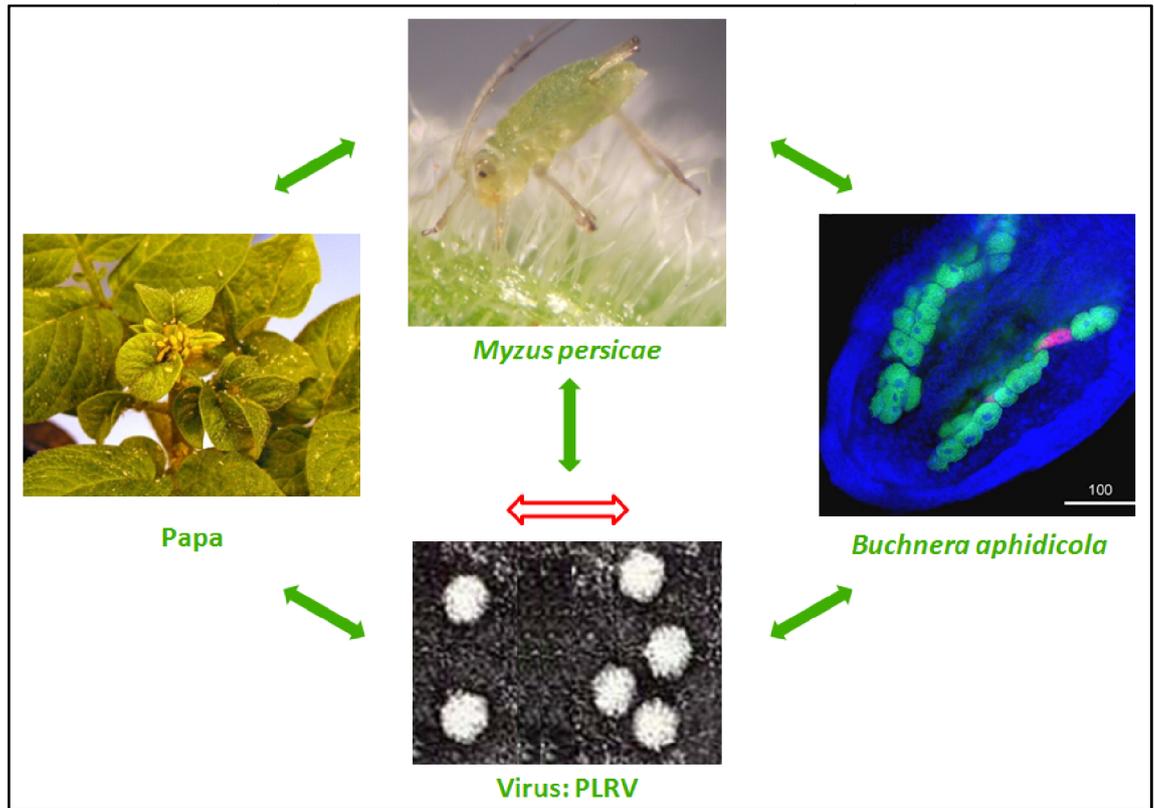


Figura 1.3. Modelo de trabajo utilizado en ésta Tesis. Las flechas verdes, señalan las relaciones aceptadas entre los participantes. *Myzus persicae* es la plaga con mayor prevalencia en el cultivo de papa, principalmente por su capacidad para ser vector de virosis, como por ejemplo el PLRV. *M. persicae* al igual que todos los áfidos, se asocia con la bacteria endosimbiótica *Buchnera aphidicola* (foto de R. Koga) cuya función aceptada es suplementar la dieta del áfido. Además *B. aphidicola* produce una proteína fundamental para la trasmisión de virus. El objetivo de éste trabajo (señalado por la flecha roja hueca) es evaluar si existe relación entre *B. aphidicola* y la planta hospedante del áfido en relación a la aceptación.

1.8.2. Hipótesis de trabajo

Buchnera aphidicola produce proteínas o pequeños péptidos efectores que están presentes en la saliva del áfido y que son inoculados por el insecto en los tejidos de la planta, o bien la bacteria produce proteínas que actúan sobre las glándulas salivares del áfido, modificando la composición de la saliva (**Figura 1.4**). La saliva del áfido

contendrá entonces moléculas efectoras que desencadenarán respuestas en las plantas, como por ejemplo, la inducción de procesos similares a la senescencia.

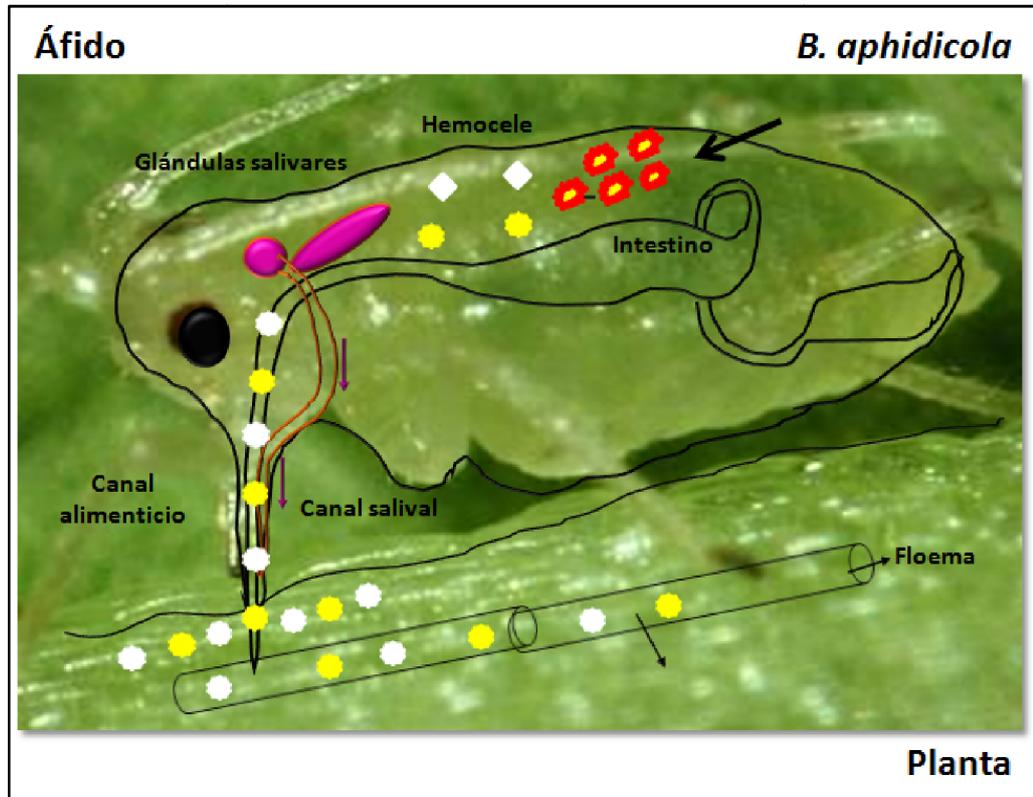


Figura 1.4. Hipótesis de trabajo de ésta Tesis. *Buchnera aphidicola*, la bacteria endosimbiótica de *Myzus persicae*, que se localiza en el hemocele del áfido (formas color naranja), produce efectores que son inoculados en los tejidos de la planta hospedante del áfido (círculos amarillos), o bien proteínas que actúan sobre las glándulas salivares del áfido (rombos blancos), induciendo la producción de efectores del áfido (círculos blancos). La presencia de éstos efectores en la saliva de *M. persicae*, desencadenan cambios fisiológicos en la planta, como por ejemplo procesos similares a la senescencia foliar.

1.8.3. Estructura de la tesis

En el **Capítulo 2**, se estudió la relación planta-áfido, evaluando el efecto de la senescencia foliar inducida. Para esto se indujo senescencia por estrés lumínico en la parte basal de las plantas de papa, conservando los brotes apicales normales y en ellos, se midió el desempeño (*performance*) y el comportamiento alimenticio de los áfidos.

En el **Capítulo 3**, se estudió la relación áfido-endosimbionte en relación a la aceptación del hospedante. Para lograr este objetivo, se eliminó experimentalmente la bacteria del cuerpo de los áfidos, y se evaluó el comportamiento alimenticio en un

hospedante óptimo como lo es el rabanito utilizando la técnica de gráfico de penetración eléctrica (EPG). Además, se midió la expresión de genes que se expresan en la glándula salival del áfido.

En el **Capítulo 4**, se estudio la relación planta-áfido-endosimbionte en relación a la aceptación de la planta hospedante, trabajando con dos genotipos de papa de distinta susceptibilidad a *M. persicae*. Para esto se eliminó experimentalmente a *B. aphidicola* del cuerpo de los áfidos, y se estudió el comportamiento alimenticio de los áfidos utilizando la técnica de EPG.

En el **Capítulo 5**, se estudio la relación planta-áfido-endosimbionte en relación a la percepción por parte de la planta hospedera del ataque del áfido, estudiando la expresión de genes marcadores de las principales vías de defensa en plantas de *S. tuberosum* y en la planta modelo, *Arabidopsis thaliana*.

Finalmente, el **Capítulo 6** es una discusión general acerca de los resultados, en una visión integrada de las relaciones planta-áfido-endosimbionte. En este capítulo se discuten también, líneas futuras de investigación generadas a partir de esta Tesis.

CAPÍTULO 2

Interacción planta-áfido: La senescencia inducida en plantas de papa favorece la alimentación y el desarrollo ninfal de *Myzus persicae*

Este capítulo ha dado lugar a la siguiente publicación:

- **Machado Assefh, Cristina R., Lucatti, Alejandro F., Alvarez, Adriana E.** (2013). Induced senescence promotes the feeding activities and nymph development of *Myzus persicae* on potato plants. *Journal of Insect Science*. *En prensa*.

Resumen

El efecto que tiene la senescencia inducida en plantas de *Solanum tuberosum* se evaluó en el comportamiento alimenticio y desempeño del áfido verde del duraznero, *Myzus persicae*. Se indujo senescencia cubriendo la parte basal de la planta con una tela negra por 5 días, evitando el pasaje de luz y permitiendo el pasaje de gases, pero conservando los brotes apicales descubiertos. La parte basal de las plantas control se cubrió con una tela blanca que permite el pasaje de luz y gases. El grado de senescencia se determinó midiendo el contenido de clorofila de las hojas cubiertas. El desempeño y el comportamiento alimenticio de *M. persicae* se estudiaron en las hojas apicales descubiertas. El desempeño se evaluó midiendo la mortalidad de las ninfas y el tiempo pre-reproductivo. El comportamiento alimenticio de los áfidos se monitoreó con la técnica de gráfico de penetración eléctrica (*electrical penetration graph, EPG*). En las plantas con senescencia inducida, los áfidos mostraron una reducción en el tiempo pre-reproductivo. Los áfidos también pasaron más tiempo ingiriendo savia del floema que en las plantas control y realizaron más pruebas breves después de la primera ingestión sostenida de savia. Estos resultados sugieren que las actividades floemáticas y el desarrollo ninfal de *M. persicae* se benefician del enriquecimiento nutricional que resulta de la senescencia inducida en plantas de papa. La senescencia inducida mejoró la aceptación de la planta por parte de *M. persicae* a través de un incremento en la ingestión de savia que, probablemente, resultó en una reducción en el tiempo de desarrollo.

2.1. Introducción

El pulgón verde del duraznero, *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) es un insecto fitosuccívoro que se alimenta de la savia del floema a través de su aparato bucal modificado en forma de agujas, que recibe el nombre de estiletes. Para seleccionar la planta huésped, los áfidos insertan sus estiletes entre las paredes celulares de las células de la epidermis y el mesófilo, y en el camino hacia el floema, pueden punzar las células presumiblemente para “probar” su contenido (Tjallingii y Esch 1993). Cuando los áfidos alcanzan un elemento de tubo criboso, prueban el contenido celular y si éste es favorable, comienzan a ingerir la savia del floema. El proceso de aceptación de la planta toma varias horas en las cuales el áfido y la planta interactúan cercanamente (Pollard 1973; Tjallingii y Esch 1993; Miles 1999; Cherqui y Tjallingii 2000; Tjallingii 2006; Will y van Bel 2006). A través de la técnica de gráfico de penetración eléctrica (*electrical penetration graph*, EPG) ha sido posible estudiar la penetración de la planta por los estiletes (McLean y Kinsey 1964; Kimmins y Tjallingii 1985; Tjallingii 1985; Tjallingii 1988). Las señales de EPG se han correlacionado con las actividades de los áfidos y con la localización de los estiletes en los distintos tejidos de las plantas (Tjallingii y Esch 1993), y por lo tanto, constituye una herramienta sólida y valiosa para estudiar las interacciones planta-insecto a nivel de tejido.

Myzus persicae es una especie de áfido que tiene un amplio rango de hospedantes. Ataca a muchas plantas de importancia económica y es la especie de áfido más importante que infesta el cultivo de papa (Kuroli y Lantos 2006). Sin embargo, se han reportado algunos ejemplos de resistencia en especies silvestres de papa. Alvarez *et al.* (Alvarez *et al.* 2006; Alvarez *et al.* 2013) encontraron que el cultivar Kardal (*Solanum tuberosum*) presenta resistencia a *M. persicae* a nivel de floema, pero la resistencia disminuye con la edad de la planta, y la susceptibilidad en éste cultivar, está

relacionada con la aparición de senescencia foliar. Por esta razón, *M. persicae* no puede colonizar las hojas jóvenes de las plantas, pero puede sobrevivir y reproducirse en las hojas maduras senescentes.

La senescencia foliar es un proceso programado de degradación que constituye el paso final del desarrollo de la hoja (Buchanan-Wollaston 1997; Lim *et al.* 2007). Es un proceso activo que involucra un decrecimiento altamente regulado de la fotosíntesis; degradación de los cloroplastos y macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y lípidos), pérdida de clorofila, y removilización de nutrientes hacia diferentes destinos dentro de la planta (Buchanan-Wollaston 1997; Page *et al.* 2001; Liu *et al.* 2008). Estos cambios fisiológicos, son evidentes en la expresión de genes relacionados con varias categorías funcionales y con la activación de distintas vías de señalización (Buchanan-Wollaston *et al.* 2003; Gepstein *et al.* 2003; Buchanan-Wollaston *et al.* 2005; Breeze *et al.* 2008). Como resultado de la degradación de las proteínas, los aminoácidos son movilizados y enriquecen la savia floemática. En este sentido, la senescencia foliar podría favorecer a los áfidos, ya que un mayor contenido de aminoácidos en la savia, podría estimular la ingestión y mejorar la nutrición.

Hay evidencias de que en plantas infestadas por áfidos, la expresión de genes que están involucrados en la conversión de sitios de alimentación de los insectos, cambia para convertir estos sitios en sumideros metabólicos (Moran *et al.* 2002; Alvarez *et al.* 2014). Esto sugiere que la ingestión de savia por los áfidos, puede ser hidráulicamente equivalente a los sumideros de las plantas, como por ejemplo, las raíces o los frutos. Sin embargo, la interacción establecida entre la planta y el áfido es más compleja que una interacción natural fuente-sumidero de los tejidos de las plantas (Douglas 2003).

Por otro lado, hay ejemplos de que los áfidos pueden modificar la composición de la savia del floema. Por ejemplo, se ha encontrado que en plantas de trigo y de avena infestadas con *Schizaphis graminum*, la concentración de aminoácidos, en particular la de glutamina, aumenta local y sistémicamente. La glutamina es el principal medio de transporte de nitrógeno desde las hojas senescentes a los órganos sumideros (Kamachi *et al.* 1992; Watanabe 1997; Buchanan-Wollaston *et al.* 2003).

También se ha demostrado que un gran número de genes cambian su expresión, tanto en presencia de senescencia, como bajo herbivoría. Muchos de estos genes que se expresan diferencialmente, pueden generar cambios en el estado fisiológico de la planta, de fuente a sumidero, lo que sugeriría una manipulación de la planta por parte del áfido para su propio beneficio. Se ha sugerido que estos cambios son necesarios para preparar el sitio de alimentación y que pueden mediar la habilidad de los áfidos para establecer una colonia sobre un hospedante, promoviendo la susceptibilidad de la planta (Moran y Thompson 2001; Moran *et al.* 2002; Vos *et al.* 2007; Alvarez *et al.* 2013).

Por otro lado, se ha propuesto que las plantas pueden utilizar la senescencia como un mecanismo de resistencia. En *Arabidopsis thaliana*, el fenotipo hipersenescente relacionado a la expresión constitutiva del gen *PR genes5 (cpr 5) /hypersenescence1 mutant*, mostró estar asociada al incremento de la resistencia a *M. persicae* en éste mutante, ya que la reproducción de los áfidos y la tasa de crecimiento se redujeron comparados con el genotipo silvestre (Pegadaraju *et al.* 2005; Pegadaraju *et al.* 2007).

En éste Capítulo, se indujo senescencia por estrés lumínico en la parte basal de las plantas de papa, para estudiar el efecto que la senescencia inducida tiene sobre el rendimiento y el comportamiento alimenticio de los áfidos. La evaluación se realizó en los ápices descubiertos de las plantas. El objetivo es estudiar el efecto de la senescencia

foliar inducida en la interacción planta-áfido. La hipótesis propuesta es que la reconversión y removilización de nutrientes desde la parte basal de la planta con senescencia inducida hacia el resto de la planta, favorece el desempeño y el comportamiento alimenticio de *M. persicae* en plantas de *S. tuberosum*, promoviendo la aceptación de la planta.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Plantas y áfidos

Se utilizaron plantas de papa del cultivar PO 97.11.9 de *S. tuberosum* dada su susceptibilidad a *M. persicae*. Este cultivar fue obtenido desde el banco de germoplasma de INTA Balcarce, Buenos Aires, Argentina. La propagación de las plantas se llevó a cabo *in-vitro* en medio Murashige y Skoog con vitaminas, sacarosa al 3%, y pH 5,8. Luego de 2 semanas, las plántulas que mostraron raíces, fueron transferidas a macetas de 500 gr con tierra como sustrato, y colocadas en una cámara de crecimiento a $22 \pm 3^\circ\text{C}$, con aproximadamente 70% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16 hs de luz y 8 de oscuridad. Todas las plantas fueron evaluadas en el periodo de prefloración.

Los áfidos utilizados provinieron de una colonia monoclonal criada en plantas de rabanito (*Raphanus sativus* L) en el bioterio la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta, Salta-Argentina. Esta colonia fue iniciada a partir de una sola hembra virginópara, colectada a campo en 2009 y mantenida en una cámara climática a $22 \pm 3^\circ\text{C}$, 30 – 40% de humedad relativa, y un fotoperiodo de 16 hs de luz y 8 de oscuridad para promover la partenogénesis. Se inició una colonia nueva cada semana y los adultos ápteros recién mudados fueron utilizados para los experimentos.

2.2.2. Inducción de senescencia en plantas de papa

Se indujo senescencia en plantas de papa de 4 semanas de edad, cubriendo la parte basal de plantas durante 5 días con una bolsa de tela de algodón de color negro,

que evita el paso de la luz, pero permite el intercambio de gases. En las plantas control, la parte basal se cubrió con bolsas de tela antihelada (agrotexil) de color blanco que permite tanto el pasaje de gas como de luz. Tanto en las plantas con inducción de senescencia como en las plantas control, los brotes apicales se mantuvieron descubiertos hasta el final de la evaluación, y fue en esas hojas donde se evaluó el comportamiento alimenticio y el rendimiento de *M. persicae* (**Figura 2.1 A**).

2.2.3. Contenido de clorofila

Como marcador del inicio de la senescencia, se utilizó la disminución del contenido de clorofila. El contenido de clorofila a, clorofila b y contenido total de clorofila se midió por espectrofotometría en las hojas cubiertas. Se seleccionó una hoja al azar de la parte cubierta de cada planta. La extracción de clorofilas se llevó a cabo utilizando una solución 80 % v/v de acetona/amortiguador fosfato 2,5 mM; pH 7,8. Se cortaron y pesaron discos de hojas de 10 mm, los que se trituraron con un mortero con 2 mL de la solución de acetona. El homogenado fue colectado y lavado 2 veces (cada lavado con 1,5 mL de volumen final de la misma solución). Luego de la centrifugación, el sobrenadante fue llevado a un volumen final de 8mL y se midió la absorbancia de la solución a 663 y 646 nm, con un espectrofotómetro (MetroLab 325 BD). Se calculó el contenido de clorofila y se lo expreso como μg de clorofila* mL^{-1} de solución por gr de tejido fresco, tal como describe Porra *et al.* (1989). Se determinó el contenido de clorofila de una hoja por planta, de 4 plantas elegidas al azar, tanto en las plantas con senescencia inducida como en las plantas control.

2.2.4. Desempeño de los áfidos en plantas con senescencia inducida

El desempeño de *M. persicae* en plantas de papa con senescencia inducida y en plantas control (**Figura 2.1**), se evaluó registrando la mortalidad de las ninfas y el tiempo prereproductivo (desde ninfas recién nacidas a individuos adultos). Se colocaron

2 hembras adultas (1-3 días) en el lado abaxial de las hojas apicales (no cubiertas) de las plantas, en jaulas *clip-on* de 20 mm de diámetro. Se colocaron 4 o 5 jaulas por planta, y se utilizaron 8 plantas por cada tratamiento. Las jaulas se colocaron en las primeras 5 hojas totalmente expandidas, contando desde el ápice y con cuidado de que al colocar la jaula, la hoja no se dañe. Luego de las primeras 24 hs, se removieron los adultos dejando solamente 1 ninfa recién nacida por jaula. Se registró diariamente la condición de este individuo, vivo o muerto, hasta la producción de la primera progenie. Los experimentos se realizaron a 22 ± 2 °C, 60 % de humedad relativa y 16 hs de luz y 8hs de oscuridad. Se evaluaron un total de 35 insectos en las plantas senescentes y 30 en las plantas control.

2.2.5. Comportamiento alimenticio de los áfidos: Gráfico de penetración eléctrica, (*electrical penetration graph*, EPG)

Se utilizó la técnica de gráfico de penetración eléctrica DC-EPG o gráfico de penetración eléctrica (*electrical penetration graph*) (Tjallingii 1985) para monitorear el comportamiento alimenticio de áfidos hembras, adultas y ápteras. Se colocaron dos plantas de cada tratamiento en una jaula de Faraday y se registró el comportamiento alimenticio de 2 áfidos simultáneamente durante 6 horas, a 25 ± 2 °C, con luz constante en el laboratorio (**Figura 2.1B**). Los áfidos fueron colocados en el lado abaxial de una hoja, completamente extendida. El monitoreo se realizó en los ápices descubiertos de las plantas con inducción de senescencia y plantas control (**Figura 2.1A**). Antes de ser colocado en la planta, el áfido se conectó a un electrodo, que consistió en un cable de hilo de oro de 2-3 cm de largo y un diámetro de 20 μm . Para conectar el áfido al electrodo, primero se lo inmovilizó con un sistema de vacío, y luego se lo pegó con un pegamento de plata a base de agua, que conduce la electricidad. El otro extremo del cable se conectó a un alambre de cobre de 3 cm de largo y 0.2mm de diámetro. Seguidamente, éste alambre fue conectado a la entrada del amplificador principal, el que

posee una resistencia de 1 giga-ohm y $50\times$ de ganancia. El electrodo de la planta, un alambre de 2mm de diámetro y 10 cm de largo, fue insertado en el sustrato de la maceta que contenía la planta. Finalmente, este electrodo fue conectado a una salida de voltaje ubicado en el equipo de EPG (Giga-8, fabricado en la Universidad de Wageningen, Holanda). El registro se inició inmediatamente luego de adherir los áfidos a los electrodos, y aproximadamente 1 hora después de colectar los áfidos de la colonia. Se registraron las señales de 8 áfidos, 2 por planta en cada ronda de evaluación, incluyendo los 2 tratamientos (**Figura 2.1B**). La adquisición de datos se realizó utilizando el programa PROBE 3.0 (Laboratorio de Entomología, Universidad de Wageningen, Holanda), y el análisis de las señales con el programa Stylet v01.23 (EPG Systems, Wageningen, Holanda).

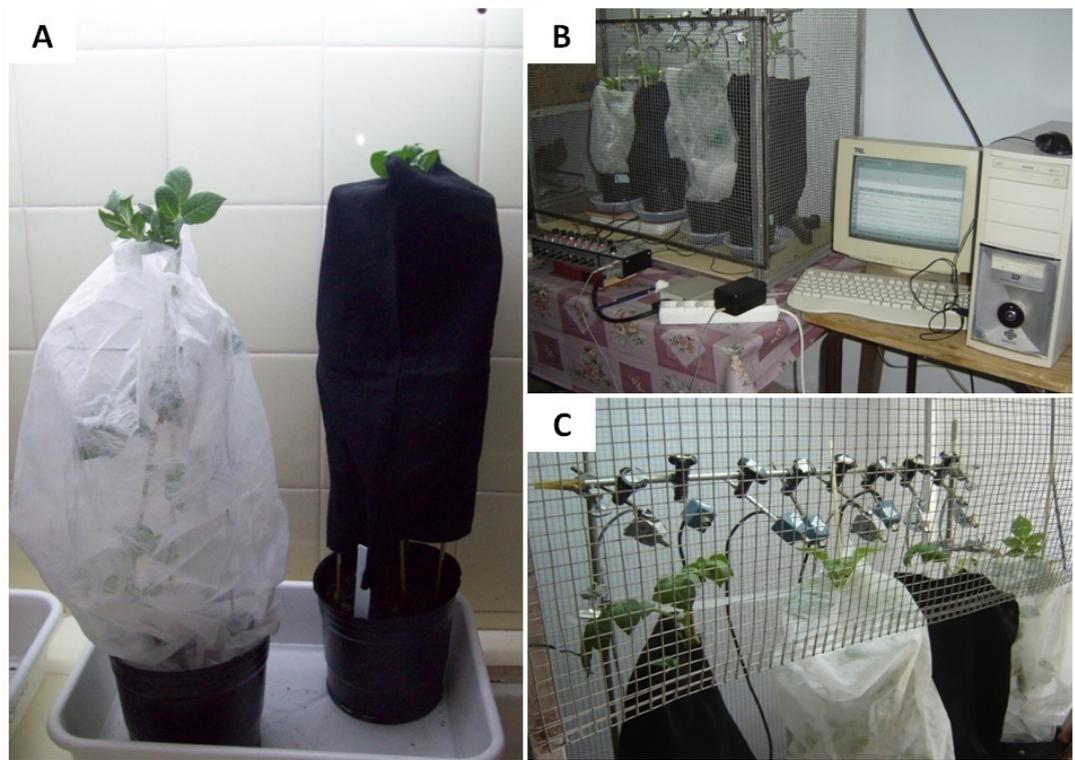


Figura 2.1. A) Plantas de *Solanum tuberosum* con inducción de senescencia (bolsa negra) y plantas control (bolsa blanca). B) Experimento de evaluación de comportamiento alimenticio con la técnica de gráfico de penetración eléctrica (EPG) en marcha. C) Plantas con senescencia inducida, y plantas control con los ápices descubiertos donde se colocaron los áfidos para ser evaluadas con EPG.

2.2.6. Ondas de EPG, patrones de ondas y variables

Las señales de EPG fueron analizadas para distinguir las siguientes fases, tipos o subtipos: (i) onda C, fase de pasaje de los estiletes por los otros tejidos de la planta y que agrupa a 4 ondas: A, B, C y pd (*potencial drops*, caídas de potencial). La onda A refleja el pasaje de los estiletes por la epidermis de la hoja, B refleja la salivación intercelular, C los movimientos de los estiletes y la formación de la vaina intercelular de saliva gelificante, y los pd, las caídas de potencial que se producen por efecto de las breves punciones celulares que traspasan la membrana plasmática. La onda E, que se produce cuando los estiletes del áfido realizan actividades en el floema, y fue separada en (ii) onda E1, de salivación en el elemento de tubo criboso y (iii) onda E2, de ingestión de savia con salivación simultánea; (iv) onda F, que se observa cuando ocurren problemas mecánicos con los estiletes (dificultades con la penetración de los estiletes) y (v) onda G, que es el consumo activo de agua desde los elementos del xilema (Tjallingii 1990). Los eventos de cada onda se definen como ocurrencias simples ininterrumpidas, de cualquiera de los tipos o subtipos de ondas antes descriptas. Las ondas fueron caracterizadas en 6 categorías de variables de EPG siguiendo la nomenclatura propuesta por Tjallingii (<http://www.epgsystems.eu/downloads.php>), Backus *et al.* (2007) y Sarria (2009): 1) número medio de veces que la onda ocurrió por insecto; 2) duración media de la onda por evento y por insecto; 3) duración máxima media de la onda por cada insecto; 4) tiempo medio a la primera vez que la onda ocurrió desde el inicio del experimento; y 5) número o porcentaje de áfidos que realizan ingestión sostenida de savia. (sE2: período ininterrumpido de E2 más largo que 10 minutos). Estas variables fueron calculadas para cada tratamiento utilizando la planilla de cálculo *Excel® workbook for EPG data calculation* (Sarria *et al.* 2009). La terminología utilizada para algunas variables fue modificada de acuerdo con Backus *et al.* (2007).

2.2.7. Análisis estadísticos

El contenido de clorofila a, b y clorofilas totales se comparó entre plantas con senescencia inducida y plantas control por la prueba *t* de Student para muestras independientes. La mortalidad de las ninfas fue comparada por la prueba exacta de Fisher, y el tiempo prereproductivo fue comparado utilizando la prueba U de rangos de Mann-Whitney para muestras independientes, para comparar los áfidos en plantas con senescencia inducida y plantas control. Las variables de EPG fueron calculadas individualmente para cada áfido, y luego se calcularon medias y errores estándar de la media (SEM) para cada tratamiento. En el caso de múltiples eventos de ondas o pruebas, la duración fue promediada de la media por individuo. Los individuos que no muestran una cierta onda, no contribuyeron a la variable calculada y, por tanto, el n fue menor que el número total de individuos evaluados por tratamiento. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para evaluar la diferencia entre plantas con senescencia inducida y plantas control, ya que las variables obtenidas con EPG no mostraron distribución normal. Para el análisis del número de áfidos que mostraron ingestión sostenida de savia (un evento de E2 mayor que 10 min) se utilizó la prueba exacta de Fisher. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando InfoStat Professional v2011p (<http://www.infostat.com.ar>).

2.3. Resultados

2.3.1. Determinación de clorofilas

Las hojas de las plantas con senescencia inducida mostraron etiolación y una reducción del contenido de clorofila a, clorofila b y clorofila total en comparación con las hojas de las plantas de control (Prueba de Student, $p \leq 0,05$; **Figura 2.2**).

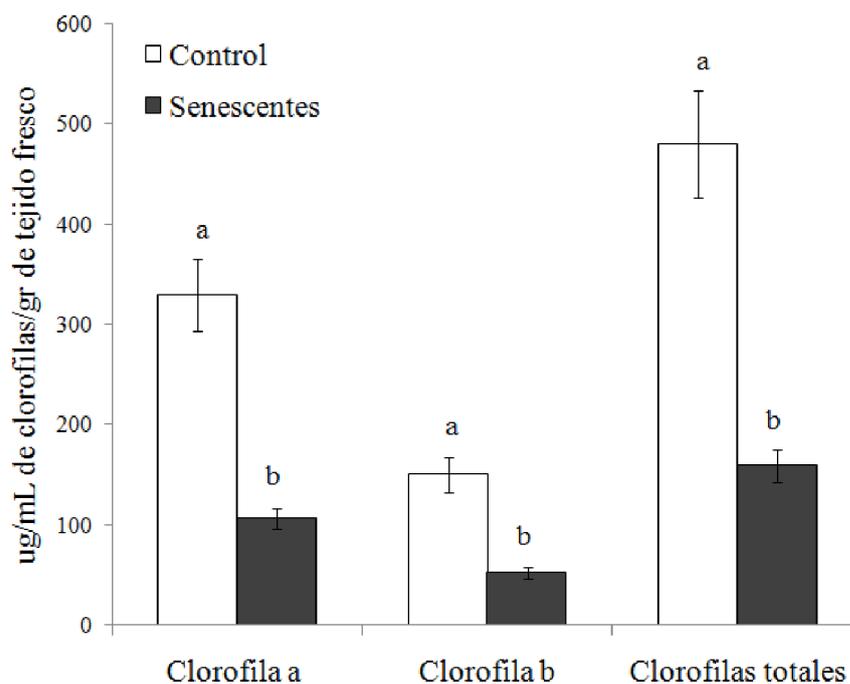


Figura 2.2. Contenido de clorofila a, clorofila b, y clorofila total en las plantas con senescencia inducida versus las plantas control de *Solanum tuberosum*. Se determinó el contenido de clorofila de una hoja por planta, de 4 plantas elegidas al azar de cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas (prueba *t* de Student, $p \leq 0,05$)

2.3.2. Desempeño de los áfidos en plantas con senescencia inducida

Se comparó el desempeño de los áfidos en plantas con senescencia inducida por estrés lumínico versus áfidos en plantas control. Se observaron diferencias significativas en algunos parámetros de vida. El tiempo prereproductivo fue más corto para los áfidos que se colocaron en las hojas apicales de las plantas con senescencia inducida, que en las plantas control (Mann-Whitney, $p = 0,0027$). La mortalidad de las ninfas no mostró diferencias significativas (prueba exacta de Fisher, $p = 0,440$) (**Tabla 2.1**).

Tabla 2.1. Tiempo de pre-reproductivo de *Myzus persicae* (en días) y la mortalidad de las ninfas por ciento durante el periodo pre-reproductivo en las hojas apicales de senescentes y de control de las plantas de *Solanum tuberosum*.

	Senescentes (n = 35)	Control (n = 30)	<i>p</i>
Tiempo prereproductivo	6 ± 0,3	7 ± 0,5	0,0027 ^{a*}
Mortalidad de ninfas	31	43	0,440 ^b

Valores *p*. ^a Mann-Whitney, diferencias significativas a $p \leq 0,05$; ^b prueba exacta de Fisher, diferencias significativas a $p \leq 0,05$. El asterisco (*) indica diferencias significativas

2.3.3. Comportamiento alimenticio de *M. persicae* en plantas con senescencia inducida

Las variables de EPG se clasificaron en tres grupos teniendo en cuenta su relación con la actividad del pulgón, o la ubicación del estilete en el tejido de la planta (**Tabla 2.2**). Se encontraron diferencias entre plantas senescentes y plantas control, en el número de pruebas cortas (pruebas más cortas que 3 minutos, **Tabla 2.2**, variable 10) después de la primera alimentación sostenida de floema, siendo significativamente mayor en las plantas con senescencia inducida ($W = 178$; $p < 0,01$). El resto de las variables que se relacionan con los periodos de prueba y de pasaje por otros tejidos, antes de iniciar las actividades en el floema (**Tabla 2.2**, variables 1-11) no mostraron diferencias significativas entre las plantas senescentes y las plantas control.

Con respecto a las variables que se relacionan con las actividades en el floema, se encontró que en las plantas con senescencia inducida el número de periodos de salivación seguido por ingestión de savia (**Tabla 2.2**, variable 14) fue significativamente mayor que en las plantas control ($W = 196$; $p = 0,05$). El tiempo total de actividades en el floema, por insecto (**Tabla 2.2**, variable 21), fue significativamente mayor en las plantas con senescencia inducida ($W = 190$; $p = 0,03$) y esto se debió a un tiempo significativamente más largo en la fase de ingestión de savia del floema (**Tabla 2.2**, variable 17; $W = 182$; $p = 0,03$). En contraste, la duración media total de salivación en el floema (E1, **Tabla 2.2**, variable 22), no mostró diferencias entre los tratamientos ($W = 226$; $p = 0,42$). El porcentaje de áfidos que mostraron alimentación sostenida en el floema fue mayor en las plantas con senescencia inducida que en las plantas control (82% y 60%, respectivamente, **Tabla 2.2**, variable 25; Fisher; $p = 0,24$). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Tabla 2.2. Medias ± EEM de variables de EPG de comportamiento alimenticio de *Myzus persicae* en plantas de *Solanum tuberosum* con senescencia inducida y en plantas control.

Relacionadas con	N°	Variables de EPG	Unidad	Control (n ^a = 15)	Senescentes (n = 17)	P ^b
Pruebas y punciones celulares	1	Tiempo desde el inicio del experimento hasta la 1er prueba	Min	2,34± 0,58	2,14±0,52	0,51
	2	Número de pruebas, por insecto	#	45,33 ± 24,54	31,03 ± 3,10	0,10
	3	Duración total de la 1er prueba, por insecto	Min	4,94 ± 3,03	3,74 ± 2,42	0,23
	4	Número de C (prueba, excluyendo F y G)	#	54 ± 24	41 ± 3	0,08
	5	Duración total de C por insecto	Min	4,27 ± 0,43	3,98 ± 0,32	0,25
	6	Duración media del evento de C	Min	4,28 ± 0,43	4,00 ± 0,33	0,35
	7	Número medio del evento de pd	#	140,6 ± 13,34	159,8 ± 12,54	0,39
	8	Duración total de eventos de pd	S	4,64 ± 0,17	4,36 ± 0,12	0,06
	9	Duración media de eventos de pd	Min	10,68 ± 0,99	11,56 ± 0,97	0,51
	10	Número medio de pruebas cortas luego del 1er E2 sostenido	#	1,27 ± 1,02	8,82 ± 2,2	<0,01**
	11	Tiempo al 1er E2 sostenido desde la 1er prueba	Min	231,6 ± 30,38	182,04 ± 27,03	0,34
Contacto con el floema: salivación e ingestión	12	Número medio de E1 simples (sin E2 siguiente) por insecto	#	6,13 ± 1,11	6,76 ± 0,93	0,57
	13	Número medio de E1 (tanto E1 simple + E1 seguidos de E2)	#	9,67 ± 1,57	12,59 ± 1,31	0,10
	14	Número medio de E12 (E1 y E2 combinados)	#	1,53 ± 0,31	3,41 ± 0,06	0,05*
	15	Duración media de E1 simple, p/insecto	Min	2,8 ± 0,37	3,07 ± 0,36	0,84
	16	Duración media de E1, p/insecto	Min	3,34 ± 0,53	3,12 ± 0,44	0,90
	17	Duración media de E2, p/insecto	Min	19,35 ± 12,58	19,73 ± 3,74	0,07
	18	Duración media de E12, p/insecto	Min	36,96 ± 15,27	20,15 ± 3,76	0,65
	19	Duración media máxima de E1 simple, p insecto	Min	5,46 ± 0,75	7,36 ± 1,31	0,58
	20	Duración máxima de E1	Min	13,30 ± 4,16	10,53 ± 2,07	0,84
	21	Duración máxima de E12 (combinado E1 y E2)	Min	44,39 ± 16,50	50,46 ± 11,29	0,29
	22	Duración total E1	Min	34,30 ± 7,67	36,57 ± 5,27	0,42
	23	Duración total de E1	Min	18,92 ± 4,38	20,79 ± 3,67	0,81
	24	Duración total de E2	Min	34,70 ± 16,40	76,04 ± 13,80	0,03*
	25	Duración total de E12	Min	50,08 ± 16,40	91,82 ± 13,80	0,03*
Aceptación del hospedante	26	Áfidos que realizan E2 sostenido	#(%)	9 (60%)	14 (82%)	0,24 ^c

^aReplicas de EPG; ^bvalores P, *Prueba de Mann Whitney (*) indica diferencias significativas, $p \leq 0,05$; Prueba exacta de ^cFisher's

2.4. Discusión

La senescencia foliar es un proceso complejo que implica la expresión de miles de genes y múltiples vías de señalización que conducen a cambios metabólicos tales como hidrólisis de las macromoléculas y una re-movilización masiva de las moléculas hidrolizadas que finalmente enriquecen la savia del floema (Buchanan-Wollaston *et al.* 2003; Buchanan-wollaston *et al.* 2005; Liu *et al.* 2008). La propuesta de éste Capítulo, es que los cambios fisiológicos en los tejidos y, en particular, en la composición de la savia del floema que ocurren como consecuencia de la senescencia inducida tienen un impacto en el desempeño y el comportamiento alimenticio del áfido, favoreciendo a *M. persicae*, ya que un mayor contenido de aminoácidos en la savia podría estimular la ingestión.

Se encontró que la inducción de senescencia acortó el tiempo prereproductivo de las ninfas de *M. persicae* que se alimentaron en las hojas apicales no cubiertas (**Tabla 2.1**). Por otro lado, la senescencia inducida no afectó a la mortalidad de las ninfas. Por lo tanto, se infiere que la idoneidad de *S. tuberosum* cv PO97.11.9 como hospedante de *M. persicae*, no se vio negativamente afectada por la inducción de senescencia.

La senescencia inducida tuvo además un impacto en el comportamiento alimenticio de *M. persicae*. Esto fue evidente en las diferencias encontradas en las variables de EPG relacionadas a las actividades en el floema. Los áfidos pasaron más tiempo ingiriendo savia en las yemas apicales de las plantas con senescencia inducida que en las plantas control, lo que sugiere que la inducción de senescencia promovió la ingestión en los áfidos. En la literatura se ha demostrado que la susceptibilidad o resistencia en muchos genotipos de *Solanum* están, en su mayoría, relacionados con factores de resistencia que se localizan en el floema (Alvarez *et al.* 2006; Le Roux *et al.*

2008; Le Roux *et al.* 2010), y que la senescencia foliar permite que *M. persicae* colonice las hojas senescentes del cultivar Kardal, y no así las hojas jóvenes resistentes. Es por esto que es posible que el aumento en el tiempo de ingestión de los áfidos en plantas de papa con senescencia inducida esté relacionado con cambios ocurridos en el floema. En las plantas con senescencia inducida, los áfidos también realizaron significativamente mayor número de pruebas cortas después del primer periodo de E2 sostenido que en las plantas control. El rol que cumplen éstas pruebas cortas continúa siendo desconocido aunque se ha demostrado que, en su camino hacia el floema, los áfidos insertan repetidamente sus estiletes en las células del mesófilo y realizan estas pruebas cortas, probablemente para preparar el tejido para alimentarse (Tjallingii 1985; 1988; 1995). Es posible que las realicen luego del primer E2 sostenido, también con el mismo objetivo.

La aceptación de la planta por los áfidos mejoró ligeramente gracias a la inducción de senescencia, ya que el porcentaje de los áfidos que alcanzaron la alimentación sostenida en el floema en plantas con senescencia inducida fue mayor (82%) que en las plantas control (60%), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Existen antecedentes de interacciones planta-áfido que muestran que las modificaciones de la fisiología de la planta benefician a los áfidos. Sandström *et al.* (2000) encontraron que *Schizaphis graminum* y *Diuraphis noxia* inducen lesiones cloróticas en sus plantas hospedantes y alteran la fisiología de las plantas aumentando la concentración de aminoácidos en el floema, en particular la del aminoácido glutamina. En contraste, *Rhopalosiphum padi* que no induce cambios macroscópicos en sus plantas huésped, parece tener poco efecto sobre el contenido de aminoácidos del floema de la planta hospedante. Es probable que estos cambios sean nutricionalmente ventajosos para los áfidos, pero se necesitan más estudios del efecto de

estos cambios en el desempeño de los áfidos. Otro ejemplo es el áfido *Melanocallis caryaefoliae* que se alimenta de hojas maduras y senescentes de sus hospedantes, y prefiere instalarse en discos de hojas que muestran clorosis de la alimentación anterior del mismo pulgón que en los discos control (Cottrell *et al.* 2009).

Por otro lado, se ha propuesto que las plantas pueden utilizar la senescencia como un mecanismo de resistencia. En el mutante hipersenescente de *Arabidopsis*, *PR genes5 (cpr 5) / hypersenescence1*, la resistencia de la planta parece estar asociada a la senescencia, ya que el número de áfidos que sobreviven sobre esas plantas fue más bajo que en las plantas del genotipo silvestre y la tasa de crecimiento se redujo cuando *M. persicae* se alimentó de este mutante. Sin embargo, es probable que la explicación para este fenómeno sea que este mutante no es un buen hospedante para *M. persicae*, ya que expresa constitutivamente la senescencia y, por lo tanto, tiene un menor contenido de clorofila. Además, este mutante muestra espontáneamente muerte celular (Pegadaraju *et al.* 2005; Pegadaraju *et al.* 2007). Es probable que éste mutante, al ser una planta nutricionalmente pobre, por ser constitutivamente senescente, no pueda mostrar la redistribución y reciclado de nutrientes mediante la manipulación de la fisiología de las plantas que se ha propuesto que deben ocurrir para la alimentación del áfido (Walling 2000; Sandström *et al.* 2000; Alvarez 2007; Walling 2008; Cottrell *et al.* 2009).

Cubrir las hojas con un paño negro, que permite el intercambio de gases pero que impide el pasaje de luz, demostró ser un método eficaz para inducir senescencia ya que el contenido de clorofila se redujo significativamente (**Figura 2.2**). Existen evidencias que muestran que el contenido de clorofila se puede utilizar como marcador para indicar el inicio de la senescencia, y que la capacidad de reverdecimiento de las hojas etioladas, es decir de revertir el proceso de senescencia, depende de la duración de la fase de oscuridad y de la especie de planta (revisado por van Doorn 2005). Por

ejemplo, en *Arabidopsis* y en trigo, la etiolación es irreversible luego de 2 y 4 días de oscuridad, respectivamente (Wittenbach 1978; Weaver y Amasino 2001), por lo que se considera que la estrategia utilizada para simular la senescencia natural, fue adecuada.

La validez del uso de la senescencia inducida por oscuridad como un método para simular el proceso de senescencia natural, ha sido discutida con anterioridad, ya que si bien muchos de los acontecimientos que se producen en las hojas tratadas con oscuridad reflejan los procesos ocurridos en la senescencia natural, también existen muchas diferencias. Las principales se muestran, por ejemplo, en genes que se expresan de manera diferente entre ambos procesos, y que se relacionan con la señalización hormonal, el metabolismo y la movilización de nitrógeno y lípidos, y la falta de azúcar (Becker y Apel 1993; Weaver *et al.* 1998; Lin y Wu 2004; Buchanan-Wollaston *et al.* 2005). Sin embargo, siempre y cuando las limitaciones del uso de la inducción de senescencia por oscuridad se tengan en cuenta, este método parece ser el enfoque más adecuado para los estudios sobre la interacción de áfidos con la senescencia foliar.

Los resultados presentados aquí apoyan la hipótesis de que la aceptación de la planta por parte de los áfidos puede mejorar mediante la inducción de senescencia foliar, y los áfidos podrían inducir procesos relacionados con la senescencia en beneficio propio al preparar los tejidos para la actividad de alimentación, promoviendo un aumento en la calidad nutricional de la savia, y hacer frente a los factores de resistencia del floema (Zhu-Salzman *et al.* 2004; Alvarez 2007; Alvarez *et al.* 2014). A pesar de esta evidencia no está claro cuál es el mecanismo que los áfidos podrían utilizar para inducir senescencia, aunque muchos genes relacionados con senescencia son inducidos durante el ataque de *M. persicae* a plantas de *Solanum* (Alvarez *et al.* 2013).

CAPÍTULO 3

Interacción áfido-endosimbionte: La interrupción de la simbiosis con *Buchnera aphidicola* modifica el comportamiento alimenticio de *Myzus persicae* y cambia la expresión de genes que se expresan en la glándula salival del áfido

Resumen

Myzus persicae, al igual que casi todos los áfidos, establece una simbiosis obligada con la bacteria *Buchnera aphidicola*. Aunque la función aceptada de *B. aphidicola* es suplementar la dieta del áfido con nutrientes, tales como aminoácidos esenciales y vitaminas, hay indicios de que podría participar más directamente en la interacción planta-insecto. Además, en la saliva de *M. persicae* se han identificado proteínas con una posible acción efectora sobre el metabolismo de la planta huésped. Esto conduce a la hipótesis de que *B. aphidicola* tiene un rol activo en la interacción planta-insecto, a través de su influencia sobre la saliva del áfido. El objetivo de este Capítulo es evaluar el efecto de la interrupción de la simbiosis con *B. aphidicola* en el comportamiento alimenticio de *M. persicae* y en la expresión de genes de la glándula salival. Se administró el antibiótico rifampicina a áfidos adultos a través de dietas artificiales para interrumpir la simbiosis. Las comparaciones se realizaron con áfidos control, tratados en dieta sin antibiótico, y áfidos normales, alimentados en plantas de rabanito. Se encontraron diferencias en el comportamiento alimenticio de los áfidos aposimbióticos, los que mostraron un retraso en la aceptación del hospedante y problemas con la penetración de los estiletes en los tejidos de la planta. Además se encontró que la interrupción de la simbiosis con *B. aphidicola* disminuye la expresión del gen que se expresa en la glándula salival de *M. persicae*, *MP1026*. En conjunto, estos resultados sugieren que *B. aphidicola* tiene una función directa en la interacción planta-insecto. Se discute la validez del uso de dietas artificiales en los estudios de las interacciones planta-insecto.

3.1. Introducción

Las bacterias mutualistas de insectos son, cada vez más, consideradas como participantes importantes en las interacciones con las plantas (Frago *et al.* 2012). El pulgón verde del duraznero, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), es un insecto fitosuccívoro que se alimenta de la savia floemática y, como casi todos los áfidos, se asocia a la bacteria endosimbiótica *Buchnera aphidicola* (Munson *et al.* 1991). *B. aphidicola* se localiza en el hemocele del áfido dentro de células especializadas, llamadas bacteriocitos (Buchner 1965) y, como resultado de una larga coevolución con el áfido, muestra un genoma reducido y es completamente dependiente del hábitat intracelular del áfido (Whitehead y Douglas 1993; Shigenobu *et al.* 2000; Shigenobu *et al.* 2001). La presencia de *B. aphidicola* es crucial para *M. persicae* ya que le provee aminoácidos esenciales y vitaminas que el áfido no pueden obtener de la planta (Prosser and Douglas 1992; Douglas 1996; Douglas 1998). Además de *B. aphidicola*, los áfidos establecen relaciones con otros tipos de bacterias endosimbióticas, que se denominan endosimbiontes secundarios (Tsuchida *et al.* 2006, von Burg *et al.* 2008, Vourburger *et al.* 2010, revisado por Oliver *et al.* 2010).

El rol aceptado de *B. aphidicola* en la interacción con los áfidos es suplementar la dieta de los insectos. Sin embargo, también hay evidencias de interacciones planta-insecto en los que *B. aphidicola* parecería estar involucrada. Por ejemplo, *B. aphidicola* favorece la viabilidad de un virus persistente para el cual *M. persicae* actúa como vector, a través de una proteína chaperona específica llamada *GroEL* que se encuentra en el hemocele del áfido (van den Heuvel *et al.* 1997, van den Heuvel *et al.* 1994). *Buchnera aphidicola* también es capaz de responder al hospedante del áfido, ya que se encontró que un mismo clon de *M. persicae*, alimentado en distintos hospedantes, tiene en su cuerpo distintas cantidades de una proteína de *B. aphidicola* en el hemocele

(Francis *et al.* 2006) y un clon de *Macrosiphum euphorbiae* muestra diferencias en abundancia de proteínas de *B. aphidicola* cuando es alimentado en un hospedante resistente, comparado con uno susceptible (Francis *et al.* 2010). Sin embargo, la posible participación directa de *B. aphidicola* en la aceptación de la planta como hospedante del áfido, permanece sin investigarse.

Para seleccionar la planta huésped, los áfidos penetran los tejidos insertando sus estiles entre las paredes celulares de las células de la epidermis y del mesófilo (Tjallingii y Esch 1993). Durante los procesos de prueba e ingestión de savia, los áfidos salivan constantemente produciendo dos tipos de saliva: saliva gelificante y saliva acuosa. La saliva gelificante es densa, rica en proteínas y gelifica en cuestión de segundos alrededor de los estiletes, formando una vaina entre las células (Miles 1999). La saliva gelificante limita el daño de las células de la epidermis y del mesofilo, y reduce el contacto del áfido con las defensas extracelulares de la planta. La saliva acuosa, en cambio, contiene proteínas que tienen una función de protección como enzimas detoxificantes, y también participa en la interacción planta-insecto (Miles 1999; Cherqui y Tjallingii 2000; Tjallingii 2006; Will y van Bel 2006; Will *et al.* 2007; Will *et al.* 2012). Las proteínas salivales no solo facilitan el consumo de savia desde el floema, sino que además parecen estar involucradas en el reconocimiento de la alimentación del áfido, por parte de la planta (revisado por Bonaventure 2012; Elzinga y Jander 2013). Además hay un creciente número de estudios sobre la diversidad de las proteínas salivales de los áfidos (Ramsey *et al.* 2007; Harmel *et al.* 2008; Carolan *et al.* 2009; Cooper *et al.* 2010; Rao *et al.* 2013). En la saliva de *M. persicae* y *Acyrtosiphon pisum* se han identificado proteínas que afectan el metabolismo de sus hospedantes y que pueden estar involucradas en la aceptación de la planta (Will *et al.* 2007; Pitino *et al.* 2011; Nicholson *et al.* 2012; Pitino y Hogenhout 2013). Mutti *et al.* (2008),

demonstraron que una proteína salival es crucial en la alimentación de *A. pisum* en plantas de *Vicia faba*, y de Vos y Jander (2009) encontraron que *M. persicae* produce una proteína que induce respuestas de defensa en *Arabidopsis thaliana*. Recientemente se ha demostrado que las proteínas salivales *MP10*, *MP42* y *MPC002* afectan el metabolismo de la planta hospedante del áfido (Bos *et al.* 2010).

También se ha propuesto que los organismos endosimbióticos de los insectos estarían involucrados en la interacción planta-insecto debido a las similitudes de las respuestas de las plantas a los áfidos y a los patógenos (Moran *et al.* 2002; Zhu-Salzman *et al.* 2004; Thompson y Goggin 2006; Alvarez 2007; Zarate *et al.* 2007). Aunque la función aceptada de *B. aphidicola* es suplementar la dieta del áfido con nutrientes que éste no obtiene de la savia floemática, hay algunos indicios de que podría participar, directa o indirectamente, en la interacción planta-insecto. En este sentido es que la obtención de información detallada acerca de cómo se produce la interacción en ausencia de la simbiosis con *B. aphidicola*, resulta fundamental. A través de la técnica de gráfico de penetración eléctrica, (*electrical penetration graph*, EPG) es posible estudiar en detalle la penetración de los estiletes del áfido y por lo tanto, constituye una herramienta sólida para estudiar las interacciones planta-áfido a nivel intercelular e intracelular en los tejidos de la planta hospedante. La técnica de EPG fue introducida por McLean y Kinsey (1964) y desarrollada por Tjallingii (Tjallingii 1978; Tjallingii 1985; Tjallingii 1988). Las ondas de EPG han sido correlacionadas con la actividad de los áfidos así como con la localización de los estiletes (Tjallingii 1978; Kimmins y Tjallingii 1985; Tjallingii y Esch 1993). Esta técnica ha sido utilizada en una oportunidad para estudiar el comportamiento alimenticio de *A. pisum* aposimbóticos (Wilkinson y Douglas 1995) pero el análisis necesita ser extendido.

El objetivo de éste capítulo es evaluar la posible participación de *B. aphidicola* en la interacción planta-áfido, estudiando en detalle la interacción en ausencia de la simbiosis con *B. aphidicola*. Para comparar áfidos aposimbióticos y áfidos normales, se utilizó un tratamiento con antibiótico para interrumpir experimentalmente a la simbiosis de *M. persicae* y *B. aphidicola*. Esta aproximación ya ha sido utilizada con anterioridad para estudiar la interacción nutricional entre el áfido y la bacteria (Prosser y Douglas 1992; Wilkinson y Douglas 1995) y también la interacción entre *B. aphidicola* y otras bacterias endosimbióticas (Koga *et al.* 2003; Koga *et al.* 2007).

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Insectos

Los áfidos utilizados en los experimentos de EPG provinieron de una colonia de *M. persicae* mantenida en la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta. Esta colonia fue iniciada a partir de una única hembra adulta áptera y virginópara, colectada a campo en 2009. Para los experimentos de análisis de genes que se expresan en la glándula salival, se utilizaron áfidos del clon G006 de *M. persicae* cuya colonia monoclonal fue iniciada a partir de un individuo colectado a campo en Geneva, Nueva York y mantenida en el Instituto Boyce Thompson (Ithaca, NY, EEUU). En ambos casos las colonias fueron criadas en plantas de rabanito (*Raphanus sativus*) en una cámara de crecimiento a 22 ± 2 °C, 30 – 40% humedad relativa, y un fotoperiodo de 16 hs. de luz y 8 hs. de oscuridad para promover la partenogénesis. Una colonia nueva se inició cada semana, y para los experimentos se utilizaron adultos jóvenes, recientemente mudados.

Para producir áfidos aposimbióticos, se utilizaron áfidos adultos, ápteros, recién emergidos, criados en rabanito en condiciones normales hasta el primer día que alcanzaron la adultez. En ese momento se administró por vía oral mediante una dieta

artificial (ver Anexo, pág. 145), un antibiótico que tiene como blanco a *B. aphidicola*, en una concentración de 50 µg ml⁻¹ (Prosser y Douglas 1992). El antibiótico se administró utilizando una dieta artificial que contenía 150 mM de aminoácidos, 500 mM de sacarosa, vitaminas y minerales, modificada de Prosser y Douglas (1992). Las cajas de dieta consistieron en tubos cilíndricos plásticos de 3 cm de diámetro y 1,5 de alto, cerrados en un lado por malla antiáfidos (para evitar que los insectos escapen) y del otro lado por dos capas de Parafilm (® Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA). Se colocó 150µl de dieta artificial entre las dos capas de Parafilm®, y los áfidos ingirieron la dieta perforando el film con sus estiletes. Las comparaciones se establecieron entre tres tratamientos de áfidos: 1) áfidos aposimbióticos, tratados con antibiótico para interrumpir la simbiosis con *B. aphidicola*; 2) áfidos control, mantenidos en dieta artificial sin antibiótico, y 3) áfidos normales, mantenidos en rabanito hasta el momento de la evaluación.

3.2.2. Tratamiento con antibiótico y comparación entre clorotetraciclina y rifampicina

Para lograr áfidos aposimbióticos en la bibliografía se utilizan indistintamente los antibióticos clorotetraciclina y rifampicina (Wilkinson y Douglas 1995; Koga *et al.* 2007). La clorotetraciclina es un antibiótico de la familia de las tetraciclinas y por lo tanto interfiere con la síntesis de proteínas (Sigma Prod. No. C4881, *Product information Data Sheet*). La rifampicina es un derivado semisintético de la rifamicina B y pertenece al grupo de los antibióticos rifamicinas. Funciona como un agente bacteriostático al interferir con la síntesis de ácidos nucleicos (Sigma Prod. No. R3501, *Product information Data Sheet*). Para evaluar y comparar la eficiencia de ambos antibióticos en la interrupción de la simbiosis se midió la expresión del gen *GroEl*, específico de *Buchnera*, por RT-qPCR. Los cebadores utilizados fueron: Sentido TCGCAAATCAGGAAAACCT y antisentido ACGACGATCTCCAAATCCTG.

3.2.3. Comportamiento alimenticio de *Myzus persicae* aposimbióticos en plantas de rabanito

Se utilizó la técnica de DC-EPG (Tjallingii 1985; Tjallingii 1988) para monitorear el comportamiento alimenticio de áfidos adultos, ápteros, aposimbióticos comparados con áfidos control y áfidos normales. Se trabajó con plantas de rabanito (*Raphanus sativus*) de 4 semanas de edad, mantenidas en una cámara de crecimiento a 22 ± 3 °C, 30-40% de humedad relativa, y 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad. Las plantas se colocaron en una jaula de Faraday para aislar el sistema de interferencias electromagnéticas y se registró el comportamiento alimenticio de dos áfidos en cada planta simultáneamente durante 6 horas. Los áfidos se colocaron en el lado abaxial de una hoja apical de las plantas de rabanito. Antes de ser colocado en la planta, el áfido se conectó a un electrodo (un hilo de oro delgado de 20µm de diámetro), pegándolo con un pegamento de plata a base de agua. El otro extremo del hilo de oro se pegó a un alambre de cobre de 3 cm de largo (diámetro 0,2 mm) y se conectó a la entrada del amplificador principal con una resistencia de entrada de 1 giga-ohmios y 50× de ganancia. El electrodo de la planta, que consistió en una varilla de cobre de 2 mm de espesor y 10 cm de largo, fue insertado en la tierra de la maceta de la planta y se conectó a la salida de tensión para la planta del dispositivo de EPG (Giga-8, fabricado por EPG Systems, <http://www.epgsystems.eu/>). El registro de la actividad se inició inmediatamente después de colocar los electrodos a los áfidos, a 23 ± 3 °C, bajo luz constante en el laboratorio, y aproximadamente 1 hora después de sacar los áfidos de las dietas. Se registraron señales de ocho áfidos, dos por planta en cada ronda de evaluación. Los áfidos pertenecientes a los 3 tratamientos, fueron distribuidos al azar en cada ronda de evaluación. Para la adquisición de datos se utilizó el programa PROBE 3.0 (Laboratorio de Entomología de la Universidad de Wageningen, Países Bajos) y para el posterior análisis de las ondas se utilizó Stylet v01.23 (EPG Systems, Wageningen, Países Bajos).

3.2.4. Diseño del experimento

Los áfidos fueron mantenidos en rabanito hasta el primer día que alcanzaron la adultez, y luego fueron trasladados a las cajas con dietas. El comportamiento alimenticio de los áfidos aposimbióticos, tratados por 4 días con antibiótico con rifampicina se comparó con áfidos controles y áfidos normales (ver **Figura 3.1**). Para cada tratamiento, solo se consideraron como registros válidos, aquellos áfidos que mostraron actividad en cada una de las 6 horas de evaluación. En total se obtuvieron 17 réplicas para los áfidos aposimbióticos, 18 para los áfidos control, y 10 para los áfidos normales.

3.2.5. Ondas, patrones de onda y variables de EPG

Las señales de EPG se analizaron distinguiendo las siguientes fases, tipos o subtipos de ondas: (i) onda C, fase de pasaje hacia el floema, que agrupa a 4 ondas: A, B, C y pd, (*potencial drops*, caídas de potencial), donde la onda A refleja el paso de los estiletes por la epidermis de la hoja, B refleja la salivación intercelular, C los movimientos de los estiletes y la formación de la vaina intercelular de saliva gelificante, y pd que se producen por efecto de las breves punciones celulares que traspasan la membrana plasmática; onda E, o fase de floema que contempla dos subfases: (ii) onda E1, salivación en el elemento de tubo criboso del floema y (iii) onda E2, ingestión de savia floemática sin contar las salivaciones que pueden ocurrir durante la ingestión; (iv) onda E1e que se supone refleja las salivaciones extracelulares; (v) onda F, que refleja problemas mecánicos con el deslizamiento de los estiletes en el tejido o dificultades en la penetración; y (vi) onda G, ingestión activa de agua desde el xilema. Los eventos de cada onda de EPG, se definen como la ocurrencia ininterrumpida de alguna de los tipos o subtipos de ondas que se indicaron arriba.

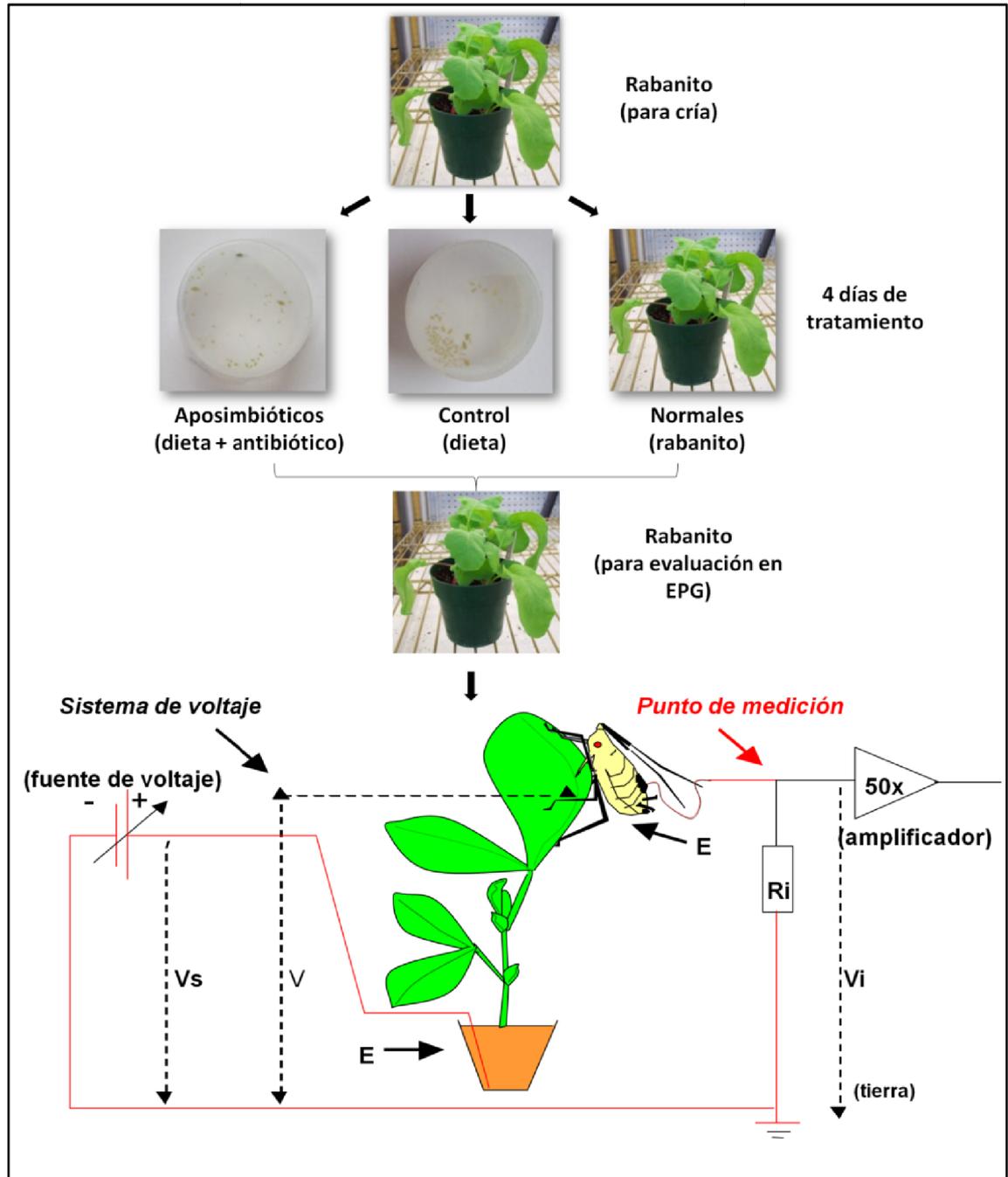


Figura 3.1. Diseño del experimento de EPG. Se monitoreó el comportamiento alimenticio *Myzus persicae* según los siguientes tratamientos, 1) áfidos aposimbóticos: tratados con rifampicina $50 \mu\text{gml}^{-1}$ por 4 días en dieta artificial; 2) áfidos control: tratados con dieta sin rifampicina por 4 días; y 3) áfidos normales: extraídos de una colonia de áfidos en rabanito. Todos los insectos fueron evaluados en plantas de rabanito. V_s , fuente de voltaje; R_i , resistencia; E , electrodos; V_i , entrada de voltaje o tensión; V , sistema de voltaje ($V = V_s + E + E$).

Las ondas se caracterizaron en seis categorías: 1) número medio de veces que la onda ocurrió por insecto, 2) duración media de cada evento, por insecto, 3) duración media total de la onda por insecto, 4) máxima duración media del evento por cada onda,

y 5) tiempo transcurrido hasta la primera vez que ocurrió la onda desde el inicio del experimento, 6) tiempo medio transcurrido hasta la primera vez que se observa la onda desde el inicio de la prueba en la que ocurrió la onda. Además, se analizó el número o proporción de áfidos que mostraron cada onda, con especial interés en los insectos que muestran ingestión sostenida de savia ($E2 > 10$ minutos), ya que ésta variable refleja la aceptación de la planta como hospedante. Todas las variables fueron calculadas para cada tratamiento utilizando la planilla de cálculo de Sarria *et al.* (2009).

3.2.6. Evaluación de genes que se expresan en la glándula salival en *M. persicae* en aposimbiosis, por RT-qPCR

Se evaluó la expresión de los genes que codifican 6 proteínas que se expresan abundantemente en las glándulas salivales de *M. persicae* (Harmel *et al.* 2008; Carolan *et al.* 2009) y que fueron identificados a partir de datos de secuencias de ADNc (Ramsey *et al.* 2007). La información sobre los genes evaluados se presenta en la **Tabla 3.1**. La expresión de estos genes se comparó entre los tres tratamientos: 1) áfidos, aposimbióticos, 2) áfidos control, y 3) áfidos normales. Para administrar el antibiótico, se utilizó el mismo protocolo descrito en el experimento de EPG. Luego de 4 días de tratamiento con antibiótico se tomaron 20 áfidos que se encontraban en ingiriendo dieta al momento de la recolección, inmediatamente se los colocó en nitrógeno líquido en microtubos plásticos de 2 mL, y se los almacenó a -80 °C hasta su procesamiento. El ARN total se aisló del cuerpo de los áfidos utilizando TriReagent (Ambion) y el kit SV total RNA Isolation System (Promega). Para eliminar el ADN genómico, el ARN total se trató con la DNasa RQ 1, libre de RNasa (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 1 µg de ARN total (libre de ADN) se convirtió en ADNc utilizando cebadores oligo DT20, 10 mM de dNTPs, y la transcriptasa inversa Clontech MMLV SMART de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El análisis RT-qPCR se realizó en placas de 384 pocillos, y se cubrió con láminas adhesivas transparentes, ambos de

calidad óptica (Applied Biosystems, Forest City, CA, EE.UU.) con un equipo de PCR en tiempo real, ABI 7900HT *Fast System real time PCR* (Applied Biosystems). La síntesis de ADN de doble cadena se monitoreó mediante el uso de SYBR® Green como molécula indicadora. Cada reacción contenía 3,3 µL de ADNc (dilución 1/10), 0,9 µL de H₂O MiliQ, 0,4 µL de cada cebador a una concentración de 3 mM, y 0,5 µL de SYBR® Green Mix (Applied Biosystems). Se utilizó el siguiente programa para todas las reacciones de PCR: 95 ° C durante 2 minutos seguido por 40 ciclos de 95 ° C durante 30 segundos, 60 ° C durante 30 segundos, y 72 ° C durante 30 segundos. Los cebadores utilizados para la PCR cuantitativa se presentan en la **Tabla 3**. Para analizar la expresión de cada gen, el ciclo en el que la fluorescencia alcanza un umbral o "ciclo umbral" (Ct) se calculó utilizando el programa de Applied Biosystems (Versión 2.3 para Windows XP SDS). Los valores de Ct se calcularon como el cambio en la expresión relativa (cantidad de veces que cambió) de los genes de interés, normalizados con el gen de referencia *RPL7* (Nikoh *et al.* 2010) utilizando curvas de calibración construidas para cada gen, a partir de una mezcla de ADNc de todos los tratamientos. El gen *RPL7* se seleccionó como gen de referencia y control endógeno, ya que codifica para una proteína ribosomal que se expresa constitutivamente en *M. persicae*. Su expresión absoluta no se vio afectada por los tratamientos de los áfidos y sus valores permitieron su uso como normalizador para los otros 6 genes de interés (resultados no mostrados).

3.2.7. Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Infostat Professional v2011p (<http://www.infostat.com.ar>) (Di Rienzo *et al.* 2011). Para evaluar las diferencias en la expresión del gen *GroEl*, las medias se compararon con la prueba *t* de Student, contrastando cada media de los tratamientos versus los áfidos control a un valor de significancia de $p \leq 0,05$. Las variables de EPG fueron analizadas

individualmente para cada áfido, se calculó un promedio para cada insecto y luego para cada tratamiento se obtuvieron medias y errores estándares de las medias (EEM). En el caso de múltiples eventos, la duración fue calculada a partir de la media de cada insecto. Los individuos que no muestran una cierta onda, no contribuyeron a la variable calculada y, por tanto, el n fue menor que el número total de individuos evaluados por tratamiento. Se realizó el análisis de la varianza (ANAVA) no paramétrico a una vía de clasificación propuesto por Kruskal-Wallis, ya que las variables no cumplían con el supuesto de distribución normal. Cuando se detectó efecto significativo de los tratamientos, se realizaron comparaciones de a pares entre las medias de los rangos de tratamientos utilizando la prueba de Conover. Para evaluar la significancia en la diferencia de proporciones de individuos que realizan cada tipo de actividad se utilizó la prueba exacta de Fisher. Se realizaron comparaciones entre los tratamientos que mostraron diferencias. La expresión de los 6 genes que se expresan en la glándula salival, se analizó con un ANAVA, y cuando se detectó un efecto significativo, las diferencias entre medias se evaluaron usando la prueba de mínima diferencia significativa, LSD (*least significant difference*) propuesta por Fisher, comparando las medias de a pares a un nivel de significancia $p \leq 0,05$.

Tabla 3.1. Genes de la glándula salival de *M. persicae* cuya expresión relativa fue evaluada por RT-qPCR en áfidos aposimbóticos y áfidos control. *Gen de referencia.

Gen	Código de GeneBank	Función putativa	Identificador en <i>A. pisum</i>	Cebadores	Referencia
<i>Mp1026</i>	XP_001951978	Hidroxiacil dehidrogenasa	ACYPI005506	Fwd-CAACAAAAGCAGTGCCATA Rev-TCGTTGACCATTTTCGTCAG	Harmel <i>et al.</i> (2008); Carolan <i>et al.</i> (2009)
<i>Mp3324</i>		Retinol dehidrogenasa II	ACYPI007265	Fwd-TCTTTCCGTGGGTAAAGA Rev-GCCAACGTCGATGGTTCTAT	-
<i>Mp844</i>	XP_001943898	CoA ligasa, AMPdependiente	ACYPI003714	Fwd-TGTGATTATCGCCACAGCTC Rev-CGGGATAGTTTTGGGTCTTG	Harmel <i>et al.</i> (2008)
<i>Mp2323</i>	BAH71891	Desconocida	ACYPI56506	Fwd-GTGTTACTCGTGCGTCGTGT Rev-TACGACCCGGTGGTTACATT	Harmel <i>et al.</i> (2008)
<i>Mp3170</i>		Desconocida	ACYPI008219	Fwd-TTACGTAAAATGCCCGAGGA Rev-ATTCTTCCGGCTTGTCACAG	-
<i>Mp389</i>		Desconocida	No anotado	Fwd-CCCAAACCTATGCAAAGGA Rev-TTTGGATCCGTTTCACCATT	-
<i>RpL7*</i>		Proteína ribosomal 7	ACYPI010200	Fwd-TGCCGGAGTCTGTACTCAA Rev-CACGCGTTCCTTACGTTCT	Nikoh <i>et al.</i> (2010)

3.3. Resultados

3.3.1. Tratamientos con antibiótico y comparación entre clorotetraciclina y rifampicina

Se comparó la efectividad de los antibióticos rifampicina y clorotetraciclina, para interrumpir la simbiosis con *B. aphidicola*, ya que ambos son utilizados indistintamente en la literatura con ese fin. La efectividad de los antibióticos fue evaluada comparando el nivel de expresión de un gen específico de *B. aphidicola*, *GroEl*. Luego de 4 días de tratamiento con rifampicina 50 μgmL^{-1} , la reducción en la expresión del gen bacteriano *GroEL* fue del 93% mientras que con la misma concentración de clorotetraciclina la disminución fue del 37% (Student, $p = 0,02$ y $p = 0,02$ respectivamente; **Figura 3.2**).

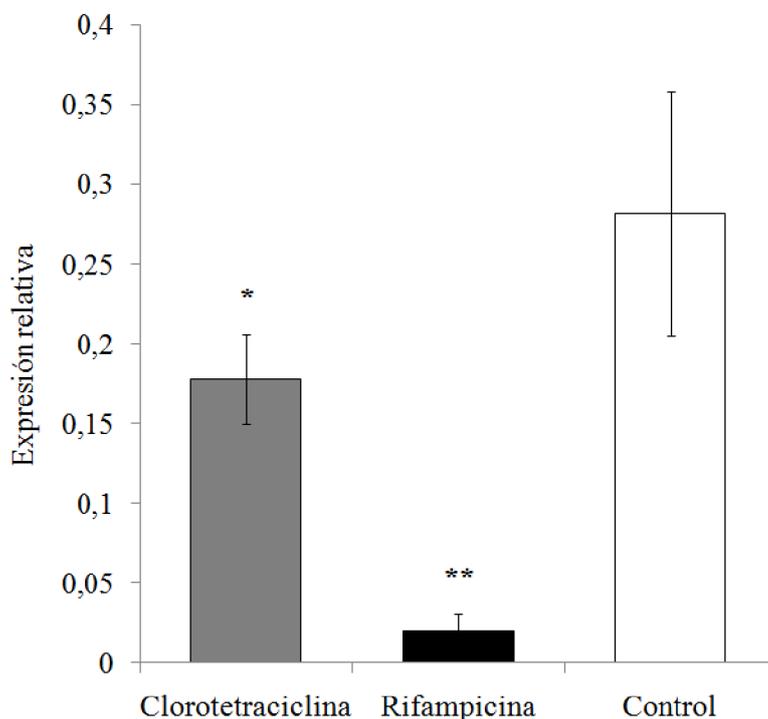


Figura 3.2: Expresión relativa del gen de *Buchnera aphidicola*, *GroEl* luego de 4 días de tratamiento con clorotetraciclina o rifampicina. Las barras muestran Medias \pm EEM. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$ según la prueba t de Student, entre las medias de los cada tratamiento comparadas con el control.

3.3.2. Comportamiento alimenticio de *Myzus persicae* aposimbióticos en plantas de rabanito

Se evaluó el comportamiento alimenticio de *M. persicae* aposimbióticos, control y normales en plantas de rabanito, con la técnica de EPG. Se encontraron diferencias entre los áfidos aposimbióticos, comparados con los áfidos controles y los áfidos normales. El tiempo al primer E1 desde el inicio de la prueba, fue más largo para los áfidos aposimbióticos que para los áfidos control y los áfidos normales (**Tabla 3.2**, variable 14; $H = 14,4$; $p \leq 0,01$). Los áfidos normales y los áfidos control tuvieron menor tiempo de C antes de la primera salivación E1 (**Tabla 3.2**, variable 16) que los áfidos aposimbióticos ($H = 11,49$; $p = 0,03$). El tiempo al primer E2 desde el comienzo de la prueba en la que ocurrió (**Tabla 3.2**, variable 17) y el tiempo al E2 sostenida desde el comienzo de la prueba (**Figura 3.3A**, variable 18), fueron más largos para los áfidos aposimbióticos que para los áfidos control y los áfidos normales ($H = 8,73$; $p = 0,02$ y $H = 8,48$; $p = 0,02$, respectivamente). Los áfidos aposimbióticos tuvieron menos eventos de ingestión sostenida de savia del floema (sE2, **Tabla 3.2**, variable 27) que los áfidos normales y los áfidos control ($H = 5,28$; $p = 0,05$). Los áfidos aposimbióticos mostraron diferencias en las actividades en el xilema (G) y dificultades en la penetración de los estiletes (F) en comparación con los áfidos control y los áfidos normales. El número de eventos de G (**Tabla 3.2**, variable 29) fue significativamente mayor en los áfidos aposimbióticos que en los áfidos control ($H = 6,44$; $p = 0,01$). Los áfidos normales no tuvieron eventos G. Los áfidos aposimbióticos tuvieron mayor proporción de insectos con eventos de onda F (**Tabla 3.2**, variable 36), y mayor número de F por insectos (**B y Tabla 3.2**, variable 33) en comparación con los áfidos control y los áfidos normales (prueba exacta de Fisher, $p \leq 0,01$ y $H = 19,48$, $p \leq 0,01$; respectivamente).

Tabla 3.2: Medias ± EEM de variables de gráfico de penetración eléctrica (EPG) para el comportamiento alimenticio de *Myzus persicae* aposimbóticos, controles y normales en plantas de rabanito, durante 6 horas de evaluación. Para las variables con distinto n que el número total de individuos evaluados por tratamiento, se agregó una variable específica que indica la proporción de individuos que realizó la actividad.

Relacionado con	N°	Variables de EPG	Unidad	Aposimbóticos (n ^a =17)	Control (n=18)	Normal (n=10)	P ^b
Pruebas y punciones celulares	1	Tiempo desde el inicio del experimento a la 1er prueba	Seg	128,9 ± 12,8	278,6 ± 130,1	117,9 ± 22,4	0,44
	2	Número de no prueba	#	13,4 ± 2,6 ^b	18,9±3,33 ^b	5,2 ± 1,2 ^a	0,01*
	3	Duración total de no prueba	Min	38,6 ± 8,1 ^b	43,2 ± 7,9 ^b	12,6 ± 5,6 ^a	0,01*
	4	Duración media de no prueba	Min	5,7 ± 3,2	3,2 ± 1,1	2,3 ± 0,5	0,22
	5	Número de pruebas	#	13,4 ± 2,6 ^b	18,7 ± 3,3 ^b	5,2 ± 1,2 ^a	0,01*
	6	Duración total de pruebas	Hs	5,36 ± 0,14 ^a	5,28 ± 0,13 ^a	5,79 ± 0,09 ^b	0,01*
	7	Número de C	#	15,8 ± 2,7 ^b	21,2 ± 3,5 ^b	6,0 ± 0,0a	0,01*
	8	Total duración de C	Hs	2,06 ± 0,30 ^a	3,40 ± 0,32 ^a	1,19 ± 0,34 ^b	<0,01**
	9	Media duración de C	Min	8,9 ± 1,2	21,1 ± 8,4	14,2 ± 3,3	0,45
	10	Número de caídas de potencial (pd)	#	61,2 ± 8,9	88,9 ± 14,4	45,2 ± 7,7	0,20
	11	Duración total de pd	Min	7,0 ± 1,1 ^b	9,82 ± 1,6 ^b	3,3 ± 0,5 ^a	<0,01**
	12	Duración media de pd	Seg	6,7 ± 0,3 ^b	7,1 ± 0,8 ^b	4,5 ± 0,1 ^a	<0,01**
	13	Tiempo desde la 1er prueba al 1er pd	Seg	246,0 ± 44,7 ^b	330,5±68,1 ^b	47,2 ± 14,3 ^a	<0, 01**
	14	Tiempo desde el inicio de la prueba al 1er E1	Min	110,9 ± 33,4 ^b	25,9 ± 7,5 ^a	21,5 ± 3,3 ^a	<0,01**
	15	Tiempo desde la 1er prueba al 1er E2	Min	249,2 ± 28,7	221,7 ± 28,3	40,2 ± 6,4	0,28
	16	Duración del periodo de C más corto, antes deE1	Min	87,2 ± 35,7 ^b	14,1 ± 2,3 ^a	21,5 ± 3,3 ^a	<0,01**
	17	Tiempo desde el inicio de la prueba al 1erE2	Min	115,0 ± 37,0 ^b	33,7 ± 7,3 ^a	22,3 ± 3,2 ^a	0,02*
	18	Tiempo desde el inicio de la prueba al 1er E2 sostenido	Min	69,3 ± 13,8 ^b	30,8 ± 8,5 ^a	23,5 ± 3,3 ^a	0,02*
Contacto con el floema	19	Número de E1 (E1simple + E1fraccion)	#	1,2 ± 0,3	2,6 ± 0,6	2,4 ± 0,7	0,24
	20	Duración total de E1 (E1simple + E1 fracción)	Min	1,3 ± 0,3	6,5 ± 2,4	28,3 ± 26,9	0,13
	21	Duración media de E1 (E1simple + E1 fracción)	Min	0,7 ± 0,1	1,3 ± 0,3	6,0 ± 5,3	0,2
	22	Áfidos que hacen E1	# (%)	12 (71)	12 (67)	10 (100)	0,06§
	23	Número de E2	#	0,9 ± 0,2	1,5 ± 0,4	2,0 ± 0,5	0,12
	24	Duración total de E2	Hs	1,67 ± 0,46 ^a	2,04 ± 0,52 ^a	4,38 ± 0,60 ^b	<0,01**

Relacionado con	Nº	Variables de EPG	Unidad	Aposimbóticos (n ^a =17)	Control (n=18)	Normal (n=10)	P ^b
	25	Duración media de E2	Hs	1,14 ± 0,33 ^a	1,31 ± 0,44 ^a	3,10 ± 0,66 ^b	0,04*
	26	Duración total de E12 (con ambos, E1 y E2)	Hs	1,69 ± 0,46 ^a	2,08 ± 0,52 ^a	4,41 ± 0,56 ^b	<0,01**
	27	Número E2 sostenido (>10 min)	#	0,7 ± 0,2 ^a	1,1 ± 0,3 ^b	1,7 ± 0,3 ^b	0,05*
	28	Áfidos que realizan sE2	# (%)	8 (48)	10 (56)	10 (100)	0,74§
Contacto con el xilema	29	Número de G	#	1,5 ± 0,5 ^b	0,2 ± 0,1 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,01*
	30	Duración total de G	Min	80,9 ± 23,8	56,7 ± 36,9	0,0 ± 0,0	0,41
	31	Duración media de G	Min	41,6 ± 14,4	56,7 ± 36,9	0,0 ± 0,0	0,94
	32	Áfidos que realizan G	# (%)	9 (50)	4 (24)	0 (0)	0,09§
Problemas mecánicos con los estiletes	33	Número de F	#	1,8 ± 0,3 ^b	0,2 ± 0,1 ^a	0,2 ± 0,2 ^a	<0,01**
	34	Duración total de F	Min	106,4 ± 28,9	80,9 ± 62,8	1,9 ± 0,0	0,52
	35	Duración media de F	Min	73,9 ± 25,8	80,9 ± 62,8	1,00 ± 0,0	0,64
	36	Áfidos que realizan F	# (%)	15 (83)	3 (17)	1 (10)	<0,01**§

^aReplicas de EPG; ^bvalores P. Dentro de cada variable, las letras diferentes indican diferencias significativas según Kruskal-Wallis seguido por la prueba de Conover, $p \leq 0,05$;

§Prueba exacta de Fisher's

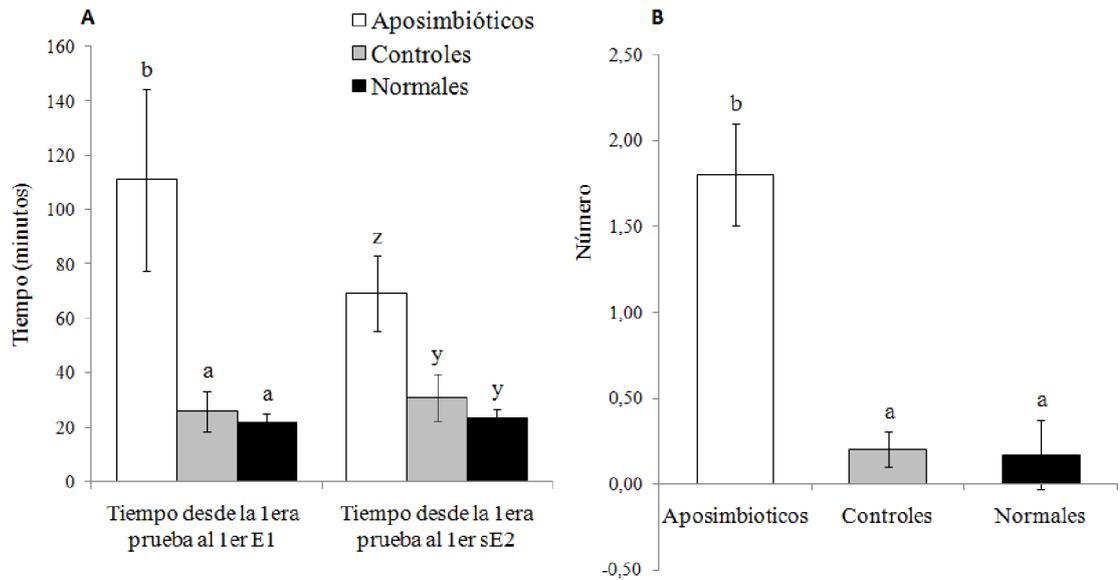


Figura 3.3: Variables de gráfico de penetración eléctrica (EPG) que difieren entre áfidos aposimbióticos versus áfidos control y áfidos normales, en plantas de rabanito. Las barras representan las medias +EEM. Dentro de cada variable, letras diferentes arriba de las barras indican diferencias significativas según Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Conover, $P \leq 0,05$. A) Tiempo desde la primera prueba a la primer salivación E1, y tiempo desde que ocurre la primer prueba a la primera ingestión sostenida de savia (sE2). B) Número de eventos de descarrilamiento de los estiletes (F).

También se encontraron diferencias entre los áfidos alimentados con dietas artificiales (áfidos aposimbióticos y áfidos control), comparados con los áfidos normales. El número y la duración total de periodos de “no prueba” (períodos en el que los áfidos tienen los estiletes fuera de los tejidos de la planta, **Tabla 3.2**, variable 2 y 3) fueron mayores para los áfidos aposimbióticos y áfidos control ($H = 9,23$, $p = 0,01$, y $H = 8,94$, $p = 0,01$, respectivamente) que para los áfidos normales. En contraste, la duración total de prueba (**Tabla 3.2**, variable 6) fue la más corta para los áfidos aposimbióticos y los áfidos control, que para los áfidos normales ($H = 9,23$, $p = 0,01$). El número de C (períodos durante los cuales los áfidos tienen sus estiletes en el tejido de la planta sin tener en cuenta E1, E2, o pd) y su duración total (**Figura 3.4A**, **Tabla 3.2**, variables 7 y 8) fueron mayores para los áfidos normales que para los áfidos aposimbióticos y los áfidos control ($H = 10,18$; $p = 0,01$ y $H = 15,54$; $p \leq 0,001$; respectivamente). La duración total y la duración media de las caídas de potencial, pd,

(Figura 3.4B, Tabla 3.2, variables 11 y 12) fueron más largas en los áfidos aposimbóticos y los áfidos control que en los áfidos normales ($H = 7,71$; $p = 0,01$ y $H = 19,5$; $p \leq 0,01$; respectivamente). Además, el tiempo desde la primera prueba al primer pd (Tabla 3.2, variable 13) fue más larga para los áfidos alimentados con dietas artificiales que para los áfidos normales ($H = 9,18$; $p = 0,01$). La duración total de E2 (Figura 3.4, Tabla 3.2, variable 24) fue más corta para los áfidos aposimbóticos y los áfidos control que para los áfidos normales ($H = 12,23$; $p \leq 0,01$). La duración total de E12 (salivación E1 seguida por ingestión E2 + E2; Tabla 3.2, variable 26) fue más corta para los áfidos aposimbóticos y los áfidos control, que para los áfidos normales ($H = 12,55$, $p = 0,002$).

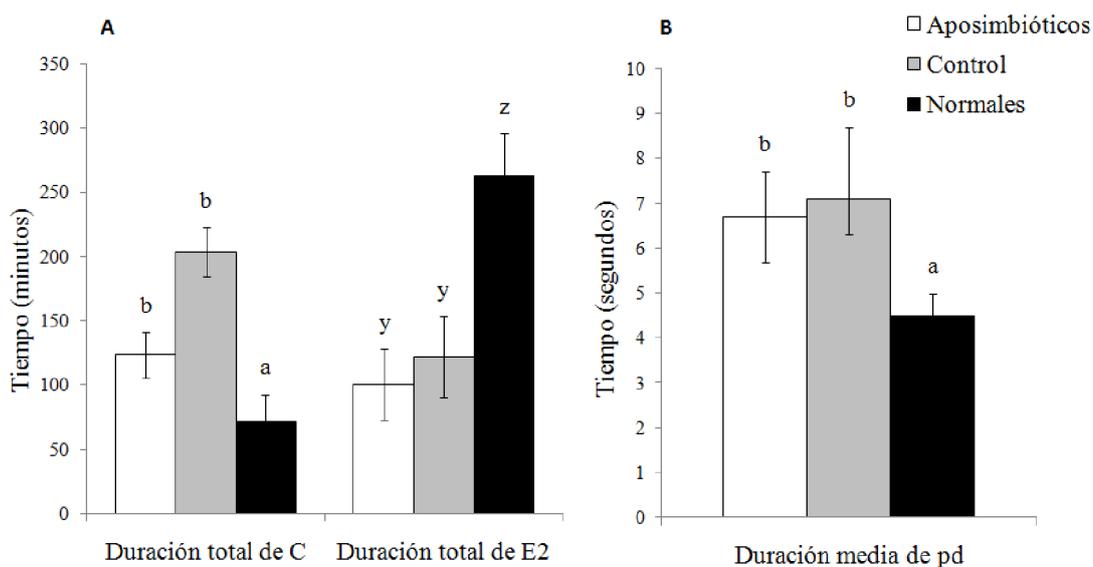


Figura 3.4. Variables de gráfico de penetración eléctrica (EPG) que difieren entre áfidos alimentados en dietas artificiales (áfidos aposimbóticos y áfidos control) versus áfidos normales, en plantas de rabanito. Las barras representan las medias \pm EEM. Dentro de cada variable, las letras diferentes arriba de las barras indican diferencias significativas según Kruskal-Wallis seguido de Conover test, $p \leq 0,05$. A) Duración total de C y duración total de la ingestión de savia en el floema. B) Duración media de las caídas de potencial.

3.3.3. Evaluación de genes que se expresan en la glándula salival en *M. persicae* en aposimbiosis, por RT-qPCR

El efecto de la interrupción de la simbiosis con *B. aphidicola*, en la saliva de *M. persicae* se estudió analizando la expresión de genes que se expresan en la glándula

salival a través de RT-qPCR. La expresión de los 6 genes (**Tabla 3.1**) se evaluó en tres tratamientos: 1) áfidos aposimbióticos, alimentados en dietas artificiales + antibiótico por 4 días, 2) áfidos control, alimentados en dieta sin antibiótico, y 3) áfidos normales, alimentados en rabanito. En la **Figura 3.5** se presentan los resultados de niveles de expresión relativa, en los 4 genes para los que se encontraron diferencias significativas. En el **Anexo** (pág. 145) se presentan las tablas con todos los resultados de expresión de genes. La expresión relativa del gen *MPI026* (hidroxi acil deshidrogenasa), fue significativamente más bajo en los áfidos aposimbióticos que en los áfidos control, y los áfidos normales ($F = 8,65$; $p = 0,01$). En el gen *MP3170* (función desconocida), el nivel de expresión relativa se redujo en los áfidos aposimbióticos y también en los control, aunque en menor cantidad, con respecto a los áfidos normales ($F = 6,39$; $p = 0,02$). Para el gen *MP2323* (función desconocida), la expresión relativa mostró un incremento en los áfidos alimentados en dietas, es decir, en los áfidos aposimbióticos y los áfidos controles, comparados con los normales. En el gen *MP844* (CoA Ligasa dependiente de AMP), la expresión relativa mostró diferencias solamente en los áfidos control, con respecto a los aposimbióticos y normales ($F = 11,27$; $p = 0,004$). Para los genes *MP3324* (retinol dehidrogenasa) y *MP389* (función desconocida) no se encontraron diferencias en la expresión entre los tres tratamientos ($F = 3,43$; $p = 0,08$ y $F = 1,07$; $p = 0,384$).

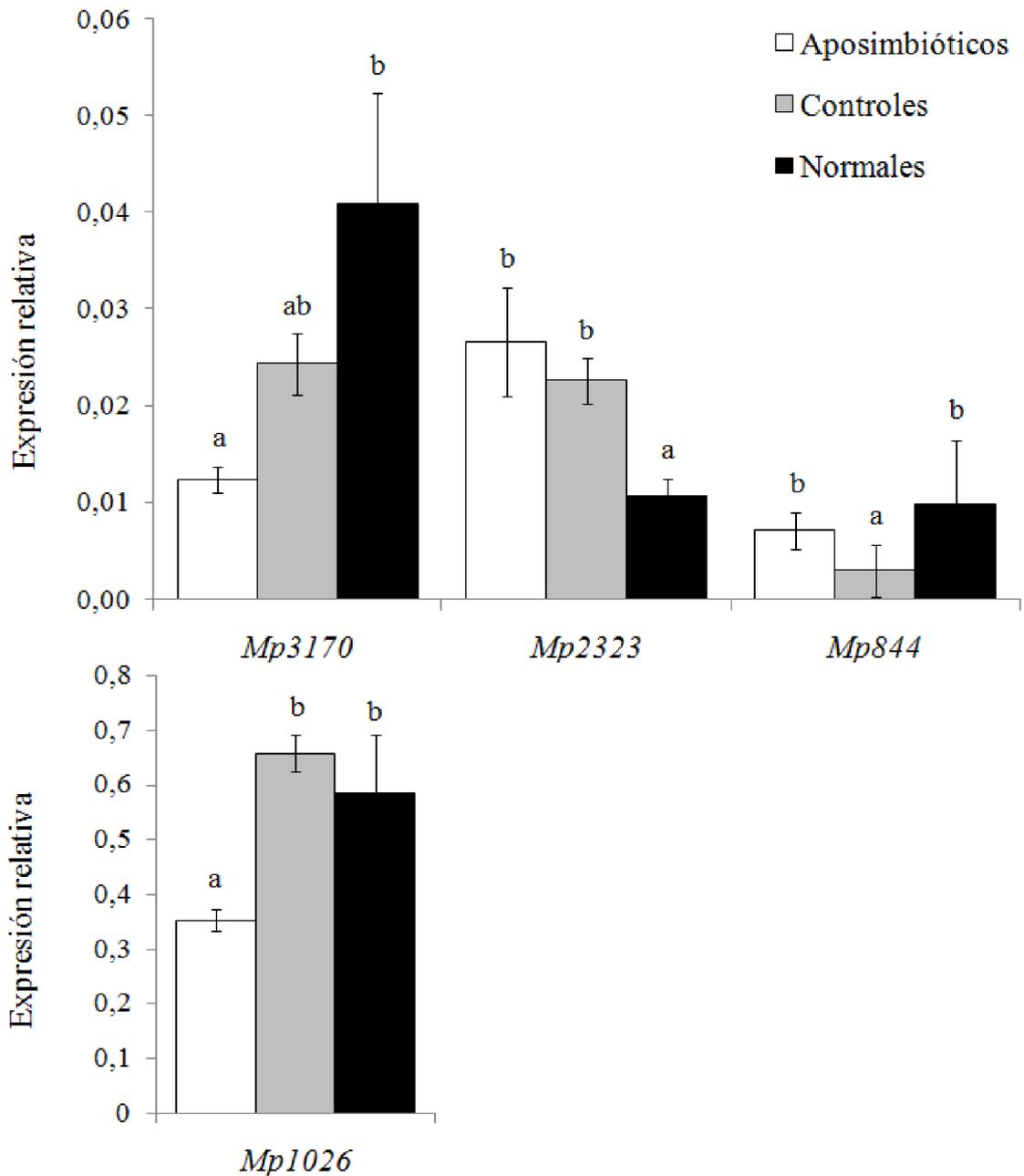


Figura 3.5: Expresión relativa de genes de la glándula salival de *Myzus persicae*. Se muestran sólo los genes que mostraron diferencias significativas. Las barras representan medias \pm EEM de la expresión relativa al gen *RpL7*, en áfidos aposimbióticos (alimentados en dieta artificial + rifampicina por 4 días para tratar a *Buchnera aphidicola*), áfidos control (alimentados en dietas sin rifampicina) y áfidos normales (alimentados en rabanito). Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas de acuerdo a ANAVA seguido de Fisher's LSD, $p \leq 0,05$).

3.4. Discusión

El comportamiento alimenticio en plantas de rabanito de los áfidos aposimbióticos, mostró diferencias en comparación con los áfidos control y los áfidos

normales. Las principales diferencias se encontraron en relación con el tiempo necesario para iniciar las actividades de alimentación en el floema. Los áfidos aposimbóticos pasaron más tiempo probando en la epidermis y mesófilo (onda C) antes de la primera salivación en el floema (onda E1) que los áfidos control y los áfidos normales (**Tabla 3.2**, variable 16). Además, el tiempo desde el inicio de la prueba hasta que se produjo la primera salivación en el floema, también fue el más largo en los áfidos aposimbóticos que en los áfidos normales y los áfidos control (**Figura 3.3A** **Tabla 3.2**, variable 14). La salivación en el floema es un proceso fundamental que se produce como parte de la prueba del contenido del tubo criboso antes de comenzar a alimentarse y, una vez que la alimentación sostenida se ha establecido, la salivación probablemente contrarresta las defensas de las plantas y permite el flujo continuo de la savia del floema (Tjallingii, 2006; Walling, 2008). Los áfidos aposimbóticos también necesitaron más tiempo desde el comienzo de la prueba para iniciar la ingestión sostenida de savia del floema (E2 por más de 10 min; **Figura 3.3A**) que los áfidos control y los áfidos normales (**Tabla 3.2**, variable 18). También mostraron un menor número de eventos de ingestión sostenida (sE2) que los áfidos control y los áfidos normales (**Tabla 3.2**, variable 27). La ingestión sostenida de savia del floema es un parámetro importante, ya que está relacionada con la aceptación de la planta mediante la determinación de la idoneidad de la planta como hospedante (Tjallingii, 1990). Los áfidos aposimbóticos también tuvieron problemas mecánicos con los estiletes (**Figura 3.3B**, **Tabla 3.2**, variables 33 y 36), que están relacionados con dificultades en el movimiento de los estiletes y problemas en la generación de la vaina salival (Tjallingii 1987). En conjunto, estos resultados sugieren que en los áfidos aposimbóticos, la aceptación de la planta se retrasó con respecto a los áfidos control y los áfidos normales. La explicación propuesta es que la interrupción de la simbiosis de *M. persicae* y *B. aphidicola* genera, directa o indirectamente, el retraso

en la aceptación de la planta huésped en los áfidos aposimbióticos. La hipótesis es que ocurren cambios en la saliva que afectan a los procesos fisiológicos que tienen lugar durante la interacción áfido-planta y que son los que finalmente conducen a la aceptación de la planta.

También se encontraron diferencias entre los áfidos alimentados con dietas artificiales (áfidos aposimbióticos y áfidos control) frente a los áfidos alimentados en planta (áfidos normales). Los áfidos alimentados con dietas pasaron más tiempo con los estiletes fuera de la planta (períodos de no prueba, **Tabla 3.2**, variables 2 y 3). Como consecuencia, el tiempo total de ingestión de savia del floema, fue el más corto para estos áfidos (**Figura 3.4**, **Tabla 3.2**, variable 24). Esto sugiere que los áfidos que fueron alimentados con dieta antes del experimento de EPG tienen dificultades en reconocer y llegar al floema. Los áfidos alimentados con dieta también mostraron onda G, que se correlaciona con la ingestión activa en el xilema y/o mesófilo (Tjallingii 1988; Prado y Tjallingii 1994). Esta onda no se encontró en los áfidos alimentados en plantas de rabanito (áfidos normales; **Tabla 3.2**, variable 32). En otros estudios de EPG con áfidos que se alimentan de dietas artificiales se encontró que durante la ingestión en las dietas, los áfidos muestran dos patrones principales ondas, C y G, por analogía a los descritos para las plantas, que representan la formación de la vaina de saliva gelificante y la ingestión activa de la dieta (Sauvion *et al.* 2004; Halarewicz y Gabryś 2012). En los experimentos presentados aquí, antes del experimento de EPG, tanto los áfidos aposimbióticos como los áfidos control pasaron 4 días ingiriendo dieta artificial, y es probable que se adaptaran a la ingestión activa como modo para la alimentación (similar a la ingestión de savia del xilema). Por lo tanto, los áfidos alimentados con dieta, necesitan tiempo adicional en la planta para reajustar a la ingestión pasiva de la savia del floema. Los áfidos alimentados con dietas también tuvieron mayor duración total y

duración media de las caídas de potencial o punciones de células en su camino hacia el floema (**Figura 3.4**, **Tabla 3.2**, variables 11 y 12). Durante estas punciones celulares, pequeñas cantidades de contenido de la célula son ingeridos por los áfidos presumiblemente para ser “analizados” (Cherqui y Tjallingii 2000), por lo tanto, las caídas de potenciales más largas mostradas por los áfidos alimentados en dietas, también podrían atribuirse a que el modo de alimentación en las dietas artificiales, cambia con respecto a la alimentación en la planta.

El segundo objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la interrupción de la simbiosis de *M. persicae* con *B. aphidicola*, en la expresión de los genes que se expresan en la glándula salival del áfido. La saliva de los áfidos juega un papel fundamental en la interacción con las plantas hospedantes (Miles 1999; Cherqui y Tjallingii 2000a, revisado por Bonaventure 2012; Elzinga y Jander 2013), debido, al menos en parte, a la presencia de proteínas que facilitan la ingestión de savia del floema y que pueden alterar la fisiología de las células de la planta (Miles 1999; Tjallingii 2006; Will y van Bel 2006; Mutti *et al.* 2008; De Vos y Jander 2009; Bos *et al.* 2010). Además, es probable que la saliva constituya el enlace que permite la interacción de *B. aphidicola* con la planta huésped del áfido. Aquí, se encontró que la expresión del gen salival *MP1026* (hidroxi acilo deshidrogenasa) fue significativamente menor para los áfidos aposimbióticos que para los áfidos control y los áfidos normales (**Figura 3.5**). Si bien a esta proteína no se le ha atribuido ningún papel en la interacción planta-insecto, su expresión cambió en aposimbiosis de *B. aphidicola*. Probablemente, los cambios en el nivel de expresión de genes que se expresan en la glándula salival, como el observado en *MP1026*, podrían dar lugar a una composición de la saliva diferente, que puede ser la causa de los cambios en el comportamiento alimenticio de los áfidos aposimbióticos. Por otro lado, y de manera similar a lo que se encontró en los experimentos de EPG, la

expresión de dos genes que se expresan en la glándula salival, *MP2323* y *MP3170* (ambos de función desconocida, **Figura 3.5**), mostró cambios aparentemente asociados con la alimentación en las dietas artificiales, ya que los áfidos alimentados en ellas, es decir, tanto los áfidos aposimbióticos como los áfidos control, tuvieron una expresión diferente con respecto a los áfidos normales que provenían de una planta.

En los últimos años, las interacciones de los áfidos con *B. aphidicola* se han estudiado desde diferentes perspectivas, incluyendo la complementación nutricional y metabólica de la bacteria con el áfido (Prosser y Douglas 1992; Wilkinson y Douglas 1998; Douglas *et al.* 2001; Viñuelas *et al.* 2011), asociaciones con endosimbiontes facultativos de los áfidos (Koga *et al.* 2003; Tsuchida *et al.* 2005; Tsuchida *et al.* 2010), y la evolución de los genomas de *B. aphidicola* y los áfidos (Shigenobu *et al.* 2000; Shigenobu *et al.* 2001; Moran 2003; Moran y Degan 2006; Nováková *et al.* 2013). A pesar de todo el conocimiento adquirido acerca de esta interacción, aún es relativamente poco lo que se sabe acerca de la posible interacción entre *B. aphidicola* y las plantas hospedantes de los áfidos. Francis *et al.* (2006; 2010) demostraron que la cantidad de algunas proteínas de *B. aphidicola* cambian en respuesta a la alimentación del áfido en diferentes hospedantes. En éste Capítulo se encontró que la interrupción de la simbiosis de *M. persicae* con su bacteria endosimbótica, *B. aphidicola*, modifica el comportamiento alimenticio del áfido en plantas de rabanito, probablemente debido a los cambios que se producen en la expresión de los genes de las glándulas salivales del áfido.

Los resultados que se presentan aquí también muestran que las dietas artificiales afectan el comportamiento alimenticio de los áfidos y la expresión de genes de la glándula salival. Debido a que no es posible aislar la saliva de los áfidos mientras se alimentan de una planta, hasta ahora todos los estudios que han descrito proteínas

salivales secretadas por los áfidos, han trabajado con saliva aislada a partir de dietas artificiales (Will *et al.* 2007; Harmel *et al.* 2008; Carolan *et al.* 2009; Cooper *et al.* 2010; Rao *et al.* 2013). Sin embargo, existe poca información acerca de cómo las dietas artificiales pueden afectar la composición de la saliva. En un experimento reciente realizado con saliva gelificante, Will *et al.* (2012) mostraron que los áfidos son capaces de adaptar sus secreciones salivales en respuesta a diferentes dietas. Todos estos hechos discutidos aquí, parecen limitar el uso de las dietas artificiales en el análisis del rol que cumplen las proteínas salivales en las interacciones planta-áfido, o al menos hacen que las extrapolaciones con la situación natural, deban ser más cuidadosas. Para estudiar más a fondo el papel de la saliva en la interacción planta-áfido y, teniendo en cuenta la creciente cantidad de recursos genómicos que se están generando para los áfidos (Ramsey *et al.* 2007; The International Aphid Genomics Consortium 2010; Legeai *et al.* 2010), se propone el uso de la técnica de RT-qPCR para medir la expresión de genes de proteínas salivales candidatas, en respuesta a diferentes hospedantes de plantas y dietas, como una aproximación interesante.

La propuesta en este Capítulo es que *B. aphidicola* produce proteínas o péptidos pequeños que actúan como efectores en la planta hospedante de *M. persicae*. Estos efectores podrían ser inyectados directamente por el áfido junto con la saliva en las células vegetales, o tal vez ejercen su efecto en las glándulas salivales de los áfido. Como resultado, la saliva del áfido, modificada por la presencia de *B. aphidicola*, genera respuestas específicas en la planta, tales como la regulación de las rutas metabólicas que conducen a cambios en el estado fisiológico del tejido, (por ejemplo, senescencia de las hojas) lo que afecta la aceptación de la planta como hospedante. Las dificultades en el manejo de la saliva de los áfidos (debido a que sólo puede ser estudiada de manera directa por la salivación en dietas artificiales) genera que no haya

evidencia concreta de la presencia de proteínas de *B. aphidicola* en la saliva de *M. persicae*, aunque existen indicios de la presencia de *GroEl* en la saliva de *Rhopalosiphum padi* y *Sitobion avenae* (van den Heuvel *et al.* 1994; Filichkin *et al.* 1997) pero se necesita más investigación en ésta línea. Curiosamente, en la saliva de *M. persicae* y *A. pisum* existen proteínas con un efecto sobre el metabolismo de la planta huésped, que podrían estar involucrados en la aceptación de la planta hospedante por los áfidos (Will *et al.* 2007; Harmel *et al.* 2008; Carolan *et al.* 2009; Cooper *et al.* 2010; Rao *et al.* 2013). Se ha sugerido que los efectores derivados del áfido pueden interferir con la respuesta de defensa de la planta, tal vez de una manera similar a como lo hacen los efectores de organismos fitopatógenos (Hogenhout y Bos 2011; Alvarez *et al.* 2013). Los resultados que se presentan aquí, confirman la participación de *B. aphidicola* en la interacción planta-insecto, aunque se necesitan más estudios para señalar un mecanismo. La evaluación de genotipos de plantas con interacción compatible e incompatible con *M. persicae*, y el estudio de las respuestas de las plantas a los áfidos aposimbóticos son los pasos siguientes elegidos para estudiar la participación de *B. aphidicola* en las interacciones planta-áfido.

CAPÍTULO 4

Interacción planta-áfido-endosimbionte: La interrupción de la simbiosis con *Buchnera aphidicola* modifica el comportamiento alimenticio de *Myzus persicae* en plantas de papa

Resumen

El pulgón verde del duraznero, *Myzus persicae*, es la plaga con mayor prevalencia en el cultivo de papa. Al igual que casi todos los áfidos, *M. persicae* se asocia con la bacteria endosimbiótica, *Buchnera aphidicola*, cuyo rol aceptado es suplementar la dieta del áfido, aunque en el Capítulo 3, utilizando la técnica de gráfico de penetración eléctrica (*electrical penetration graph*, EPG), se demostró que está involucrada en la aceptación de plantas de *Raphanus sativus* como hospedante. En este Capítulo se estudió el comportamiento alimenticio de *M. persicae* aposimbióticos (tratados para interrumpir la simbiosis con su endosimbionte primario, *B. aphidicola*), en dos genotipos de papa de susceptibilidad contrastante. Como modelo de interacción incompatible, se utilizó un pariente silvestre de la papa, *Solanum stoloniferum*, que presenta resistencia a *M. persicae*, y como interacción compatible, *Solanum tuberosum*. Se encontraron diferencias significativas en el comportamiento alimenticio de los áfidos aposimbióticos sobre plantas de ambas especies con respecto a los áfidos control. Las diferencias más importantes se observaron en relación con demoras en el inicio de las actividades en el floema. Las diferencias entre áfidos aposimbióticos y áfidos control, fueron más evidentes en la interacción compatible con *S. tuberosum* que en la interacción con *S. stoloniferum*. En aposimbiosis de *B. aphidicola*, la interacción con *S. tuberosum* se comporta como interacción incompatible con valores similares a los que se observa para la interacción con *S. stoloniferum*.

4.1. Introducción

El áfido verde del duraznero, *Myzus persicae*, es una de las plagas más importantes en el cultivo de papa, principalmente por su abundancia y su capacidad para actuar como vector de virosis. Entre las enfermedades que pueden afectar a la papa, las virosis son particularmente importantes porque los virus pueden permanecer en los tubérculos, y debido a que el cultivo se propaga vegetativamente, las virosis pueden persistir por mucho tiempo causando pérdidas severas por disminución del rendimiento o calidad (Edwards *et al.* 2008). Existen al menos 54 virus que pueden infectar a la papa (Brunt *et al.* 1996), pero los principales son: PVY (*Potato virus Y*) o Virus “Y” de la papa causante del mosaico severo, PVX (*Potato virus X*) o Virus “X” de la papa, causante del mosaico latente y, el PLRV (*Potato leaf roll virus*) o Virus del enrollamiento de la hoja de papa.

Myzus persicae es un insecto fitosuccívoro que se alimenta de savia del floema utilizando un aparato bucal especializado conformado por cuatro estiletos. Es una especie de áfido altamente polífaga, que puede infestar a una gran diversidad de plantas pertenecientes a más de 40 familias botánicas, entre las que se encuentran Solanaceae, Asteraceae, Malvaceae, Brassicaceae, Amaranthaceae, Rosaceae, Cucurbitaceae, entre otras (Blackman y Eastop 2000). Para seleccionar la planta huésped, los áfidos poseen un mecanismo sumamente especializado que consiste en la penetración de los tejidos vegetales, insertando sus estiletos entre las paredes de las células de epidermis y mesófilo (Tjallingii 1988; Tjallingii y Esch 1993). En el trayecto hacia el floema, los áfidos forman una vaina entre las células con saliva gelificante y pueden perforar las células sin matarlas para probar su contenido. Cuando llegan a un tubo criboso (floema), prueban el contenido celular, repitiendo este mecanismo muchas veces, y si la planta es favorable comienzan a alimentarse (Tjallingii 2006). Este proceso dura varias horas, es

decir que áfido y planta interactúan íntimamente antes de comenzar a alimentarse (Martin *et al.* 1997; Cherqui y Tjallingii 2000; Will *et al.* 2008; Will *et al.* 2009).

Al igual que casi todos los áfidos, *M. persicae* se asocia con la bacteria endosimbiótica *Buchnera aphidicola*. Si bien la función aceptada de *B. aphidicola* es suplementar la dieta del áfido con aminoácidos esenciales que el áfido no obtiene de la savia floemática, hay evidencias que indican su participación en otros aspectos de la interacción planta-áfido. Por ejemplo, un mismo clon de *M. persicae* alimentado en distintas especies de plantas posee en su hemocele distinta cantidad de proteínas de *B. aphidicola* (Francis *et al.* 2006). *B. aphidicola* favorece la viabilidad de virus persistentes para los que el áfido actúa como vector, por medio de la secreción de una chaperona específica (GroEL) (van den Heuvel *et al.* 1994; van den Heuvel *et al.* 1997). En el Capítulo 3 de ésta tesis, utilizando la técnica de EPG (*electrical penetration graph*), se ha demostrado que *B. aphidicola* participa en la aceptación de *M. persicae* a plantas de rabanito (*Raphanus sativus*). La técnica de EPG (McLean y Kinsey 1964; Tjallingii 1985; Tjallingii 1988) permite estudiar la penetración de los tejidos de la planta por los estiletes del áfido y analizar en detalle la interacción planta-insecto. Alvarez *et al.* (2006; 2013) estudiaron con EPG el comportamiento alimenticio de *M. persicae* frente a distintas especies del género *Solanum*. Estos autores encontraron que *Solanum stoloniferum* tiene una resistencia constitutiva hacia *M. persicae* que se localiza a nivel de la epidermis y el mesófilo. Además, se encontró que cuando se infestan las plantas de *S. stoloniferum* con un alto número de individuos de *M. persicae*, se induce la formación de pústulas.

En este Capítulo, se estudió el comportamiento alimenticio de *M. persicae* aposimbióticos (tratados con antibiótico para interrumpir la simbiosis con *B. aphidicola*), en dos genotipos de papa que poseen distinto grado de aceptación a la

infestación con *M. persicae*. Como modelo de interacción áfido-planta no compatible con *M. persicae* se eligió *S. stoloniferum* y como interacción compatible, *S. tuberosum*.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Insectos y plantas

Los áfidos utilizados para todos los experimentos provinieron de una colonia de *M. persicae*, mantenida en plantas de rabanito *Raphanus sativus*, en el bioterio de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta. Esta colonia monoclonal fue iniciada a partir de una única hembra adulta áptera y virgínopara colectada a campo en 2009. Las colonias fueron mantenidas en una cámara de crecimiento a 22 ± 3 °C, 30 – 40% de humedad relativa, y un fotoperiodo de 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad para promover la partenogénesis. Se inició una colonia nueva cada semana, y para los experimentos se utilizaron adultos jóvenes que recientemente habían mudado.

Se trabajó con plantas de *Solanum tuberosum* cultivar PO 97. 11.9 del Banco de Germoplasma del INTA Balcarce y con plantas de *S. stoloniferum* provista por el Centro para Recursos Genéticos (*Centre for Genetic Resources*, Wageningen, Holanda). La propagación de las plantas se llevó a cabo *in-vitro* en medio Murashige y Skoog (con vitaminas) al 3%, pH 5,8. Luego de dos semanas, las plántulas que presentaban desarrollo de raíces, fueron trasplantadas a tierra en macetas de 500 gr de capacidad, y fueron mantenidas en una cámara de crecimiento a 22 ± 3 °C, 30 – 40% de humedad relativa, y un fotoperiodo de 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad.

Para producir áfidos aposimbióticos (áfidos privados experimentalmente de la bacteria), se administró por vía oral el antibiótico rifampicina en una concentración de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Prosser y Douglas 1992) a áfidos adultos ápteros recién mudados. El antibiótico se administró utilizando una dieta artificial (150 mM aminoácidos, 500 mM

sacarosa, vitaminas y minerales) modificada de Prosser y Douglas (Prosser y Douglas 1992) (ver **Anexo**, pág. 145). La eficacia del tratamiento con antibiótico en las bacterias se corroboró por RT-qPCR midiendo la expresión del gen específico de *B. aphidicola*, *GroEL*.

4.2.2. Comportamiento alimenticio de áfidos aposimbióticos en plantas de *Solanum tuberosum* y *Solanum stoloniferum*, mediante la técnica de EPG

Se utilizó la técnica de DC-EPG (Tjallingii 1985) para monitorear el comportamiento alimenticio de áfidos adultos, ápteros, aposimbióticos comparados con áfidos control (que provenían de dietas artificiales sin antibiótico). Las plantas e insectos se colocaron en una jaula de Faraday para aislar el sistema de interferencias electromagnéticas, y se registró el comportamiento alimenticio de dos áfidos en cada planta simultáneamente durante 6 horas, a 23 ± 3 °C, bajo luz constante en el laboratorio. Los áfidos se colocaron en el lado abaxial de una hoja apical de las plantas de *S. tuberosum* y *S. stoloniferum*. Antes de ser colocado en la planta, el áfido se conectó a un electrodo (un hilo de oro delgado de 20 μm de diámetro), pegándolo con un pegamento de plata a base de agua. El otro extremo del hilo de oro se pegó a un alambre de cobre de 3 cm de largo (diámetro 0.2 mm) y se conectó a la entrada del amplificador principal con una resistencia de entrada de 1 giga-ohmios y 50 \times de ganancia. El electrodo de la planta, que consistió en una varilla de cobre de 2 mm de espesor y 10 cm de largo fue insertado en la tierra de la maceta de la planta y se conectó a una salida de tensión del dispositivo de EPG (Giga-8, fabricado por EPG Systems) (<http://www.epgsystems.eu/>). El registro de la actividad se inició inmediatamente después de colocar los electrodos a los áfidos y aproximadamente 1 hora después de sacar los áfidos de las cajas de dieta. Se recogieron señales de ocho áfidos, dos por planta en cada ronda de evaluación. Se analizó un total de 15 áfidos aposimbióticos y 14

áfidos control en *S. tuberosum*, y 12 áfidos aposimbióticos y 13 áfidos control en *S. stoloniferum*. Para la adquisición de datos se utilizó el programa PROBE 3.0 (Laboratorio de Entomología de la Universidad de Wageningen, Países Bajos) y para el posterior análisis de las ondas se utilizó Stylet v01.23 (EPG Systems, Wageningen, Países Bajos).

4.2.3. Ondas, patrones de onda y variables de EPG

Las señales de EPG se analizaron distinguiendo las siguientes fases, tipos o subtipos de ondas: (i) onda C, fase de pasaje hacia el floema, que agrupa a 4 ondas: A, B, C y pd, (potencial drops, caídas de potencial) en las que la onda A refleja el traspaso de la epidermis de la hoja con los estiletes, B refleja la salivación intercelular, C los movimientos de los estiletes y la formación de la vaina intercelular de saliva gelificante, y pd las caídas de potencial que se producen por efecto de las breves punciones celulares que traspasan la membrana plasmática; onda E, o fase de floema contempla dos subfases: (ii) onda E1, salivación en el elemento de tubo criboso del floema y (iii) onda E2, ingestión de savia floemática sin contar las salivaciones que pueden ocurrir durante la ingestión; (iv) onda E1e que se supone refleja las salivaciones extracelulares; (v) onda F, que se observa cuando ocurren problemas mecánicos con el deslizamiento de los estiletes en el tejido o dificultades en la penetración; y (vi) onda G, ingestión activa de agua desde el xilema. Los eventos de cada onda, se definen como la ocurrencia ininterrumpida de alguno de los tipos o subtipos de ondas que se indicaron arriba. Las ondas se caracterizaron en seis categorías: 1) número medio de veces que la onda ocurrió por insecto, 2) duración media de cada evento por insecto, 3) duración media total de la onda por insecto, 4) máxima duración del evento por cada onda, y 5) tiempo medio transcurrido hasta la primera vez que ocurrió la onda desde el inicio del experimento, 6) tiempo medio transcurrido hasta la primera vez que ocurrió la onda

desde el inicio de la prueba en la que ocurrió la onda. Además se analizó el número o proporción de áfidos que mostraron cada onda, con especial interés en los insectos que muestran ingestión sostenida de savia (E2 mayor de 10 minutos), ya que ésta variable refleja la aceptación de la planta como hospedante. Todas las variables fueron calculadas para cada tratamiento utilizando la planilla de cálculo de Sarria *et al.* (2009) (2009).

4.2.4. Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Infostat Professional v2011p (<http://www.infostat.com.ar>) (Di Rienzo *et al.* 2011). Las variables de EPG fueron analizadas individualmente para cada insecto, y luego se calculó un promedio para cada insecto en cada tratamiento y se obtuvieron medias y errores estándares de las medias (EEM). En el caso de múltiples eventos, la duración fue promediada a partir de la media de cada insecto. Los individuos que no mostraron una cierta onda, no contribuyeron a la variable calculada. En éstos casos el n fue menor que el número total de individuos evaluados por tratamiento y se agregó una variable que indica la proporción de individuos que realizó la actividad utilizando la prueba exacta de Fisher. Se realizó el análisis de la varianza (ANAVA) no paramétrico a una vía de clasificación propuesto por Kruskal-Wallis, ya que las variables no cumplían con el supuesto de distribución normal. Cuando se detectó efecto significativo de los tratamientos ($p \leq 0,05$), se realizaron comparaciones de a pares entre las medias de los rangos de tratamientos utilizando la prueba de Conover.

4.3. Resultados

4.3.1. Comportamiento alimenticio de *Myzus persicae* aposimbióticos en plantas de *Solanum stoloniferum*

Se evaluó el comportamiento alimenticio de *M. persicae* aposimbióticos y áfidos control, en plantas de *S. stoloniferum* utilizando la técnica de EPG. Se encontraron diferencias significativas en las variables relacionadas al comportamiento de prueba. El número de pruebas fue menor para los áfidos aposimbióticos que para los áfidos control ($W = 126$, $p \leq 0,01$; **Tabla 4.1**, variable 2). La duración total de C (períodos en los que los áfidos tienen los estiletos en los tejidos de la planta, sin considerar E1, E2, o pd), fue menor para los áfidos aposimbióticos que para los áfidos control ($W = 90$, $p \leq 0,01$, **Tabla 4.1**, variable 7), aunque la duración media de estos eventos fue mayor para los áfidos aposimbióticos ($W = 118$, $p = 0,04$; **Tabla 4.1**, variable 8). El número y duración total de las caídas de potencial o pd fueron significativamente menores para los áfidos aposimbióticos que para los áfidos control ($W = 90$, $p \leq 0,01$; $W = 93$, $p \leq 0,01$, respectivamente; **Tabla 4.1**, variable 9 y 10). Sin embargo, la duración media de los pd fue mayor para los áfidos aposimbióticos que para los áfidos control ($W = 194$, $p = 0,04$; **Tabla 4.1**, variable 11). Además, se encontró que el tiempo hasta la primera salivación en el floema (E1) desde la primera prueba fue mayor para los áfidos aposimbióticos que para los áfidos control ($W = 195$, $p = 0,03$; **Tabla 4.1**, variable 13). Con respecto a las actividades en el floema, se observó que el 25% de los áfidos aposimbióticos y el 54% de los áfidos control mostraron E1 (**Tabla 4.1**, variable 20), aunque estas diferencias entre los grupos no fueron significativas. La duración total de E1 fue menor para los áfidos aposimbióticos que para los áfidos control ($W = 8$, $p = 0,05$, **Tabla 4.1**, variable 18). No se observó ingestión de savia del floema, onda E2 en ninguno de los áfidos en las 6 horas de registro de EPG (**Tabla 4.1**, variables 21-26). También se encontró que el 100 % de los áfidos aposimbióticos tuvieron problemas

mecánicos de penetración de los estiletos en la ruta hacia el floema, onda F, mientras que solo el 54% de los áfidos control mostraron onda F (Fisher, $p = 0,01$, **Tabla 4.1**, variable 34). Además el número y la duración total de los periodos F también fueron significativamente mayores en los áfidos aposimbióticos que en los áfidos control ($W = 209$, $p = 0.034$ y $W = 36$, $p = 0.04$, respectivamente, **Tabla 4.1**, variables 31 y 32).

4.3.2. Comportamiento alimenticio de *Myzus persicae* aposimbióticos en *Solanum tuberosum*

Se evaluó el comportamiento alimenticio de *M. persicae* aposimbióticos y áfidos control, en plantas de *S. tuberosum* utilizando la técnica de EPG. Se encontraron diferencias significativas en variables relacionadas a la actividad de prueba. El número de pruebas fue menor para los áfidos aposimbióticos que para los áfidos control ($W = 254$; $p \leq 0,01$; **Tabla 4.1**, variables 2), sin embargo, la duración total de prueba fue mayor para los áfidos aposimbióticos ($W = 135$, $p = 0,01$; **Tabla 4.1**, variable 3). El número y la duración total de C fue menor en los áfidos aposimbióticos que en los áfidos control ($W = 256$, $p \leq 0,01$ y $W = 255$; $p \leq 0,01$, respectivamente; **Tabla 4.1**, variables 6 y 7). Con respecto a los pd se observó que el número y duración total fue menor en los áfidos aposimbióticos que en los áfidos control ($W = 256$; $p \leq 0,01$ y $W = 252$; $p \leq 0,01$, respectivamente; **Tabla 4.1**, variables 9 y 10). El 20% de los áfidos aposimbióticos y el 84% de los áfidos control, mostraron salivación en el floema (E1) respectivamente (Fisher, $p = 0,01$; **Tabla 4.1**, variable 20). Además, se observó que los áfidos aposimbióticos tuvieron menor número y duración total de salivaciones (E1) que los áfidos control ($W = 10$, $p = 0,05$ y $W = 10$, $p = 0,05$, respectivamente; **Tabla 4.1**, variable 17 y 18). Además, el tiempo hasta la primera salivación en el floema (E1) desde la primera prueba, fue mayor para los áfidos aposimbióticos que en los áfidos control ($W = 117$; $p \leq 0,01$; **Tabla 4.1**, variable 13). Ninguno de los áfidos mostró ingestión de savia del floema E2, durante las 6 horas de registro (**Tabla 4.1**, variables

21 a 26). Los áfidos aposimbióticos además mostraron mayor número y duración total de onda F ($W = 209$; $p \leq 0,01$; $W = 36$; $p \leq 0,01$, respectivamente; **Tabla 4.1**, variables 31 y 32).

Luego del análisis individual de los áfidos aposimbióticos sobre *S. stoloniferum* y *S. tuberosum*, se compararon los resultados en forma conjunta para las dos especies de *Solanum* mediante ANAVA no paramétrico, los resultados se muestran en la **Tabla 4.1**, **Figura 4.1** y **Figura 4.2**.

Tabla 4.1. Medias ± EEM de variables de EPG para el comportamiento alimenticio de *Myzus persicae* aposimbióticos y controles en plantas de *Solanum stoloniferum* y *Solanum tuberosum*. Para las variables con distinto n que el número total de individuos evaluados por tratamiento, se agregó una variable específica que indica la proporción de individuos que realizó la actividad.

Relacionado con	Nº	VARIABLES	Unidad	P [†]	Sto-Mp aposim n=12	Sto-Mp control n=13	P [‡]	Tub-Mp aposim n=15	Tub-Mp control n=13	P [‡]
Pruebas y punciones celulares	1	Tiempo hasta la 1er prueba	Min	0,25	9,03 ± 4,69	7,37 ± 2,17	0,62	3,46 ± 1,15	3,05 ± 0,47	0,62
	2	Número de pruebas	#	<0,01**	8,00 ± 1,69 ^a	15,85 ± 3,23 ^{ab}	0,01**	8,27 ± 1,92 ^a	22,00 ± 3,15 ^b	<0,01* *
	3	Duración total de prueba	H	<0,02*	5,26 ± 0,13 ^{ab}	5,05 ± 0,20 ^a	0,74	5,53 ± 0,17 ^b	4,94 ± 0,17 ^a	0,01**
	4	Duración de la 1er prueba	H	0,06	2,05 ± 0,65	1,30 ± 0,60	0,50	0,79 ± 0,44	0,28 ± 0,24	0,98
	5	Duración de la 2da prueba	H	0,16	0,41 ± 0,26	0,68 ± 0,42	0,20	1,19 ± 0,58	1,13 ± 0,49	0,13
	6	Número de C	#	<0,01**	11 ± 2,35 ^a	19,46 ± 3,38 ^b	0,061	10,33 ± 2,00 ^a	27,36 ± 3,27 ^b	<0,01* *
	7	Duración total de C	H	<0,01**	1,25 ± 0,34 ^a	2,83 ± 0,33 ^b	<0,01* *	1,22 ± 0,30 ^a	2,89 ± 0,37 ^b	<0,01* *
	8	Duración media de C	Min	0,09	15,68 ± 10,18 ^a	12,48 ± 2,23 ^a	0,04	7,64 ± 1,46	7,10 ± 0,77	0,91
	9	Número de pd	#	<0,01**	28,00 ± 6,3 ^a	108,46 ± 16,9 ^b	<0,01* *	31,80 ± 7,98 ^a	138,8 ± 17,95 ^b	<0,01* *
	10	Duración total de pd	Min	<0,01**	2,25 ± 0,49 ^a	8,23 ± 1,37 ^b	<0,01* *	2,80 ± 0,72 ^a	10,25 ± 1,27 ^b	<0,01* *
	11	Duración media de pd	Seg	0,92	5,04 ± 0,22	4,47 ± 0,15	0,04*	4,67 ± 0,23	4,35 ± 0,19	0,41
	12	Tiempo desde la 1er prueba al 1er pd	Min	0,82	55,17 ± 29,83	24,16 ± 21,83	0,70	23,92 ± 19,60	27,33 ± 0,60	0,63
	13	Tiempo desde la 1er prueba al 1er E1	H	<0,01**	5,46 ± 0,26 ^b	4,58 ± 0,48 ^{ab}	0,03*	5,35 ± 0,40 ^b	2,88 ± 0,6 ^a	<0,01* *
	14	Tiempo desde el inicio de la prueba al 1er E1	Seg	0,41	16,36 ± 1,07	28,31 ± 5,12	0,14	25,94 ± 6,37	21,78 ± 3,74	0,48
	15	Número de pruebas hasta el 1er E1	#	0,94	10,33 ± 2,73	9,43 ± 2,93	0,92	10,33 ± 7,36	10,00 ± 2,62	0,92
	16	Duración del evento C más corto	Min	0,64	16,33 ± 1,07	24,67 ± 5,93	0,67	25,99 ± 6,37	19,26 ± 4,24	0,32

Relacionado con	Nº	Variables	Unidad	P [†]	Sto-Mp aposim n=12	Sto-Mp control n=13	P [‡]	Tub-Mp aposim n=15	Tub-Mp control n=13	P [‡]
Contacto con el floema: salivación e ingestión	17	Número de E1	#	<0,01**	1,18 ± 0,25 ^a	2,61 ± 0,6 ^{ab}	0,24	0,33 ± 0,19 ^a	3,86 ± 1,2 ^b	0,05*
	18	Duración total de E1	Min	0,04*	1,46 ± 0,90 ^a	14,73 ± 5,35 ^c	0,05*	2,16 ± 1,66 ^{ab}	9,91 ± 3,19 ^{bc}	0,05*
	19	Duración media de E1	Min	0,08	1,46 ± 0,89	3,51 ± 0,86	0,14	1,13 ± 0,81	3,30 ± 0,89	0,07
	20	Áfidos que realizan E1	# (%)	-	3 (25)	7 (54)	0,23§	3 (20)	11 (84)	0,01*§
	21	Número de E2	#	-	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-
	22	Duración total de E2	Min	-	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-
	23	Duración media de E2	Min	-	0,00 ± 0,00	0,00±0,00	-	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-
	24	Duración total de E1 seguido de E2	Min	-	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-
	25	Número de E2 sostenido	#	-	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-
	26	Áfidos que realizan E2 sostenida	#	-	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	0 (0)	-
Xilema	27	Número de G	#	0,15	0,33 ± 0,14	0,92 ± 0,29	0,15	0,93 ± 0,55	1,08 ± 0,26	0,15
	28	Duración total de G	Min	0,11	30,25 ± 14,65	123,49 ± 38,85	0,09	97,51 ± 30,99	118,83 ± 27,77	0,09
	29	Duración media de G	Min	0,42	30,25 ± 14,65	82,73 ± 29,73	0,26	46,47 ± 9,87	92,77 ± 28,78	0,26
	30	Áfidos que realizan G	# (%)	0,07	4 (33)	7 (54)	0,43§	5 (33)	10 (77)	0,08§
Problemas mecánicos en los estiletes	31	Número de F	#	<0,01**	4,08 ± 0,93 ^b	1,23 ± 0,38 ^a	0,03*	3,07 ± 0,55 ^b	1,07 ± 0,32 ^a	<0,01* *
	32	Duración total de F	H	<0,01**	4,20 ± 0,28 ^b	1,84 ± 0,51 ^a	<0,01* *	4,04 ± 0,49 ^b	0,93 ± 0,59 ^a	<0,01* *
	33	Duración media de F	H	0,02	1,88 ± 0,52 ^b	0,87 ± 0,26 ^{ab}	0,21	1,93 ± 0,51 ^b	0,71 ± 0,58 ^a	0,20
	34	Áfidos que realizan F	# (%)	-	12 (100)	7 (54)	0,01** §	14 (93)	9 (79)	0,08§

[†]ANAVA según Kruskal-Wallis para los 4 tratamientos seguido de comparaciones múltiples por Conover; para la misma fila, valores seguidos por distinta letra indican diferencias significativas, p≤0,05, [‡]Prueba U de rangos de Mann-Whitney dentro de cada especie de planta, y [§]Test exacto de Fisher entre áfidos en la misma especie, * p≤0,05

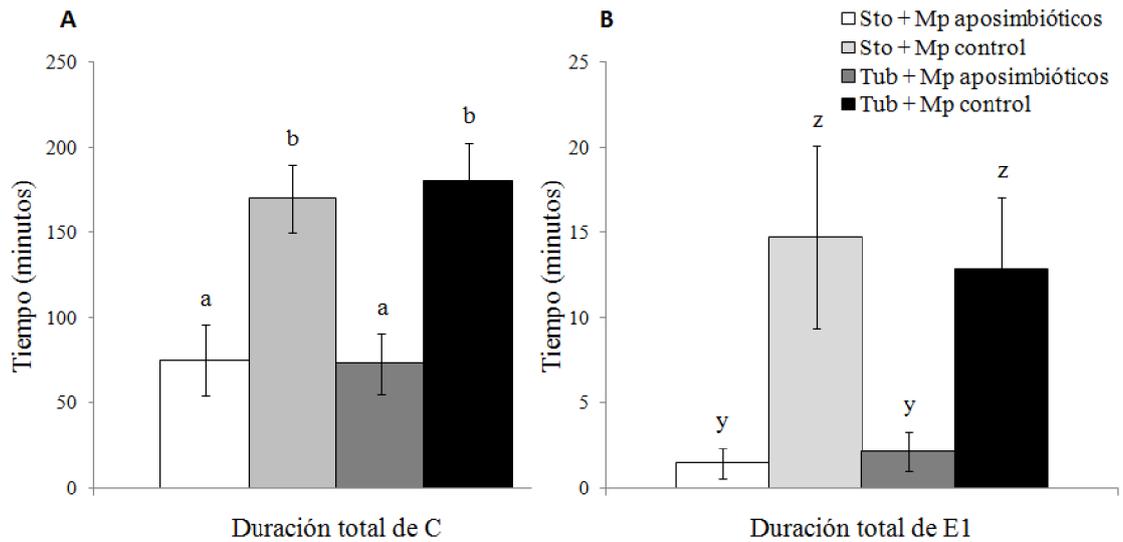


Figura 4.1. Variables de EPG que difieren entre *Myzus persicae*, aposimbióticos (Mp aposimbiótico) y control (Mp control). A) Duración total de onda C en plantas de *S. stoloniferum* (Sto) y plantas de *S. tuberosum* (Tub). B) Duración total de E1 en plantas de *S. stoloniferum* (Sto) y plantas de *S. tuberosum* (Tub). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (a,b, duración total de C); (y,z, duración total de E1), ANAVA según Krukall-Wallis, $P \leq 0,05$ seguido de la prueba de Conover).

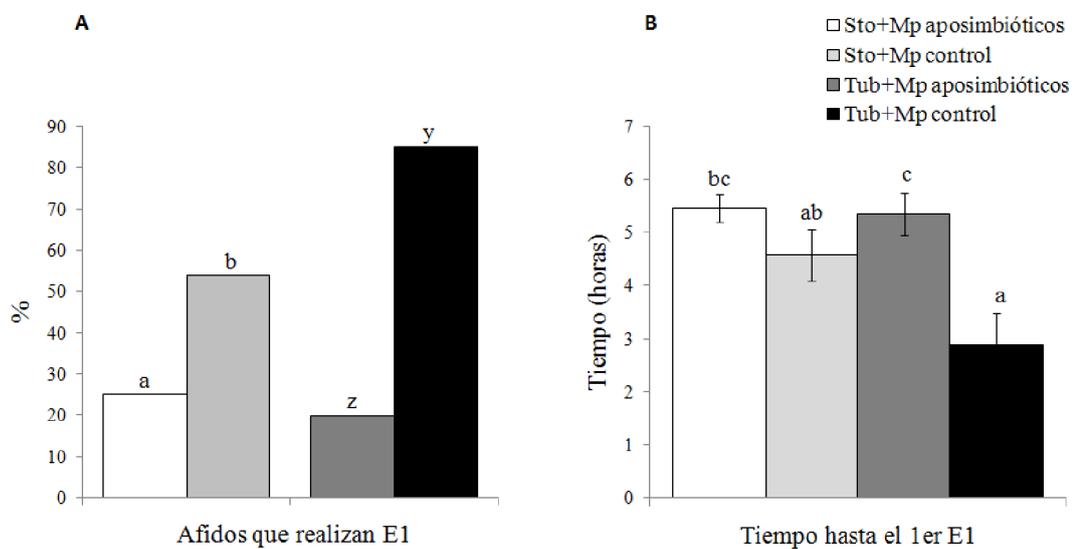


Figura 4.2. Variables de EPG que difieren entre *Myzus persicae*, aposimbióticos (Mp aposimbiótico) y control (Mp control). A) Porcentaje de *M. persicae* aposimbióticos (Mp aposimbióticos) y áfidos control (Mp control) que muestran salivación en el floema (onda E1) en plantas de *S. stoloniferum* (Sto) y plantas de *S. tuberosum* (Tub). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos de áfidos sobre cada una de las especies de plantas, según la prueba exacta de Fisher, $P \leq 0,05$; a, b para *S. stoloniferum* y z, y, para *S. tuberosum*. B) Tiempo hasta el primer E1. Letras distintas indican diferencias según ANAVA Krukall-Wallis, $P \leq 0,05$ seguido de la prueba de Conover).

4.4. Discusión

El comportamiento alimenticio de *M. persicae* aposimbióticos se monitoreó con la técnica de EPG en plantas de *Solanum stoloniferum* y *Solanum tuberosum*, para estudiar la participación de la bacteria endosimbiótica del áfido, *Buchnera aphidicola*, en la interacción con la planta. Los áfidos aposimbióticos mostraron un comportamiento alimenticio diferente que el de los áfidos control. Estas diferencias se manifestaron de manera similar tanto en *S. stoloniferum* como en *S. tuberosum*. Los áfidos aposimbióticos mostraron menor número y duración de periodos C (**Tabla 4.1**, variable 6 y 7, **Figura 4.2**), menor número de caídas de potencial (pd) y menor duración total de pd (**Tabla 4.1**, variables 12 y 13). La mayor duración total de pd de los controles se debió al mayor número de estos eventos (**Tabla 4.1**, variable 9 y 10).

En estudios de EPG en plantas de rabanito (*Raphanus sativa*) (Capítulo 3) se observó que la duración media de los pd fue mayor en los áfidos que antes de la evaluación por EPG habían sido alimentados en dietas artificiales (áfidos aposimbióticos y áfidos control), que en los áfidos normales alimentados en planta. En este Capítulo tanto en *S. stoloniferum* y *S. tuberosum* los resultados de la duración media de pd, se obtuvieron de áfidos que previo al EPG, habían sido alimentados en dietas artificiales (**Tabla 4.1**, variable 11) y la duración media de pd en *S. stoloniferum* y *S. tuberosum* es mayor que la encontrada por otros autores para áfidos normales alimentados en planta (Alvarez *et al.* 2013). Esto sugeriría que de forma similar a lo que ocurre en plantas de rabanito, la duración media de los pd en *S. tuberosum* y *S. stoloniferum* también se ve afectada por las dietas artificiales, probablemente debido al cambio en el modo de alimentación que ocurre en las dietas artificiales.

Tanto para áfidos aposimbióticos como para los áfidos controles, indistintamente de la especie de planta, la actividad en el floema consistió

exclusivamente en salivación (E1) y no realizaron ingestión (E2) (**Tabla 4.1**, variables 21-26). Tjallingii y Hogen Esch (1993) describieron que la actividad en el floema siempre se inicia con salivación, que corresponde a E1, y luego puede seguir o no con la actividad de ingestión de savia, E2. Si luego de la salivación, se inicia o no ingestión, dependerá de la aceptación de la planta como hospedante, considerándose a una ingestión sostenida de más de 10 minutos como criterio de aceptación de la planta (Tjallingii 1990; Tjallingii 2006). La salivación E1 en el floema, permite contrarrestar los mecanismos de coagulación de los elementos de tubo criboso. Un mayor periodo de salivación E1 antes de la ingestión sostenida de savia, E2, se observa en las plantas resistentes a *M. persicae*, comparadas con las susceptibles (Alvarez *et al.* 2013). En el Capítulo 3 de ésta tesis, se ha demostrado que la interrupción de la simbiosis con *B. aphidicola* genera en los áfidos dificultades en la salivación E1, lo que probablemente dificulta el pasaje de salivación E1 a ingestión de savia E2. *Solanum tuberosum*, es mejor hospedante para *M. persicae* (interacción compatible) que *S. stoloniferum* (interacción incompatible) (Alvarez *et al.* 2006; Le Roux *et al.* 2008; Alvarez *et al.* 2013) y se observó que el efecto de la aposimbiosis sobre la aceptación de la planta hospedante fue más evidente en la relación compatible que en la relación incompatible de *M. persicae* con éstas plantas. Esto se observa en que, si bien los áfidos aposimbióticos tanto en *S. stoloniferum* como en *S. tuberosum*, necesitaron más tiempo antes de poder iniciar la salivación en el floema que los áfidos control, esa diferencia fue del doble en *S. tuberosum*. Además, el tiempo que le toma a los áfidos aposimbióticos iniciar la salivación, se asemeja a los valores que se demora *M. persicae* en observar salivación en la interacción incompatible *S. stoloniferum*-*M. persicae*. Alvarez *et al.* (2013) mostraron que *M. persicae* normales, demoran más del doble en aceptar a *S. stoloniferum*, con respecto a *S. tuberosum*, lo que guarda correlación con lo

encontrado aquí. Es probable entonces, que la aposimbiosis de *B. aphidicola* sea la causa de la demora en iniciar la actividad de salivación en el floema, E1, en los áfidos aposimbióticos, lo que genera que la relación *M. persicae*-*S. tuberosum*, se vuelva incompatible. También la diferencia en el porcentaje de áfidos que mostraron salivación en el floema es mucho mayor entre los áfidos aposimbióticos y los control en *S. tuberosum*, que entre los áfidos control de *S. stoloniferum* y *S. tuberosum*, por lo que se evidencia que la aposimbiosis afectó más a la interacción compatible que a la incompatible (**Tabla 4.1**, variable 20 y **Figura 4.2**).

Como ya se discutió en el Capítulo 3, la propuesta para explicar el mecanismo por el cual *B. aphidicola* modifica el comportamiento alimenticio de *M. persicae* sobre plantas que en condiciones normales, serían sus hospedantes, sería que *B. aphidicola* tiene un efecto directo al producir proteínas efectoras o pequeños péptidos que son inyectados por el insecto junto con la saliva en las células de las plantas, o que tiene un efecto indirecto al producir péptidos que tienen a las glándulas salivales como blanco, y que de esa forma, afectan a la saliva. La aposimbiosis de *B. aphidicola*, probablemente genera cambios en la saliva de *M. persicae*, tal como se encontró en la expresión de genes que se expresan en la glándula salival en el Capítulo 3, que afectan los cambios fisiológicos que tienen lugar en la interacción planta-áfido. Los perfiles transcripcionales de *S. tuberosum* y *Solanum stoloniferum* atacadas por *M. persicae*, muestran cambios en la expresión de un gran número de genes relacionados con patogenicidad (genes PR) y genes relacionados con la transducción de señales dependientes del ácido salicílico (SA) (Alvarez *et al.* 2007; Alvarez *et al.* 2013). Ambos procesos están relacionados con la resistencia a organismos patógenos del tipo biotróficos (Walling 2000; Loon *et al.* 2006). Muchos de estos genes están relacionados con procesos de cambio del estado fisiológico de la planta lo que sugeriría una

manipulación por parte del áfido (Thompson y Goggin 2006; Alvarez 2007; Vos *et al.* 2007; Goggin 2007; Smith y Boyko 2007). Se ha sugerido que estos cambios representan una condición para la preferencia del áfido por un determinado genotipo de planta huésped (Zhu-Salzman *et al.* 2004; Alvarez 2007; Alvarez *et al.* 2013). Además, el cambio en la expresión de algunos genes en plantas de *Solanum* y *Arabidopsis*, atacadas por *M. persicae*, indica que la respuesta de estas plantas tiene cierta similitud a la respuesta a una infección bacteriana biotrófica (Alvarez 2007; De Vos y Jander 2009). Esta similitud, se observa sobre todo en la activación de genes que han sido caracterizados en respuesta a bacterias patógenas biotróficas (por ejemplo *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) (Marois *et al.* 2002), o de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) y a la transducción de señales de respuestas a patógenos. Es por esto que se ha propuesto que *B. aphidicola*, podría estar implicada en esta interacción, participando de la percepción que realiza la planta del ataque de por parte de los áfidos. Los resultados obtenidos aquí, junto con los del Capítulo 3, confirman la participación de la bacteria en la interacción *Solanum* - *M. persicae*. El paso siguiente es, por lo tanto, estudiar qué ocurre con las respuestas transcripcionales de las principales vías de defensa de las plantas de *Solanum* a *M. persicae* aposimbóticos.

CAPÍTULO 5

Interacción planta-áfido-endosimbionte: El endosimbionte *Buchnera aphidicola*, participa junto a *Myzus persicae* en la manipulación de las respuestas de la planta

Resumen

Los perfiles transcripcionales de *Solanum tuberosum* y *Arabidopsis thaliana* infestadas por *Myzus persicae* muestran cambios en la expresión de un gran número de genes: 1) relacionados a la patogénesis (PR), 2) de la vía del ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) y 3) genes del metabolismo celular. Muchos de estos genes están relacionados con procesos de cambio del estado fisiológico de la planta que pasa de fuente a sumidero, lo que sugiere una manipulación por parte del áfido. Estos cambios estarían mediados por un efector, que podría tratarse de un componente salival sintetizado por el insecto o su endosimbionte primario, *Buchnera aphidicola*. El objetivo de éste capítulo fue evaluar la participación de *B. aphidicola* en la manipulación que realiza *M. persicae* en la fisiología de las plantas hospedantes. Se analizó la expresión de genes de *S. tuberosum* y *A. thaliana* por RT-qPCR en respuesta a áfidos aposimbióticos tratados en dieta con antibiótico, áfidos normales en dieta control, y áfidos normales criados en planta. Se evaluaron genes de distintas vías de defensa (SA, JA, y etileno), y genes *PR* que se expresan en *S. tuberosum* en respuesta a *M. persicae*. En *A. thaliana*, las plantas infestadas por áfidos aposimbióticos mostraron diferencias en la expresión del gen *LOX* (vía del JA) y del gen *PR1* (vía del SA) en relación a los áfidos normales, lo que sugiere la participación de *B. aphidicola* en la manipulación de la fisiología de la planta por parte del áfido.

5.1. Introducción

Las plantas son constantemente atacadas por diferentes tipos de patógenos y plagas y, por lo tanto, para defenderse invierten energía en distintos mecanismos de resistencia. La amenaza puede provenir de una serie de potenciales enemigos, consecuentemente la percepción de cada tipo de ataque requiere la habilidad de la planta para reconocer las señales químicas generadas por el atacante y poder así distinguir patrones particulares. La planta percibe el ataque de los insectos dependiendo del modo de alimentación, es decir si son insectos masticadores, como por ejemplo las larvas de los lepidópteros, o si son insectos fitosuccívoros (también llamados picadores de floema) como por ejemplo los áfidos, moscas blancas y otros hemípteros. En ambos casos, durante la alimentación de los insectos, la saliva se pone en contacto con las células de la planta y algunos componentes salivales pueden actuar como efectores activando diferentes cascadas de señalización (revisado por Bonaventure 2012; Elzinga y Jander 2013).

La percepción de los insectos herbívoros por parte de la planta ha sido ampliamente investigada en el caso de los insectos masticadores, en particular la percepción de las larvas de lepidópteros se ha estudiado a nivel transcriptómico, proteómico, y metabolómico (revisado por Wu y Baldwin 2010). En la saliva de lepidópteros se han identificado distintos componentes que actúan como efectores en las plantas hospedantes como por ejemplo enzimas hidrolíticas de *Helicoverpa zea* (Eichenseer *et al.* 1999) y β -glucosidasa de *Pieris brassicae* (Mattiacci *et al.* 1995); derivados conjugados de ácidos grasos como volicitina de *Spodoptera exigua* (Alborn *et al.* 1997; Alborn *et al.* 2007) y caeliferina de *Schistocerca americana* (Alborn *et al.* 2007). En el caso de los insectos fitosuccívoros, la saliva de los áfidos es la más caracterizada y se han encontrado distintas proteínas salivales que actúan como

efectores en la planta hospedante (Mutti *et al.* 2008; De Vos y Jander 2009; Bos *et al.* 2010).

Los áfidos son insectos herbívoros, parásitos de plantas que se alimentan del fluido floemático por medio de un aparato bucal modificado en forma de agujas, conformado por cuatro estiletes. Para seleccionar la planta huésped, los áfidos insertan sus estiletes entre las células de los tejidos vegetales hasta alcanzar el floema. En el camino hacia el floema pueden perforar algunas células realizando pequeñas punciones para “probar” el contenido (Tjallingii 1985; Tjallingii 1988; Helden y Tjallingii 1993) y durante estas punciones también pueden salivar e ingerir minúsculas cantidades de contenido celular (Martín *et al.* 1997).

Las plantas, a lo largo de la evolución, han desarrollado un arsenal de mecanismos de defensa que determina que sólo una pequeña proporción de los ataques de diversos invasores sean exitosos. Los mecanismos de defensa de las plantas pueden ser constitutivos o preexistentes que involucran barreras estructurales como por ejemplo la cutícula o reservorios de compuestos antibióticos posicionados estratégicamente; o bien pueden ser mecanismos de defensa inducidos que se producen en respuesta al ataque y requieren que el metabolismo de la planta se active cuando el invasor es percibido (revisado por Wu y Baldwin 2010). Cuando una planta percibe el ataque del insecto se inician una serie de respuestas que pueden conducir a una interacción compatible (planta susceptible) o a una interacción incompatible (planta resistente). En el caso de los áfidos se ha encontrado que las respuestas de las plantas son muy diversas, complejas e involucran diferentes vías de señalización. Se ha propuesto que esta complejidad, en parte se debe al modo de alimentación tan especializado de los áfidos, en el que el pasaje de los estiletes por el apoplasto de los tejidos de la planta, seguido de la ingestión de savia floemática a partir de un único elemento de tubo

criboso (Tjallingii y Hogen Esch, Hewer *et al.* 2011), causa un daño físico menor al provocado por los insectos herbívoros del tipo masticadores. Por ejemplo, la infestación de *Myzus persicae* en *Solanum tuberosum* y *Arabidopsis thaliana* induce la expresión de genes relacionados con patogenicidad (genes PR) y genes relacionados con la transducción de señales dependientes del ácido salicílico (*salicylic acid*, SA) (De Vos y Jander 2009; Alvarez 2007, Alvarez *et al.* 2013). Ambos procesos están relacionados con la resistencia a organismos patógenos del tipo biotróficos (Walling 2000; Loon *et al.* 2006). Además, se modifica la expresión de genes relacionados con procesos de cambio del estado fisiológico de la planta, de fuente a sumidera, lo que sugeriría una manipulación de la planta por parte del áfido (Vos *et al.* 2005; Thompson y Goggin 2006; Vos *et al.* 2007; Smith y Boyko 2007). En general se acepta que la ruta del SA es inducida por agentes patógenos biotróficos e insectos fitosuccívoros, y la vía del ácido jasmónico (*jasmonic acid*, JA) es inducida por herbívoros masticadores y patógenos necrotrofos (Glazebrook 2005; Hogenhout y Bos 2011). A pesar de que los áfidos son susceptibles a las defensas mediadas por JA (Ellis *et al.* 2002), inducen principalmente la vía mediada por SA (Moran y Thompson 2001; De Vos y Jander 2009; Alvarez *et al.* 2013). Sin embargo, hay evidencias de una comunicación (*crosstalk*), conservada evolutivamente, entre las vías de SA-JA que resulta en un antagonismo recíproco entre estas vías. Este antagonismo entre SA-JA se cree que minimiza la expresión de las defensas costosas e ineficaces que desvían los recursos de carbono y nitrógeno de la planta en crecimiento vegetativo, evitando compromisos para la reproducción (revisado por Thaler *et al.* 2012). Por esta razón, la capacidad que tienen los áfidos de inducir la vía del SA y suprimir las defensas mediadas por el JA, se considera como una “manipulación” de las defensas de la planta por parte del áfido para mejorar su desempeño en la planta hospedante. Esta manipulación se cree que podría estar mediada

por efectores, que presumiblemente son componentes salivales sintetizados por el áfido o su endosimbionte *B. aphidicola* (Vos *et al.* 2007; De Vos y Jander 2009; Alvarez *et al.* 2013).

En los Capítulos 3 y 4 de ésta Tesis, se ha demostrado que *B. aphidicola* está involucrada en las interacciones entre la planta y el áfido, ya que en ausencia de la endosimbiosis con la bacteria, los áfidos presentan dificultades en la penetración de los tejidos vegetales y en la aceptación de la planta como hospedante. El objetivo de éste Capítulo es estudiar la participación que tiene *B. aphidicola* en las interacciones entre *M. persicae* y dos plantas hospedantes, *S. tuberosum* y *A. thaliana*, en relación a la expresión de genes relacionadas a las vías de defensas desencadenadas al producirse la infestación. El monitoreo de los niveles de ARN de genes centinelas de las defensas luego del ataque de los áfidos, ha sido utilizado ampliamente para estudiar las respuestas de las plantas a la infestación con distintos organismos (Moran y Thompson 2001; Zhu-salzman *et al.* 2004; Zarate *et al.* 2007; Casteel *et al.* 2012).

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Expresión de genes de *Solanum tuberosum* en respuesta a *Myzus persicae* aposimbióticos

Plantas: Se trabajó con plantas de *Solanum tuberosum* cultivar PO 97. 11.9 del Banco de Germoplasma del INTA Balcarce, Buenos Aires, Argentina. La propagación de las plantas se llevó a cabo *in-vitro* en medio Murashige y Skoog (con vitaminas) al 3%, pH 5.8. Luego de dos semanas *in-vitro*, las plántulas que tenían raíces fueron transferidas a macetas de 500 gr de capacidad, utilizando tierra como sustrato. Las plantas fueron utilizadas para los experimentos cuando tuvieron 4 semanas de edad.

Insectos: Los insectos provinieron de una colonia de *Myzus persicae* mantenida en el bioterio de la Facultad de Ciencias Naturales, en plantas de rabanito (*Raphanus*

sativus) en una cámara de cría a 22 ± 3 °C, 30-40 % de humedad relativa y con un fotoperíodo de 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad. Se generaron tres grupos de áfidos, 1) áfidos aposimbióticos, tratados en dietas artificiales con el antibiótico rifampicina; 2) áfidos control, tratados en dietas artificiales sin antibiótico y 3) áfidos normales que provenían de la colonia de insectos. Para producir, áfidos aposimbióticos se administró por vía oral el antibiótico rifampicina a los áfidos, utilizando el mismo protocolo descrito en los **Capítulos 3 y 4** (ver **Anexo**, pág. 145).

Diseño del experimento: Se prepararon 16 cajas con 25 áfidos cada una, de cada uno de los tratamientos de dietas. Luego de 4 días se transfirieron 20 áfidos a 2 hojas apicales de las plantas de papa en bolsas de 3 cm x 3 cm, de tela antihelada (agrotexil). Para el tratamiento de áfidos normales, se utilizaron áfidos que provenían de la colonia de rabanito. Como control, se colocaron bolsas sin áfidos a otro grupo de plantas y se distribuyeron las plantas en un diseño completamente aleatorizado (DCA) (**Figura 5.1**). Para cada tratamiento se obtuvieron 4 réplicas biológicas que consistieron en 2 hojas por planta infestadas con alguno de los 3 tratamientos de áfidos o con bolsas vacías. Luego de 8 y 24 hs se recolectaron las muestras e inmediatamente se colocaron en nitrógeno líquido. Se almacenó el material a -80 °C hasta su procesamiento para ser analizado por RT-qPCR.

Extracción de ARN: El ARN se extrajo de las muestras utilizando el protocolo de TriReagent (Ambion) y luego purificado con el kit SV Total RNA Isolation (Promega). Para eliminar los restos de ADN genómico de las muestras, 1 µg de ARN se trató con la enzima DNasa RQ1 (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego, el ARN se utilizó para sintetizar ADNc utilizando cebadores oligo DT20, 10 mM dNTPs y la transcriptasa inversa SMART MMLV de Clontech de acuerdo con las

instrucciones del fabricante. La eficiencia de la síntesis de ADNc se evaluó por PCR usando cebadores para el gen *EF-1*.

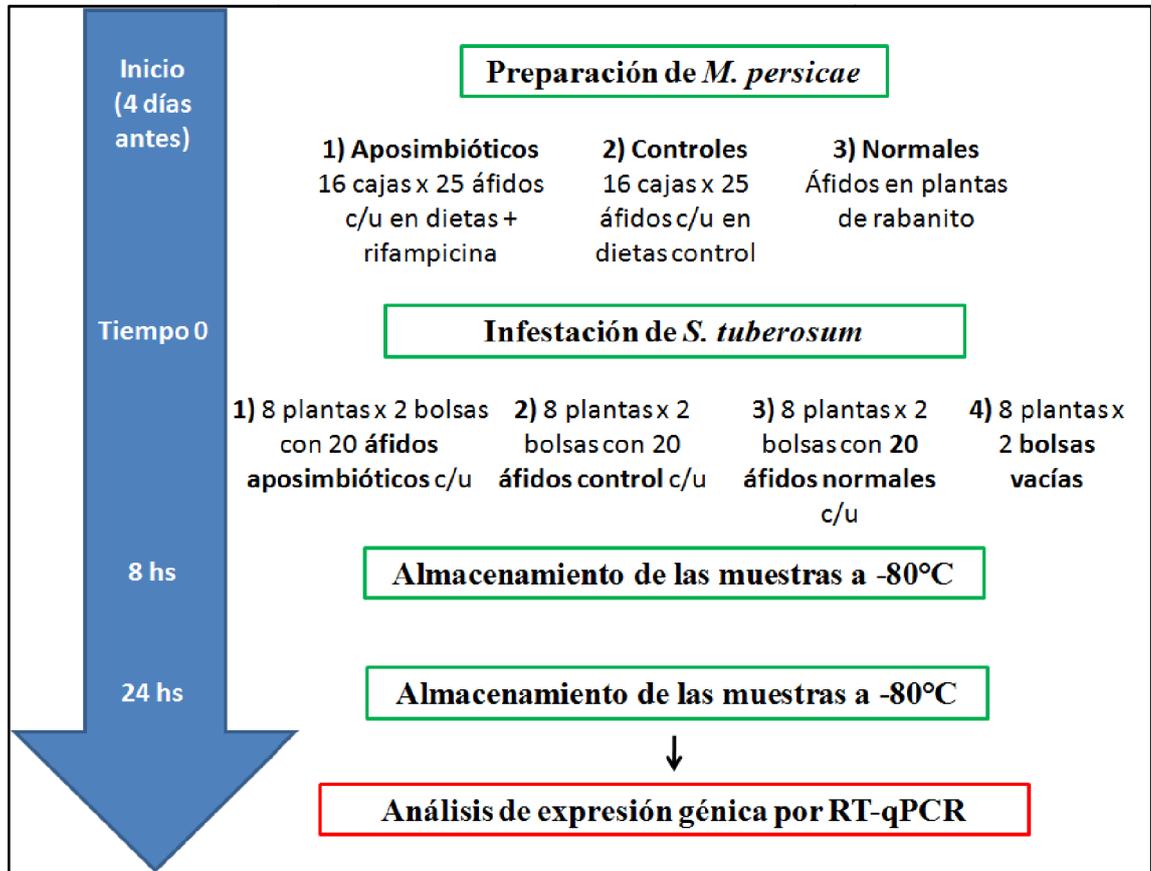


Figura 5.1. Diseño del experimento de evaluación de expresión de genes de *Solanum tuberosum* en respuesta a *Myzus persicae* aposimbióticos, control y normales. 4 días antes de la infestación de las plantas, los áfidos fueron preparados de acuerdo a cada uno de los tratamientos: aposimbióticos, en dietas + antibiótico rifampicina; control, en dietas sin antibiótico y normales, que fueron mantenidos en la colonia hasta el día de la infestación (tiempo 0). Las plantas de *S. tuberosum* fueron infestadas con áfidos de cada uno de los tratamientos. Como control, también se utilizaron plantas libres de áfidos. Luego de 8 y 24 hs, se tomaron muestras y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento para RT-qPCR.

RT-qPCR: Para evaluar las respuestas de *S. tuberosum* a los áfidos, se midió la expresión de genes que están involucrados en las diferentes vías de defensa (SA, JA, y Etileno) y genes de proteínas asociadas a la patogénesis (*pathogenesis related*, PR) que se expresan en *S. tuberosum* en respuesta a *M. persicae* (Alvarez *et al.* 2013). Los cebadores se diseñaron utilizando el programa PrimerPlus3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). El detalle de los genes evaluados y los cebadores utilizados se presenta en la **Tabla 5.1**.

Tabla 5.1. Detalle de genes de *Solanum tuberosum* que fueron evaluados por RT-qPCR en respuesta a infestación con áfidos aposimbóticos.

Gen	Detalle	Relacionado con	Accesión	Cebadores
PR1-1	PR-1 isoforma b1,	Respuesta a SA	BI433563	Fwd-CTATCTTGCGGTTCAACAACG Rev-CTGCACCGGAATGAATCAAG
WRKY4	Proteína 4 de unión WRKY-DNA-	Respuesta a SA	BI434091.1	Fwd: CGAAGAGGACGATACAAGAGAAG Rev: CAAGCATGGCCATCATAACAC
CHAI1	Quitinasa acida clase II	Respuesta a SA	BQ517484.1	Fwd: TGCAGCTAACTCGTTTCCAG Rev: GGCAGCCATTTCTTCTTAC
CH19	Quitinasa	Respuesta a ET	U589895	Fwd-GTCATCACCGGAAGATGGCAGC Rev-CCGATCCTGGACCCTGCTGT
LOX2	Lipoxigenasa	Biosíntesis de JA	U37840	Fwd-CCGTGGTTGACACATTATCG Rev-ACAGCAGTCCGCCCTATTTA
PIN2	Inhibidor de proteasas 2	Respuesta a JA	K03291	Fwd-AATTATCCATCATGGCTGTTTCCAC Rev-CCTTTTGGATCAGATTCTCCTT
AOS	Aleno oxido sintasa	Biosíntesis de JA	AF30371	Fwd-TCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTCC Rev-CGCCGGGTATAGTCTGGTAGATA
JAZ2	Proteína Jaz	Respuesta a JA	EF591123.1	Fwd-GATTTACCAATCGCGAGACG Rev-TTGAGCACCTAATCCCAACC
SAUR	Proteína SAUR	Respuesta a patógenos	BI919302.1	Fwd-TGGCTAGGAAATGGCAGAAG Rev-TACTGCAACTGTCTGCATCG
EF-1 α	Factor de elongación 1 α	Referencia	X114449	Fwd-CTCCGTCTTCCACTTCAGG Rev-TCAGTTGTCAAACCAGTAGGG

Los análisis de RT-qPCR fueron hechos en placas de 96 pocillos, transparentes y cubiertas con films adhesivos, ambos de calidad óptica (Bio-Rad) con el sistema de detección MyIQ Single Color Real Time PCR (Bio-Rad). Se utilizó SYBR® Green como molécula reportera, para monitorear la síntesis de ADN de doble cadena. Cada reacción contuvo 10 ng de cDNA, 1 μ L de cada cebador en una concentración de 3mM y 5 μ L de SYBR® Green Mix (Applied Biosystems) en un volumen final de 10 μ L. Para cada uno de los genes evaluados, cada réplica biológica fue colocada por duplicado en la placa (réplica técnica). Se utilizó el siguiente perfil térmico para todas las reacciones de PCR: 95 °C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 45 segundos (hibridación y elongación). Para el análisis de la expresión de cada gen, se calculo el ciclo en el cual la fluorescencia alcanza un valor

umbral o “*threshold cycle*” (Ct) utilizando el programa Optical System versión 2.0 para MylQ (Bio-Rad). Con cada valor de Ct se calculó el cambio en la expresión relativa de los genes de interés $2^{-\Delta Ct}$, normalizada con el gen de referencia *EF-1*. El gen *EF-1* se seleccionó como gen de referencia y control endógeno, ya que codifica para una proteína (Factor de elongación 1) que se expresa constitutivamente en *S. tuberosum*. Su expresión absoluta fue constante en todos los tratamientos evaluados y con valores que permitieron su uso como normalizador para los otros genes de interés (resultados no mostrados).

5.2.2. Expresión de genes de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a *Myzus persicae* aposimbóticos

Plantas: Se trabajó con plantas de *A. thaliana* variedad Columbia (Col-0), provista por el Centro para Recursos Biológicos de *Arabidopsis* (*Arabidopsis Biological Resource Center*) (www.arabidopsis.org). Previo a la siembra, las semillas fueron incubadas durante 48 hs a 6 °C para favorecer la germinación. Luego se las sembró utilizando Rockwool® (<http://www.grodan.com/sw9984.asp>) como sustrato, embebido en una solución nutritiva del fertilizante Hyponex® (NPK = 7-6-19) (Hydroponic Chemical Company Inc.) la cual también se utilizó para regarlas cada 3 días. Las plantas fueron mantenidas en una cámara de crecimiento Conviron® a 23 °C, 50% de humedad relativa, y se utilizaron cuando alcanzaron un tamaño superior al 70% del tamaño final de la roseta (28 días desde siembra, estado 3.70-3.09 según Boyes *et al*, 2001).

Insectos: Los insectos provinieron de una colonia de *M. persicae* mantenida en el Laboratorio de *Plant Breeding*, en la Universidad de Wageningen. Para la cría se utilizó una variedad susceptible de repollo (*Brassica oleracea*) y se las mantuvo en una cámara a 22 ± 3 °C, 30-40 % de humedad relativa y con un fotoperíodo de 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad. Se utilizaron los mismos tratamientos de áfidos que en el

experimento con *S. tuberosum*: 1) áfidos aposimbóticos, 2) áfidos control y 3) áfidos. Para producir áfidos aposimbóticos, se utilizó el mismo protocolo que el utilizado para el experimento con *S. tuberosum*.

Diseño del experimento: Se prepararon 30 cajas con 25 áfidos cada una, de cada uno de los tratamientos de dietas. Luego de 4 días, se transfirieron 20 áfidos a 2 hojas apicales de las plantas de *A. thaliana* en cajas *clip-on*. Para el tratamiento áfidos normales se utilizaron áfidos que provenían de la colonia de repollo. Como control, se colocaron bolsas sin áfidos a otro grupo de plantas y se distribuyeron las plantas en un diseño completamente aleatorizado (DCA) (Figura 5.2).

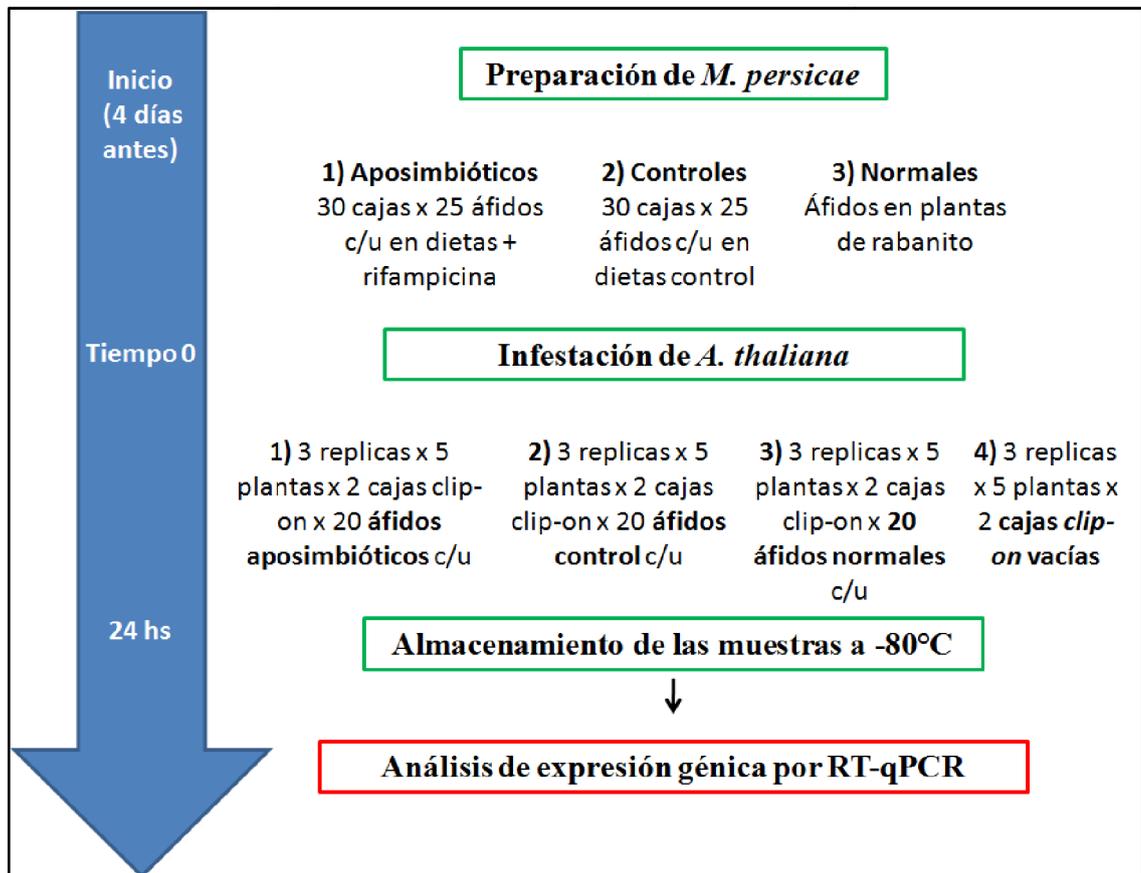


Figura 5.2. Diseño del experimento de evaluación de expresión de genes de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a *Myzus persicae* aposimbóticos. 4 días antes de la infestación de las plantas, los áfidos fueron preparados de acuerdo a cada uno de los tratamientos: aposimbóticos, en dietas + antibiótico; control, en dietas sin antibiótico y normales, que fueron mantenidos en la colonia hasta el día de la infestación (tiempo 0). Las plantas de *A. thaliana* fueron infestadas con áfidos de cada uno de los tratamientos. Como control, también se utilizaron plantas libres de áfidos. Luego de 24 hs, se tomaron muestras y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento por RT-qPCR.

Para cada tratamiento se obtuvieron 3 réplicas biológicas que consistieron en 2 hojas de 5 plantas infestadas con alguno de los 3 tratamientos de áfidos o con cajas *clip-on* vacías. Luego de 24 hs, se almacenó el material a -80 °C hasta su procesamiento, para luego ser analizado por RT-qPCR.

Extracción y purificación de ARN: Se utilizó el kit RNAeasy® Plant Mini Kit (Quiagen). Para eliminar los restos de ADN, el ARN se trató con DNAsa I® (Invitrogen). Finalmente, el ARN se utilizó para sintetizar ADNc utilizando el kit iScript® cDNA Synthesis (BIO-RAD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La eficiencia de la síntesis de ADNc se evaluó por PCR utilizando cebadores para el gen *ACTIN8* que se expresa constitutivamente en *A. thaliana*.

RT-qPCR: Se evaluaron genes que están involucrados en las diferentes vías de defensa (SA, JA, y Etileno). Los cebadores se diseñaron utilizando el programa PrimerPlus3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). El detalle de los genes evaluados y los cebadores utilizados se presenta en la **Tabla 5.2**. Los análisis de RT-qPCR se llevaron a cabo siguiendo el mismo protocolo descrito para *S. tuberosum*. Para cada uno de los genes evaluados, cada réplica biológica fue colocada por duplicado en la placa (réplica técnica). Se calculó el cambio en la expresión relativa de los genes de interés $2^{-\Delta C_t}$ normalizada con el gen de referencia *ACTIN8* (Chen *et al.* 2013). El gen *ACTIN8* y sus homólogos son ampliamente utilizados como genes de referencia y controles endógenos en RT-qPCR. Su expresión absoluta fue constante en todos los tratamientos evaluados y con valores que permitieron su uso como normalizador para los otros genes de interés (resultados no mostrados).

Tabla 5.2. Detalle de genes de *Arabidopsis thaliana* que fueron evaluados por RT-qPCR en respuesta a infestación con áfidos aposimbióticos.

Gen	Detalle	Relacionado a	Accesión	Cebadores
LOX2	Lipoxigenasa 2	Biosíntesis de JA	At3G45140	Fwd-AGATTCAAAGGCAAGCTCCA Rev-ACAACACCAGCTCCAGCTCT
VSP2	Prot. de almacenamiento vegetativo 2	Respuesta a JA/Et	At5G24770	Fwd-TACGAACGAAGCCGAAGTCT Rev-GGCACCGTGTCTGAAGTCTAT
PDF1.2	Prot. defensiva de plantas 1	Respuesta a JA	At5G44420	Fwd-CACCCCTTATCTTCGCTGCTC Rev-GCACAACCTTCTGTGCTTCCA
PAD4	Deficiencia de fitoalexinas	Respuesta a SA	At3G52430	Fwd-GTTCTTTTCCCGGCTTATC Rev-CGGTTATCACCACCAGCTTT
PR1	Prot. relacionada a la patogénesis 1	Respuesta a SA	At2G14610	Fwd-GGCCTTACGGGGAAAAGTCA Rev-CTCGCTAACCCACATGTTCA
ERF1	Factor de respuesta al etileno	Respuesta a Et	At3G23240	Fwd-CTTCCGACGAAGATCGTAGC Rev-TCTTGACCGGAACAGAATCC
ACTIN8	Actina	Referencia	At1G49240	Fwd-GATGGAGACCTCGAAAACCA Rev-AAAAGGACTTCTGGGCACCT

5.2.3. Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Infostat Profesional v2011p (<http://www.infostat.com.ar>) (Di Rienzo J.A. *et al.* 2011). Los valores de expresión de genes fueron transformados con el log₂ y sobre esos valores se realizó un análisis de ANAVA. Cuando el efecto del tratamiento fue significativo, se probaron las diferencias entre las medias con la prueba de LSD (*Least significant difference*) de Fisher.

5.3. Resultados

5.3.1. Expresión de genes de *Solanum tuberosum* en respuesta a *Myzus persicae* aposimbióticos

Se estudió la expresión de genes involucrados en vías de defensa (**Tabla 5.1**) en plantas de *S. tuberosum* cultivar PO 97. 11.9, en respuesta a la infestación con áfidos aposimbióticos, áfidos control (alimentados en dieta artificial sin antibiótico) y áfidos normales (que provenían de las colonias mantenidas en rabanito), luego de 8 y 24 hs. Como control, también se midió la expresión de éstos genes en plantas libres de áfidos. En la **Figura 5.3** se presentan los resultados de expresión de los genes en los que si bien

no se encontraron diferencias significativas, se encontró una tendencia similar a lo que se encontró en *A. thaliana*. En el **Anexo** (pág.145) se presentan las tablas con todos los resultados de expresión de genes.

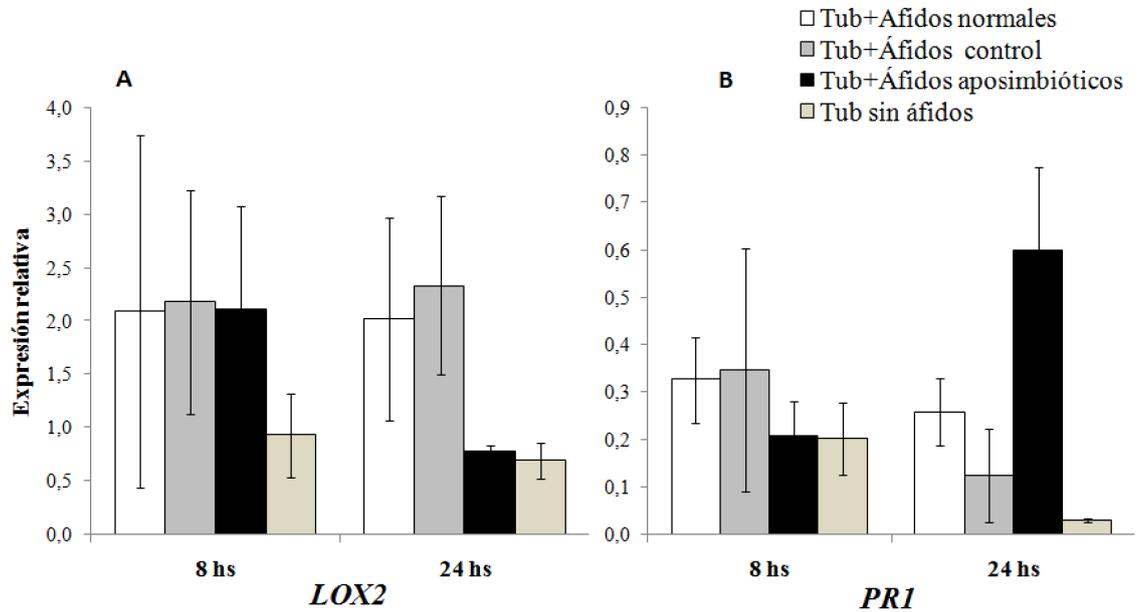


Figura 5.3. Expresión relativa de genes de *Solanum tuberosum* en respuesta a *Myzus persicae* aposimbióticos, áfidos control y áfidos normales. La expresión de los genes se cuantificó por qPCR luego de 8 y 24 horas de infestación. Las barras muestran las medias \pm EEM.

Luego de las primeras 8 horas de infestación, se observó que la expresión del gen *LOX2* que codifica para la enzima lipoxigenasa, fue mayor en las plantas infestadas con cualquiera de los tres tratamientos de áfidos (aposimbióticos, control y normales), con respecto a las plantas sanas. Luego de 24 hs de infestación, se produjo una reducción en el nivel de expresión en las plantas infestadas con áfidos aposimbióticos, con respecto a las plantas infestadas con áfidos control y normales (A). En el caso del gen *PRI*, que codifica para la proteína relacionada a la patogénesis, a las 8 horas, se observó que la expresión en las plantas infestadas con áfidos normales y control, fue ligeramente superior que con los áfidos aposimbióticos y en las plantas libres de áfidos. A las 24 hs, se detectó un aumento en la expresión en las plantas infestadas con áfidos aposimbióticos con respecto a las infestadas con áfidos normales y control (B).

5.1.1. Expresión de genes de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a *Myzus persicae* aposimbióticos

Se estudiaron las respuestas transcripcionales de plantas de *A. thaliana* variedad Col-0 a la infestación por 24 hs con áfidos aposimbióticos, áfidos control (alimentados en dieta artificial sin antibiótico) y áfidos normales (que provenían de las colonias mantenidas en rabanito). Se analizaron 6 genes que están involucrados en las principales vías de defensa. En la **Figura 5.4** se presentan los resultados de expresión de los genes en los que se encontraron diferencias en relación a la expresión del gen de referencia. En el **Anexo** (pág. 145) se presentan las tablas con todos los resultados de expresión de genes.

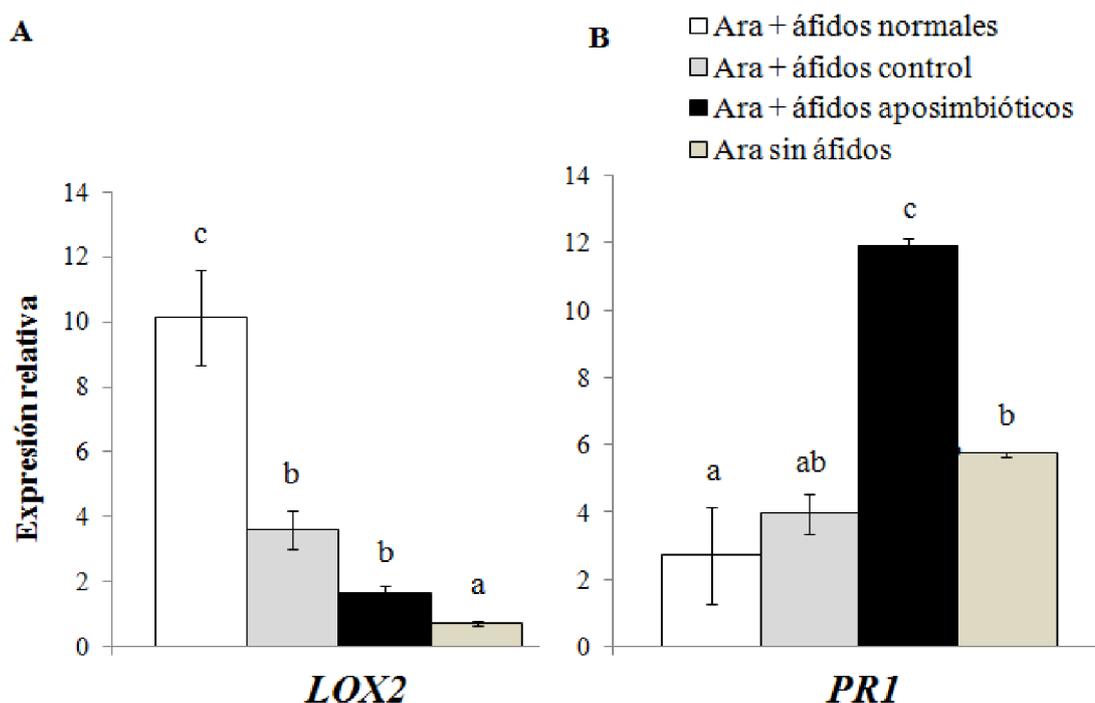


Figura 5.4. Expresión relativa de genes de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a *Myzus persicae* aposimbióticos, áfidos control y áfidos normales. La expresión de los genes se cuantificó por qPCR luego de 24 horas de infestación. Las barras muestran las medias \pm EEM. Letras distintas indican diferencias significativas según LSD de Fisher ($p \leq 0,05$).

En el caso del gen *LOX2*, el nivel de expresión en las plantas infestadas con áfidos aposimbióticos y áfidos control, fue menor que el nivel de expresión en las plantas infestadas con áfidos normales ($F = 70.658$, $p \leq 0,01$), con valores similares a

los encontrados en las plantas sanas. Para el gen *PRI*, se observó que la expresión en plantas infestadas con áfidos aposimbióticos, fue mayor que en las plantas infestadas con los otros dos tratamientos de áfidos, áfidos control y áfidos normales, y que el de las plantas sanas ($F = 12.96$, $p = 0,01$).

5.2. Discusión

Las respuestas de las plantas a la infestación por *Myzus persicae* son complejas, y los resultados presentados aquí sugieren que la bacteria endosimbiótica primaria de los áfidos, *B. aphidicola*, podría estar involucrada en la interacción del áfido con *A. thaliana* y posiblemente también con *S. tuberosum*. En *A. thaliana*, la expresión de genes que están involucrados en distintas vías de señalización, mostraron diferencias en la respuesta a la infestación con áfidos aposimbióticos. En el caso de *S. tuberosum*, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas, se observa que los valores muestran una tendencia hacia lo que se encontró en *A. thaliana*.

En las plantas de *A. thaliana*, luego de 24 hs de infestación, la expresión del gen *LOX2* (vía del JA) mostró una disminución de su expresión relativa en las plantas infestadas con áfidos aposimbióticos, con respecto a las plantas infestadas con los otros tratamientos de áfidos, alcanzando valores similares a los observados en las plantas libres de áfidos. En las plantas de *S. tuberosum*, luego de 8 horas de la infestación con áfidos control, áfidos aposimbióticos y áfidos normales, la expresión del gen *LOX2* tuvo valores de expresión similares en las plantas infestadas con los 3 tratamientos de áfidos, comparadas con las plantas libre de áfidos, lo que sugeriría que la expresión de éste gen se comportó de manera similar en las etapas de infestación con cualquiera de los tres tratamientos de áfidos. El gen *LOX2*, codifica para la enzima lipoxigenasa que es una enzima importante en la vía de síntesis del ácido jasmónico. Existen antecedentes de inducción de gen *LOX2* en respuesta a la infestación de *M. persicae* en plantas de

tomate a los 7 días posteriores a la infestación (Findatsef *et al.* 2009) y también en el ataque de la mosca blanca *Bemisia tabaci* en *A. thaliana* (Zhang *et al.* 2013). El gen *LOX2* también es importante en la percepción del ataque por organismos fitopatógenos. Findatsef *et al.* (2009) encontraron que el gen *LOX2* se induce en plantas de tomate inoculadas con el hongo *Phytophthora infestans* por 24 hs (Findatsef *et al.* 1999). También en plantas de algodón, el gen *LOX2* se induce luego de la inoculación con la bacteria *Xanthomonas campestris*, y además la inducción es mayor cuando la interacción es incompatible (Sanier *et al.* 2012). Es decir que los resultados encontrados aquí, específicamente el hecho de que la interrupción de la simbiosis de *M. persicae* y *B. aphidicola*, provoque que la expresión de *LOX2* en la planta atacada disminuya, con respecto a las plantas atacadas por áfidos normales, podrían explicarse si se considera que de alguna manera las plantas de *S. tuberosum* y *A. thaliana* son capaces de percibir a través del áfido algún factor de *B. aphidicola*.

En el caso del gen *PRI* (vía del SA), en las plantas de *A. thaliana* se observó un aumento en la expresión de éste gen luego de 24 horas de infestación con áfidos aposimbióticos, con respecto a las plantas infestadas con áfidos normales y áfidos control. En el caso de las plantas de *S. tuberosum*, a las 24 hs luego de la infestación la expresión de éste gen mostró una tendencia similar a lo que se encontró en las plantas de *A. thaliana* luego de 24 hs de infestación con áfidos aposimbióticos, aunque las diferencias no fueron significativas. Estos resultados sugieren de alguna manera, la simbiosis de *M. persicae* con *B. aphidicola*, genera una inhibición del gen *PRI* relacionado a las defensas mediadas por SA durante la interacción planta-áfido. Casteel *et al.* (2012) encontraron que la bacteria, *Candidatus Liberibacter psyllaourous*, patógena de tomate, reprime en las plantas de tomate la expresión del gen *PRI*, luego de 24 hs de inoculación. Esta bacteria patógena de tomate, se comporta a la vez como

endosimbionte del vector, el psílido del tomate *Bactericerca cockerelli* por lo que estos autores concluyeron que la bacteria *L. psyllarous* participa de las manipulaciones de las respuestas de las plantas de tomate, por parte del insecto vector (Casteel *et al.* 2012). Los resultados de estos autores se relacionan con los encontrados en este Capítulo en la interacción áfido-planta, donde se encontró que en presencia del endosimbionte *B. aphidicola* en el áfido, la expresión del gen *PR* se mantiene baja, mientras que la aposimbiosis permitiría su expresión.

Los resultados presentados aquí confirmarían la hipótesis de que *B. aphidicola* participa en la interacción entre *M. persicae* con *A. thaliana* y posiblemente también con *S. tuberosum*. Cuando se interrumpió la simbiosis de *M. persicae* y *B. aphidicola*, la expresión relativa de los genes *LOX2* (vía del JA) y *PR1* (vía del SA) mostró valores opuestos a los de las plantas infestadas con áfidos control (con *B. aphidicola*) en *A. thaliana* y mostró una tendencia similar en *S. tuberosum*, aunque se requieren más experimentos en ésta última especie para confirmar los resultados.

Los resultados encontrados en las respuestas de las dos especies de plantas evaluadas, pareciera contradecir lo encontrado por otros autores, que observaron que la infestación por insectos hemípteros, como ser áfidos, moscas blancas y psílidos, inducen las defensas mediadas por SA y reprimen las defensas mediadas por JA (Zarate *et al.* 2007; De Vos y Jander 2009; Bos *et al.* 2010; Alvarez *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2013), proponiendo que las bacterias endosimbióticas de éstos insectos, podrían ser las responsables de tales cambios. En los resultados de éste Capítulo se esperaba que la interrupción de la simbiosis con *B. aphidicola*, provocara la inhibición de la vía del SA, y esto permitiría la activación de la vía del JA, que confiere resistencia a patógenos necrotrófico e insectos masticadores (Glazebrook 2005). Sin embargo, Zhang *et al.* (2013) trabajando con *A. thaliana* y la mosca blanca *Bemisia tabaci*, encontraron que la

infestación con las moscas blancas indujo tanto la expresión del gen *PRI* como del gen *LOX2*, siendo ambos genes que se encuentran “aguas arriba” en la vías respectivas, aunque la expresión del gen *VSP1* (JA) que se encuentra “aguas abajo” fue reprimida, por lo que concluyen que la mosca blanca solamente reprime la señalización de genes que se encuentran “aguas abajo” en la vía del JA. Por esto se propone que para complementar la información obtenida en éste Capítulo, y así poder aumentar el entendimiento del complejo proceso de reconocimiento del ataque de *M. persicae*, se requiere la incorporación del análisis de expresión de genes en tiempos posteriores de interacción, para que los resultados puedan ser comparables con los trabajos mencionados. Además, en otro estudio en plantas de tomate, a las 24 hs pos inoculación con el hongo *Phytophthora infestans*, la expresión del gen *LOX* mostró niveles de inducción similares a los obtenidos por el ataque del lepidóptero *Helicoverpa zea*, es decir que la expresión de este gen por sí sólo, no permitiría detectar las diferencias en la activación de las vías de defensa, en comparación con otros genes marcadores cuya expresión muestra mayores diferencias dependiendo del organismo atacante (Findatsef *et al.* 1999). Estos resultados también podrían relacionarse con la idea de que la vía del JA representa una maquinaria de señalización conservada que se activa por ambos patrones de reconocimiento, tanto específicos como no-específicos tras el ataque herbívoro. La especificidad de la respuesta entonces, se lograría a través de procesos independientes del JA, con importancia fundamental de los cambios espacio-temporales de las hormonas que modulan a la vía del JA, incluyendo SA y ET.

CAPÍTULO 6

Conclusiones y discusión general: Interacciones entre plantas, áfidos y endosimbiontes

6.1. Introducción y conclusiones de la Tesis

Los áfidos constituyen uno de los principales grupos de insectos de interés agronómico que se alimentan de floema, utilizando sus estiletes para alimentarse del contenido de los elementos de tubo criboso de las plantas hospedantes (Pollard 1973; Blackman y Eastop 2000). En ésta Tesis se integraron diferentes estudios que aportaron información al conocimiento de los mecanismos de interacción planta-áfido-endosimbionte con el objetivo de hacer un aporte al entendimiento de la relación ecológica y evolutiva entre los áfidos y su endosimbionte primario *Buchnera aphidicola*. Otro aporte importante de este trabajo es contar con nuevos conocimientos que podrían en un futuro facilitar el desarrollo de herramientas de control con intervención de la simbiosis, para control de áfidos, sobre todo en la producción de papa semilla. Además, estos conocimientos también podrían ser la base para los estudios, en otros sistemas de interés agronómico.

El modelo utilizado en esta Tesis, constituido por *Myzus persicae* y *Solanum tuberosum*, constituye un modelo ideal para trabajar con interacciones planta-áfido, ya que la papa es un cultivo de gran importancia económica y *M. persicae* es una de las plagas más importantes, no sólo en este cultivo, sino en muchos otros. Además, el genoma de la papa se encuentra secuenciado y si bien el de *M. persicae* aun no está disponible, sí lo está el del áfido de las arvejas, *A. pisum*, por lo que hay disponible una gran cantidad de herramientas moleculares. Por otro lado, *M. persicae* también puede infestar a *Arabidopsis thaliana*, lo que permite comparar los resultados con esta planta modelo.

En ésta Tesis se presentan las primeras evidencias que *B. aphidicola* tiene un rol en la interacción planta-áfido. En la última década, se sugirió la participación de ésta bacteria en la interacción (Goggin 2007; De Vos y Jander 2009; Alvarez *et al.* 2013) sin

embargo hasta esta tesis, no había sido demostrado. La aposimbiosis de *B. aphidicola*, es para los áfidos una situación artificial, que difícilmente se encuentra en la naturaleza, y que genera efectos colaterales (**Capítulo 3**), sin embargo se considera que la estrategia utilizada es la más adecuada para estudiar la participación de *B. aphidicola* en la interacción planta áfidos. En los experimentos con aposimbiosis que demostraron la complementación metabólica entre *B. aphidicola* y los áfidos (Prosser y Douglas 1992; Douglas 1998), se utilizaron áfidos tratados con antibióticos desde las etapas tempranas del desarrollo, donde la presencia del endosimbionte es más crítica para los áfidos. Los áfidos aposimbióticos obtenidos en esas condiciones, muestran una serie de efectos colaterales de la aposimbiosis, sobre todo en el desarrollo como por ejemplo menor tamaño corporal, imposibilidad de alcanzar la adultez, esterilidad, entre otros, que limitan aun más las comparaciones con la situación normal, en experimentos que involucran comportamiento alimenticio e infestación de plantas. En los experimentos presentados aquí, los áfidos aposimbióticos fueron criados en condiciones normales en una colonia mantenida en una planta hospedante óptima, hasta alcanzar la adultez, minimizando las consecuencias del tratamiento con antibiótico y también los efectos secundarios de la alimentación en dietas artificiales. Es decir, que se les permitió completar su desarrollo de manera normal, y luego se les administró un antibiótico para eliminar la bacteria.

En esta tesis, se integraron estudios que involucran distintas situaciones de la interacción entre plantas y áfidos aposimbióticos, comparando el comportamiento de *M. persicae* con y sin la bacteria en dos genotipos de papas con las que establecen interacciones compatibles (*Solanum tuberosum*) o incompatibles (*Solanum stoloniferum*); demostrándose que los áfidos en aposimbiosis presentan grandes dificultades en la capacidad de aceptación de la planta compatible (**Capítulo 4**).

También, se encontró que la percepción de la planta hospedante a la infestación con áfidos, parece depender de la presencia de *B. aphidicola* en el sistema con la planta modelo *A. thaliana*. En *S. tuberosum* los resultados mostraron la misma tendencia que en *A. thaliana*, aunque se requerirían más experimentos para confirmar estos resultados.

En ésta Tesis además se presentan estudios que indicarían que la senescencia foliar inducida, no necesariamente constituye un mecanismo de resistencia a *M. persicae* en plantas de *S. tuberosum*, como se ha reportado para otros sistemas.

A continuación se discuten los principales hallazgos de la Tesis, en un contexto general y de la literatura actual en el tema.

6.2. Efecto de la senescencia foliar inducida en la interacción planta-áfido

En las plantas con senescencia inducida por oscuridad, *Myzus persicae* mostró una reducción en el tiempo pre-reproductivo y mediante estudios de comportamiento alimenticio, se observó que los áfidos pasaron más tiempo ingiriendo savia del floema que en las plantas control y realizaron más pruebas breves después de la primera ingestión sostenida de savia (**Capítulo 2**). Estos resultados indican que las actividades en el floema y el desarrollo ninfal de *M. persicae* podrían haberse beneficiado del enriquecimiento nutricional que resultó de la senescencia inducida en plantas de papa. La senescencia inducida mejoró la aceptación de la planta por parte de *M. persicae* a través de un incremento en la ingestión de savia que resultó en una reducción en el tiempo de desarrollo de ninfa a adulto.

La manipulación del metabolismo del nitrógeno en la planta hospedante por parte de los áfidos, ha sido demostrada para varios sistemas planta-áfido. Por ejemplo, los áfidos *Diuraphis noxia* y *Schizaphis graminum* promueven el aumento de la

concentración de aminoácidos esenciales en el floema de sus plantas hospedantes (Sandström *et al.* 2000). La infestación con *Acyrtosiphon pisum*, redirige el nitrógeno de los brotes apicales a sus sitios de alimentación (Girousse *et al.* 2005).

Además, en la literatura se ha demostrado que la infestación por *M. persicae* induce la expresión de genes relacionados con la senescencia tanto en *Solanum* como en *Arabidopsis* de manera análoga a lo que ocurre con organismos patógenos biotróficos (Alvarez 2007). Sin embargo, en el caso de los áfidos que, a diferencia de las organismos patógenos, pueden evadir esas respuestas localizadas por que tienen la posibilidad de trasladarse y de beneficiarse de la re-movilización de nutrientes de sitios distantes, se presume que la inducción de senescencia no es un mecanismo de resistencia general a los áfidos como proponen Pegadaraju *et al.* (2005).

La inducción de procesos como senescencia, clorosis, muerte celular programada, entre otros, son procesos promovidos por la vía del ácido salicílico (SA) que confieren resistencia de amplio rango contra organismos patógenos (Walling 2000). El hecho de que en las plantas exista solapamiento entre las vías de defensa en respuesta a los áfidos y a bacterias patógenas biótropas, podría estar vinculado a la presencia de efectores en la saliva de los áfidos que guarden similitud con efectores bacterianos. Por ésta razón en esta tesis se estudio el rol que cumple en la interacción planta-áfido la bacteria endosimbionte de los áfidos, *Buchnera aphidicola*.

6.3. Efecto de la aposimbiosis en relación a la aceptación de la planta hospedante

La estrategia elegida para estudiar el rol de *B. aphidicola* en la interacción planta-áfido, fue la interrupción experimental de la simbiosis de *M. persicae* con su endosimbionte primario, *B. aphidicola* (aposimbiosis), a través del tratamiento con

antibiótico (**Capítulo 3**). Se encontró que la aposimbiosis modificó la expresión de genes que se expresan en la glándula salival de *M. persicae*, reprimiendo la expresión de la proteína salival *Mp1026*. Si bien, ésta proteína es producida por el insecto y aún no se le puede asignar un rol, este resultado apoya la hipótesis propuesta en esta tesis, de que *B. aphidicola* influye en la expresión de proteínas salivales del áfido, produciendo cambios en la composición de la saliva (**Capítulo 1, Figura 1.1**). A pesar de que aún no se han encontrado proteínas de origen bacteriano en la saliva del áfido, no se descarta la posibilidad de que existan efectores de origen bacteriano, y que probablemente los efectores sean pequeñas moléculas difíciles de detectar.

La aposimbiosis afectó el comportamiento alimenticio de *M. persicae*. En plantas de rabanito (*Raphanus sativus*), el comportamiento alimenticio de los áfidos aposimbióticos, mostró diferencias en comparación con el de los áfidos control (en dieta sin antibiótico) y con el de los áfidos normales (que provenían de la colonia de insectos). Las principales diferencias se encontraron en relación con el tiempo necesario para iniciar las actividades de salivación e ingestión en el floema, y con problemas mecánicos con los estiletes (**Capítulo 3**).

En plantas de *S. tuberosum* (interacción compatible) y *S. stoloniferum* (interacción incompatible), el efecto de la aposimbiosis sobre la aceptación de la planta hospedante fue más pronunciada en la interacción compatible que en la interacción incompatible con *M. persicae* (**Capítulo 4**). Esto se observa en que, si bien los áfidos aposimbióticos tanto en *S. stoloniferum* como en *S. tuberosum*, necesitaron más tiempo antes de poder iniciar la salivación en el floema que los áfidos control, esa diferencia fue dos veces mayor en *S. tuberosum*. Además, el tiempo que le llevó a los áfidos aposimbióticos en *S. tuberosum* iniciar la salivación en el floema, fue similar a los valores que demora *M. persicae* en alcanzar la salivación en el floema en *S.*

stoloniferum (interacción incompatible) (Alvarez *et al.* 2013). En los áfidos aposimbióticos la interrupción de la simbiosis con *B. aphidicola* sería la causa de la demora en iniciar la actividad de salivación en el floema, lo que genera que la relación compatible entre *M. persicae* y su hospedante, *S. tuberosum* se torne incompatible en aposimbiosis.

El proceso de “prueba” de una planta, por parte de un áfido puede durar varias horas, es decir que áfido y planta interactúan íntimamente antes de que el áfido comience a alimentarse (Pollard 1973; Tjallingii y Esch 1993; Martin *et al.* 1997; Miles 1999; Cherqui y Tjallingii 2000; Tjallingii 2006; Will y van Bel 2006). Durante éste proceso de prueba, la expresión de muchos genes que están relacionados con procesos de cambio del estado fisiológico de la planta, cambian su expresión como resultado de la interacción con el insecto, lo que sugeriría una manipulación por parte del áfido (Thompson y Goggin 2006; Vos *et al.* 2007; Smith y Boyko 2007; Goggin 2007; De Vos y Jander 2009). Se ha sugerido que los cambios en la fisiología de la planta representan una condición para la aceptación de un determinado genotipo de planta hospedante, por parte de un áfido (Zhu-Salzman *et al.* 2004; Alvarez 2007; Alvarez *et al.* 2013) y que la aceptación depende de los procesos que ocurren luego de que la planta percibe el ataque.

6.4. Efecto de la aposimbiosis en relación a la percepción del ataque del insecto

Una vez que los áfidos insertan sus estiletes en la planta, se inicia un proceso de interacción a nivel celular, que puede conducir a la aceptación de la planta como hospedante por parte del áfido, o a la resistencia de la planta. En esta interacción, como en casi todas las interacciones de las plantas con agentes biótrosos, participan las

principales vías de defensas mediadas por ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (Et).

Las plantas de *S. tuberosum* y *A. thaliana* expuestas a la infestación con áfidos aposimbióticos mostraron diferencias en la expresión de genes marcadores de la vía del SA, el gen *PRI*; y de la vía del JA, el gen *LOX*. En el caso de *S. tuberosum*, las diferencias en la expresión de los genes no fueron estadísticamente significativas debido a la variabilidad en el nivel de expresión entre las réplicas, pero tuvieron una clara tendencia. Esta tendencia, sumada al hecho de que en la planta modelo *A. thaliana*, se encontró un comportamiento similar cuando fueron infestadas con áfidos aposimbióticos, indica que *B. aphidicola* participa en la interacción planta-insecto afectando la manera en que la planta percibe a los áfidos (**Capítulo 5**).

La vía del JA representa en la planta una maquinaria de señalización conservada que se activa en respuesta a diversos factores. Tras el ataque de un herbívoro, ya sea específico o no, se ha observado la activación de la vía del JA. La especificidad de la respuesta al ataque, se lograría a través de procesos independientes del JA, teniendo importancia fundamental los cambios espacio-temporales de las hormonas que modulan la vía del JA, incluyendo SA y ET (Erb *et al.* 2012). Luego de la percepción del ataque, la planta debe ajustar finamente la respuesta más adecuada al tipo de ataque. Esto es un proceso fundamental, ya que este ajuste no sólo permite una defensa efectiva contra el atacante, sino que permite compensar el costo que tienen las defensas, que toman recursos de otros procesos fundamentales como el crecimiento y la reproducción (Baldwin 1998; Zavala y Baldwin 2004).

6.5. Implicancias evolutivas, ecológicas y agronómicas del rol de *Buchnera aphidicola* en la interacción planta-áfido

La manipulación que realizan los insectos herbívoros sobre la fisiología de la planta hospedante, para su propio beneficio, es un hecho que ha ido ganando aceptación en los últimos años (revisado por Pieterse y Dicke 2007). Estudiar si los endosimbiontes con los que se asocian los insectos, son jugadores ocultos en la interacción planta-insecto, es hoy uno de los desafíos en el estudio de interacciones planta-insecto (Frago *et al.* 2012). Para un insecto herbívoro, contar con un socio simbiótico es ventajoso, ya que le permite disponer de recursos genéticos extras, por ejemplo la capacidad de sintetizar moléculas de origen bacteriano “bioactivas” que puedan cumplir un rol en la interacción con la planta hospedante del insecto. Existen varios ejemplos de asociaciones de insectos con distintos tipos de microorganismos, que resultan en beneficios para el insecto, y en consecuencia también para el microorganismo (revisado por Frago *et al.* 2012). Específicamente hay bacterias endosimbióticas que benefician a los insectos con los que se asocian (revisado por Feldhaar 2011). Por ejemplo el gusano de la raíz del maíz, *Diabrotica virgifera*, es una de las principales plagas del maíz y se asocia con bacterias del género *Wolbachia*, y al eliminar la bacteria de los insectos, se observó en la planta un aumento en la activación de genes relacionados con las defensas (Barr *et al.* 2010). Del mismo modo, en el psílido del tomate, *Bactericerca cockerelli*, las altas concentraciones del simbionte bacteriano *Candidatus Liberibacter psyllaurens* se correlacionan con la reducción de la expresión de las vías de defensa de la planta en tomate (Casteel *et al.* 2012).

Casi todos los áfidos se asocian con *B. aphidicola*, y se sabe que ésta relación se estableció hace millones de años. La comparación de secuencias de rRNA de distintas

Buchneras spp. junto a las características morfológicas de los áfidos que las albergan, proporcionan una fuerte evidencia de que un solo ancestro áfido fue infectado por la bacteria hace 250 millones de años (Munson *et al.* 1991; Martínez-Torres *et al.* 2001). Este hecho, sumado a la baja variabilidad genética de la bacteria, no permitiría explicar la gran diversidad en interacciones compatibles e incompatibles entre plantas y áfidos que se observan en la naturaleza. Por esta razón, se propone que la contribución de la bacteria a la manipulación de la fisiología de la planta, ya sea suprimiendo defensas antiherbívoro, o promoviendo cambios en el metabolismo de las plantas que los beneficien nutricionalmente, podría haber sido un factor más en la historia evolutiva del establecimiento de la simbiosis entre los áfidos y *B. aphidicola*.

El floema como alimento para los áfidos, tiene la ventaja de contener menores componentes tóxicos de defensa, en comparación con otros tejidos vegetales, ya que la mayoría de los compuestos tóxicos que se liberan en respuesta a la infestación se localizan en el apoplasto de los tejidos de las plantas y se ponen en contacto cuando se produce daño por herbivoría. Sin embargo, el floema presenta la desventaja de ser nutricionalmente deficiente, sobre todo en aminoácidos (Douglas 2003). La asociación del ancestro de los áfidos con el de *Buchnera*, puede haber promovido un tipo de diversificación adaptativa que les permitió la utilización de un nuevo nicho ecológico: la alimentación en el floema. Los beneficios de la asociación áfido-bacteria se basaría entonces en dos razones, el suplemento nutricional de la dieta (Douglas y Prosser 1992; Douglas 1996), y la contribución a la manipulación de la fisiología de planta, al suprimir defensas e inducir cambios en el metabolismo celular que promueven la aceptación de la planta como hospedante, como se demostró en ésta Tesis

Además de *B. aphidicola*, los áfidos establecen relaciones con otros tipos de bacterias endosimbióticas que son transmitidas verticalmente y/o horizontalmente, y que

colectivamente se denominan endosimbiontes secundarios (S-simbiontes) o facultativos (Tsuchida *et al.* 2002). En *M. persicae*, es poco lo que se sabe acerca de sus endosimbiontes secundarios ya que solo se ha documentado la presencia de *Regiella insecticola* (von Burg *et al.* 2008, Vorburger *et al.* 2010). En el caso de *A. pisum*, se han documentado cinco endosimbiontes secundarios (Tsuchida *et al.* 2002; Baumann 2005). En general, las asociaciones son del tipo: *Buchnera* + un tipo de endosimbionte secundario. La participación que tienen los endosimbiontes secundarios en la interacción planta-áfido en relación a la aceptación de la planta como huésped tampoco está clara, aunque en experimentos con *A. pisum* y *Macrosiphum euphorbiae* se ha demostrado que los simbiontes facultativos pueden influir en la aceptación de la planta como huésped, además de brindar protección contra hongos entomo-patógenos y avispas parasitoides (revisado por Oliver *et al.* 2010).

Para muchos cultivos de importancia económica, se ha propuesto que la invasión de plagas de insectos es probable que sea facilitada por sus microorganismos mutualistas, y que además nuevas interacciones, contribuyan a promover la aparición de nuevas plagas de insectos con mayor potencial de daño. Por lo tanto, conocer cómo los microorganismos mutualistas de los insectos interactúan con las plantas hospedantes, es de gran importancia. El hecho de que exista gran cantidad de información genética y molecular para áfidos, sus plantas hospedantes y sus endosimbiontes; y que esta información esté disponible en base de datos públicos, hace posible que los áfidos y sus endosimbiontes sean un modelo ideal para estudiar la ecología de las interacciones planta-insecto-microorganismo.

La comprensión del comportamiento de los áfidos, junto al estudio de sus endosimbiontes, y de los cambios fisiológicos que ocurre en la planta infestada, constituye una valiosa fuente de información para el desarrollo de herramientas de

aplicación en el control de plagas. Por ejemplo, la manipulación de los endosimbiontes en áfidos podría ser en el futuro una estrategia del control de estas plagas.

6.6. Proyecciones de esta Tesis

Del análisis de los resultados obtenidos en esta tesis, en el contexto actual de los estudios entre plantas e insectos, se proponen las siguientes líneas de investigación:

- Estudiar detalladamente la expresión de genes de las principales vías de defensa de las plantas, en respuesta a la infestación con áfidos aposimbióticos, a distintos tiempos de la interacción. Esto permitiría obtener mayor información del o los mecanismos de respuesta en las plantas huésped. Se propone el uso de tecnologías como los microarreglos de genes (*cDNA microarrays*) o secuenciación de ARNs (*RNAseq*), combinado con RT-qPCR para un entendimiento global de los cambios que ocurren a nivel transcriptómico.

- Analizar exhaustivamente mediante técnicas de transcriptómica y proteómica las proteínas salivales de los áfidos aposimbióticos y de áfidos normales, completando la información obtenida en el Capítulo 3 de ésta Tesis, esta información haría un aporte central en la comprensión de la interacción que se establece entre planta, áfido y endosimbionte.

- Identificar los endosimbiontes secundarios en *M. persicae* y estudiar su posible participación en la interacción planta-insecto, aplicando técnicas de eliminación selectiva de los endosimbiontes (utilizar el método descrito por Koga *et al.* 2007). Estos estudios permitirían evaluar el efecto individual y el efecto conjunto de cada endosimbionte, sobre la aceptación de la planta hospedante.

- Investigar el o los mecanismos de aceptación de los áfidos y su planta huésped mediante el estudio conjunto del efecto que tiene la inducción de senescencia en plantas

del género *Solanum*, en la interacción con áfidos aposimbióticos de *M. persicae*. De acuerdo a la hipótesis planteada en esta tesis, la aposimbiosis no permitiría a los áfidos desencadenar en las plantas todos los cambios fisiológicos necesarios para que se produzca la aceptación de la planta como hospedante. Se propone estudiar si los áfidos aposimbióticos mejoran su comportamiento alimenticio en plantas con senescencia inducida en comparación con el comportamiento en plantas no senescentes.

Finalmente, es válido mencionar que el interés por los estudios de los roles de los endosimbiontes de insectos en las interacciones planta-insecto, es muy reciente por lo que es en las últimas décadas que se ha comenzado a entender cómo los microorganismos mutualistas de insectos pueden modular las interacciones de los insectos con sus plantas huésped, y que se espera que en los próximos años se logre un avance en desentrañar las bases fisiológicas y moleculares de estas interacciones.

Bibliografía

- Alborn HT, Hansen TV, Jones TH, *et al.* (2007) Disulfooxy fatty acids from the American bird grasshopper *Schistocerca americana*, elicitors of plant volatiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 12976–12981.
- Alborn HT, Turlings TCJ, Jones TH, *et al.* (1997) An Elicitor of Plant Volatiles from Beet Armyworm Oral Secretion. *Science* 276 (5314): 945–949.
- Alvarez AE, Garzo E, Verbeek M, *et al.* (2007) Infection of potato plants with potato leafroll virus changes attraction and feeding behaviour of *Myzus persicae*. *Entomol Exp Appl* 125:135–144.
- Alvarez AE, Tjallingii WF, Garzo E, *et al.* (2006) Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae*. *Entomol Exp Appl* 121: 145–157.
- Alvarez AE, Broglia VG, Alberti D'Amato AM, *et al.* (2013) Comparative analysis of *Solanum stoloniferum* responses to probing by the green peach aphid *Myzus persicae* and the potato aphid *Macrosiphum euphorbiae*. *Insect Sci* 20: 207–227.
- Alvarez AE, Alberti D'Amato AM, *et al.* (2014). Response of *Solanum tuberosum* to *Myzus persicae* infestation at different stages of foliage maturity. DOI: 10.1111/1744-7917.12072
- Alvarez AE (2007) Resistance mechanisms of *Solanum* species to *Myzus persicae*. (PhD thesis, Wageningen University). CIP – Data Koninklijke Bibliotheek. ISSN: 978-90-8504-660-8, The Netherlands.
- Backus E A., Cline AR, Ellerseick MR, Serrano MS (2007) *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) Feeding on Cotton: New Methods and Parameters for Analysis of Nonsequential Electrical Penetration Graph Data. *Ann Entomol Soc Am* 100: 296–310.
- Baldwin IT (1998) Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8113–8118.
- Barr KL, Hearne LB, Briesacher S, *et al.* (2010) Microbial symbionts in insects influence down-regulation of defense genes in maize. *PLoS One* 5:e11339.
- Baumann P (2005) Biology of Bacteriocyte-Associated Endosymbionts of Plant Sap-Sucking Insects Endosymbionts. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 155–89.
- Becker W, Apel K (1993) Differences in gene expression between natural and artificially induced leaf senescence. *Planta* 189: 74–79.
- Blackman R (1974) *Aphids*. Gin & Company Limited, London.

- Blackman RL, Eastop VF (2000) Aphids on the world's crop. An identification and Information guide. John Wiley & Sons, Chichester.
- Bonaventure G (2012) Perception of insect feeding by plants. *Plant Biol (Stuttg)* 14: 872–80.
- Boquel S, Giordanengo P, Ameline A (2011) Probing behavior of apterous and alate morphs of two potato-colonizing aphids. *J Insect Sci* 11:164.
- Bos JIB, Prince D, Pitino M, *et al.* (2010) A functional genomics approach identifies candidate effectors from the aphid species *Myzus persicae* (green peach aphid). *PLoS Genet* 6:e1001216.
- Breeze E, Harrison E, Page T, *et al.* (2008) Transcriptional regulation of plant senescence : from functional genomics to systems biology. *Plant Biol* 10: 99–109.
- Brunt AA., Crabtree K., Dallwitz MJ, *et al.* (1996) Viruses of plants. Descriptions and lists from the VIDE database. 1448.
- Buchanan-Wollaston V (1997) The molecular biology of leaf senescence. *J Exp Bot* 48: 181–199.
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, *et al.* (2003) The molecular analysis of leaf senescence-a genomics approach. *Plant Biotechnol J* 1: 3–22.
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, *et al.* (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark / starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 42: 567–585.
- Buchner P (1965) Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. Interscience Publishers, New York, NY.
- Carolan JC, Fitzroy CIJ, Ashton PD, *et al.* (2009) The secreted salivary proteome of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* characterised by mass spectrometry. *Proteomics* 9: 2457–2467.
- Casteel CL, Hansen AK, Walling LL, Paine TD (2012) Manipulation of plant defense responses by the tomato psyllid (*Bactericerca cockerelli*) and its associated endosymbiont *Candidatus Liberibacter psyllauros*. *PLoS One* 7:e35191.
- Cherqui A, Tjallingii W (2000) Salivary proteins of aphids, a pilot study on identification, separation and immuno localization. *J Insect Physiol* 46: 1177–1186.
- Chen X, , Zhang Z, Visser RGF, Broekgaarden C, Vosman B (2013) Overexpression of IRM1 Enhances Resistance to Aphids in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 8(8): e70914.
- Claire LL (1996) Historia de la papa. *Rev. Papa FEDEPAPA* 16.

- Cooper WR, Dillwith JW, Puterka GJ (2010) Salivary proteins of Russian wheat aphid (Hemiptera: Aphididae). *Environ Entomol* 39: 223–31.
- Cottrell T, Wood BW, Ni X (2009) Chlorotic Feeding Injury by the Black Pecan Aphid (Hemiptera: Aphididae) to Pecan Foliage Promotes Aphid Settling and Nymphal Development. *Environ Entomol* 38: 412–416.
- De Vos M, Jander G (2009) *Myzus persicae* (green peach aphid) salivary components induce defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 32: 1548–60.
- De Vos M, Van Oosten VR, Van Poecke RMP, *et al.* (2005) Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 923–37.
- Devonshire AL, Field LM (1991) Gene amplification and insecticide resistance. *Annu Rev Entomol* 36: 1–23.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini M., *et al.* (2011) InfoStat versión 2011.
- Dixon G (1985) *Aphid ecology*. 157. Blackie and Son Limited. Glasgow.
- Douglas AE (1996) Reproductive failure and the free amino acid pools in pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) lacking symbiotic bacteria. *J Insect Physiol* 42: 247–255.
- Douglas AE (1998) NUTRITIONAL INTERACTIONS IN INSECT-MICROBIAL SYMBIOSES: Aphids and Their Symbiotic Bacteria Buchnera. *Annu. Rev. Entomol.* 43:17–37.
- Douglas AE (2003) The Nutritional Physiology of Aphids. *Adv. Insect Physiol.* 31: 73–140.
- Douglas AE, Minto LB, Wilkinson TL (2001) Quantifying nutrient production by the microbial symbionts in an aphid. *J Exp Biol* 204: 349–358.
- Douglas AE, Prosser WA (1992) Synthesis of the essential aminoacid tryptophan in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) symbiosis. 38: 565–568.
- Edwards OR, Franzmann B, Thackray D, Micic S (2008) Insecticide resistance and implications for future aphid management in Australian grains and pastures: A review. *Aust J Exp Agric* 48: 1523–1530.
- Eichenseer H, Mathews M, Bi J, *et al.* (1999) Salivary glucose oxidase: multifunctional roles for *Helicoverpa zea*? *Arch Insect Biochem Physiol* 42: 99–109.
- 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.

- Elzinga D a, Jander G (2013) The role of protein effectors in plant-aphid interactions. *Curr Opin Plant Biol* 16: 451–6.
- Erb M, Meldau S, Howe G A (2012) Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends Plant Sci* 17: 250–9.
- Feldhaar H (2011) Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecol Entomol* 36: 533–543.
- Fereres A, Moreno A (2009) Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Res* 141: 158–68.
- Filichkin SA, Brumfield S, Filichkin TP, Young MJ (1997) In vitro interactions of the aphid endosymbiotic SymL chaperonin with barley yellow dwarf virus . In *Vitro Interactions of the Aphid Endosymbiotic SymL Chaperonin with Barley Yellow Dwarf Virus*. *J Virol* 71: 569–577.
- Findatsef AL, Stout MJ, Thaler JS, *et al.* (1999) Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon sculentum*. *Physiol Mol Plant Pathol* 54: 97–114.
- Frago E, Dicke M, Godfray HCJ (2012) Insect symbionts as hidden players in insect-plant interactions. *Trends Ecol Evol* 27: 705–11.
- Francis F, Gerken P, Harmel N, *et al.* (2006) Proteomics in *Myzus persicae*: effect of aphid host plant switch. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 219–27.
- Francis F, Guillonneau F, Leprince P, *et al.* (2010) Tritrophic interactions among *Macrosiphum euphorbiae* aphids, their host plants and endosymbionts: investigation by a proteomic approach. *J Insect Physiol* 56: 575–85.
- Gatehouse JA (2002) Plant resistance towards insect herbivores : a dynamic interaction. *New Phytologist* 156 (2): 145–169.
- Gepstein S, Sabehi G, Carp M-J, *et al.* (2003) Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *Plant J* 36: 629–642.
- 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 Physiol* 137: 1474–1484.
- Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. 43: 205–207.
- Goggin FL (2007) Plant-aphid interactions: molecular and ecological perspectives. *Curr Opin Plant Biol* 10: 399–408.
- Halarewicz A, Gabryś B (2012) Probing behavior of bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* (L.) on native bird cherry *Prunus padus* L. and alien invasive

- black cherry *Prunus serotina* Erhr. in Europe and the role of cyanogenic glycosides. *Arthropod Plant Interact* 6: 497–505.
- Hansen AK, Moran NA (2011) Aphid genome expression reveals host-symbiont cooperation in the production of amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 2849–54.
- Harmel N, Létocart E, Cherqui A, *et al.* (2008) Identification of aphid salivary proteins: a proteomic investigation of *Myzus persicae*. *Insect Mol Biol* 17: 165–74.
- Hewer A, Becker A, van Bel AJE (2011) An aphid's Odyssey--the cortical quest for the vascular bundle. *J Exp Biol* 214: 3868–79.
- Hogenhout SA, Bos JIB (2011) Effector proteins that modulate plant--insect interactions. *Curr Opin Plant Biol* 14: 422–8.
- Howe GA, Jander G (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol* 59: 41–66.
- Kamachi K, Yamaya T, Hayakawa T, *et al.* (1992) Changes in Cytosolic Glutamine Synthetase Polypeptide and its mRNA in a Leaf Blade of Rice Plants during Natural Senescence. *Plant Physiol* 98: 1323–9.
- Kimmins FM, Tjallingii WF (1985) Ultrastructure of sieve element penetration by aphid stylets during electrical recording. *Entomol Exp Appl* 39: 135–143.
- Koga R, Tsuchida T, Fukatsu T (2003) Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proc Biol Sci* 270: 2543–50.
- Koga R, Tsuchida T, Sakurai M, Fukatsu T (2007) Selective elimination of aphid endosymbionts: effects of antibiotic dose and host genotype, and fitness consequences. *FEMS Microbiol Ecol* 60: 229–39.
- Kuroli G, Lantos Z (2006) Long-term Study of Alata Aphid Flight Activity and Abundance of Potato Colonizing Aphid Species. *Acta Phytopathol Entomol Hungarica* 41: 261–273.
- Le Roux V, Campan EDM, Dubois F, *et al.* (2007) Screening for resistance against *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae* among wild *Solanum*. *Ann Appl Biol* 151: 83–88.
- Le Roux V, Dugravot S, Brunissen L, *et al.* (2010) Antixenosis phloem-based resistance to aphids: is it the rule? *Ecol Entomol.* 35: 407–416.
- Le Roux V, Dugravot S, Campan E, *et al.* (2008) Wild *Solanum* resistance to aphids: antixenosis or antibiosis? *J Econ Entomol* 101: 584–91.

- Legeai F, Shigenobu S, Gauthier J-P, *et al.* (2010) AphidBase: a centralized bioinformatic resource for annotation of the pea aphid genome. *Insect Mol Biol* 19 Suppl 2: 5–12.
- Lim PO, Kim HJ, Nam HG (2007) Leaf Senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 115–36
- Lin J, Wu S (2004) Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant J* 39: 612–628.
- Liu J, Wu YH, Jie J, *et al.* (2008) Protein Degradation and Nitrogen Remobilization during Leaf Senescence. *J Plant Biol* 51: 11–19.
- Marois E, Van den Ackerveken G, Bonas U (2002) The xanthomonas type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 637–46.
- Martin B, Collar J, Tjallingii W, Fereres A (1997) Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. *J Gen Virol* 78: 2701–2705.
- Martinez-Torres D, Buades C, Latorre A, Moya A (2001) Molecular systematics of aphids and their primary endosymbionts. *Mol Phylogenet Evol* 20: 437–49.
- Mattiacci L, Dicke M, Posthumus MA (1995) B-Glucosidase: An elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2036–2040.
- McLean D, Kinsey M (1964) A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. *Nature* 202: 1358–1359.
- Miles PW (1999) Aphid Saliva. *Biol Rev Camb Philos Soc* 74: 41–85.
- Moran NA (2003) Tracing the evolution of gene loss in obligate bacterial symbionts. *Curr Opin Microbiol* 6: 512–518.
- Moran NA, Degnan PH (2006) Functional genomics of *Buchnera* and the ecology of aphid hosts. *Mol Ecol* 15: 1251–61.
- Moran PJ, Cheng Y, Cassell JL, Thompson GA (2002) Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* in compatible plant-aphid interactions. *Arch Insect Biochem Physiol* 51: 182–203.
- Moran PJ, Thompson GA (2001) Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways. *Plant Physiol* 125: 1074–85.
- Moreno A, Garzo E, Fernandez-Mata G, *et al.* (2011) Aphids secrete watery saliva into plant tissues from the onset of stylet penetration. *Entomol Exp Appl* 139: 145–153.
- Morkunas I, Mai VC, Gabryś B (2011) Phytohormonal signaling in plant responses to aphid feeding. *Acta Physiol Plant* 33: 2057–2073.

- Munson MA, Baumann P, Kinsey MG (1991) *Buchnera* gen. nov. and *Buchnera aphidicola* sp. nov., a taxon Consisting of the Mycetocyte-Associated , Primary Endosymbionts of Aphids. *Int J Syst Bacteriol* 41: 566–568.
- Mutti NS, Louis J, Pappan LK, *et al.* (2008) A protein from the salivary glands of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, is essential in feeding on a host plant. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 9965–9.
- Nicholson SJ, Hartson SD, Puterka GJ (2012) Proteomic analysis of secreted saliva from Russian Wheat Aphid (*Diuraphis noxia* Kurd.) biotypes that differ in virulence to wheat. *J Proteomics* 75: 2252–68.
- Nováková E, Hypša V, Klein J, *et al.* (2013) Reconstructing the phylogeny of aphids (Hemiptera: Aphididae) using DNA of the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*. *Mol Phylogenet Evol* 68: 42–54.
- Oliver KM, Degnan PH, Burke GR, Moran N A (2010) Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annu Rev Entomol* 55: 247–66.
- Page T, Griffiths G, Buchanan-Wollaston V (2001) Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. *Plant Physiol* 125: 718–27.
- Pegadaraju V, Knepper C, Reese J, Shah J (2005) Premature Leaf Senescence Modulated by the Arabidopsis PHYTOALEXIN DEFICIENT4 Gene Is Associated with Defense against the Phloem-Feeding. *Plant Physiology* 139: 1927–1934
- Pegadaraju V, Louis J, Singh V, *et al.* (2007) Phloem-based resistance to green peach aphid is controlled by Arabidopsis *PHYTOALEXIN DEFICIENT4* without its signaling partner *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1*. *Plant J* 52: 332–341.
- Pieterse CMJ, Dicke M (2007) Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends Plant Sci* 12: 564–9.
- Pitino M, Coleman AD, Maffei ME, *et al.* (2011) Silencing of Aphid Genes by dsRNA Feeding from Plants. *PLoS One* 6: 1–8.
- Pitino M, Hogenhout SA (2013) Aphid Protein Effectors Promote Aphid Colonization in a Plant Species-Specific Manner. *26*: 130–139.
- Pollard D (1973) Plant penetration by feeding aphids (Hemiptera: Aphidoidea): a review. *Bull Entomol Res* 62: 631–714.
- Porra RJ (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents : verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 975: 384–394.
- Prado E, Tjallingii WF (2007) Behavioral evidence for local reduction of aphid-induced resistance. *J. Insect Sci.* 7: 48

- Prosser WA, Douglas AE (1992) A test of hypothesis that nitrogen is upgraded and recycled in an aphid (*Acyrtosiphon pisum*) symbiosis. *J Insect Physiol* 38: 93–99.
- Ramsey JS, Wilson ACC, De Vos M, *et al.* (2007) Genomic resources for *Myzus persicae*: EST sequencing, SNP identification, and microarray design. *BMC Genomics* 8: 1–17.
- Rao SAK, Carolan JC, Wilkinson TL (2013) Proteomic Profiling of Cereal Aphid Saliva Reveals Both Ubiquitous and Adaptive Secreted Proteins. *PLoS One* 8(2): e57413.
- Robert Y, Woodford JAT, Ducray-Bourdin DG (2000) Some epidemiological approaches to the control of aphid-borne virus diseases in seed potato crops in Northern Europe. *Virus Res* 71: 33–47.
- Rousselle P, Robert Y, Crosiner J. (1999) *La Patata*. Editorial Mundi-prensa, Madrid
- Sandström J, Telang A, Moran NA. (2000) Nutritional enhancement of host plants by aphids - a comparison of three aphid species on grasses. *J Insect Physiol* 46: 33–40.
- Sanier C, Sayegh-Alhamedia M, Jalloul A, *et al.* (2012) A 13-lipoxygenase is Expressed Early in the Hypersensitive Reaction of Cotton Plants to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *J Phytopathol* 160: 286–293.
- Sarria E, Cid M, Garzo E, Fereres A. (2009) Excel Workbook for automatic parameter calculation of EPG data. *Comput Electron Agric* 67:35–42.
- Sauvion N, Charles H, Febvay G, Rahbé Y (2004) Effects of jackbean lectin (ConA) on the feeding behaviour and kinetics of intoxication of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Entomol Exp Appl* 110: 31–44.
- Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M (2000) Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp APS. *Nature* 407: 81–86.
- Shigenobu S, Watanabe H, Sakaki Y, Ishikawa H (2001) Accumulation of Species-Specific Amino Acid Replacements That Cause Loss of Particular Protein Functions in *Buchnera*, an Endocellular Bacterial Symbiont. *J Mol Evol* (2001) 53: 377–386.
- Smith CM, Boyko E V. (2007) The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomol Exp Appl* 122: 1–16.
- Sugio A, MacLean AM, Kingdom HN, *et al.* (2011) Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annu Rev Phytopathol* 49: 175–95.
- Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK (2012) Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci* 17:260–270.

- The International Aphid Genomics Consortium (2010) Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. PLoS Biol 8: e1000313.
- Thompson GA, Goggin FL (2006) Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects. J Exp Bot 57: 755–766.
- Tjallingii W (1978) Electronic recording of penetration behaviour by aphids. Entomol Exp Appl 24: 721–730.
- Tjallingii W (1985) Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. Entomol Exp Appl 38: 177–186.
- Tjallingii W (1988) Electrical recording of stylet penetration activities. In: Minks A, Harrewijn P (eds) Aphids, Their Biol. Nat. Enemies Control. Elsevier, Amsterdam, pp 95–108
- Tjallingii W (1990) Continuous recording of stylet penetration activities. In: Campbell RK, Eikenbary RD (eds) Aphid-Plant Genotype Interact. Elsevier, Amsterdam, pp 89–99
- Tjallingii WF (2006) Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. J Exp Bot 57: 739–745.
- Tjallingii WF, Esch TH (1993) Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. Physiol Entomol 18: 317–328.
- Tjallingii WF, Garzo E, Fereres A (2010) New structure in cell puncture activities by aphid stylets : a dual-mode EPG study. Entomol Exp Appl 135: 193–207.
- Tsuchida T, Koga R, Harunobu S, *et al.* (2002) Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid , *Acyrtosiphon pisum*. Mol Ecol 11: 2123–2135.
- Tsuchida T, Koga R, Horikawa M, *et al.* (2010) Symbiotic bacterium modifies aphid body color. Science 330: 1102–1104.
- Tsuchida T, Koga R, Meng XY, *et al.* (2005) Characterization of a Facultative Endosymbiotic Bacterium of the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*. 49: 126–133.
- Van den Heuvel JF, Bruyère a, Hogenhout S A, *et al.* (1997) The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to *Buchnera* GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. J Virol 71: 7258–65.
- Van den Heuvel JF, Verbeek M, van der Wilk F (1994) Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. J Gen Virol 75 10: 2559–2565.
- Van Doorn W (2005) Plant programmed cell death and the point of no return. Trends Plant Sci 10: 478–483.

- Van Helden M, Tjallingii WF (1993) Tissue localisation of lettuce resistance to the aphid *Nasonovia ribisnigri* using electrical penetration graphs. *Entomol Exp Appl* 68: 269–278.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu Rev Phytopathol* 44: 135–162.
- Viñuelas J, Febvay G, Duport G, *et al.* (2011) Multimodal dynamic response of the *Buchnera aphidicola* pLeu plasmid to variations in leucine demand of its host, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Mol Microbiol* 81: 1271–1285.
- Von Burg S, Ferrari J, Müller CB, Vorburger C (2008) Genetic variation and covariation of susceptibility to parasitoids in the aphid *Myzus persicae*: no evidence for trade-offs. *Proc Biol Sci* 275: 1089–94.
- Vorburger C, Gehrler L, Rodriguez P (2010) A strain of the bacterial symbiont *Regiella insecticola* protects aphids against parasitoids. *Biol. Lett* 6, 109–111.
- Vos M De, Kim JH, Jander G (2007) Biochemistry and molecular biology of Arabidopsis – aphid interactions. *BioEssays* 29: 871–883.
- Vos M De, Oosten VR Van, Poecke RMP Van, *et al.* (2005) Signal Signature and Transcriptome Changes of Arabidopsis During Pathogen and Insect Attack. 18: 923–937.
- Walling LL (2000) The Myriad Plant Responses to Herbivores. *J Plant Growth Regul* 19: 195–216.
- Walling LL (2008) Avoiding effective defenses: strategies employed by phloem-feeding insects. *Plant Physiol* 146: 859–66.
- Watanabe A (1997) Internal Gln / Glu Ratio as a Potential Regulatory Parameter for the Expression of a Cytosolic Glutamine Synthetase Gene of Radish in Cultured. *Plant Cell Physiol* 38: 1000–1006.
- Weaver L, Amasino R (2001) Senescence Is Induced in Individually Darkened Arabidopsis Leaves, but Inhibited in Whole Darkened Plants. *Plant Physiol* 127: 876–886.
- Weaver LM, Gan S, Quirino B, Amasino RM (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol Biol* 37: 455–469.
- Whitehead L, Douglas AE (1993) A metabolic study of *Buchnera*, the intracellular bacterial symbionts of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J Gen Microbiol* 139: 821–826.
- Wilkinson TL, Douglas AE (1995) Aphid Feeding , as Influenced by Disruption of the Symbiotic Bacteria : an Analysis of the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*). 41 (8): 635-640.

- Wilkinson TL, Douglas AE (1998) Host cell allometry and regulation of the symbiosis between pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*, and bacteria, *Buchnera*. *J Insect Physiol* 44: 629–635.
- Will T, Hewer A, Bel AJE Van (2008) A novel perfusion system shows that aphid feeding behaviour is altered by decrease of sieve-tube pressure. *Entomol Exp Appl* 127: 237–245.
- Will T, Kornemann SR, Furch ACU, *et al.* (2009) Aphid watery saliva counteracts sieve-tube occlusion : a universal phenomenon? *J Exp Biol* 212: 3305–3312.
- Will T, Steckbauer K, Hardt M, van Bel AJE (2012) Aphid Gel Saliva: Sheath Structure, Protein Composition and Secretory Dependence on Stylet-Tip Milieu. *PLoS One* 7: e46903.
- Will T, Tjallingii WF, Thönnessen A, Van Bel AJE (2007) Molecular sabotage of plant defense by aphid saliva. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 10–15.
- Will T, van Bel AJE (2006) Physical and chemical interactions between aphids and plants. *J Exp Bot* 57: 729–37.
- Wittenbach VA (1978) Breakdown of Ribulose Bisphosphate Carboxylase and Change in Proteolytic Activity during Dark-induced Senescence of Wheat Seedlings. *Plant Physiol* 62: 604–608.
- Wu J, Baldwin IT (2010) New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annu Rev Genet* 44: 1–24.
- Zarate SI, Kempema LA, Walling LL (2007) Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant Physiol* 143: 866–75.
- Zavala JA, Baldwin IT (2004) Fitness benefits of trypsin proteinase inhibitor expression in *Nicotiana attenuata* are greater than their costs when plants are attacked. *BMC Ecol* 4: 11.
- Zhang P-J, Li W-D, Huang F, *et al.* (2013) Feeding by whiteflies suppresses downstream jasmonic acid signaling by eliciting salicylic acid signaling. *J Chem Ecol* 39: 612–9.
- Zhu-Salzman K, Salzman RA, Ahn J, Koiwa H (2004) Transcriptional Regulation of Sorghum Defense Determinants against a Phloem-Feeding Aphid. *Plant Physiol* 134: 420–431.

Anexo

- Protocolo para la preparación de dietas artificiales para *Myzus persicae*

Materiales

- Drogas (20 aminoácidos, 9 vitaminas, sales minerales y sacarosa)
- Parafilm®
- Jeringas de 5 ml plásticas estériles
- Filtros de jeringa, descartables, de 0,22 µm de poro.
- Tubos plásticos estériles de 5 y 10 ml con tapa rosca.
- Cintas indicadoras de pH (pH 5-10).
- H₂O MiliQ

Procedimientos

Preparar soluciones stock (guardar en congelador a -20 por <3 meses)

1. Sales minerales

	mg
FeCl ₃ . 6H ₂ O	11
MnCl ₂ .6H ₂ O	4
CuCl ₂ . 4H ₂ O	2
ZnSO ₄	17

- Disolver las sales minerales en 10 ml de agua Mili Q
- Dividir en 100 alícuotas de 0.1 ml y congelar.

2. Vitaminas

	mg
Biotina	0,2
Pantotenato	10
Acido fólico	2
Acido nicotínico	20
Piridoxina	5
Tiamina	5
Colina	100
Mio-inositol	100

3. Aminoácidos

Aminoácido		PM	Mol%	mg para una concentración final de				
				50mM	100mM	150mM	200mM	250mM
Alanina	ALA	89,09	3,8	16,9	33,9	50,8	67,7	84,6
Asparagina	ASN	150,1	9,5	71,3	142,6	213,9	285,2	356,5
Aspartato	ASP	133,1	9,5	63,2	126,4	189,7	252,9	316,1
Cisteína	CYS	157,6	1,8	14,2	28,4	42,5	56,7	70,9
Acido glutámico	GLU	147,13	5,6	41,2	82,4	123,6	164,7	205,9
Glutamina	GLN	146,1	11	80,4	160,7	241,1	321,4	401,8
Glicina	GLY	75,07	0,8	3,0	6,0	9,0	12,0	15,0
Prolina	PRO	115,1	3,8	21,9	43,7	65,6	87,5	109,3
Serina	SER	105,09	3,8	20,0	39,9	59,9	79,9	99,8
Tirosina	TYR	181,2	0,4	3,6	7,2	10,9	14,5	18,1
Arginina	ARG	210,66	9,5	100,1	200,1	300,2	400,3	500,3
Histidina	HIS	209,6	5,8	60,8	121,6	182,4	243,1	303,9
Isoleucina	ISO	131,18	5,8	38,0	76,1	114,1	152,2	190,2
Leucina	LEU	131,18	5,8	38,0	76,1	114,1	152,2	190,2
Lisina	LYS	182,6	5,8	53,0	105,9	158,9	211,8	264,8
Metionina	MET	149,2	1,9	14,2	28,3	42,5	56,7	70,9
Fenilalanina	PHE	165,2	1,9	15,7	31,4	47,1	62,8	78,5
Treonina	THR	119,1	5,8	34,5	69,1	103,6	138,2	172,7
Triptófano	TRP	204,2	1,9	19,4	38,8	58,2	77,6	97,0
Valina	VAL	117,1	5,8	34,0	67,9	101,9	135,8	169,8

- Pesar los aminoácidos en grupos de 5, en vidrios de reloj y disolverlos bien antes de agregar los 5 siguientes. Se puede usar calor para disolver.
- Dividir en 10 alícuotas de 5 ml y congelar.

Preparar en el mismo día:

- 1) Descongelar completamente los stocks de aminoácidos, minerales y vitaminas. Agitar en vortex antes de agregar, con especial cuidado del stock de minerales.

- 2) Agregar una alícuota (de 0,1 ml) de minerales y 1 de vitaminas (de 0,5 ml) al stock de aminoácidos (de 5 ml). Usando pipetas automáticas, colocar en el tubo de los aminoácidos, el stock de vitaminas y minerales.
- 3) Pesar la cantidad necesaria de mezcla de sacarosa y disolver en 3 ml de volumen total. Agregar a la mezcla de aminoácidos, minerales y vitaminas. Mezclar y revisar que todo esté perfectamente disuelto.

Mezcla de sacarosa

Acido ascórbico	10 mg
Acido cítrico	1 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	20 mg
Sacarosa:	1,7 gr (concentración final 500mM)

- 4) Pesar el fosfato y disolver en 1 ml de agua. Agregar esta solución a la mezcla de aminoácidos, vitaminas, minerales y sacarosa. Revisar que la solución no esté turbia (causada por la precipitación de fosfato).

Fosfato

K₂HPO₄- 115 mg

- 5) Revisar el pH con las cintas indicadoras. Debería estar en pH 7,0-7,5. Si no lo está es porque hubo un error en la preparación de la dieta y hay que comenzar de nuevo (errores más comunes: cantidad errónea de fosfato, demasiado citrato o disolución incompleta).
- 6) Llevar la solución a 10 ml con agua MiliQ.
- 7) Esterilizar con filtros de jeringa en tubos de plástico estéril, y guardar en heladera durante <1 semana o congelar a -20 por menos de 3 meses.

Si se usa antibiótico:

- Dividir los 10 ml de dieta en 2 x 5 ml.
 - Filtrar 5 ml como dieta libre de antibiótico
- 3) Agregar 50 µl del stock de antibiótico a 5 ml de dieta, revisar que se disuelva completamente y filtrar.
 - 4) Almacenar en el congelador por < 1 semana o congelar a -20 °C por 3 meses.

Stock de antibiótico (para clorotetraciclina o rifampicina)

- Disolver 5 mg (o 10 mg) de antibiótico en 1 ml de agua Mili Q.
- Dividir en alícuotas de 20 x 50 µl y congelar.

Para preparar las jaulas de la dieta

Nota: Si se requiere esterilidad, usar el flujo laminar (dejar que el etanol se evapore) para preparar las cajas de dieta y usar pipetas Pasteur estériles

- 1) Agregar los áfidos en la caja.
- 2) Estirar el cuadrado de Parafilm® en la caja y agregar 200 o 300 ul de dieta con pipeta automática, en el centro de la caja.
- 3) Aplicar un segundo cuadrado forzando a la dieta a desparramarse por toda el área de la dieta pero evitando que se derrame por los costados de la caja.
- 4) Mantener los áfidos en condiciones estándar de cultivo de áfidos pero con baja luminosidad.

- Resultados de expresión de genes que de las glándulas salivales

Tabla S1: Expresión relativa de genes que se expresan en la glándula salival de *Myzus persicae*. Los valores indican el cambio en la abundancia relativa (cantidad de veces que cambió) de ARN de los genes de interés, normalizados con el gen de referencia *RPL7*, en áfidos aposimbióticos (alimentados en dieta artificial + rifampicina por 4 días para tratar a *B. aphidicola*), áfidos control (alimentados en dietas sin rifampicina) y áfidos normales (alimentados en rabanito).

Genes		Áfidos normales	Áfidos controles	Áfidos aposimbióticos
<i>mp3170</i>	Media	0,040921339	0,024333471	0,012365338
	Error estándar	0,011473067	0,003203551	0,001394698
<i>mp1026</i>	Media	0,585981803	0,657562508	0,352773614
	Error estándar	0,104846226	0,032669376	0,020346928
<i>mp2323</i>	Media	0,010682771	0,02262563	0,026649001
	Error estándar	0,001863328	0,002418762	0,005604407
<i>mp2659</i>	Media	0,024465466	0,037916272	0,015288543
	Error estándar	0,006670348	0,002636057	0,001868262
<i>mp3324</i>	Media	0,052157873	0,007265057	0,007833347
	Error estándar	0,017228423	0,000805861	0,000203339
<i>mp389</i>	Media	0,022712394	0,017004538	0,029901537
	Error estándar	0,004960175	0,001166666	0,009499388
<i>mp844</i>	Media	0,009777678	0,00296274	0,00706526
	Error estándar	0,00087732	5,81694E-05	0,001746331

- Resultados de expresión de genes de *Solanum tuberosum* en respuesta a áfidos aposimbióticos

Tabla S2: Expresión relativa de genes de *Solanum tuberosum* en respuesta a *Myzus persicae* aposimbióticos, áfidos control y áfidos normales. La expresión relativa de genes se calculó como el cambio en la expresión de los genes de interés $2^{-\Delta Ct}$, normalizada con el gen de referencia *EF-1*.

Genes		Tub sin áfidos	Tub + Áfidos normales	Tub+ Áfidos control	Tub+ Áfidos aposimbióticos
PR1	Media	0,0300	0,1300	0,1800	0,2500
	Error estándar	0,01	0,04	0,03	0,03
CH 19	Media	1,2300	2,4200	1,8600	2,3400
	Error estándar	0,58	0,78	0,34	1,4
Pin 2	Media	0,1900	0,1900	0,4100	0,3100
	Error estándar	0,07	0,16	0,33	0,07
AOS	Media	0,0100	0,0700	0,3400	0,0900
	Error estándar	0,01	0,02	0,24	0,02
LOX	Media	0,3787	3,0145	3,7689	0,5880
	Error estándar	0,1658	1,0344	0,8363	0,2438
Jaz	Media	0,6943	0,7791	0,9623	0,7110
	Error estándar	0,0433	0,1708	0,0697	0,2152
Saur	Media	0,2203	0,2754	0,1245	0,1218
	Error estándar	0,1471	0,1213	0,0285	0,0958

* Los resultados de los genes WRKY4, CHAI1, AOS no se muestran debido a que los valores de fluorescencia no permitieron obtener los Ct.

- Resultados de expresión de genes de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a áfidos aposimbióticos

Tabla S3: Expresión relativa de genes de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a *Myzus persicae* aposimbióticos, áfidos control y áfidos normales. La expresión relativa de genes se calculó como el cambio en la expresión de los genes de interés $2^{-\Delta Ct}$, normalizada con el gen de referencia *ACTIN8*.

Genes		Ara sin áfidos	Ara + Afidos normales	Ara + áfidos control	Ara + áfidos aposimbióticos
LOX	Media	0,7433	10,1367	3,6150	1,6350
	Error estándar	0,06766	1,44427	0,58500	0,24500
PR1	Media	5,7367	2,7300	3,9600	11,9250
	Error estándar	0,82313	0,66776	0,27000	1,05500
VSP2	Media	0,0367	0,7767	0,6267	0,4200
	Error estándar	0,00882	,11566	0,06888	0,10000
ERF	Media	0,2033	0,2500	0,2600	0,2533
	Error estándar	0,04333	0,01528	0,03786	0,05696

*Los resultados de los genes PDF1.2 y PAD4 no se muestran porque los valores de fluorescencia no permitieron obtener los Ct.

