



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

**Identificación de genes relacionados con  
defensa en tomate de cáscara (*Physalis  
philadelphica*) en respuesta a la  
infestación por mosquita blanca  
(*Trialeurodes vaporariorum*)**

**Tesis**

**que para obtener el grado de:**

**Doctor en Ciencias en Biosistemática,  
Ecología y Manejo de Recursos Naturales y  
Agrícolas**

**Presenta:**

**M.C. Martín Quintana Camargo**

**DIRECTORA**

**Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández**

**Zapopan, Jalisco, México.**

**11 de Diciembre de 2015**



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

## Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Doctorado en Ciencias en Biosistemática, Ecología y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

Identificación de genes relacionados con defensa en tomate de cáscara (*Physalis philadelphica*) en respuesta a la infestación por mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*)

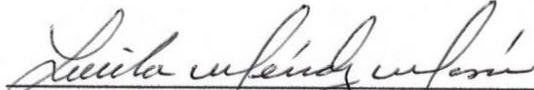
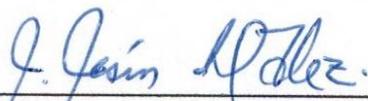
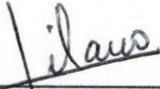
Por

Martín Quintana Camargo

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias en Biosistemática, Ecología y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

Aprobado por:

 Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández Directora de Tesis e integrante del Jurado	<u>03-12-2015</u> Fecha
 Dra. Lucila Méndez Morán Asesor del Comité Particular e Integrante del Jurado	<u>03-12-2015</u> Fecha
 Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba Asesor del Comité Particular e Integrante del Jurado	<u>4/Dic-2015</u> Fecha
 Dr. José de Jesús Sánchez González Asesor del Comité Particular e Integrante del Jurado	<u>4/12/2015</u> Fecha
 Dr. John Paul Delano Frier Asesor Externo de Tesis e Integrante del Jurado	<u>02-12-2015</u> Fecha
 Dr. Diego González Eguiarte Coordinador de la Orientación en Ciencias Agrícolas	<u>4/12/2015</u> Fecha

## **DEDICATORIA**

**Adriana y Saúl**

*Gracias por formar parte de mi mundo*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico.

A la Universidad de Guadalajara y al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado.

Un especial agradecimiento a los miembros de mi comité por brindarme la oportunidad de llegar hasta esta etapa.

A todos los compañeros del laboratorio de marcadores moleculares CUCBA-U de G.

# ÍNDICE

CONTENIDO	Página
<b>ÍNDICE</b> .....	iii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	vi
<b>ABREVIATURAS</b> .....	vii
<b>RESUMEN</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	4
2.1 Defensa en plantas .....	4
2.2 Insectos succionadores.....	5
2.2.1 Mosca blanca.....	6
2.3 Análisis de expresión génica.....	7
2.3.1 Bibliotecas sustractivas.....	7
2.4 Tomate de cáscara.....	8
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	10
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	10
4.1 Objetivo General.....	10
4.2 Objetivos Específicos.....	10
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	11
5.1 Material biológico.....	11
5.1.1 Plantas.....	11
5.1.2 Insectos.....	11

5.2 Ensayos de herbivoría.....	12
5.2.1 Aislamiento de RNA.....	12
5.3 Bibliotecas sustractivas (HSS).....	13
5.4 Análisis de secuencias .....	15
5.4.1 Edición de secuencias .....	16
5.4.2 Asignación de identidad y clasificación funcional.....	16
5.5 Confirmación de las bibliotecas por qPCR.....	16
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
6.1 Bibliotecas sustractivas. ....	20
6.2 Análisis de secuencias.....	21
6.2.1 Análisis funcional de las secuencias.....	28
6.3 Confirmación de las bibliotecas sustractivas por qPCR.....	29
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>34</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>41</b>
<b>IX. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>42</b>
<b>X. ANEXOS.....</b>	<b>52</b>

## Lista de Figuras

	Página
<b>Figura 1.</b> Esquema del fundamento teórico de la técnica de hibridación supresora sustractiva.	8
<b>Figura 2.</b> Esquema general del protocolo utilizado durante la generación de las bibliotecas de ADNc por hibridación supresora sustractiva.	15
<b>Figura 3.</b> Verificación de la eficiencia de sustracción.	19
<b>Figura 4.</b> Validación de la técnica por qPCR de secuencias expresadas diferencialmente identificados en las bibliotecas sustractivas a partir de hojas de plantas de <i>Physalis philadelphica</i> infestadas con <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (5 o 15 días posinfección).	29
<b>Figura 5.</b> Niveles de expresión de genes identificados en las bibliotecas sustractivas, en hojas de plantas de <i>Physalis philadelphica</i> expuestas a la infestación de mosca blanca ( <i>Trialeurodes vaporariorum</i> ) por 5 o 15 días.	31
<b>Figura 6.</b> Comparación de los niveles de expresión de los genes <i>LEA</i> , <i>OSM</i> , <i>SOD</i> y <i>SCP</i> en hojas de plantas de <i>Physalis philadelphica</i> expuestas a herbivoría.	32

## Lista de Cuadros

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Oligonucleótidos utilizados para la validación por qPCR diseñados a partir de genes inducidos identificados en las bibliotecas sustractivas de hojas de plantas de <i>Physalis philadelphica</i> infestadas con <i>Trialeurodes vaporariorum</i> .	17
<b>Cuadro 2.</b> Análisis de datos de las secuencias expresadas diferencialmente identificadas en las bibliotecas sustractivas a partir de hojas de plantas de <i>Physalis philadelphica</i> infestadas con <i>Trialeurodes vaporariorum</i> .	21
<b>Cuadro 3.</b> Datos de genes identificados en las bibliotecas sustractivas de hojas de plantas de <i>Physalis philadelphica</i> infestadas con <i>Trialeurodes vaporariorum</i> durante 5 días.	22
<b>Cuadro 4.</b> Datos de genes identificados en las bibliotecas sustractivas de hojas de plantas de <i>Physalis philadelphica</i> infestadas con <i>Trialeurodes vaporariorum</i> durante 15 días.	25
<b>Cuadro 5.</b> Clasificación funcional de las secuencias expresadas diferencialmente identificadas en las bibliotecas sustractivas a partir de hojas de plantas de <i>Physalis philadelphica</i> infestadas con <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (datos en porcentaje).	28

## Abreviaturas

ABA	ácido abscisico
AJ	ácido jasmónico
AQP	acuaporina
ARF	por sus siglas en inglés, <i>ADP Ribosylation Factor</i> (factor de ribosilación de ADP)
AS	ácido salicílico
BGL	$\beta$ -glucanasa
BTH	benzotiadiazol, análogo funcional del AS
CDSP	por sus siglas en inglés, <i>chloroplast dehydration-stress-induced protein</i> (proteína inducida por estrés hídrico en cloroplasto)
Ct	por sus siglas en inglés, <i>cycle threshold</i> (ciclo umbral de detección)
DNAc	DNA complementario
dpi	días posteriores a la infestación
EST	por sus siglas en inglés, <i>Expresion Sequence Tag</i> (marcador de secuencia expresada)
ET	etileno
GI	Gigantea
GTX	glutarredoxina
HSP	por sus siglas en inglés, <i>Heat Shock Protein</i> (proteína de choque térmico)
HSS	hibridación supresora sustractiva
KOR	glucanasa Korrigan
LEA	por sus siglas en inglés, <i>Late Embryogenesis Abundant</i> (proteína abundante en la embriogénesis tardía)
LP	proteína inducida por lesión
MDHAR	monodehidroascorbato reductasa
MLP	por sus siglas en inglés, <i>Major Latex Protein</i> (proteína mayoritaria del latex)
NADPH-ME	enzima málica dependiente de NADPH
NS	no sustraído

OSM	osmotina
<i>P</i>	probabilidad
PEPc	por sus siglas en inglés, <i>Phosphoenolpyruvate carboxylase</i> (fosfoenolpiruvato carboxilasa)
PP2	por sus siglas en inglés, <i>Phloem Protein 2</i> (proteína de floema 2)
PR	por sus siglas en inglés <i>Pathogenesis Related</i> , (proteínas relacionadas con patogénesis)
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
R	genes de resistencia
RDA	análisis de representación diferencial
RLK	por su siglas en inglés, <i>Receptor-Like Kinases</i> (receptor tipo cinasa)
ROS	por su siglas en inglés, Reactive Oxygen Species, (especies reactivas de oxígeno)
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
RNA-seq	secuenciación masiva del RNA
S	sustraído
SAGE	análisis seriales de expresión génica
SCP	serina carbopeptidasa
SOD	superóxido dismutasa
SSR	marcador molecular tipo microsatélite
T <sub>m</sub>	temperatura de fusión
UV-B	luz ultravioleta B (onda media)
v/v	relación volumen/volumen
valor-E	valor estadístico
WR	por sus siglas en inglés <i>Wound-Related</i> , (proteína relacionada con daño)

## RESUMEN

Las plantas en general, responden a la herbivoría de la mosca blanca a través de marcados cambios en la expresión génica. Para identificar los genes expresados diferencialmente en plantas de tomate de cáscara infestadas con *Trialeurodes vaporariorum*, plantas jóvenes fueron infestadas con adultos de mosca blanca. Bibliotecas sustractivas directa e inversa fueron construidas a partir de hojas infestadas por 5 y 15 d posteriores a la infestación. Varios genes implicados en respuestas de defensa en plantas a insectos succionadores fueron identificados. Entre los más representativos se detectaron aquellos que codifican a proteínas de síntesis, o de degradación, fortificación, o de modificación de pared celular, a genes necesarios para la biosíntesis de aminoácidos, metabolismo y síntesis de lípidos incluidos los componentes de pared celular tales como suberina, y genes de respuesta a estrés, o relacionados con la fotosíntesis. También se identificaron genes regulados negativamente, entre los que destacaron genes codificantes de quinasas y acuaporinas. Se observaron similitudes en los perfiles de expresión de genes en respuesta a nematodos, áfidos, y mosca blanca. Así mismo, los resultados sugieren que el ácido abscísico, los brassinoesteroides y las citoquininas podrían estar participando en la regulación de la respuesta a la infestación por la mosca blanca en *Physalis philadelphica* debido sobre todo por los patrones de expresión de genes codificantes para proteínas con motivos tipo F-box, asociados con rutas de señalización de dichas hormonas.

## ABSTRACT

All the plants respond to phloem-feeding whiteflies by extensive changes in gene expression. To identify differentially expressed genes in husk tomato plants (*Physalis philadelphica*) infested with *Trialeurodes vaporariorum*, young plants were challenged with adult whiteflies, and forward and reverse subtractive libraries were constructed from infested leaves at 5 and 15 d after infestation. Several genes were identified as up-regulated; these included a diversity of genes involved in plant defense responses, protein synthesis or degradation, and cell wall fortification or modification. Genes required for amino acid biosynthesis, lipid metabolism and synthesis, including cell surface components such as suberin, responses to stress, photosynthesis and other functions, were similarly induced. Down-regulated genes were also identified, most prominently kinases and aquaporin genes. Similarities in defense responses between tomato and *P. philadelphica* were noted regarding the expression of certain genes in response to nematodes, aphids, or whiteflies. A role for abscisic acid, brassinosteroids, and cytokinins in the regulated response to whitefly infestation in *P. philadelphica* was also implied by the expression pattern of phytohormone-associated genes, including genes coding for proteins containing F-box motifs, associated with signaling pathways of these hormones.

## I. INTRODUCCIÓN

Las plantas responden a la herbivoría de insectos a través de un complejo y diverso sistema de defensa, el cual involucra barreras físicas, compuestos químicos tóxicos, proteínas, reclutamiento de enemigos naturales (Howe y Jander 2008; War *et al.* 2012). Las defensas en plantas, son producidas tanto de manera constitutiva, las cuales están presentes durante todo el ciclo de vida de la planta o bien, pueden inducirse en respuesta al daño ocasionado por agresores bióticos. Estas respuestas pueden afectar la preferencia de los mismos por ejemplo: la selección de la planta hospedera o su comportamiento en cuanto a la tasa y velocidad de crecimiento del insecto (Karban y Baldwin 1997). Posterior al reconocimiento de un herbívoro, varias moléculas endógenas de señalización en las que se incluyen: ácido jasmónico (AJ), etileno (ET), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (AS), y las especies reactivas de oxígeno (ROS), son producidas para regular cascadas de transducción de señales en las células de la planta. Esto conduce a la activación y modulación de genes relacionados con defensa (Walling 2000; Rojo *et al.* 2003; Zhu-Salzman *et al.* 2005). Dichas rutas están interconectadas y pueden actuar de manera antagónica, aditiva o sinérgica (Mur *et al.* 2006).

La interacción entre las rutas de señalización tiene un papel importante en la regulación y modulación de las respuestas defensivas, ya que le permite a la planta establecer un sistema efectivo de defensa de manera local o sistémica (Zarate *et al.* 2007; Koorneef y Pieterse 2008). La planta genera mecanismos de defensa en función del agresor; por ello, las respuestas moduladas después de la herbivoría del insecto correlacionan con el modo de alimentación y/o la cantidad de tejido dañado en el sitio de alimentación (Walling 2000, 2008; Heidel y Balwing 2004; Thompson y Gogging 2006; Kempema *et al.* 2007; Estrada-Hernández *et al.* 2009). Los insectos masticadores activan principalmente las respuestas mediadas por AJ, mientras que los insectos succionadores, en semejanza con patógenos biótrosos, activan las respuestas mediadas por AS (Moran y Thompson 2001; Kempema *et al.* 2007; Zarate *et al.* 2007).

La mosca blanca de invernadero *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), es una plaga económicamente importante en cultivos hortícolas y ornamentales, cultivados a campo abierto

o en invernadero (Inbar y Gerling 2008). La mosca blanca es un insecto generalista y polífago que causa considerables daños a los cultivos como: la reducción del vigor de la planta, retraso en el crecimiento, deformaciones de follaje, decoloraciones y/o defoliaciones (Berlinger 1986), también actúa como un vector de enfermedades virosas (Jones 2003); así mismo, afecta el proceso fotosintético ocasionado por la obstrucción de la luz, como resultado del crecimiento de hongos saprófitos que es favorecido por la excreción de mielecilla (Byrne y Miller 1990).

En comparación con los insectos masticadores, los insectos succionadores causan un daño limitado a los tejidos (Walling 2000). Las respuestas de las plantas a la infestación por mosca blanca resultan en el incremento de las defensas reguladas por AS, de manera simultánea expresan una disminución de las respuestas mediadas por AJ, así como en cambios en el balance redox y el metabolismo de nitrógeno y carbono (Mayer *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2013). Sin embargo, en *Arabidopsis thaliana*, la supresión de la ruta de defensa regulada por AJ retardó el desarrollo de la larva de mosca blanca (Zarate *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2013). Otros estudios demostraron que la infestación por mosca blanca en jitomate modifica la expresión de genes asociados con fotosíntesis, senescencia, metabolismo secundario, estrés biótico y abiótico dependiendo de la etapa de desarrollo de la mosca blanca (Estrada-Hernández *et al.* 2009).

El tomate de cáscara o tomate verde (*Physalis philadelphica* Lam.) es un cultivo importante que forma parte de la dieta y la herbolaria tradicional de México y Centroamérica, condición que le confiere su alto valor nutricional en términos de vitaminas, minerales y antioxidantes, así como por sus propiedades curativas (Bock *et al.* 1995; Maldonado *et al.* 2011). En el país se ha domesticado y cultivado por siglos, valiéndose de un proceso que ha explotado su variabilidad morfológica en términos de rasgos vegetales y reproductivos (Zamora-Tavares *et al.* 2014); del cual se reconocen al menos ocho razas (Peña *et al.* 2001).

Recientemente, para las especies *Physalis peruviana* y *P. alkekengi* se ha obtenido información genómica y transcriptómica (Simbaqueba *et al.* 2011; Garzón-Martínez *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012; Wei *et al.* 2012). Sin embargo, información con respecto a la

respuesta defensiva contra insectos herbívoros es escasa. A pesar de la alta susceptibilidad a varios insectos herbívoros de diversos gremios alimenticios, desde los altamente especializados como el barrenador del fruto *Heliothis subflexa* (Petzold *et al.* 2009), el cual es una plaga exclusiva del género *Physalis*, hasta numerosas plagas de suelo, follaje y fruto, incluidas larvas de lepidopteros, minadores de hoja, áfidos, trips y mosca blanca, algunas de las cuales son vectores de enfermedades virosas que afectan seriamente la producción de *Physalis* (De la Torre-Almaráz *et al.* 2003, Fischer *et al.* 2014; Muniz *et al.* 2014). En este sentido, se carece de información con respecto al daño causado por la infestación de *T. vaporariorum*, aunque ésta puede tener efectos devastadores en otros cultivos relacionados, como papa y jitomate (Ramos *et al.* 2002; Morales 2003) por ello, para mejorar la comprensión de los mecanismos subyacentes a la respuesta a la herbivoría de mosca blanca, se analizaron e interpretaron los datos de bibliotecas de hibridación por supresión sustractiva (HSS) generadas a partir de hojas de plantas infestadas por 5 o 15 d por *T. vaporariorum*.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Defensa en plantas

A través de su ciclo de vida, las plantas están expuestas a una serie de condiciones adversas, tanto bióticas como abióticas. El estrés biótico está representado en particular por organismos heterótrofos entre estos: hongos, bacterias fitopatógenas, virus, plantas parásitas e insectos herbívoros (Mithöfer y Boland 2012). De esta interacción ha resultado la evolución de sofisticados mecanismos defensivos por parte de las plantas, mientras que los insectos han desarrollado estrategias para superar o evitar dichas respuestas (Bilgin *et al.* 2010; Yin *et al.* 2011).

Las defensas contra los insectos herbívoros se dividen en: constitutivas e inducibles. Las primeras, se presentan durante el desarrollo de la planta y forman parte de sus barreras estructurales tales como tricomas, espinas y ceras. Las segundas, se activan durante el proceso de herbivoría y requieren de una serie de estímulos y/ o señales generados durante la interacción planta-insecto (Howe y Jander 2008). Además, los rasgos que confieren resistencia se clasifican a su vez como defensas directas e indirectas. En las defensas directas, el control de los herbívoros ocurre predominantemente a través de la acción de las defensas que afectan negativamente la fisiología del herbívoro, particularmente a nivel del proceso digestivo, mientras que en las indirectas, el control ocurre mediante el tercer nivel trófico. Es decir, a través de la atracción de depredadores y parasitoides por compuestos orgánicos volátiles emitidos por la planta atacada. Así, la combinación de dichos mecanismos provee a la planta una resistencia duradera y funcional ante diferentes herbívoros (Howe y Jander 2008; Mithofer y Boland 2012). Las defensas inducibles requieren de un sistema de detección, el cual permite el reconocimiento del daño causado o del agresor, que a su vez activa un sistema de transducción de señales y una respuesta metabólica regulada a nivel transcripcional (Lamb *et al.* 1989). Algunas respuestas defensivas de la planta son muy rápidas, y su activación ocurre en segundos o minutos después del estímulo, se conocen como “respuestas tempranas”, mientras que otras se inducen lentamente, horas o días después del daño por lo que se denominan “respuestas tardías”, éstas últimas permanecen activas durante varios días (Baldwin *et al.* 2001).

El reconocimiento del herbívoro ocasiona de manera rápida respuestas tempranas tales como la apertura de canales iónicos, cambios en la concentración de calcio citosólico, producción de especies reactivas de oxígeno y fosforilación de proteínas. Como consecuencia de dichos procesos, ocurre posteriormente la síntesis de AS, AJ, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y otros compuestos de señalización necesarios para la inducción de las respuestas locales y/o sistémicas en la planta. Las plantas utilizan distintas rutas de transducción de señales para inducir respuestas de defensa específicas, incrementando o disminuyendo de manera selectiva la expresión de ciertos genes (Walling 2000; Rojo *et al.* 2003; Zhu-Salzman *et al.* 2005; Wu y Baldwin 2010). Sin embargo, aun cuando las rutas de transducción de señales poseen elementos únicos para una respuesta en particular, esto no excluye la posibilidad de interacciones entre ellas, dando lugar a comunicación entrecruzada, efectos inhibitorios o sinérgicos entre componentes de las mismas (Mur *et al.* 2006; Koornneef y Pieterse 2008).

La resistencia inducida contra herbívoros muestra especificidad en términos de los agentes inductores y los organismos afectados por dichas respuestas. Se ha documentado que la modulación de las respuestas está correlacionada con el modo de alimentación y/o la cantidad de tejido dañado en el sitio de alimentación (Walling 2000, 2008; Heidel y Baldwin 2004; Thompson y Gogging 2006; Kempema *et al.* 2007; Estrada-Hernández *et al.* 2009). Los insectos masticadores activan principalmente las respuestas mediadas por AJ (Ryan 2000; Li *et al.* 2002), mientras que los insectos succionadores a semejanza de los patógenos biótropos activan las respuestas mediadas por AS (Moran y Thompson 2001; Kempema *et al.* 2007; Zarate *et al.* 2007).

## **2.2 Insectos succionadores**

Una característica de las plantas superiores es la presencia de tejidos especializados (xilema y floema) para la conducción de agua, sustancias inorgánicas y orgánicas. La presencia de aminoácidos y otros metabolitos orgánicos disponibles en xilema o floema hacen al sistema vascular un blanco para el ataque de plagas insectiles con aparato bucal succionador del orden hemíptera como los áfidos, moscas blancas y psílidos (Thompson y Goggin 2006; Will *et al.* 2013). Los insectos succionadores son grandes consumidores de azúcar y

nutrientes, su demanda es similar al consumo de tejido foliar o frutos en desarrollo por lo que pueden interferir con su distribución (Bardner y Fletcher 19749). Sin embargo, la savia del floema representa un alimento poco nutritivo; ya que contiene carbohidratos además de pocas proteínas y aminoácidos. Para compensar este déficit nutrimental, estos insectos consumen gran cantidad de savia buscando los compuestos nitrógenados, excretando el exceso de carbohidratos como melaza. Los insectos que se alimentan a partir de floema inducen en sus hospederos reprogramación transcripcional que conlleva cambios cuantitativos y cualitativos diferentes a otros insectos. Los cuales son similares a las respuestas inducidas por patógenos biotróficos o hemibiotróficos (Kempema *et al.* 2007). A pesar de causar un daño mínimo a la planta, los insectos succionadores, inducen respuestas locales y sistémicas dependientes de las rutas de AS y AJ (Moran y Thompson 2001; Zarate *et al.* 2007; Estrada-Hernández *et al.* 2009), en donde se promueven la expresión de genes relacionados con estrés oxidativo, señalización dependiente de calcio, modificaciones de pared celular, metabolismo secundario y respuestas asociadas a patogénesis, como son el incremento en la actividad de lipoxigenasas, quitinasas y peroxidasas (Moran y Thompson 2001; Thompson y Goggin 2006).

### 2.2.1 Mosca blanca

En los últimos años las moscas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae) se han convertido en una de las principales plagas agrícolas a escala mundial, principalmente en áreas tropicales y subtropicales. En el ámbito mundial se han identificado 1200 especies agrupadas en 126 géneros. En México se tiene registro de 67 especies incluidas en 27 géneros, aunque solo *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* son reconocidas como especies de importancia económica. La propagación geográfica de la mosquita blanca se ha acelerado debido al transporte de material vegetal que existe entre varios países. Se ha registrado la presencia de la mosquita en más de 600 especies de plantas, entre las cuales se encuentran especies vegetales cultivables y no cultivables, perennes o anuales, las cuales se han reconocido como fuente de alimento o como hospederos reproductivos. El 50% de las especies vegetales reportadas como hospederas se agrupan en sólo 5 familias: Fabaceae, Asteraceae, Malvaceae, Solanaceae y Euphorbiaceae. Entre las especies cultivadas hospederas se reportan: pimiento, pepino,

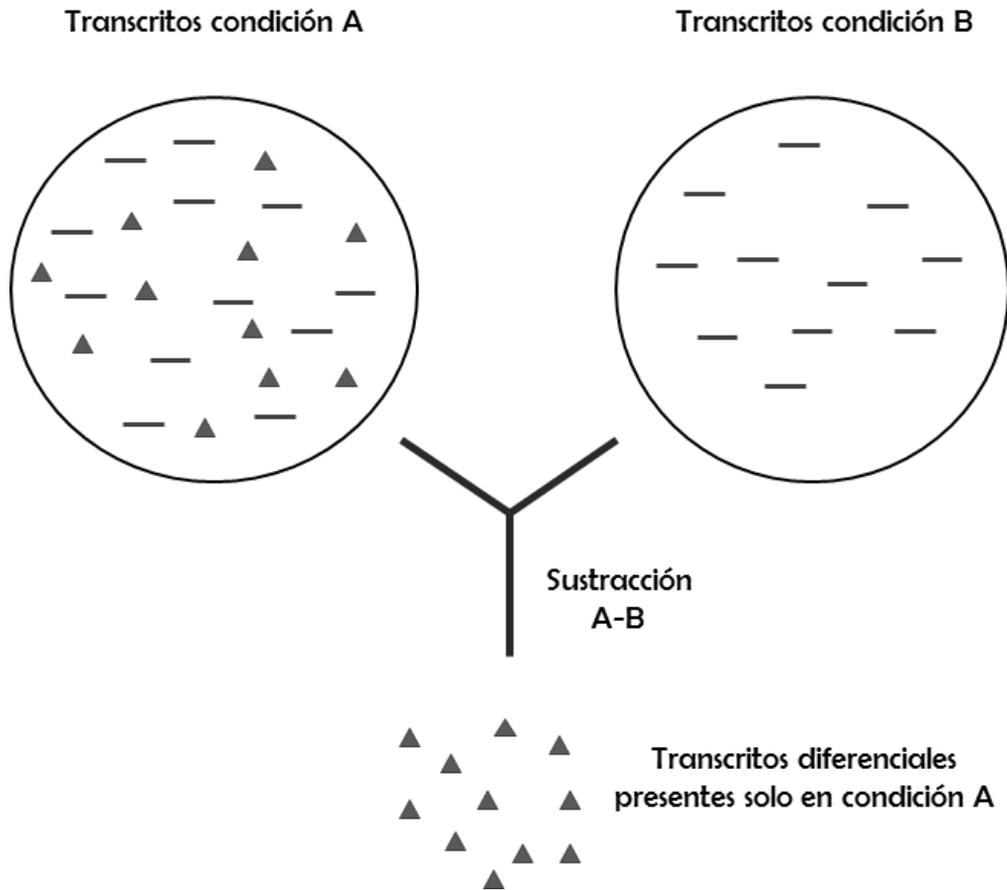
calabaza, crisantemo, soya, algodón, girasol, lechuga, jitomate, plátano, tabaco, aguacate, berenjena, papa y ajonjolí (Carrapia 2008).

## 2.3 Análisis de expresión génica

El estudio del efecto de las condiciones de estrés sobre las plantas, se fundamenta en el análisis de expresión génica (Nicot *et al.* 2005), puesto que dicho análisis se basa sobre la regulación que conlleva a la sobreexpresión o represión de un gen bajo diferentes situaciones fisiológicas. Hoy en día existen varias técnicas disponibles, entre ellas: bibliotecas de DNAC, hibridación en microarreglos, análisis de representación diferencial (RDA), análisis seriales de expresión génica (SAGE), bibliotecas sustractivas o hibridación supresora sustractiva (HSS) y la secuenciación masiva del RNA (RNA-seq) Cada una tiene características particulares; por lo que la elección de una técnica o estrategia a seguir está en función de la disponibilidad de equipo, el recurso económico y el alcance mismo de la investigación (Casassola *et al.* 2013).

### 2.3.1 Bibliotecas sustractivas

La técnica HSS, es utilizada para identificar genes que varían en su nivel de expresión durante diferentes procesos biológicos (Huang *et al.* 2007). Esta técnica involucra la separación de secuencias expresadas diferencialmente por ello, simplifican la evaluación de la biblioteca de DNAC, además conlleva implícita una reducción en los costos del análisis (Casassola *et al.* 2013). El fundamento de la técnica es la supresión por PCR, que combina la normalización y sustracción en un solo procedimiento. En la etapa de normalización, se iguala la abundancia de fragmentos de DNA dentro de la población bajo estudio, y en la etapa de sustracción, se excluyen las secuencias comunes a las poblaciones en comparación (**Figura 1**).



**Figura 1.** Esquema del fundamento teórico de la técnica de hibridación supresora sustractiva

Esto aumenta la probabilidad de obtener secuencias de baja abundancia expresadas diferencialmente y simplifica el análisis de la biblioteca sustraída (Diatchenko *et al.* 1997). La HSS es utilizada en estudios genéticos comparativos y funcionales (Lukyanov *et al.* 2007; Da *et al.* 2012), diversas condiciones de estrés biótico (Estrada-Hernández *et al.* 2009) y abiótico (Padmanabhan y Sahi 2011). Puesto que permite analizar una porción de los transcritos (Wang *et al.* 2009).

## 2.4 Tomate de cáscara

En años recientes, el cultivo de tomate de cáscara (*Physalis philadelphica* Lam.) ha cobrado importancia agronómica, se cultiva comercialmente en todos los estados del país y su producción se destina al mercado nacional y de exportación. En 2013, se tuvo una producción

nacional de 588,224 t, de la cual se exportó el 8 % a los EU, con un valor de mercado cercano a los 56 millones de dólares (INEGI 2014). Originalmente el cultivo era exclusivo de América Latina e islas del caribe; no obstante hoy en día se cultiva en otros países distribuidos en todos los continentes (Calyecac-Cortero *et al.* 2007).

En México actualmente se reconocen las razas: Silvestre, Milpero, Arandas, Tamazula, Manzano, Rendidora, Salamanca y Puebla (Peña 2001). En función de esta marcada variabilidad morfológica, el género *Physalis* se ha considerado un modelo para explicar la base genética de la evolución y desarrollo de la diversidad morfológica dentro de la familia *Solanaceae* (Zhan *et al.* 2014; Wang *et al.* 2012).

### III. HIPÓTEIS

Las plantas de *Physalis philadelphica* expuestas a herbivoría por *Trialeurodes vaporariorum* modifican de manera diferencial su perfil de expresión génica en función del tiempo de infestación.

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo General

Caracterizar, a nivel molecular, los cambios tempranos y tardíos ocurridos en hojas de *Physalis philadelphica* Lam. en respuesta a la infestación por *Trialeurodes vaporariorum*.

#### 4.2 Objetivos Específicos

- a) Construir bancos de expresión diferencial de DNA complementario (DNAc), a partir de plantas expuestas a 5 o 15 días de infestación con *Trialeurodes vaporariorum*.
- b) Identificar genes de respuesta a la herbivoría por *Trialeurodes vaporariorum*.
- c) Evaluar los patrones de expresión de genes de respuesta a *Trialeurodes vaporariorum* en plantas expuestas a herbivoría por larvas de *Manduca sexta*, un insecto masticador.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Material biológico

#### 5.1.1 Plantas

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Marcadores Moleculares de la Universidad de Guadalajara, para lo cual, semillas de *Physalis philadelphica* Lam. cultivar Morada R, fueron sembradas en charolas de germinación con musgo en descomposición [Sunshine Mix 3<sup>TM</sup> (SunGro Horticulture, Bellevue, WA)] como sustrato, en cámara de crecimiento (Thermo Scientific Mod. 844, Dubuque, IA, EUA.), bajo las siguientes condiciones: 16 h luz a una intensidad lumínica de  $\approx 300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$  y 28 °C de temperatura, por 8 h de oscuridad y 16 °C de temperatura. Las plántulas fueron transferidas a macetas de 4" con mezcla general [1 parte de Sunshine Mix 3<sup>TM</sup>, 1 parte de tierra lama, 1 parte de perlita (Termolita, S.A., Nuevo León México, y 1 parte de tezontle]. Las plantas fueron regadas cada 2 d con 40 ml de agua, y fertilizadas semanalmente con una fórmula 20-20-20 (Peters Professional, Scotts-Sierra Horticultural products, Marysville, OH, EUA), con una dosis de 5 g del fertilizante por litro de agua de los cuales, se aplicaron 40 ml por maceta. En esta etapa, las plantas fueron mantenidas en las mismas condiciones de fotoperiodo y temperatura hasta desarrollar 4 a 5 hojas verdaderas; únicamente fueron consideradas para los ensayos de herbivoría, aquellas plantas uniformes en tamaño y carentes de deformaciones.

#### 5.1.2 Insectos

Una colonia de mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) libre de virus, fue mantenida en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) cultivar Rio Fuego (Cal-Oro Vegetable Seeds, United Genetics, Inc., Gilroy, CA, EUA) en una jaula con malla antiáfidos bajo condiciones controladas de luz ( $\approx 300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$ ), temperatura (27 °C) y fotoperiodo (16 h luz/ 8 h oscuridad). Para los experimentos se utilizaron adultos de mosca blanca con 1 a 5 d de emergencia. Como herbívoro masticador, se utilizaron larvas de *Manduca sexta* las cuales

fueron proporcionadas por el insectario del Cinvestav-Unidad Irapuato, mismas que fueron criadas con una dieta nutritiva descrita por Yamamoto (1964).

## 5.2 Ensayos de herbivoría

Las plantas de tomate de cáscara fueron expuestas a la colonia de mosca blanca en el punto de máxima presencia de adultos. Para la generación de las bibliotecas sustractivas se colectó el tejido foliar de 6 plantas, a los 5 o 15 días posteriores a la infestación (dpi). Para los ensayos de *M. sexta*, se colocaron dos larvas de 3er. instar por planta y se les permitió alimentarse *ad libitum* por 6 h. Cumplido este tiempo, las larvas fueron removidas y el tejido foliar fue colectado 18 h después. Las muestras fueron congeladas, pulverizadas con nitrógeno líquido y almacenadas a -70 °C hasta su uso.

Para los ensayos de qPCR se repitieron las condiciones de inducción con mosca blanca previamente descritas. En todos los experimentos, se colectaron plantas sin daño (controles) crecidas bajo las mismas condiciones. El tejido colectado fue molido inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenado a -70 °C hasta su uso.

### 5.2.1 Aislamiento de RNA

A partir de esta etapa, el trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología de la Defensa, CINVESTAV-Unidad Irapuato; para ello, a partir del del tejido colectado en la etapa previa, se aisló el RNA total, utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A partir de 1 mg de RNA total se aisló el RNA mensajero (RNAm) utilizando PolyAtract mRNA Isolation System (Promega, Madison, WI, EUA). Para los ensayos de qPCR se aisló RNA utilizando las columnas RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, EUA) y las muestras fueron tratadas con DNAsa (Qiagen). En todos los casos, la integridad del RNA fue analizada mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes y su cuantificación se realizó por espectrofotometría utilizando el Nano Drop ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, EUA).

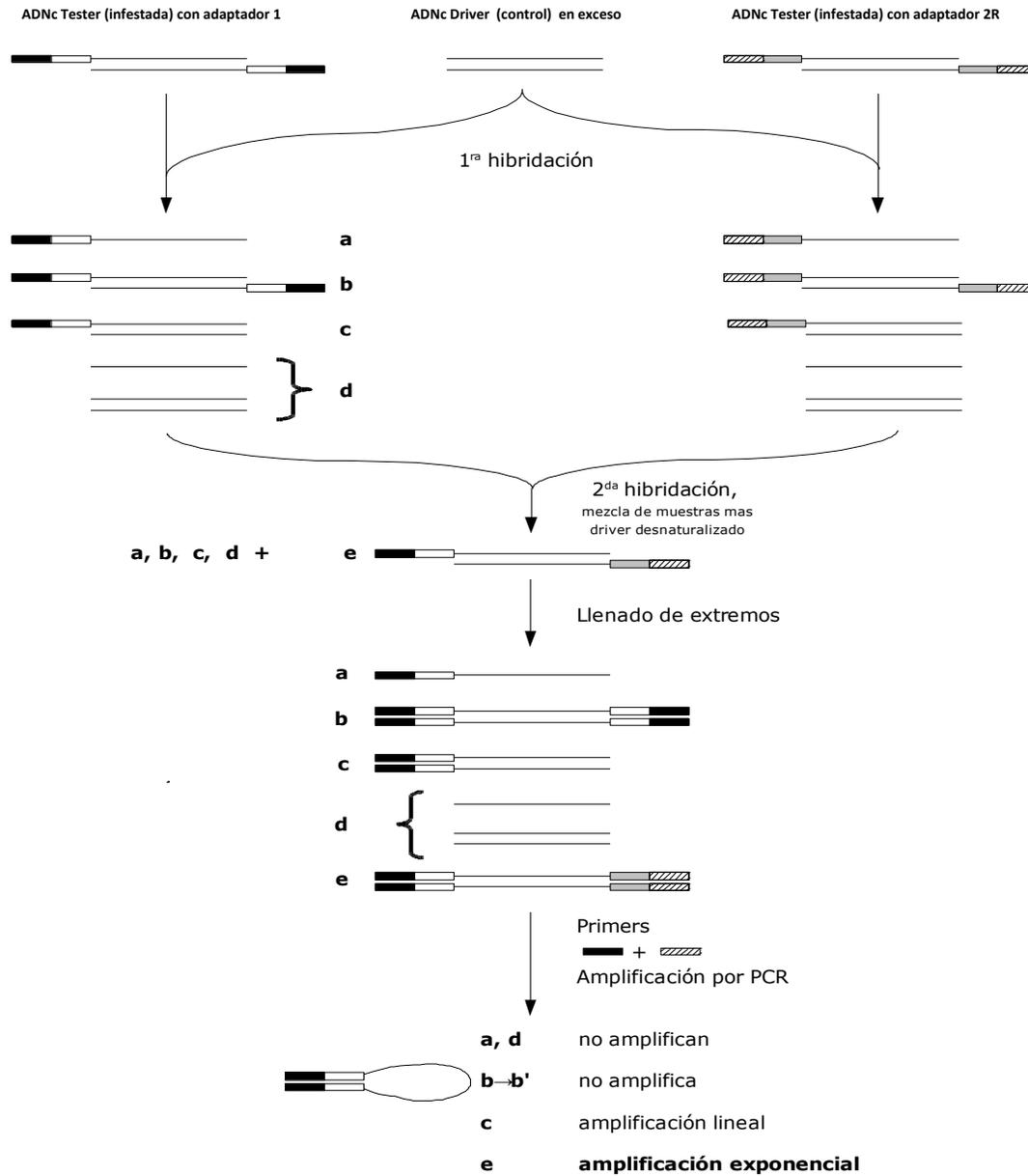
### 5.3 Bibliotecas sustractivas (HSS)

Para la realización de las bibliotecas sustractivas primero se aisló el RNAm de las muestras; luego, se sustrajeron los fragmentos diferenciales y se clonaron en células de *E. coli*. El RNAm se purificó a partir del RNA total utilizando una columna PolyATtract mRNA Isolation System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La obtención de los fragmentos diferenciales se realizó con el kit PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech, Palo Alto, CA, EUA) de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Se realizó la sustracción directa (genes inducidos) e inversa (genes reprimidos) de cada tiempo de infestación. Se utilizó la muestra infestada o problema como “tester” y el control fue la muestra sin daño como “driver”, en el caso de la sustracción directa y viceversa para la sustracción inversa. Para la síntesis de la primera y la segunda cadena de DNAc se transcribieron 2 µg de ARNm (**Anexo 1**). Una vez obtenido el DNAc de cadena doble, las muestras fueron digeridas con la enzima *Rsa* I; para generar fragmentos de DNAc más cortos con extremos romos o parejos, necesarios para la sustracción y requeridos para la ligación de adaptadores (**Anexo 2**). Posteriormente, la muestra problema se dividió en dos y cada parte se ligó con adaptadores diferentes (tester 1 y tester 2R). Así mismo, se obtuvo el “tester” del control no sustraído el cual consistió de una mezcla de ambas muestras (**Anexo 3**).

Posteriormente, se realizaron dos hibridaciones; en la primera, a cada una de las muestras se les adicionó un exceso de “driver” que permitió igualar las concentraciones de ADNc, tanto los abundantes como los escasos. En la segunda hibridación, se mezclaron las dos muestras de la primera hibridación, se adicionó una segunda porción de “driver” desnaturalizado, lo cual permitió excluir de la amplificación las secuencias que son comunes a las poblaciones comparadas (**Anexo 4**). Para cada una de las muestras sustraídas se realizaron dos rondas de amplificación (**Anexo 5**), para enriquecer los fragmentos diferenciales utilizando la enzima *Advantage2R Polymerase Mix* (Clontech) (**Figura 2**).

Los fragmentos diferenciales se purificaron (QIAquick PCR Purification Kit, Quiagen, Dusseldorf, Alemania) y se clonaron en el vector pJET1.2/blunt (Fermentas, Glen Burnie, MD, EUA). Por último, se transformaron células electrocompetentes de *Escherichia coli* TOP10 Electrocom™ (Invitrogen). La electroporación se realizó en el equipo Easyject Optima (Equibio, Ashford, UK) en celdas de 1 mm. Las clonas obtenidas se picaron y crecieron en placas estériles de 96 pozos con medio LB líquido con carbenicilina (100 µg/ µl). Para verificar que las clonas tuvieran fragmentos, se realizó un miniprep rápido para la extracción de DNA plasmídico en este caso los cultivos fueron centrifugados y al precipitado se le adiciono una mezcla de 20 µl de fenol, 20 µl de cloroformo, 20 µl de buffer de lisis de DNA y 20 µl de medio; se agitó en vortex y se centrifugó 5 min a 12000 rpm y la fase acuosa se cargó en un gel de agarosa al 1 % con bromuro de etidio. También se realizó un PCR directo de colonia para comprobar si tenían fragmentos de interés utilizando la enzima Taq DNA polimerasa (Fermentas) y los oligonucleótidos anidados: 1 y 2R incluidos en el kit de sustracción. Posteriormente, las clonas transformadas fueron almacenadas en glicerol 50 % (v/v) a -70 °C.



**Figura 2.** Esquema general del protocolo utilizado durante la generación de las bibliotecas de ADNc por hibridación supresora sustractiva.

#### 5.4 Análisis de secuencias

Las clonas positivas seleccionadas aleatoriamente fueron enviadas para su secuenciación a CINVESTAV, Unidad Irapuato; servicio privado que brinda el laboratorio método Sanger con

el equipo ABI Prism 377 ADN sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Obtenidas las secuencias de nucleótidos, se realizó el análisis *in silico* comparando las secuencias con la base de datos en línea de BLAST del National Center for Biotechnology Information (Bethesda, USA) y el SOL Genomics Network.

#### 5.4.1 Edición de secuencias

En el proceso de edición se eliminaron secuencias cortas (menores a 100 pb) y aquellas de mala calidad. Además, se eliminaron secuencias de DNA pertenecientes al cebador del adaptador y/ o al vector de clonación, con el uso de los programas (Chou y Holmes, 2001): SeqClean (<http://www.tigr.org/tdb/tdb.html>) y Lucy2 (<http://www.complex.iastate.edu/download/Lucy2/index.html>). Posterior a la edición, las secuencias fueron ensambladas con la ayuda del software CAP3 (<http://seq.cs.iastate.edu/>) (Huang y Madan 1999).

#### 5.4.2 Asignación de identidad y clasificación funcional

En todas las secuencias se analizó la similitud con secuencias de nucleótidos y de proteínas utilizando el algoritmo BLASTx para identificar genes similares en los genomas vegetales disponibles en las bases de datos públicas de *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR) (<https://www.arabidopsis.org/>), *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y *SOL Genomics Network* (<https://solgenomics.net/>). Similitudes con  $E\text{-value} < e^{-5}$  se consideraron significativas y fueron categorizados de acuerdo a su función. La clasificación funcional se realizó utilizando FunCat versión 2.1 (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/>) agrupando de acuerdo a las categorías funcionales de proteínas de *A. thaliana*.

### 5.5 Confirmación de las bibliotecas por qPCR

Para validar las bibliotecas sustractivas generadas, se seleccionaron 13 secuencias inducidas en respuesta a mosca blanca para determinar sus niveles de expresión por qPCR. Ensayo que se realizó en el Instituto de Enfermedades Crónico Degenerativas del CUCS, U de

G. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos específicos (**Cuadro 1**) en el programa *Primer Express Software* v 3.0.1 (Applied Biosystems Life Technologies). A partir de 2 µg de RNA se sintetizó el DNAc por medio de la enzima transcriptasa inversa (QuantiTect Reverse Transcription Kit; Quiagen, Duesseldorf, Germany), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El PCR tiempo real se realizó en un termociclador LightCycler 1.5 System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). La detección se realizó por medio de la cuantificación de la fluorescencia con el reactivo Light Cycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (Roche). La reacción se realizó según las recomendaciones del fabricante, en un volumen total de 10 µl, utilizando una concentración de 0.125 µM de cada oligonucleótido. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización, 95 °C por 10 min, seguidos por 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 10 s y una tm de alineamiento de 57 a 65 °C por 7 s. En todos los casos se incluyeron triplicados técnicos de cada determinación. Posterior a las amplificaciones, se realizaron las curvas de disociación con el objeto de confirmar la especificidad de las reacciones. La línea base y el ciclo umbral de detección (Ct) fueron automáticamente determinados utilizando el LightCycler<sup>®</sup> Software 3.5.3 (Roche). En todos los casos las eficiencias de amplificación fueron mayores a 95 %.

**Cuadro 1.** Oligonucleótidos utilizados para la validación por qPCR diseñados a partir de los genes inducidos que fueron identificados en las bibliotecas sustractivas obtenidas de plantas de *Physalis philadelphica* infestadas con *Trialeurodes vaporariorum* por 5 o 15 días.

Gen	Descripción	Oligonucleótidos Sentido/Antisentido	Tamaño de amplión (pb)	Tm (°C)
<i>LP</i>	proteína inducida por lesión	TCCTCTTTGCTTCCGTTTTCA/ CCATCTTCCCAAATTCATTGA	64	61
<i>AQP</i>	proteína tipo acuaporina	CACTTGGGATTTGCTCATGAGA/ GGGTCTACTGGGCTGGTCC	96	63
<i>LEA</i>	proteína abundante en embriogénesis tardía	GTTGGATGTGCCAGTGAAGGT/ CTCCACCAATGTCCCTAACCA	65	64
<i>BGL</i>	$\beta$ -1, 3-glucanasa	TTATTCCGATGCTATGTTGGATTCC/ TACCGATCCCCACCTGAT	63	63
<i>WR</i>	proteína relacionada con daño	GGAGTGAATCATCGGCTTGTT/ GGCGGGTTCATCGGAAGT	62	61
<i>OSM</i>	osmotina	GTTGGGCCAAAAGACATAGGG/ CACCAAACACCTTAGCCGAATAC	106	65
<i>SOD</i>	superóxido dismutasa	CAATCGACCACCAGCGTT/ GGAAAGGGTGGCCATGAAC	54	59
<i>CDSP</i>	proteína inducida por estrés hídrico en cloroplasto	GAAGACCACAAAATCGATCAAAAA/ TGGTCCGCAATGCTTCAA	63	59
<i>HSP</i>	proteína de choque térmico	TACGGAGGGTGAGGTGGAGTT/ TCATTGTTTAGAGGAGCCATTCC	66	66
<i>GTX</i>	glutarredoxina	TCCATAAACCCAGCGTCCAT/ TCTCCGTAGCTCCGTGTTTC	63	62
<i>SCP</i>	serina carboxipeptidasa	GTTGGCTTATGGAGCTGCTGAA/ CGCCAAGTTGTTCCAAGAGTAAG	96	66
<i>MDHAR</i>	monodehidroascorbato reductasa	GCGGGACACCTGAAGAGAAC/ GCTAGCAACGGGTTGAACTTTT	62	63
<i>KOR</i>	$\beta$ -1, 4-glucanasa (Korrigan)	GTTTCCATGATGTCCGTTCTAATTA/ CAACCAAACCAGCATTTC	69	63
<i>ACTIN</i>	gen de referencia	GGGATGATATGGAGAAGATA/ AGTACAGCCTGAATAGCAAC	180	57

pb = pares de bases; Tm = temperatura de alineamiento.

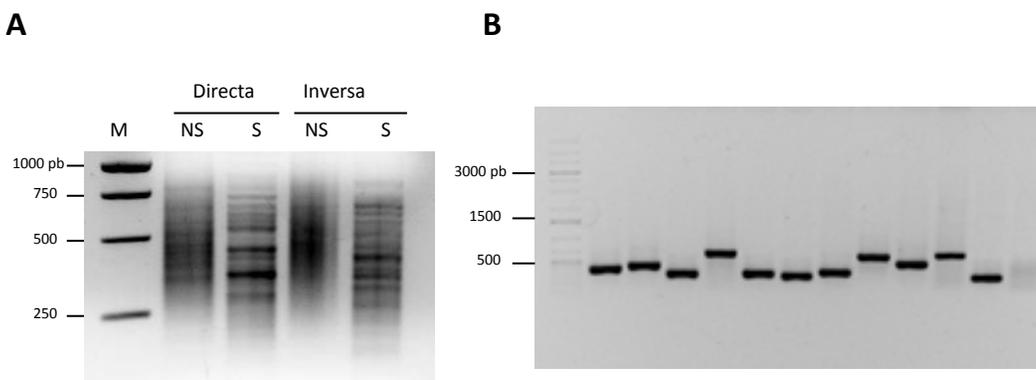
El análisis de expresión se realizó por el método comparativo, mediante la ecuación  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  en donde  $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ del gen a evaluar} - Ct \text{ del promedio del gen de referencia})_{\text{en plantas infestadas}} - (Ct \text{ del gen a evaluar} - \text{promedio del } Ct \text{ del gen de referencia})_{\text{en plantas control}}$ , de acuerdo a Livak y Schmittgen (2001). La abundancia de los transcritos fue normalizada usando el gen de actina de *S. tuberosum* como referencia (Reca *et al.* 2008). Los niveles de expresión significativos entre plantas control y plantas tratadas se realizó por medio de la prueba estadística *t* de Student, con datos transformados mediante Box-cox (Sakia 1992) para cumplir

con los supuestos de la normalidad. Las comparaciones entre días de infestación fueron realizadas mediante una prueba Mann-Whitney. Así mismo, los niveles de expresión posteriores a la herbivoría por *T. vaporariorum* y *M. sexta* fueron comparados mediante una prueba de *t* de Student después de una transformación Box-Cox. Los análisis estadísticos fueron realizados con los programas: Mini-Tab15 y Statistica 8.

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Bibliotecas sustractivas

Para cada muestra de los tratamientos bajo estudio, se realizó tanto la sustracción directa (que incluye a los genes inducidos) como la inversa (que incluye a los genes reprimidos) y se utilizó la muestra “tester” ligado a los adaptadores (como control no sustraído), para verificar la sustracción de las muestras. Las amplificaciones se hicieron con muestras sustraídas (S) para clonar los fragmentos y con las muestras no sustraídas (NS) como control. Las diferencias en los patrones de bandeo entre las muestras S y NS denotan una buena sustracción (**Figura 3A**) y por lo tanto se procedió con la clonación. Los resultados de la amplificación de las muestras S revelaron fragmento (bandas) de tamaño entre 300 y 700 pb (**Figura 3A**). Después de clonar las muestras se realizó un miniprep rápido y/o la amplificación directa con los oligonucleótidos anidados (**Figura 3B**) para verificar la presencia del fragmento antes de enviarse a secuenciar.



**Figura 3.** Verificación de la eficiencia de sustracción. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 8% mostrando las amplificaciones de muestras del experimento de 15 dpi, sustraídas (S) y no sustraídas (NS) utilizando el *PCR primer* para la primera amplificación y los primers anidados 1 y 2R en la segunda. (B) Electroforesis de los productos de PCR anidado directo de colonia. Para más detalles metodológicos, referirse al **Anexo**.

En total se generaron dos bibliotecas sustractivas (directa e inversa) para cada tiempo de infestación (5 y 15 d) de donde fueron seleccionadas de manera aleatoria 768 clonas que posteriormente fueron secuenciadas.

## 6.2 Análisis de secuencias

Una vez obtenida la secuencia de nucleótidos de los fragmentos diferenciales, se realizó el análisis *in silico* en dos fases: edición y asignación de identidad funcional. Durante la edición se eliminaron las secuencias correspondientes a restos del vector de clonación, colas poly A/T, las de mala calidad (con alto contenido de imprecisiones en los nucleótidos que conforman la secuencia), así como todas aquellas menores a 70 pb. Además, durante esta fase se realizó el ensamblaje de las secuencias en donde a partir de la información de un grupo de secuencias se reconstruyó la secuencia del fragmento localizado. Durante este proceso, se aliniaron las secuencias con las bases de datos para identificar las secuencias con similitud. A partir de estos alineamientos, se obtuvo una secuencia consenso que representaba a cada conjunto de secuencias, o grupos de contingencia (contig). Del proceso de edición de las secuencias se obtuvieron 349 secuencias, las cuales se agruparon en 14 grupos de contingencia (7 para cada biblioteca) y 268 grupos únicos de similitud (ensamblajes de copia única) los cuales se distribuyeron de la siguiente manera: 151 y 117 para 5 y 15 dpi respectivamente. El rango de tamaño de las secuencias editadas fue de 71 a 805 pb, con un tamaño promedio de 337 pb (**Cuadro 2**). La redundancia de secuencias se calculó de acuerdo a Da *et al.* (2012) y fue de 18.9 % y 19.4 % para las bibliotecas de 5 y 15 dpi, respectivamente.

Las secuencias editadas (**Anexo 6**) fueron comparadas mediante el algoritmo BLASTx, por medio de las bases de datos del *Genbank* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y *SOL Genomics Network* (<http://sgn.cornell.edu/tools/blast/>) y agrupadas (**Anexo7**) por categoría funcional (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/>). Un 79.8 % del total de las secuencias mostró una similitud significativa (valor estadístico  $< e^{-5}$ ) con proteínas conocidas de otras especies vegetales. El resto (20.2 %) no mostró similitud con ninguna proteína conocida o bien, el valor-*E* fue mayor al considerado para este estudio. Solo 252 secuencias

fueron aceptadas en el *Genbank*, con los siguientes códigos: JZ476497-JZ476748 (**Cuadro 3 y 4**).

**Cuadro 2.** Análisis de datos de las secuencias expresadas diferencialmente identificadas en las bibliotecas sustractivas a partir de hojas colectadas de plantas de *Physalis philadelphica* infestadas con *Trialeurodes vaporariorum* en dos estadios (“temprano” [5 dpi] y “tardío” [15 dpi]).

	5 dpi		15 dpi		Total
	Directa	Inversa	Directa	Inversa	
Clonas secuenciadas	192	192	192	192	768
Secuencias editadas	112	83	81	73	349
<i>Secuencias en contingencia</i>	6	1	4	3	14
Secuencias únicas	82	69	62	55	268
Secuencias con similitud significativa (Valor $E < e^{-5}$ )	70	57	51	47	225
Secuencias desconocidas o valor $E > e^{-5}$	18	13	15	11	57
Tamaño promedio de las secuencias (pb)	377	361	297	292	

**Cuadro 3.** Datos de genes identificados en las bibliotecas sustractivas de plantas de *Physalis philadelphica* infestadas con *Trialeurodes vaporariorum* durante 5 días. (Información tomada de Quintana-Camargo *et al.* 2015).

EST No. (Accession No.)	Putative identity	E-value	Source
<b>Up-regulated</b>			
<b>Metabolism</b>			
JZ476552	phosphoribosylformylglycinamide synthase	3.00E <sup>-46</sup>	<i>Solanum lycopersicum</i>
JZ476556	phosphoenolpyruvate carboxylase 4-like	5.00E <sup>-75</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476516	phosphomannomutase/phosphoglucomutase-like	2.00E <sup>-166</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476656	cytosolic NADP-malic enzyme	3.64E <sup>-94</sup>	<i>Nicotiana tabacum</i>
Pp02d05m_E02	phosphomannomutase/phosphoglucomutase-like	4.00E <sup>-69</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
<b>Secondary metabolism</b>			
JZ476646	geranylgeranyl diphosphate reductase, chloroplastic	3.59E <sup>-15</sup>	<i>N. tabacum</i>
JZ476655	trans-resveratrol di-O-methyltransferase-like	2.00E <sup>-85</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476658	methenyltetrahydrofolate synthase domain-containing protein-like	3.00E <sup>-103</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp02d05m_G07	hyoscyamine 6-dioxygenase-like	8.00E <sup>-11</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp01d05m_B05	S-adenosylmethionine synthase 1	6.20E <sup>-142</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
<b>Energy and photosynthesis</b>			
JZ476551	photosystem II core complex proteins psbY	4.00E <sup>-53</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476669	chlorophyll a/b binding protein	1.07E <sup>-60</sup>	<i>S. tuberosum</i>
JZ476653	chlorophyll a/b binding protein 6A, chloroplast	6.00E <sup>-35</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
<b>Protein synthesis and metabolism</b>			
JZ476667	60S ribosomal protein L23	7.00E <sup>-36</sup>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
JZ476539	60S ribosomal protein L27a-2	1.00E <sup>-27</sup>	<i>A. thaliana</i>
JZ476538	elongation factor 1B beta	2.00E <sup>-21</sup>	<i>A. thaliana</i>
JZ476666	60S ribosomal protein L36-3	9.00E <sup>-11</sup>	<i>A. thaliana</i>
JZ476651	60S ribosomal protein L23a-2	5.00E <sup>-33</sup>	<i>A. thaliana</i>
JZ476506	ubiquitin 6	1.00E <sup>-06</sup>	<i>A. thaliana</i>
JZ476534	ribosomal protein S24e family protein	3.00E <sup>-12</sup>	<i>A. thaliana</i>
JZ476652	ubiquitin-protein ligase RMA1H1	4.00E <sup>-22</sup>	<i>C. annuum</i>
JZ476644	CPR2-like cysteine proteinase	3.21E <sup>-71</sup>	<i>N. tabacum</i>
JZ476542	ly200 protein	2.21E <sup>-54</sup>	<i>Capsicum annuum</i>
JZ476545	40S ribosomal protein S17-4	6.00E <sup>-33</sup>	<i>A. thaliana</i>
JZ476662	aspartic proteinase-like protein 2-like	3.00E <sup>-63</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476540	protein translation factor SUI1 homolog isoform 1	3.00E <sup>-73</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476515	translation elongation factor 1 alpha	2.00E <sup>-71</sup>	<i>N. benthamiana</i>
JZ476547	putative ADP-ribosylation factor protein	8.00E <sup>-72</sup>	<i>Elaeis guineensis</i>
JZ476530	leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase BAM1-like	5.00E <sup>-52</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476668	constitutive photomorphogenesis protein 10-like	3.00E <sup>-48</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp01d05m_B08	UDP-glycosyltransferase 85*1-like	5.00E <sup>-18</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp02d05m_F12	60S ribosomal protein L13-1	7.00E <sup>-34</sup>	<i>A. thaliana</i>
Pp01d05m_G09	40S ribosomal protein S11	2.00E <sup>-45</sup>	<i>S. tuberosum</i>
Pp02d05m_B08	oligouridylylate binding protein-like protein	2.54E <sup>-129</sup>	<i>S. tuberosum</i>
Pp01d05m_H04	uncharacterized RING finger protein C548.05c-like	1.00E <sup>-55</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
<b>Transport</b>			
JZ476649	microsomal glutathione S-transferase 3-like isoform 1	5.00E <sup>-12</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476533	sodium-coupled neutral amino acid transporter 3-like	1.00E <sup>-55</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476505	putative calcium-transporting ATPase 13, plasma membrane-type-like	2.00E <sup>-10</sup>	<i>S. lycopersicum</i>

## Biotic and abiotic stress

JZ476504	wound-responsive protein-related ( <b>WR</b> ) <sup>1</sup>	3.00E <sup>-16</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476519	class II chitinase	9.91E <sup>-42</sup>	<i>S. tuberosum</i>
JZ476518	LEA1-like protein ( <b>LEA</b> )	3.48E <sup>-66</sup>	<i>C. annuum</i>
JZ476528	osmotin-like protein ( <b>OSM</b> )	4.60E <sup>-37</sup>	<i>N. tabacum</i>
JZ476535	protein GIGANTEA-like	2.00E <sup>-85</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476537	putative lesion-inducing protein ( <b>LP</b> )	8.07E <sup>-27</sup>	<i>C. annuum</i>
JZ476544	aquaporin-like ( <b>AOP</b> )	8.23E <sup>-91</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476543	metallothionein	3.80E <sup>-28</sup>	<i>S. nigrum</i>
JZ476553	thiazole biosynthetic enzyme	6.00E <sup>-11</sup>	<i>N. benthamiana</i>
JZ476647	chaperonin CPN60-2, mitochondrial-like	3.00E <sup>-45</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476659	serine hydroxymethyltransferase 1	5.00E <sup>-13</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp02d05m_C04	stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic-like	9.00E <sup>-44</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp02d05m_D07	prepro-beta-1,3-glucanase precursor, partial ( <b>BGL</b> )	4.00E <sup>-69</sup>	<i>N. tabacum</i>
Pp02d05m_E04	HR-like lesion-inducing protein-related isoform 1	3.00E <sup>-06</sup>	<i>Theobroma cacao</i>
Pp02d05m_G08	trypsin inhibitor A-like	3.00E <sup>-10</sup>	<i>S. lycopersicum</i>

## Signal transduction

JZ476520	F-box protein PP2-A12-like	2.00E <sup>-05</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476522	calcium-dependent protein kinase	1.54E <sup>-20</sup>	<i>S. lycopersicum</i>

## Other functions

JZ476523	gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase-like isoform 1	1.00E <sup>-20</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476525	ribonuclease P protein subunit p25-like protein-like	4.00E <sup>-43</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476524	kiwellin-like	5.00E <sup>-30</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476555	putative RNA-binding protein Luc7-like 1-like	2.00E <sup>-42</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476549	auxin repressed/dormancy associated protein cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5-like	7.80E <sup>-31</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476645	chloroplast protein 12	8.00E <sup>-10</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476536	GDT1-like protein 1, chloroplastic-like	1.50E <sup>-43</sup>	<i>N. tabacum</i>
JZ476548		9.00E <sup>-42</sup>	<i>S. lycopersicum</i>

## Unknown functions

JZ476554	uncharacterized protein LOC101266024	1.00E <sup>-15</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476511	uncharacterized protein LOC101255248	3.00E <sup>-20</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476531	uncharacterized protein LOC101250594	2.00E <sup>-22</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476657	uncharacterized protein LOC101264952	1.00E <sup>-48</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp02d05m_D08	uncharacterized protein LOC101248693	1.00E <sup>-17</sup>	<i>S. lycopersicum</i>

## Down-regulated

### Metabolism

JZ476717	glycerate dehydrogenase HPR, peroxisomal	9.00E <sup>-60</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476592	anthranilate phosphoribosyltransferase, chloroplastic	7.42E <sup>-55</sup>	<i>Vitis vinifera</i>
JZ476607	putative 3-isopropylmalate dehydrogenase large subunit	1.31E <sup>-153</sup>	<i>C. annuum</i>
JZ476584	cristal-Glass1 protein	6.64E <sup>-34</sup>	<i>C. annuum</i>
JZ476587	lipoyl synthase 2, mitochondrial-like	6.50E <sup>-33</sup>	<i>G. max</i>
JZ476614	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplastic	1.56E <sup>-61</sup>	<i>N. tabacum</i>
JZ476705	granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic-like	5.00E <sup>-12</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476708	fructose-bisphosphate aldolase, chloroplast precursor, putative, expressed	9.00E <sup>-23</sup>	<i>O. sativa</i>
JZ476619	phosphoglycolate phosphatase-like	5.00E <sup>-77</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476713	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3.00E <sup>-55</sup>	<i>C. annuum</i>
Pp02r05m_B07	carbonic anhydrase, partial	6.00E <sup>-65</sup>	<i>S. tuberosum</i>
Pp02r05m_F08	transketolase, chloroplastic	7.00E <sup>-49</sup>	<i>S. tuberosum</i>

### Energy and photosynthesis

JZ476608	thioredoxin H4-like isoform 2	2.00E <sup>-15</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476502	chloroplast oxygen-evolving protein 16 kDa subunit	7.72E <sup>-53</sup>	<i>N. tabacum</i>
JZ476718	ferredoxin I	3.00E <sup>-62</sup>	<i>S. tuberosum</i>
JZ476603	chlorophyllide a oxygenase, chloroplastic-like	1.00E <sup>-122</sup>	<i>S. lycopersicum</i>

JZ476605	plastocyanin, chloroplastic; Flags: Precursor	9.26E <sup>-83</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp02r05m_F04	ferredoxin I	4.00E <sup>-67</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
<b>Protein synthesis and metabolism</b>			
JZ476697	mediator of RNA polymerase II transcription subunit 33A-like	7.00E <sup>-33</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476715	putative mTERF domain containing protein, identical	2.00E <sup>-59</sup>	<i>S. demissum</i>
JZ476593	BTB/POZ domain-containing protein At2g30600	4.60E <sup>-78</sup>	<i>V. vinifera</i>
JZ476720	F-box/LRR-repeat protein At3g03360-like	6.00E <sup>-37</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp02r05m_D08	ribosomal protein S6-like protein	2.18E <sup>-20</sup>	<i>S. tuberosum</i>
<b>Transport</b>			
JZ476696	adenosine nucleotide translocator	1.00E <sup>-42</sup>	<i>Brassica oleracea</i>
JZ476704	probable peptide/nitrate transporter At5g62680-like	1.00E <sup>-101</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
<b>Biotic and abiotic stress</b>			
JZ476722	aquaporin-like protein	2.00E <sup>-50</sup>	<i>Petunia x hybrida</i>
JZ476600	fruit-specific protein-like	9.00E <sup>-05</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476711	Skp1	2.00E <sup>-34</sup>	<i>C. annuum</i>
JZ476598	3-ketoacyl-CoA synthase 6-like	5.00E <sup>-96</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476588	heat shock protein binding protein	2.00E <sup>-08</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476589	putative PIP-type aquaporin	7.54E <sup>-97</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476590	signal recognition particle 43 kDa protein, chloroplastic-like	3.00E <sup>-69</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476596	heat shock protein 60	2.07E <sup>-44</sup>	<i>Ageratina adenophora</i>
JZ476597	putative chloroplast thiazole biosynthetic protein	1.27E <sup>-39</sup>	<i>N. tabacum</i>
JZ476706	aquaporin-like protein	8.70E <sup>-49</sup>	<i>Petunia x hybrida</i>
JZ476709	Aqp2 protein	2.00E <sup>-70</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp02r05m_F11	UDP-glycosyltransferase 73C4-like	2.00E <sup>-12</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp02r05m_B08	defensin-like protein P322-like	2.00E <sup>-26</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp01r05m_G04	PIP2	2.00E <sup>-12</sup>	<i>Karelinia caspia</i>
<b>Signal transduction</b>			
JZ476610	mitogen-activated protein kinase	1.18E <sup>-20</sup>	<i>N. tabacum</i>
JZ476585	nucleoside diphosphate kinase	8.50E <sup>-59</sup>	<i>C. annuum</i>
JZ476616	dual specificity protein kinase pyk1 isoform 1	3.75E <sup>-92</sup>	<i>V. vinifera</i>
<b>Other functions</b>			
JZ476601	pentatricopeptide repeat-containing protein At3g49240-like	4.17E <sup>-21</sup>	<i>G. max</i>
JZ476611	ATP-dependent RNA helicase DBP2	5.00E <sup>-57</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476595	H2A histone	3.00E <sup>-43</sup>	<i>N. tabacum</i>
<b>Unknown functions</b>			
JZ476594	uncharacterized protein LOC101263228	6.00E <sup>-27</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476615	uncharacterized protein LOC101262906	2.00E <sup>-92</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476618	uncharacterized protein LOC101248056	7.00E <sup>-28</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476701	hypothetical protein	3.00E <sup>-13</sup>	<i>V. vinifera</i>
JZ476703	uncharacterized protein LOC101253866	7.00E <sup>-10</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476602	uncharacterized protein LOC101253367	5.00E <sup>-34</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476712	uncharacterized protein At5g03900, chloroplastic-like	9.00E <sup>-49</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476719	uncharacterized protein	1.00E <sup>-11</sup>	<i>Populus trichocarpa</i>
Pp01r05m_F03	uncharacterized protein LOC101262737	9.00E <sup>-116</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp02r05m_C02	uncharacterized protein	5.00E <sup>-20</sup>	<i>S. tuberosum</i>

<sup>1</sup>Genes resaltados en negritas y subrayados fueron analizados por qRT-PCR

**Cuadro 4.** Datos de genes identificados en las bibliotecas sustractivas de plantas de *Physalis philadelphica* infestadas con *Trialeurodes vaporariorum* durante 15 días. (Información tomada de Quintana-Camargo *et al.* 2015).

EST No. (Accession No.)	Putative identity	E-value	Source
<b>Up-regulated</b>			
<b>Metabolism</b>			
JZ476683	phosphoglycerate kinase, chloroplastic	6.24E <sup>-131</sup>	<i>Nicotiana tabacum</i>
JZ476670	1,4-beta-glucanase, Korrigan ( <b>KOR</b> ) <sup>1</sup>	4.77E <sup>-45</sup>	<i>Solanum lycopersicum</i>
JZ476581	GDSL esterase/lipase APG-like	2.00E <sup>-25</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476694	GDSL esterase/lipase APG-like	8.00E <sup>-53</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp02d15m_A02	glutamate-glyoxylate aminotransferase 2-like	4.00E <sup>-05</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp02d15m_A04	biotin carboxylase subunit	1.24E <sup>-10</sup>	<i>N. tabacum</i>
Pp02d15m_D05	monodehydroascorbate reductase ( <b>MDHAR</b> )	9.82E <sup>-79</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
<b>Secondary metabolism</b>			
JZ476678	feruloyl CoA ortho-hydroxylase 2-like	1.00E <sup>-08</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp02d15m_C12	glutamyl tRNA Reductase, partial	4.89E <sup>-116</sup>	<i>N. tabacum</i>
<b>Energy and photosynthesis</b>			
JZ476690	glutaredoxin family protein-like ( <b>GTX</b> )	5.00E <sup>-54</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476507	photosystem II reaction center W protein, chloroplastic-like	1.00E <sup>-18</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476563	oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	9.00E <sup>-46</sup>	<i>S. tuberosum</i>
JZ476679	photosystem I subunit XI	6.80E <sup>-39</sup>	<i>N. attenuata</i>
Pp01d15m_F06	photosystem I reaction center subunit X psaK	6.69E <sup>-59</sup>	<i>N. tabacum</i>
Pp01d15m_H02	cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit 1, chloroplastic	3.95E <sup>-14</sup>	<i>N. tabacum</i>
<b>Protein synthesis and metabolism</b>			
JZ476560	50S ribosomal protein L27, chloroplastic-like	8.00E <sup>-22</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476674	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1-like	1.00E <sup>-133</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476675	60S ribosomal protein L8-3	9.00E <sup>-40</sup>	<i>A. thaliana</i>
JZ476692	serine carboxypeptidase ( <b>SCP</b> )	2.00E <sup>-58</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476568	chaperone protein DnaJ-like isoform 2	2.00E <sup>-18</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476578	60S ribosomal protein L13a-1	8.00E <sup>-09</sup>	<i>A. thaliana</i>
JZ476687	UBX domain-containing protein 6-like	7.00E <sup>-32</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476559	D1 protease precursor	4.00E <sup>-18</sup>	<i>N. plumbaginifolia</i>
Pp01d15m_B11	probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC2-like	1.00E <sup>-37</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp01d15m_D01	F-box protein FBW2 isoform 1	2.55E <sup>-65</sup>	<i>Vitis vinifera</i>
Pp02d15m_A10	50S ribosomal protein L21, chloroplastic-like	7.00E <sup>-20</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
<b>Transport</b>			
JZ476574	triose phosphate/phosphate translocator, chloroplastic	3.00E <sup>-23</sup>	<i>S. tuberosum</i>
JZ476671	putative xanthine/uracil permease	5.00E <sup>-47</sup>	<i>Plantago major</i>
JZ476684	copper transporter 6-like	4.00E <sup>-07</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
<b>Biotic and abiotic stress</b>			
JZ476583	uncharacterized protein At3g27210-like	3.00E <sup>-22</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476582	MLP-like protein 34-like	8.00E <sup>-14</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476558	heat shock protein ( <b>HSP</b> )	2.00E <sup>-42</sup>	<i>Ricinus communis</i>
JZ476566	histone deacetylase 19-like isoform 2	5.00E <sup>-43</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476695	plastid thioredoxin M precursor	3.89E <sup>-30</sup>	<i>N. tabacum</i>
JZ476573	ferredoxin-thioredoxin-reductase catalytic subunit B	1.08E <sup>-21</sup>	<i>S. tuberosum</i>
Pp01d15m_C09	chloroplast [Cu-Zn] superoxide dismutase ( <b>SOD</b> )	1.37E <sup>-87</sup>	<i>S. nigrum</i>
Pp01d15m_D02	chloroplast Drought-induced Stress Protein ( <b>CDSP</b> )	1.31E <sup>-69</sup>	<i>S. tuberosum</i>
Pp01d15m_F12	ankyrin repeat domain-containing protein 2-like	1.00E <sup>-30</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp01d15m_C02	cytochrome P450 NADPH-reductase	8.00E <sup>-30</sup>	<i>Petunia x hybrida</i>

## Signal transduction

Pp02d15m_F08	protein thylakoid formation1, chloroplastic	1.08E <sup>-12</sup>	<i>S. tuberosum</i>
Pp01d15m_C10	C2 domain-containing family protein	2.00E <sup>-07</sup>	<i>Populus trichocarpa</i>

## Other functions

JZ476576	protein TIC 62, chloroplastic-like	5.00E <sup>-60</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476580	polyprotein, 3'-partial, putative	3.15E <sup>-15</sup>	<i>S. demissum</i>

## Unknown functions

JZ476567	hypothetical protein	1.00E <sup>-22</sup>	<i>S. tuberosum</i>
JZ476570	uncharacterized protein LOC101259555	7.00E <sup>-17</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476682	uncharacterized protein LOC101264895	4.00E <sup>-47</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476689	uncharacterized protein LOC101266602	8.00E <sup>-36</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp02d15m_G03	uncharacterized protein LOC101244590	6.00E <sup>-40</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp01d15m_F03	uncharacterized protein LOC101264041	1.00E <sup>-100</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp02d15m_H08	uncharacterized protein LOC101248178	6.00E <sup>-15</sup>	<i>S. lycopersicum</i>

## Down-regulated

### Metabolism

JZ476625	alpha-glucan phosphorylase, H isozyme	3.93E <sup>-09</sup>	<i>S. tuberosum</i>
JZ476642	xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase XTH7	2.21E <sup>-18</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476727	fructose-bisphosphate aldolase 1	3.00E <sup>-61</sup>	<i>Theobroma cacao</i>
JZ476733	triose phosphate isomerase	2.08E <sup>-13</sup>	<i>Rosa gymnocarpa</i>
JZ476624	non-symbiotic hemoglobin	4.45E <sup>-49</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp01r15m_B03	amino-acid acetyltransferase-like	1.00E <sup>-57</sup>	<i>S. lycopersicum</i>

### Secondary metabolism

JZ476732	homogentisate phytyltransferase 2, chloroplastic-like	6.00E <sup>-07</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476735	caffeic acid 3-O-methyltransferase	4.63E <sup>-32</sup>	<i>C. annuum</i>
JZ476748	probable glutathione S-transferase parC-like isoform 2	5.00E <sup>-09</sup>	<i>Vitis vinifera</i>
Pp01r15m_E12	methylecgonone reductase-like	5.00E <sup>-32</sup>	<i>Cicer arietinum</i>

### Energy and photosynthesis

JZ476726	UPF0603 protein At1g54780, chloroplastic-like	7.00E <sup>-56</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476635	chloroplast ferredoxin-NADP+ oxidoreductase precursor	5.99E <sup>-59</sup>	<i>C. annuum</i>
JZ476622	chloroplast pigment-binding protein CP26	5.00E <sup>-12</sup>	<i>C. annuum</i>
JZ476746	chlorophyll a/b-binding protein PS II-Type I	7.00E <sup>-07</sup>	<i>S. tuberosum</i>
JZ476632	chloroplast thylakoid lumenal 17.4 kDa protein	1.00E <sup>-10</sup>	<i>S. tuberosum</i>
JZ476637	chlorophyll a/b binding protein 13, chloroplastic	6.52E <sup>-39</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp02r15m_C05	ATP synthase subunit O, mitochondrial-like	2.00E <sup>-62</sup>	<i>S. lycopersicum</i>

### Protein synthesis and metabolism

JZ476747	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH-like	4.00E <sup>-68</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476631	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP53-like	2.00E <sup>-36</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476636	methionine sulfoxide reductase A4	1.68E <sup>-73</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476728	MAR-binding protein MFP1 homolog	7.14E <sup>-49</sup>	<i>N. tabacum</i>
JZ476627	proline synthase co-transcribed bacterial homolog protein-like	1.00E <sup>-63</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476734	tripeptidyl-peptidase 2-like	5.00E <sup>-37</sup>	<i>Fragaria vesca</i>
Pp02r15m_H04	30S ribosomal protein S6 alpha, chloroplastic-like	6.00E <sup>-17</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp01r15m_H11	plastid ribosomal protein l11	1.63E <sup>-75</sup>	<i>A. thaliana</i>
Pp02r15m_G04	metallothionein-like protein type 2	1.54E <sup>-16</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp02r15m_G05	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP17-2, chloroplastic-like	7.00E <sup>-16</sup>	<i>S. lycopersicum</i>

### Transport

JZ476739	protein SRG1-like	9.00E <sup>-18</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
JZ476621	outer envelope pore protein 16-3, chloroplastic/mitochondrial-like	3.00E <sup>-22</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
Pp01r15m_B07	lipid transfer protein	8.00E <sup>-16</sup>	<i>N. tabacum</i>

### Biotic and abiotic stress

JZ476745	aquaporin PIP-type pTOM75	6.00E <sup>-07</sup>	<i>S. lycopersicum</i>
----------	---------------------------	----------------------	------------------------

### Signal transduction

JZ476640 putative ADP-ribosylation factor 3.00E<sup>-16</sup> *A. thaliana*

### Other functions

JZ476639 rhodanese-like domain-containing protein 14, chloroplastic-like 9.00E<sup>-32</sup> *S. lycopersicum*  
JZ476623 tubulin beta-1 chain-like 4.65E<sup>-41</sup> *Brachypodium distachyon*  
JZ476736 lisH domain and HEAT repeat-containing protein KIAA1468 homolog 1.00E<sup>-67</sup> *S. lycopersicum*  
JZ476730 DNA binding protein, putative 2.00E<sup>-73</sup> *Ricinus communis*  
JZ476742 uncharacterized protein LOC101245846 5.00E<sup>-28</sup> *S. lycopersicum*  
Pp02r15m\_E05 tubulin alpha-6 chain 6.00E<sup>-67</sup> *A. thaliana*  
Pp01r15m\_B04 protein CbbY-like 4.00E<sup>-136</sup> *S. lycopersicum*  
Pp02r15m\_F10 DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 35-like 2.00E<sup>-38</sup> *S. lycopersicum*  
Pp02r15m\_G10 pistil-specific extensin-like protein 2.00E<sup>-22</sup> *S. nigrum*

### Unknown functions

JZ476633 uncharacterized protein LOC101253079 2.00E<sup>-34</sup> *S. lycopersicum*  
JZ476628 uncharacterized protein LOC101259526 2.00E<sup>-06</sup> *S. lycopersicum*  
JZ476626 predicted protein 4.74E<sup>-16</sup> *Populus trichocarpa*  
Pp01r15m\_F04 hypothetical protein 6.00E<sup>-05</sup> *Prunus persica*  
Pp02r15m\_A11 uncharacterized protein LOC101257692 1.00E<sup>-29</sup> *S. lycopersicum*

<sup>1</sup>Genes resaltados en negritas y subrayados fueron analizados por qRT-PCR

## 6.2.1 Análisis funcional de las secuencias

Para entender los mecanismos moleculares de defensa inducidos por mosca blanca en tomate de cáscara, los genes diferencialmente expresados identificados en las bibliotecas sustractivas, fueron clasificados de acuerdo con su función celular por medio del programa Funcat version 2.1 (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/>). Las secuencias diferenciales fueron clasificadas en 10 categorías: metabolismo, metabolismo secundario, fotosíntesis y energía, estrés biótico y abiótico, transducción de señales, síntesis y metabolismo de proteínas, transporte celular, función desconocida y sin similitud con proteínas conocidas. En general, la clasificación funcional de las secuencias entre las dos bibliotecas sustractivas (5 y 15 dpi) fue similar para la mayoría de las categorías. En ambos casos, destacan las categorías de respuesta a estrés biótico y abiótico (21 %), síntesis y metabolismo de proteínas (18 %), metabolismo (14 %), así como los principales procesos biológicos que modifican su expresión (inducción/represión) en respuesta a mosca blanca. Además se localizaron secuencias que corresponden a genes nuevos con ninguna similitud con secuencias previamente reportadas o cuya función biológica se desconoce, y comprendieron un 18 y 9 % de las secuencias analizadas, respectivamente (**Cuadro 3, 4 y 5**).

**Cuadro 5.** Clasificación funcional de las secuencias expresadas diferencialmente identificadas en las bibliotecas sustractivas a partir de plantas de *Physalis philadelphica* infestadas con *Trialeurodes vaporariorum* (datos en porcentaje).

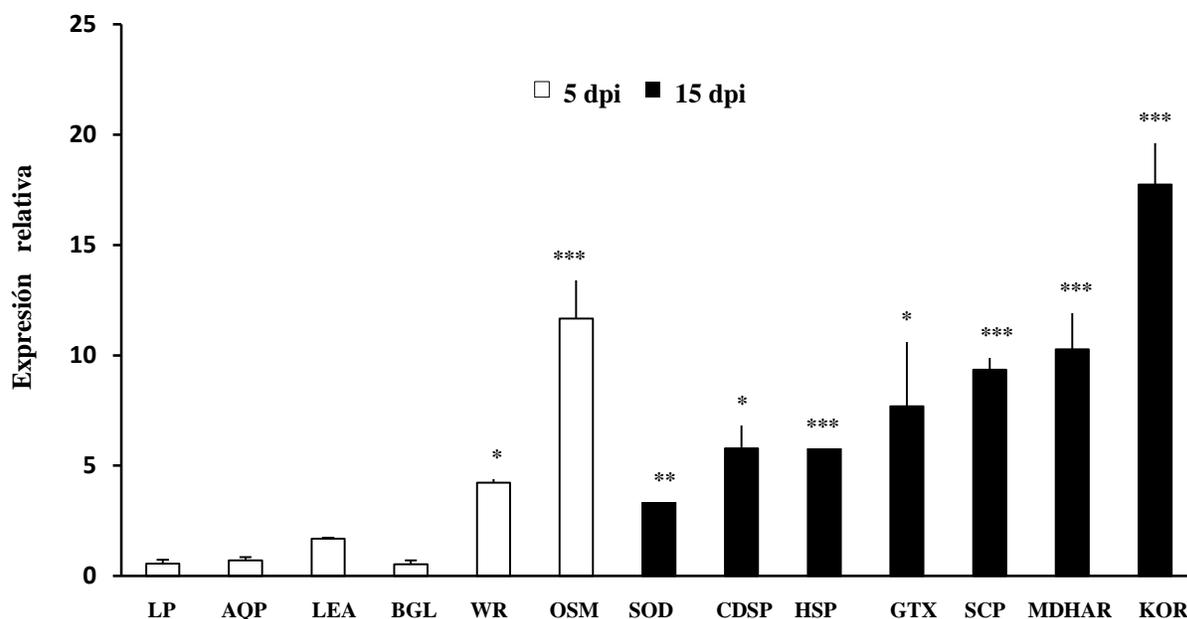
Categoría funcional	5 dpi		15 dpi	
	Directa	Inversa	Directa	Inversa
Metabolismo	13.9 %	21.7 %	14.3 %	17.9 %
Energía y fotosíntesis	2.0	4.8	3.9	7.5
Estrés biótico y abiótico	19.8	25.3	20.8	17.9
Transducción de señales	3.0	2.4	2.6	1.5
Síntesis y metabolismo proteico	26.7	12.0	19.5	17.9
Transporte	4.0	13.3	11.7	9.0
Función desconocida	12.9	4.8	7.8	10.4
Sin similitud con proteínas conocidas	17.8	15.7	19.5	17.9

En la biblioteca sustractiva directa de 5 dpi, la categoría de síntesis y metabolismo proteico presentó el mayor porcentaje. Por el contrario, en la biblioteca inversa de 5 dpi, la categoría de metabolismo fue la más representada (**Cuadro 5**). Varios de los genes identificados están asociados con la respuesta a estrés biótico y abiótico, incluidos aquellos que codifican para miembros de la familia de inhibidores de la tripsina, serina hidroximetil transferasa, aspártico y cistein proteasas, osmotina y una proteína relacionada con patogénesis (PR), fueron inducidos a los 5dpi (**Cuadro 3**). En la biblioteca sustractiva directa de 15 dpi, las categorías más representadas fueron los genes de respuesta a estrés biótico y abiótico, síntesis y metabolismo proteico (**Cuadro 5**). En este contexto, se observaron cambios en la expresión de genes relacionados con la formación ordenada de la red celulosa-hemicelulosa de pared celular, entre los que se incluyen los genes endo-1,4-beta-glucanasa Korrigan y xiloglucan: xiloglucosil transferasa. Destacan también genes involucrados en el metabolismo de los fenilpropanoides y en la producción de cera cuticular (**Cuadro 4**).

### 6.3 Confirmación de las bibliotecas sustractivas por qPCR

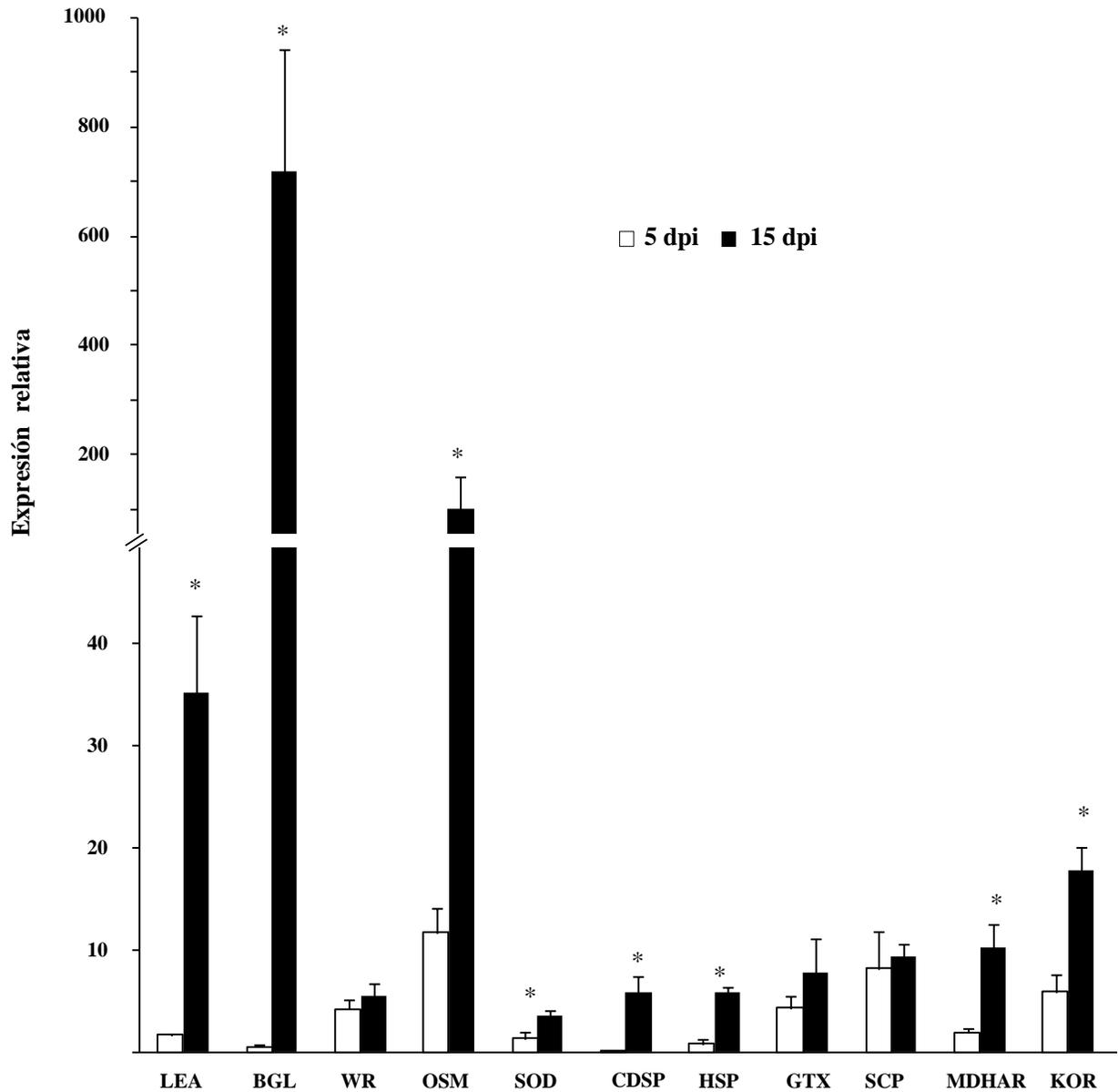
La validación de la expresión diferencial de los genes obtenidos en las bibliotecas sustractivas se realizó por medio de qPCR, para lo cual se diseñaron primers específicos (**Cuadro 1**). Se seleccionaron 13 genes de las bibliotecas sustractivas directas (6 y 7 genes,

para 5 y 15 dpi, respectivamente). No obstante, la selección se realizó con un particular interés en los genes de respuesta a defensa, también se consideró el tamaño de la secuencia ( $> 100$  pb) y el valor- $E$  ( $> 1e^{-5}$ ). En las plantas expuestas a 5 d de infestación se confirmó el incremento en los niveles de transcrito para las proteínas de respuesta a herida (WR), osmotina (OSM) y la proteína abundante en embriogénesis tardía (LEA). El incremento observado para transcritos de los genes *WR* y *OSM* fue de 4.2 y 11.6 veces mayores que los controles respectivamente. Por el contrario, no se observó acumulación de transcritos para los genes *LP* (proteína inducida por lesión), *AQP* (proteína tipo aquaporina) y *BGL* ( $\beta$ -1, 3-gluconasa) (Figura 4). En el tratamiento de 15 dpi, los genes: *SOD* (superóxido dismutasa), *CDSP* (proteína inducida por estrés hídrico), *HSP* (proteína de choque térmico) y *GTX* (glutarredoxina), aumentaron su expresión de 3.6 a 5.8 veces más que el control. Mientras que los genes *SCP* (serina carbopeptidasa), *MDHAR* (monodehidroascorbato reductasa) y *KOR* (endo-1,4-beta-gluconasa Korrigan) incrementaron sus niveles de transcrito más de 9 veces respecto al control (Figura 4).



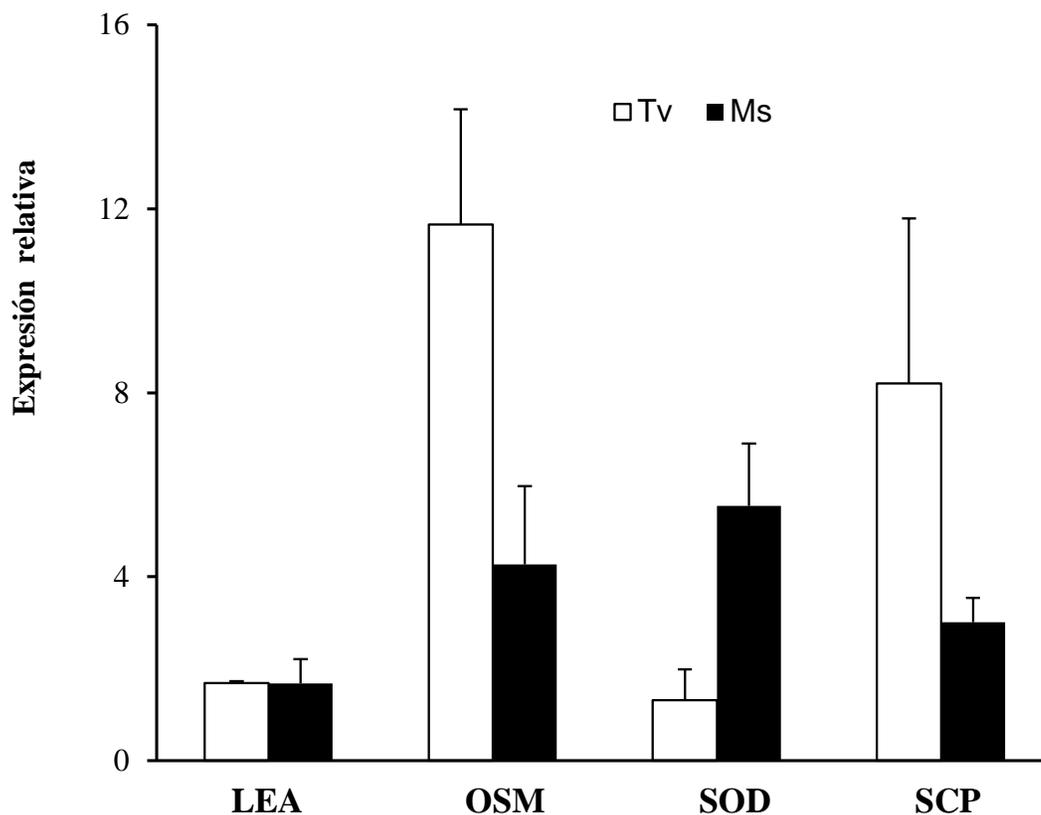
**Figura 4.** Validación por qPCR de genes expresados diferencialmente que fueron identificados en las bibliotecas sustractivas a partir de plantas de *Physalis philadelphica* infestadas con *Trialeurodes vaporariorum* (i.e., 5 días [5 dpi] o 15 días [15 dpi]). Las barras indican la abundancia relativa de ARNm. Los datos presentados fueron normalizados respecto a los niveles de expresión en plantas control (no infestadas). Los asteriscos denotan significancia estadística; \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.001$ ; \*\*\* $P \leq 0.0001$ .

Con el objetivo de analizar con mayor detalle los patrones de expresión temporal de genes cuya expresión diferencial fue confirmada (**Figura 4**) se determinaron los niveles de expresión de secuencias expresadas diferencialmente identificados en la biblioteca sustractiva de 5 dpi (*LEA*, *BGL*, *WR* y *OSM*) en plantas de *P. philadelphica* infestadas por 15 d, y genes específicos para 15 dpi (*SOD*, *CDSP*, *HSP*, *MDHAR* y *KOR*) fueron evaluaron en plantas infestadas 5 d. Acorde a los resultados obtenidos en la biblioteca sustractiva de 15 dpi, los genes *SOD*, *CDSP*, *HSP*, *MDHAR* y *KOR* mostraron mayores niveles de transcrito en plantas infestadas por 15 d respecto a plantas infestadas en sólo 5 d. Contrariamente, los transcritos específicos de 5 dpi fueron superiores en plantas infestadas por 15 d, con valores de 20.7, 8.7 y hasta 700 para los genes *LEA*, *OSM* y *BGL*, respectivamente (**Figura 5**).



**Figura 5.** Niveles de expresión por qRT-PCR de genes identificados en las bibliotecas sustractivas, en plantas de *Physalis philadelphica* infestadas por mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) por 5 d (5 dpi) o 15 d (15 dpi). Las barras indican la abundancia relativa de RNAm. Los datos presentados fueron normalizados respecto a los niveles de expresión en plantas control (no infestadas). Los asteriscos denotan significancia estadística entre los tiempos de infestación ( $P \leq 0.05$ ).

Los insectos masticadores se caracterizan por producir respuestas rápidas y fuertes en comparación con los insectos succionadores. Por ello, se decidió evaluar los niveles de expresión de los genes *LEA*, *OSM*, *SOD* y *SCP* en plantas expuestas a herbivoría por larvas de *M. sexta*, con el fin de comparar las respuestas de *P. philadelphica* a insectos pertenecientes a dos gremios de alimentación contrastantes. Los niveles de expresión de *OSM* y *SCP* fueron significativamente mayores en plantas infestadas por mosca blanca respecto a plantas dañadas por *M. sexta*. En contraste, los transcritos de *SOD* aumentaron en respuesta a *M. sexta* (4 veces). Los niveles de expresión de *LEA* fueron semejantes en respuesta a ambos herbívoros (**Figura 6**).



**Figura 6.** Comparación de los niveles de expresión de los genes *LEA*, *OSM*, *SOD* y *SCP* en plantas de *Physalis philadelphica* expuestas a herbivoría por insectos succionadores (*Trialeurodes vaporariorum*; Tv) o masticadores (*Manduca sexta*; Ms). Las barras indican la abundancia relativa de RNAm. Los datos presentados fueron normalizados respecto a los niveles de expresión en plantas control (no dañadas).

## VII. DISCUSIÓN

La información del genoma y transcriptoma para miembros del género *Physalis* se incremento en años recientes. Un beneficio de este esfuerzo ha sido la generación de información importante relacionada con la respuesta defensiva en *P. peruviana*, particularmente contra el marchitamiento vascular que es ocasionado por *Fusarium*. Adicionalmente, varias familias de genes y marcadores moleculares tipo microsatélite SSR (del inglés, *Simple Sequence Repeats*) han sido detectadas en secuencias asociados con respuesta inmunidad, muerte celular programada, deposiciones de calosa, respuestas defensivas dependientes de AJ y ET, y resistencia contra patógenos bacterianos, virus y hongos (Simbaqueba *et al.* 2011; Garzón-Martínez *et al.* 2012; Enciso-Rodríguez *et al.* 2013). En este contexto, el presente trabajo representa un primer esfuerzo para determinar a nivel de transcriptoma la respuesta a herbivoría por mosca blanca de invernadero en *P. philadelphica*. Esta especie destaca tanto como cultivo hortícola importante en México, así como una planta modelo para estudios de ecología, evolución y desarrollo (Wang *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2014; Wang *et al.* 2014, Wang *et al.* 2015).

La clasificación funcional de genes de *P. philadelphica* aislados por HSS en plantas expuestas a la infestación por mosca blanca, presentó similitud con un estudio previo de microarreglos en pequeña escala realizado en plantas de tomate infestadas con diferentes estadios ninfales de mosca blanca (Estrada-Hernández *et al.* 2009). Estos resultados coinciden con otro estudio que reporta que *Physalis* y jitomate presentan similitud a nivel de marcadores moleculares y de secuencias de DNA (Wei *et al.* 2012).

Los cambios en los niveles de expresión genética confirmaron que las plantas de *P. philadelphica* responden activamente a la infestación por mosca blanca (**Cuadros 2 y 3**). Distintos genes asociados con estrés biótico y abiótico fueron inducidos, muchos de los cuales han sido previamente relacionados como respuestas defensivas contra patógenos y herbívoros pertenecientes a gremios alimenticios distintos además de insectos succionadores como los áfidos y las moscas blancas. Ejemplos representativos fueron los genes codificantes de inhibidores de proteasas tipo tripsina y diversas enzimas proteolíticas (Estrada-Hernández *et*

*al.* 2009; Mondego *et al.* 2011; Dubey *et al.* 2013). La inducción de proteasas vegetales se confirmó, considerando el papel clave que tienen en las respuestas de defensa contra patógenos e insectos (van der Hoorn y Jones 2004; Khajuria *et al.* 2013). De manera similar, destaca la inducción del gen codificante para una serina hidroximetil transferasa, enzima fotorrespiratoria cuya actividad es necesaria para mitigar el daño oxidativo producido durante la muerte celular inducida por patógenos (Moreno *et al.* 2005). La modificación en los niveles de expresión de genes ribosomales es un fenómeno común presente durante la activación de respuestas defensivas en plantas (Maleck *et al.* 2000; Schenk *et al.* 2000). El gen codificante para una proteína tipo C3HC4 con dominio dedo de zinc/U-box, inducido a los 5 dpi, podría estar relacionada con procesos de degradación proteica similar a lo reportado para una proteína análoga de Chile, la cual se cree que actúa como una E3-ligasa para la poliubiquitinación de proteínas tipo PR (Hong *et al.* 2007). La presencia de genes involucrados en el metabolismo de la tiamina, concuerda con los datos del transcriptoma de hoja de *P. peruviana* (Garzón-Martínez *et al.* 2012). La relevancia de esta ruta metabólica está relacionada con el papel que se cree que desempeña la tiamina en la inducción de respuestas defensivas en las plantas, a través de las rutas de señalización mediadas por AS y Ca<sup>2+</sup> (Ahn *et al.* 2005; Goyer 2010) y por los efectos de antibiosis y antixenosis producidos en cebada y chícharo tratadas con tiamina (Hamada y Jonson 2013).

En contraste, se observó un efecto negativo de la infestación por mosca blanca sobre la expresión de genes relacionados con fotosíntesis, incluidos aquellos involucrados en la fijación del carbono. Estos fueron, en cierta medida, resultados esperados considerando que la represión de genes fotosintéticos en respuesta a la herbivoría y otros tipos de estrés biótico ha sido documentada en varias especies de plantas (Bilgin *et al.* 2010). Además, se detectaron cambios en los niveles de expresión de varios genes relacionados con protección a estrés oxidativo, tales como los codificantes para tiorredoxinas, incluida la proteína CDSP32 (Broin *et al.* 2000), dos proteínas glutatión S-transferasas, una proteína tipo-metalotionina, una superóxido dismutasa y una dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato (Singh *et al.* 2008). Esta respuesta también se esperaba tomando en cuenta el contexto general de las respuestas de defensa desencadenadas por diversos insectos herbívoros (Zhu-Salzman *et al.* 2008).

Los cambios en los niveles de expresión de los genes que codifican para la síntesis de enzimas: endo-1,4-beta-glucanasa Korrigan y la enzima encargada de la síntesis de xiloglucano una xiloglucosil transferasa, relacionados con el reforzamiento de pared celular y resistencia de *P. philadelphica* contra mosca blanca. La endo-1,4-beta glucanasa Korrigan, requerida para la síntesis ordenada de la red celulosa-hemicelulosa (Maloney *et al.* 2012), presentó altos niveles de expresión a los 15 dpi. Al mismo tiempo, el gen que sintetiza a la xiloglucosil transferasa involucrado en otros procesos de biogénesis de pared celular, fue reprimido. Los datos relacionados con genes involucrados con la modificación o síntesis de carbohidratos estructurales, coinciden con la descripción del marcador tipo SSR asociado con la deposición de calosa en *P. peruviana* (Simbaqueba *et al.* 2011). Las plantas de *P. philadelphica* también mostraron regulación positiva de varios genes codificantes para lipasas, proteínas transportadoras de lípidos y otras enzimas catabólicas de lípidos (por ejemplo: dos lipasas tipo GDSL). Esto en similitud con lo observado en plantas de trigo resistentes a la mosca de Hess, las cuales presentan una rápida movilización y reutilización de recursos, particularmente lípidos (Khajuria *et al.* 2013). Adicionalmente, en arroz se determinó que varias de estas proteínas pueden ser importantes en la respuesta defensiva de las plantas contra diferentes tipos de estrés biótico (Chepyshko *et al.* 2012).

Determinantes moleculares conocidos de resistencia a mosca blanca y áfidos también fueron detectados en respuesta a tiempos cortos de infestación con mosca blanca. Estos incluyeron endoquitinasa básica y  $\beta$ -1, 3 glucanasa; estos genes también fueron detectados por Puthoff *et al.* (2010) en plantas de tomate infestadas por *Bemisia tabaci* y *T. vaporariorum*. En Chile se encontró que *B. tabaci* incrementa la expresión de proteínas PR (Yang *et al.* 2011). Otros genes PR detectados en *P. philadelphica* infestadas con mosca blanca fueron el gen de una osmotina, un elemento de la familia de las PRs identificada en cebada en respuesta a la infección fúngica (ambas expresadas a 5 dpi) y una proteína mayoritaria de látex (MLP, inducida a 15 dpi). Las MLP tienen función desconocida; sin embargo, recientemente se han relacionado a algunas MLP con la super familia proteica Bet v1, que incluye proteínas de unión a citocininas y proteínas PR-10, cuya expresión se encuentra modulada por patógenos y/o estrés ambiental tal como sequía, heridas, radiación ultravioleta y estrés oxidativo (Lytle *et al.* 2009). En este sentido, recientemente se indicó que las citocininas están relacionadas con la

activación de respuestas defensivas contra áfidos y mosca blanca (Dubey *et al.* 2013). Adicionalmente, la inducción del gen de la familia proteica xantina/ uracilo permeasas, observada a 15 dpi, apoya el papel sugerido de las citocininas en la regulación de las interacciones mosca blanca-planta.

Los resultados obtenidos, sugieren que el ABA y los brasinoesteroides pudieran desempeñar un papel significativo en las respuestas de defensa de *P. philadelphica* a la infestación por mosca blanca, a través de la inducción de dos genes que codifican para proteínas F-box en etapas tempranas y tardías de infestación. La expresión del gen de una PP2 (proteína de floema), a los 5 dpi, fue similar a los resultados obtenidos para la expresión de la proteína Cs594 de pepino, que es inducida por el 24-epibrasinosteroide, e identificada, en floema, como una proteína defensiva con dominio F-box (Li *et al.* 2013). La expresión de un segundo gen F-Box, que fue encontrado a los 15 dpi, el cual codifica para un regulador negativo de la proteína Argonauta1, cuya expresión se asocia con la señalización y respuesta del ABA (Earley *et al.* 2010). Considerando que la mayoría de los genes codificantes para proteínas LEA contienen elementos de respuesta a ABA en sus promotores (Hundertmark e Hinch, 2008), la regulación positiva del gen *LEA*, a los 5 dpi, coincide con el papel propuesto de ABA en la interacción de *P. philadelphica*-mosca blanca.

Esto además, está basado con el rol conocido que desempeña ABA en la adaptación a diferentes tipos de estrés, como el hídrico y salino (Leung y Giraudat 1998), es coincidente con la inducción de una proteína tolerante a sal presente en plantas de jitomate infestadas por mosca blanca (Estrada-Hernández *et al.* 2009). En este sentido, la inducción del gen *GI* cuya expresión fue detectada a los 5 dpi, corresponde con la función descrita en *Arabidopsis*, donde la proteína regula la floración como un mecanismo de adaptación a estrés salino (Kim *et al.* 2013). Es importante resaltar que existen interacciones entre las rutas de señalización de defensa y patogénesis con las de estrés hídrico y salino (Achuo *et al.* 2006; Dombrowski, 2003). Esto podría explicar la inducción en *P. philadelphica* de algunos genes asociados a herbivoría por insectos pertenecientes a gremios alimenticios distintos a succionadores (como los masticadores), cuya expresión es regulada a través del AJ. Entre éstos se encontraron genes codificante para una proteína WR y una proteína rica en repetidos de ankirina. Esta

última, comparte homología con la proteína HBP1 de *Nicotiana tabacum* la cual tiene la capacidad para interactuar con una  $\beta$ -1,3-glucanasa (Fridborg *et al.* 2003).

Lo anterior sugiere que la proteína detectada en *P. philadelphica* podría regular la deposición de calosa durante la infestación de mosca blanca y jugar un papel relevante en defensa muy similar a lo reportado en *Arabidopsis* y algodón, donde se comprobó que la deposición de calosa en los sitios de alimentación es un mecanismo disuasivo para áfidos y mosca blanca (Lü *et al.* 2011; Dubey *et al.* 2013). Estas consideraciones coinciden nuevamente con el marcador SSR ligado a uno de los grupos de contingencia asociados a la deposición de calosa en pared celular como una respuesta defensiva descrito en *P. peruviana* (Simbaqueba *et al.* 2011).

Similar a lo observado en plantas de algodón infestadas con áfidos y mosca blanca (Dubey *et al.* 2013), la infestación por mosca blanca en *P. philadelphica* podría haber desplazado los patrones de translocación de sacarosa y aminoácidos representados por cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos y carbohidratos. Ejemplos relacionados con este escenario incluyen el aumento en la expresión de genes codificantes de proteínas fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPc), la enzima málica dependiente de NADP (NADPH-ME), la dos fosfoglucomutasa, la glutamato deshidrogenasa y proteínas relacionadas con un transportador de aminoácidos, que se presentaron a los 5 dpi. Además se presenta la inducción a los 15 dpi, de una glutamato: glioxilato aminotransferasa que también puede actuar como una alanina aminotransferasa. Asimismo, NADP-ME en combinación con PEPc ha sido reportada como regulador de pH en respuestas defensivas inducidas por radiación UV-B, infección viral o tratamientos con “elicitors” de hongos, fragmentos de celulosa o AJ (Doubnerová *et al.* 2007). En este sentido, la sobreexpresión de una fosfoglucomutasa bacteriana en plantas de papa redujo drásticamente el contenido de aminoácidos, lo cual podría afectar negativamente el crecimiento y desarrollo de los insectos succionadores de floema (Lytovchenko *et al.* 2005). Por otro lado, Saltzmann y colaboradores (2008) observaron incrementos en los niveles de transcritos del gen que codifica para una alanina aminotransferasa y un transportador transmembranal de aminoácidos en plantas de trigo susceptibles a la infestación de larvas virulentas de la mosca de Hess, la cual

se caracteriza por ejercer una manipulación del contenido de aminoácidos libres en las plantas (Saltzmann *et al.* 2008).

Genes asociados a la defensa, tales como el factor de ribosilación de ADP (ARF), previamente reportados como elementos presentes en las interacciones que ocurren entre áfidos y manzanos, también fueron identificados en *P. philadelphica*. Los ARFs participan en el tráfico de vesículas desde el aparato de Golgi al retículo endoplásmico (Kirchhausen 2000), y son componentes de varias rutas de señalización involucradas en la inducción de la expresión de proteínas PR u otras funciones biológicas asociadas con defensa (Qubbaj *et al.* 2005; Coemans *et al.* 2008). La inducción del gen codificante para una proteína tipo receptor, con motivos estructurales similares a aquellos presentes en el receptor Mi-1.2, que fue detectado en tomate de cáscara en respuesta a la infestación con mosca blanca (5 dpi), lo cual apoya la hipótesis que existe una estrategia molecular conservada presente en jitomate y jitomate y *P. philadelphica* para confrontar a mosca blanca, áfidos y nematodos. Los resultados aquí mostrados, al igual que el análisis del transcriptoma de *P. peruviana* podrán ser utilizados en el manejo y control de la marchitez vascular causada por *Fusarium* (Enciso-Rodríguez *et al.* 2013). Varios genes de inmunidad en plantas, reportados en *P. peruviana*, presentan la arquitectura típica de genes de resistencia, o genes R, incluyendo receptores tipo cinasa (RLK) y otros con motivos TIR-NBS-LRR y CC-CNBS-LRR. La riqueza de genes *R* presentes en *P. peruviana* y, probablemente también en *P. philadelphica*, sugiere que algunos genes *R* y sus homólogos, además del gen tipo *Mi-1.2* presente en tomate de cáscara, se asocian con resistencia a mosca blanca, similar a lo reportado para áfidos (Smith y Boyko 2007).

La regulación negativa de los genes que codifican para proteínas cinasas, que son reguladores clave de manera habitual de las respuestas de resistencia de la planta, fueron determinados a los 5 dpi, resultado que plantea la posibilidad de que la mosca blanca sea capaz de suprimir las respuestas defensivas de la planta para facilitar su infestación. De la misma forma, la regulación positiva de un cotransportador de calcio: sodio, podría ser una estrategia adicional para reducir los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el floema, a fin de evitar la obstrucción de los tubos cribosos dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . En este sentido, se argumenta que la disminución

en los niveles de transcrito de un gen que codifica para una proteína de la familia de proteínas con afinidad a  $\text{Ca}^{2+}$ , conocidas como “mano de EF”, representara una respuesta de contraataque de la planta, para aumentar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el floema.

Acorde a la literatura, los genes *OSM* y *SCP* se expresan normalmente en condiciones asociadas con daño mecánico, con tratamientos con etileno y AJ, o en respuesta a herbivoría por insectos masticadores de hoja (Xu *et al.* 1994; Ryan 2000; Kessler y Baldwin 2002); en el presente trabajo, fueron sorprendentes los altos niveles de expresión de los genes *OSM* y *SCP* en plantas infestadas con *T. vaporariorum*. En arroz se detectó un incremento en los niveles de transcrito del gen *OsBISCPL1* en respuesta a tratamientos con BTH o AS (Liu *et al.* 2008). La sobreexpresión del mismo gen en *Arabidopsis* generó resistencia contra *P. syringae* pv. *tomato*, patógeno biotrófico, con lo cual se determinó que su expresión está controlada a través de la ruta de señalización dependiente de AS. De la misma forma, la sobreexpresión de una proteína tipo osmotina-1 de chile (CaOSM1) en *Arabidopsis* suprimió la proliferación de *P. syringae* pv. *tomato* debido a un incremento en la inducción de muerte celular y acumulación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Choi *et al.* 2013). Considerando lo anterior es válido proponer que el aumento en la expresión de éstos dos genes en *P. philadelphica* en respuesta a mosca blanca podría determinar su participación en el proceso de defensa contra herbívoros que se alimentan de floema, a través de la vía de señalización del AS. Tal vez, los diferentes tiempos utilizados de muestreo de tejido foliar utilizados en los ensayos de inducción no pudieron ser comparados con los resultados reportados en otros trabajos por lo que será necesario el desarrollo de un experimento adicional para aclarar estos resultados.

En conclusión, la información que aquí se presentó, amplía la comprensión sobre las respuestas de defensa inducidas que operan contra la infestación de mosca blanca en *P. philadelphica* y especies relacionadas. Esta información puede ayudar a establecer estrategias más eficientes para el control de mosca blanca y otras plagas de insectos perjudiciales similares en tomate de cáscara.

## VIII. CONCLUSIONES

*Physalis philadelphica* modificó su expresión génica en respuesta a la infestación por mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*). En respuesta a mosca blanca se incrementaron los niveles de transcritos de genes relacionados con estrés biótico, síntesis o degradación de proteínas y modificación de pared celular. En contraste, se identificó un decremento en genes relacionados con fotosíntesis.

Los tiempos de infestación considerados (5 o 15 dpi) presentaron respuestas de defensa diferenciales. Además, el perfil de expresión de los genes de respuesta identificados fue diferente para cada tiempo.

Las respuestas de defensa identificadas en *P. philadelphica* con respecto a mosca blanca, presentaron cierto grado de similitud con la reacción defensiva a nematodos, áfidos y mosca blanca en jitomate (*S. lycopersicum*).

Se observaron diferencias en los patrones de expresión de genes de *P. philadelphica* asociados a defensa en respuesta al daño generado por insectos pertenecientes a diferentes gremios alimenticios.

## IX. LITERATURA CITADA

- Achuo, E. A., E. Prinsen and M. Höfte. 2006. Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. *Plant Pathol.* 55:178-186.
- Ahn, I. P., S. Kim and Y. H. Lee. 2005. Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance. *Plant Physiol.* 138:1505-1515.
- Baldwin, I. T., R. Halitschke, A. Kessler and U. Schittko. 2001. Merging molecular and ecological approaches in plant-insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology.* 4:351-358.
- Bardner, R. and K. E. Fletcher. 1974. Insect infestations and their effects on the growth and yield of field crops: a review. *Bull Entomol Res.* 64:141-605.
- Berlinger, M. J. 1986. Host plant resistance to *Bemisia tabaci*. *Agric. Ecosyst. Environ.* 17:69-82.
- Bilgin, D. D., J. A. Zavala, J. Zhu, S. J. Clough, D. R. Ort and E. H. DeLucia. 2010. Biotic stress globally down-regulates photosynthesis genes. *Plant Cell Environ.* 33:1597-1613.
- Bock, M. A., P. J. Sanchez, L. J. McKee and M. Ortiz. 1995. Selected nutritional and quality analyses of tomatillo (*Physalis ixocarpa*). *Plant Food Hum. Nutr.* 48:127-133.
- Broin, M., S. Cuiné, G. Peltier and P. Rey. 2000. Involvement of CDSP 32, a drought-induced thioredoxin, in the response to oxidative stress in potato plants. *FEBS Lett.* 467:245-248.
- Byrne, D. N. and W. B. Miller. 1990. Carbohydrate and amino acid composition of phloem sap and honeydew produced by *Bemisia tabaci*. *J. Insect Physiol.* 36:433-439.
- Calyecac-Cortero, H.G., J. Cibrián-Tovar, M. Soto-Hernández and R. García-Velasco. 2007. Isolation and identification of *Physalis philadelphica* LAM. Volatiles. *Agrociencia.* 41:337-346.
- Carrapia, R. V. E. 2008. Taxonomía y diagnosis. pp 7-18. *In: L.D. Ortega A. (Coordinadora) Moscas blancas (temas selectos sobre su manejo).* Colegio de posgraduados-Mundi prensa. México.

- Casassola, A., S. Brammer, M. Soares Chaves, J. Martinelli., M. Grando and N. Denardin. 2013. Gene Expression: A Review on Methods for the Study of Defense-Related Gene Differential Expression in Plants. *Am. J. Plant. Sci.* 4:64-73.
- Chepyshko, H., C. P. Lai, L. M. Huang, J. M. Liu and J. F. Shaw. 2012. Multifunctionality and diversity of GDSL esterase/lipase gene family in rice (*Oryza sativa* L. *japonica*) genome: new insights from bioinformatics analysis. *BMC Genomics.* 13:309.
- Choi, D. S., J. K. Hong and B. K. Hwang. 2013. Pepper osmotin-like protein 1 (CaOSM1) is an essential component for defense response, cell death, and oxidative burst in plants. *Planta.* 238:1113-1124.
- Chou, H. H. and M. H. Holmes. 2001. DNA sequence quality trimming and vector removal. *Bioinformatics.* 17:1093-1104.
- Coemans, B., Y. Takahashi, T. Berberich, A. Ito, H. Kanzaki, H. Matsumura, H. Saitoh, S. Tsuda, S. Kamoun, L. Sági, R. Swennen and R. Terauchi. 2008. High-throughput in planta expression screening identifies an ADP-ribosylation factor (ARF1) involved in non-host resistance and R gene-mediated resistance. *Mol. Plant Pathol.* 9:25-36.
- Da X., K. Yu, S. Shen, Y. Zhang, J. Wu and H. Yi. 2012. Identification of differentially expressed genes in a spontaneous altered leaf shape mutant of the navel orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Plant Physiol. Biochem.* 56:97-103.
- Diatchenko, L., Y. F. Lau, A. P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Lukyanov, N. Gurskaya, E. D. Sverdlov, and P. D. Siebert. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 12:6025-6030.
- De la Torre-Almaráz, R., M. Salazar-Segura and R. A. Valverde. 2003. Etiology of husk tomato (*Physalis ixocarpa* B.) Yellow Mottle in México. *Agrociencia.* 37:277-289.
- Dombrowski, J. E. 2003. Salt stress activation of wound-related genes in tomato plants. *Plant Physiol.* 132:2098-2107.
- Doubnerová, V., A. Jirasková, M. Janošková, K. Muller, P. Bařková, H. Synková, N. Čerovská and H. Ryřlavá. 2007. The activity and isoforms of NADP-malic enzyme in *Nicotiana benthamiana* plants under biotic stress. *Gen. Physiol. Biophys.* 26:281-289.
- Dubey, N. K., R. Goel, A. Ranjan, A. Idris, S. K. Singh, S. K. Bag, K. Chandrashekar, K. D. Pandey, P. K. Singh and S. V. Sawant. 2013. Comparative transcriptome analysis of

- Gossypium hirsutum* L. in response to sap sucking insects: aphid and whitefly. BMC Genomics. 14:241.
- Earley, K., M. R. Smith, R. Weber, B. D. Gregory and R. S. Poethig. 2010. An endogenous F-box protein regulates ARGONAUTE1 in *Arabidopsis thaliana*. Science. 1:15.
- Enciso-Rodríguez, F. E., C. González, E. A. Rodríguez, C. E. López, D. Landsman, L. S. Barrero and L. Mariño-Ramírez. 2013. Identification of immunity related genes to study the *Physalis peruviana*-*Fusarium oxysporum* pathosystem. PloS ONE. 8:e68500.
- Estrada-Hernández, M. G., J. H. Valenzuela-Soto, E. Ibarra-Laclette and J. P. Délano-Frier. 2009. Differential gene expression in whitefly *Bemisia tabaci*-infested tomato (*Solanum lycopersicum*) plants at progressing developmental stages of the insect's life cycle. Physiol. Plant. 137:44-60.
- Fridborg, I., J. Grainger, A. Page, M. Coleman, K. Findlay and S. Angell. 2003. TIP, a novel host factor linking callose degradation with the cell-to-cell movement of Potato virus X. Mol. Plant-Microbe Interact. 16:132-140.
- Fischer, G., P. Almanza-Merchán y D. Miranda. 2014. Importancia y cultivo de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.). Rev. Bras. Frutic. 36:1-15.
- Garzón-Martínez, G. A., Z. Zhu, D. Landsman, L. S. Barrero, L. Mariño-Ramírez. 2012. The *Physalis peruviana* leaf transcriptome: assembly, annotation and gene model prediction. BMC Genomics. 13:151.
- Goyer, A. 2010. Thiamine in plants: aspects of its metabolism and functions. Phytochemistry 71:1615-1624.
- Hamada, A. M. and L. M. V. Jonsson. 2013. Thiamine treatments alleviate aphid infestations in barley and pea. Phytochemistry. 94:135-141.
- Heidel, A. J. and I. T. Baldwin. 2004. Microarray analysis of salicylic acid- and jasmonic acid-signalling in responses of *Nicotiana attenuata* to attack by insects from multiple feeding guilds. Plant Cell Environ. 27:1362-1373.
- Hong, J.K., H. W. Choi, I. S. Hwang and B. K. Hwang. 2007. Role of a novel pathogen-induced pepper C3-H-C4 type RING-finger protein gene, CaRFP1, in disease susceptibility and osmotic stress tolerance. Plant Mol. Biol. 63:571-588.
- Howe, G. A. and G. Jander. 2008. Plant immunity to insect herbivores. Ann. Rev. Plant Biol. 59:41-66.

- Huang X. and A. Madan. 1999. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9:868-877.
- Huang, X., Y. Li, Q. Niu and K. Zhang. 2007. Suppression Subtractive Hybridization (SSH) and its modifications in microbiological research. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:753-60.
- Hundertmark, M. and D. K. Hinch. 2008. LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics.* 9:118.
- Inbar, M. and D. Gerling. 2008. Plant-mediated interactions between whiteflies, herbivores, and natural enemies. *Annu. Rev. Entomol.* 53:431-448.
- INEGI .2014. Balanza comercial de mercancías de México: anuario estadístico 2013: exportaciones dólares/Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México. 1090p.
- Jones, D. R. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *Eur. J. Plant Pathol.* 109:195-219.
- Karban, R. and I. T. Baldwin. 1997. Induced responses to herbivory. University of Chicago Press. Chicago. 330p.
- Kempema, L. A., X. Cui, F. M. Holzer and L. L. Walling. 2007. Arabidopsis transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. *Plant Physiol.* 143:849-865.
- Kessler, A. and I. T. Baldwin. 2002. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Ann. Rev. Plant Biol.* 53:299-328.
- Khajuria, C., H. Wang, X. Liu, S. Wheeler, J. C. Reese, M. El Bouhssini, R. J. Whitworth and M. S. Chen. 2013. Mobilization of lipids and fortification of cell wall and cuticle are important in host defense against Hessian fly. *BMC Genomics.* 14:423.
- Kim, W.Y., Z. Ali, H. J. Park, S. J. Park, J. Y. Cha, J. Perez-Hormaeche, F. J. Quintero, G. Shin, M. R. Kim, Z. Qiang, L. Ning, H. C. Park, S. Y. Lee, R. A. Bressan, J. M. Pardo, H. J. Bohnert and D. J. Yun. 2013. Release of SOS2 kinase from sequestration with GIGANTEA determines salt tolerance in Arabidopsis. *Nat. Commun.* 4:1352.
- Kirchhausen, T. 2000. Three ways to make a vesicle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:187-198.
- Koornneef, A. and C. M. J. Pieterse. 2008. Cross talk in defense signaling. *Plant Physiol.* 146:839-844.
- Lamb, C. J., M. A. Lawton, M. Dron and R. A. Dixon. 1989. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56: 215-224.

- Leung, J. and J. Giraudat. 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:199-222.
- Li, L., Li, C., Lee, G. I., & Howe, G. A. 2002. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:6416–6421.
- Li, P., L. Chen, Y. Zhou, X. Xia, K. Shi, Z. Chen and J. Yu. 2013. Brassinosteroids-induced systemic stress tolerance was associated with increased transcripts of several defence-related genes in the phloem in *Cucumis sativus*. *PloS ONE.* 8:e66582.
- Liu, H., X. Wang, H. Zhang, Y. Yang, X. Ge and F. Song. 2008. A rice serine carboxypeptidase-like gene OsBISCPL1 is involved in regulation of defense responses against biotic and oxidative stress. *Gene.* 15:57-65.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods.* 25:402-408.
- Lukyanov, S. A., D. Rebrikov, A. and A. Buzdin. 2007. Chapter 3. Suppression subtractive hybridization. A. Buzdin and S. Lukyanov (Eds.). *IN: Nucleic Acids Hybridization.* 53-84 pp.
- Lü, B., W. Sun, S. Zhang, C. Zhang, J. Qian, X. Wang, R. Gao and H. Dong. 2011. HrpNEA induced deterrent effect on phloem feeding of the green peach aphid *Myzus persicae* requires AtGSL5 and AtMYB44 genes in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biosci.* 36:123-137.
- Lytle, B. L., J. Song, N. B. de la Cruz, F. C. Peterson, K. A. Johnson, C. A. Bingman, Jr G. N. Phillips and B. F. Volkman. 2009. Structures of two *Arabidopsis thaliana* major latex proteins represent novel helix-grip folds. *Proteins.* 76:237-243.
- Lytovchenko, A., N. Schauer, L. Willmitzer and A. R. Fernie. 2005. Tuber-specific cytosolic expression of a bacterial phosphoglucomutase in potato (*Solanum tuberosum* L.) dramatically alters carbon partitioning. *Plant Cell Physiol.* 46:588-597.
- Maldonado, E., A. L. Pérez-Castorena, C. Garcés and M. Martínez. 2011. Philadelphicalactones C and D and other cytotoxic compounds from *Physalis philadelphica*. *Steroids.* 76:724-728.
- Maleck, K., A. Levine, T. Eulgem, A. Morgan, J. Schmid, K. A. Lawton, J. L. Dang, and R. A. Dietrich. 2000. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.* 26:303-410.

- Maloney, V. J., A. L. Samuels and S. D. Mansfield. 2012. The endo-1,4- $\beta$ -glucanase Korrgan exhibits functional conservation between gymnosperms and angiosperms and is required for proper cell wall formation in gymnosperms. *New Phytol.* 193:1076-1087.
- Mayer, R. T., M. Inbar, C. L. McKenzie, R. Shatters, V. Borowicz, U. Albrecht, C. A. Powell and H. Doostdar. 2002. Multitrophic interactions of the silverleaf whitefly, host plants, competing herbivores, and phytopathogens. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 51:151-169.
- Mithöfer, A. and W. Boland. 2012. Plant defense against herbivores: Chemical aspects *Annu. Rev. Plant Biol.* 63:431-450.
- Mondego, J. M., M. P. Duarte, E. Kiyota, L. Martínez, S. R. de Camargo, F. P. De Caroli, B. S. Alves, S. M. Guerreiro, M. L. Oliva, O. Guerreiro-Filho and M. Menossi. 2011. Molecular characterization of a miraculin-like gene differentially expressed during coffee development and coffee leaf miner infestation. *Planta.* 233:123-137.
- Morales, F. J. 2003. The whitefly *Trialeurodes vaporariorum* as a potential constraint to the development of sustainable cropping systems in the mesothermic valleys of the Bolivian highlands. Technical report, Tropical Whitefly IPM Project. 11p.
- Moran, P.J. and G. A. Thompson. 2001. Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways. *Plant Physiol.* 125:1074-1085.
- Moreno, J. M., R. Martín and C. Castresana. 2005. *Arabidopsis* SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress. *Plant J.* 41:451-463.
- Muniz, J., A. A. Kretschmar, L. Rufato, T. R. Pelizza, A. De Rossi Rufato and T. A. de Macedo. 2014. General aspects of *Physalis* cultivation. *Cienc. Rural.* 44:964-970.
- Mur, L. A. J., P. Kenton, R. Atzorn, O. Miersch and C. Wasternack. 2006. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant. Physiol.* 140:249-262.
- Nicot, N., J. Hausman, Hoffmann and D. Evers. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 56:2907-2914.

- Padmanabhan, P. and S. V. Sahi. 2011. Suppression subtractive hybridization reveals differential gene expression in sunflower grown in high P. *Plant Physiol Biochem.* 49:584e591.
- Peña, L. A. 2001. Situación actual y perspectivas de la producción y mejoramiento genético de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot) en México. Memoria del 1er Simposio Nacional de Técnicas Modernas de Producción de Tomate, Papa y otras Solanaceas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coah México. Conferencia 06:1-10.
- Petzold, J., C. Brownie and F. Gould. 2009. Effect of *Heliothis subflexa* herbivory on fruit abscission by *Physalis* species: the roles of mechanical damage and chemical factors. *Econ Entomol.* 34:603-613.
- Puthoff, D. P., F. M. Holzer, T. M. Perring and L. L. Walling. 2010. Tomato pathogenesis-related protein genes are expressed in response to *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia tabaci* biotype B feeding. *J. Chem. Ecol.* 36:1271-1285.
- Qubbaj, T., A. Reineke and C. P. W. Zebitz. 2005. Molecular interactions between rosy apple aphids, *Dysaphis plantaginea*, and resistant and susceptible cultivars of its primary host *Malus domestica*. *Entomol. Exp. Appl.* 115:145-152.
- Quintana-Camargo, M., L. Mendez-Moran, R. Ramirez-Romero, C. M. Gurrola-Diaz, V. Carapia-Ruiz, E. Ibarra-Laclette, J. P. Delano-Frier and C. Sanchez-Hernandez. 2015. Identification of genes differentially expressed in husk tomato (*Physalis philadelphica*) in response to whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) infestation. *Acta Physiol. Plant.* 37:29.
- Ramos, N. E., A. F. Neto, S. Arsénio, E. Mangerico, L. Stigter, E. Fortunato, J. E. Fernandes, A. M. P. Lavadinho and D. Louro. 2002. Situation of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* in protected tomato crops in Algarve (Portugal). *EPPO Bull* 32:11-15.
- Reca, I. B., A. Brutus, R. D. Avino, C. Villard and D. Bellincampi. 2008. Molecular cloning, expression and characterization of a novel apoplasmic invertase inhibitor from tomato (*Solanum lycopersicum*) and its use to purify a vacuolar invertase. *Biochimie.* 90:1611-1623.

- Rojo, E, R. Solano and J. J. Sanchez-Serrano. 2003. Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *J. Plant Growth Regul.* 22:82-98.
- Ryan, C. A. 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta.* 1477:112-121.
- Sakia, R. M. 1992. The Box-Cox transformation technique: a review. *Statistician.* 41:169-178.
- Saltzmann, K. D., M. P. Giovanini, C. Zheng and Williams. 2008. Virulent Hessian fly larvae manipulate the free amino acid content of host wheat plants. *J. Chem. Ecol.* 34:1401-1410.
- Schenk, P. M., K. Kazan, I. Wilson, J. P. Anderson, T. Richmond, S. C. Somerville and J. M. Manners. 2000. Coordinated plant defense responses in arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:11655-11660.
- SIAP. 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de la producción agrícola por cultivo. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> consultado el 7 de julio de 2015.
- Simbaqueba, J., P. Sánchez, E. Sanchez, V. M. Núñez Zarantes, M. I. Chacon, L. S. Barrero and L. Mariño-Ramírez. 2011. Development and Characterization of Microsatellite Markers for the Cape Gooseberry *Physalis peruviana*. *PloS ONE* 6: e26719.
- Singh, A., I. K. Singh and P. K. Verma. 2008. Differential transcript accumulation in *Cicer arietinum* L. in response to a chewing insect *Helicoverpa armigera* and defence regulators correlate with reduced insect performance. *J. Exp. Bot.* 59:2379-2392.
- Smith, C. M. and E. V. Boyko. 2007. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomol. Exp. Appl.* 122:1-16.
- Thompson, G. A. and F. L. Goggin. 2006. Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects. *J. Exp. Bot.* 57:755-766.
- van der Hoorn, R. A. and J. D. Jones. 2004. The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:400-407.
- Vargas, P. O., D. M. Martínez y P. D. Dávila A. 2003. La familia Solanaceae en Jalisco: el género *Physalis*. Volumen 16. Colección Flora de Jalisco. Universidad de Guadalajara. 129p.

- Walling, L. L. 2000. The myriad plant responses to herbivores. *J. Plant Growth Regul.* 19:195-216.
- Walling, L. L. 2008. Avoiding effective defenses: Strategies employed by phloem-feeding insects. *Plant Physiol.* 46:859-866.
- Wang, Z., M. Gerstein and M. Snyder. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomic. *Nat. Rev Genet.* 10:57-63.
- Wang, L., L. He, J. Li, J. Zhao, Z. Li and C. He. 2014. Regulatory change at *Physalis* Organ Size 1 correlates to natural variation in tomatillo reproductive organ size. *Nat. Commun.* 5:4271.
- Wang, L., J. Li, J. Zhao and C. He. 2015. Evolutionary developmental genetics of fruit morphological variation within the Solanaceae. *Front. Plant Sci.* 6:248.
- Wang, L., L. Zhichao and H. Chaoying. 2012. Transcriptome-wide mining of the differentially expressed transcripts for natural variation of floral organ size in *Physalis philadelphica*. *J. Exp. Bot.* 63:6457-6465.
- War, A. R., M. G. Paulraj, T. Ahmad, A. A. Buhroo, B. Hussain, S. Ignacimuthu and H. C. Sharma. 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav.* 7:1306-1320.
- Wei, J., X., Hu, J. Yang and W. Yang. 2012. Identification of single-copy orthologous genes between *Physalis* and *Solanum lycopersicum* and analysis of genetic diversity in *Physalis* using molecular markers synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *PloS One* 7:e5016.
- Will, T. A., C.U. Furch and M. R. Zimmermann. 2013. How phloem-feeding insects face the challenge of phloem-located defenses. *Front. Plant Sci.* 4:336.
- Wu, J. and I. T. Baldwin. 2010. New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annu. Rev. Genet.* 44: 1-24.
- Xu, Y., P. F. L. Chang, D. Liu, M. L. Narashiman, K. G. Raghothama, P. M. Hasegawa, and R. A. Bressan. 1994. Plant defence genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* 6:1077-1085.
- Yamamoto, R.T. 1964. Mass rearing of the tobacco hornworm II. Larval rearing and pupation. *J. Econ. Entomol.* 62:1427-1431.

- Yang, J. W., H-S Yi, H. Kim, B. Lee, S. Lee, S-Y Ghim and C-M. Ryu. 2011. Whitefly infestation of pepper plants elicits defence responses against bacterial pathogens in leaves and roots and changes the below-ground microflora. *J. Ecol.* 99:46-56.
- Yin, H., F. Yan, J. Ji, Y. Li, R. Wang and C. Xu. 2011. Proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* leaves infested by tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) B biotype. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 30:379-390.
- Zamora-Tavares, P., O. Vargas-Ponce, J. Sanchez-Martínez and D. Cabrera-Toledo. 2014. Diversity and genetic structure of the husk tomato (*Physalis philadelphica* Lam.) in Western Mexico. *Genet. Resour. Crop. Ev.* 62:141-153.
- Zarate, S.I., L. A. Kempema and L. L. Walling. 2007. Silverleaf whitefly induces salicylic acid responses and represses effectual jasmonic responses in arabidopsis. *Plant Physiol.* 143:866-875.
- Zhang, P. J., C. Broekgaarden, S. J. Zheng, T. A. Snoeren, J. J. van Loon, R. Gols and M. Dicke. 2013. Jasmonate and ethylene signaling mediate whitefly-induced interference with indirect plant defense in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 197:1291-1299.
- Zhang, J-S., J. Zhao, S. Zhang S and C. He. 2014. Efficient gene silencing mediated by tobacco rattle virus in an emerging model plant *Physalis*. *PloS ONE* 9:e85534.
- Zhu-Salzman, K., B. Jian-Long and L. Tong-Xian. 2005. Molecular strategies of plant defense and insect counter-defense. *Insect Sci.* 12:3-15.
- Zhu-Salzman, K., D. S. Luthe and G. W. Felton. 2008. Arthropod-inducible proteins: broad spectrum defenses against multiple herbivores. *Plant Physiol.* 146:852-858.

## ANEXOS

Descripción detallada del protocolo del kit PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech, Palo Alto, CA) utilizado para la obtención de los fragmentos diferenciales.

### **Anexo 1**

*Síntesis de primer y segunda cadena de ADNc*

#### a) Primera cadena de ADNc

Para cada una de las muestras se preparó en un tubo la mezcla que a continuación se detalla:

ARNm (2 µg)	2-4 µl
Oligo de síntesis de ADNc (10 mM)	1 µl

Se mezclaron los componentes, se dio un pulso en la centrífuga y se incubó a 70 °C por 2 min y posteriormente 2 min/hielo. A cada tubo se le agregó la siguiente mezcla de reacción:

Buffer de síntesis de la primera cadena de ADNc5x	2 µl
Mezcla de dNTPs (10 mM cada uno)	1 µl
H <sub>2</sub> O estéril	1 µl
AMV transcriptasa inversa (20 u/ml)	1 µl

Se mezcló y se dio un pulso en la centrífuga. Se incubó a 42 °C por 1.5 h. Se puso en hielo y se realizó la síntesis de la segunda cadena.

## b) Segunda cadena de ADNc

Se agregaron los siguientes componentes a cada uno de los tubos de reacción:

H <sub>2</sub> O estéril	48.4 µl
Buffer de la segunda cadena 5×	16 µl
Mezcla de dNTPs (10 mM)	1.6 µl
Cocktail de enzimas de la segunda cadena 20×	4.0 µl

Se incubaron a 16 °C por 2 h. Se agregaron 2 µl de T4 DNA polimerasa y se incubaron a 16 °C por 30 min. Se adicionaron 4 µl de EDTA/glicógeno 20 × para terminar la reacción. Se agregaron 100 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v). Se agitó y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a temperatura ambiente y se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio. Se adicionaron 100 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v), se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a temperatura ambiente y transfirió la fase acuosa a un tubo limpio. Se agregaron 40 µl de NH<sub>4</sub>OAc 4M y 300 µl de etanol al 95 %. Se centrifugó a 13000 por 20 min a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µl de etanol al 80 %. Se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante. Se dejó secar la pastilla y se re-suspendió en 50 µl de agua estéril.

## **Anexo 2**

### *Digestión con la enzima Rsa I*

#### Preparación de la muestra control o driver

Para cada muestra se agregaron los siguientes componentes en un tubo:

Mezcla de digestión del ADNc.

ADNc doble cadena	43.5 µl
Buffer de restricción de <i>Rsa</i> I 10 ×	5.0 µl
<i>Rsa</i> I (10 u/ µl)	1.5 µl

Se mezclaron e incubaron a 37 °C por 1.5 h. Se agregaron 2.5 µl de EDTA/glicógeno 20 × para terminar la reacción y se limpió la muestra con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v), cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v), se precipitó con NH<sub>4</sub>OAc con etanol al 95 % y se lavó con etanol al 80 %, siguiendo el procedimiento del paso anterior. Se re-suspendió la pastilla en 5.5 µl de agua estéril. Estas muestras digeridas se utilizaron como *driver* para la sustracción de los fragmentos diferenciales.

### Anexo 3

#### *Ligación de adaptadores*

##### Preparación de la muestra problema (infestada) o tester

Se tomó 1 µl de solución *driver* y se diluyó con 5 µl de agua estéril. Para cada una de las muestras se preparó la siguiente mezcla de reacción en un tubo de 0.5 ml:

Mezcla para ligación de adaptadores

H <sub>2</sub> O	3 µl
Buffer de ligación	2 µl
DNA ligasa T4	1 µl

Para cada una de las muestras se prepararon dos *testers* (cada uno con un adaptador diferente). Se mezclaron los siguientes componentes:

Mezcla para preparación del *tester*

	<i>tester 1</i>	<i>tester 2R</i>
ADNc doble cadena digerido y diluido	2 µl	2 µl
Adaptador 1 ( <i>tester 1</i> )	2 µl	-----
Adaptador 2R ( <i>tester 2R</i> )	-----	2 µl
Mezcla para ligación de adaptadores	6 µl	2 µl

Se agitaron y se dio un pulso en la centrifuga. En un tubo nuevo se mezclaron 2 µl de cada uno de los *testers* (control no sustraído). Se incubaron a 16 °C toda la noche. Se agregó 1 µl de EDTA/glicógeno para terminar la reacción y se inactivó la ligasa calentando a 70 °C. Se

diluyó el control no sustraído en 1 µl de H<sub>2</sub>O estéril para usarse como control en la amplificación.

#### **Anexo 4**

##### *Hibridaciones*

Para cada sustracción se realizaron dos hibridaciones (hibridación 1 e hibridación 2R), con cada uno de los *testers* (*tester 1* y *tester 2R*). Se mezclaron los componentes mostrados a continuación:

##### a) Primera hibridación

Componentes	Hibridación 1	Hibridación 2R
<i>Driver</i>	1.5 µl	1.5 µl
<i>tester 1</i>	1.5µl	-----
<i>tester 2</i>	-----	1.5 µl
Buffer de hibridación 4 ×	1 µl	1.0 µl

Se desnaturalizaron a 98 °C por 1.5 min y se incubaron a 68 °C por 8 h.

##### b) Segunda hibridación

Se preparó una mezcla bajo los siguientes lineamientos:

Dilución del driver para la segunda hibridación.

<i>Driver</i>	1 µl
Buffer de hibridación	1 µl
H <sub>2</sub> O estéril	2 µl

Se tomó 1 µl de la mezcla y se desnaturalizó a 98 °C por 1:30 min y se mezcló con las muestras de hibridación 1 y 2R, al mismo tiempo, sin quitar la primeras hibridaciones del incubador a 68 °C. Éstas se dejaron incubando toda la noche a 68 °C; se agregaron 200 µl de

buffer de dilución y calentaron 7 min a 68 °C (**Muestras sustraídas**). Se enfriaron y se guardaron a -20 °C.

## Anexo 5

### *Amplificación de los fragmentos diferenciales*

Para cada una de las muestras sustraídas se realizaron dos rondas de amplificación para enriquecer los fragmentos diferenciales utilizando la enzima *Advantage2<sup>R</sup> Polymerase Mix* (Clontech).

#### a) 1<sup>ra</sup> Amplificación.

Se realizó la primera amplificación de los fragmentos diferenciales utilizando la mezcla y condiciones que a continuación se presentan.

Mezcla para la primera amplificación de los fragmentos diferenciales.

H <sub>2</sub> O estéril	16.5 µl
Buffer de reacción 2S	2.5 µl
dNTPs (10 mM)	0.5 µl
Primer PCR 1	1.0 µl
50 × Advantage Mix	0.5 µl
Muestra sustraída	4.0 µl

**Nota:** Por cada sustracción se realizó también la amplificación de la muestra no sustraída como control.

Condiciones de la primera amplificación de los fragmentos diferenciales.

Llenado de extremos	75 °C	5 min	
Desnaturalización	94 °C	2 min	
Amplificación	94 °C	30 s	32 ciclos
	66 °C	30 s	
	72 °C	1:30 min	

## b) 2<sup>da</sup> Amplificación

La segunda amplificación se llevó a cabo tomando 4 µl de una dilución 1:10 de la primera amplificación como templado con la mezcla y condiciones siguientes:

Mezcla de la segunda amplificación de los fragmentos diferenciales.

H <sub>2</sub> O	15.5 µl
Buffer	2.5 µl
dNTPs	0.5 µl
<i>Nested primer 1</i>	1.0 µl
<i>Nested primer 2R</i>	1.0 µl
50 × <i>Advantage mix</i>	0.5 µl
Muestra de la 1 <sup>ra</sup> amp	4.0 µl

Secuencia de nucleótidos de los primers anidados (nested):

Primer anidado 1 5'-TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3'

Primer anidado 2R 5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'

Condiciones de la segunda amplificación de los fragmentos diferenciales.

94 °C	5 min	
94 °C	30 s	
68 °C	30 s	
72 °C	1:30 min	15 ciclos
72 °C	15 min	

## Anexo 6

### Edición de secuencias

Ejemplo de Secuencia de nucleótidos identificada por medio de HSS con primers anidados

```
NNNNNNNNNNNNNGNNGGCTCGAGTTTTTCNGCAGA[TCGCGGCCGCCCCGCGGCA]
[GGT]ACCCTGAGTGAACCAGGGCATTACCAATTATATTAGCAACACATTGGATTG
GGTGACATTTTCCAGGTCCAGGCTTAGTTGGGCCAAAAGACATAGGGATGTTGAA
TCCATCGATAACCGAAATGTCCCAGAAATCCAGGTTGCTGAATTGGTTCAAGGCG
TATTCGGCTAAGGTGTTTGGTGGTCTACCCCATCCTTTGCATTCAAGGACTCCGCC
ACAATCACCGGTCTGGCACCAACCA[ACCTCGGCCGCACCACGCCT]GAATCTTTCT
```

Secuencia editada (número de accesión en Genbank: JZ476528):

```
CAGGCTTAGTTGGGCCAAAAGACATAGGGATGTTGAATCCATCGATAACCGAAAT
GTCCCAGAAATCCAGGTTGCTGAATTGGTTCAAGGCGTATTCGGCTAAGGTGTTTG
GTGGTCTACCCCATCCTTTGCATTCAAGGACTCCGCCACAATCACCGGTCTGGCAC
CAACCA
```

## Anexo 7

Similitud (algoritmo Blastx) en:

a) Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

AEA86300.1 osmotin-like protein, partial (*Solanum nigrum*)

b) Solgenomics (<https://solgenomics.net/>)

SGN-U593442 osmotin-like protein (OSM34)

c) Tair (<https://www.arabidopsis.org/>)

AT4G11650.1 osmotin 34.

d) Categoría funcional en MIPS (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/>)  
<http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/>

Functional category	your gene matches	Genome matches	P-value
<b><u>34 INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT</u></b>	<b>10 entries (10.3%) (at1g01470 at1g22770 at2g01940 at2g36830 at3g12500 at3g15353 at3g23990 at3g57260 at4g11650 at5g07700)</b>	<b>1651 entries (5.81%)</b>	<b>5.52e-02</b>

