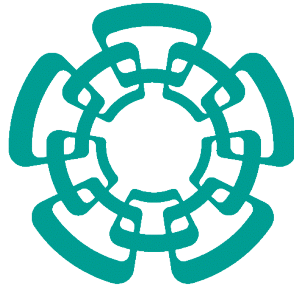


**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**



Cinvestav

**"Uso de biotecnología moderna para el
control de la mosquita blanca en plantas de
soya y tomate"**

Presenta: IBT. José Andrés Galeana López

Comité tutorial:

Dra. Beatriz Xoconostle Cázares

DBB

Dr. Roberto Ruiz Medrano

DBB

Dr. Jesús Hinojosa Moya

BUAP

Agosto, 2015

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	2
Principales plagas y enfermedades del tomate	3
Producción de tomate a nivel mundial e importancia económica en México	5
Soya (<i>Glycine max</i>).....	8
Principales plagas y enfermedades de la soya	10
Producción de soya a nivel mundial e importancia económica en México.....	12
Tricomas	15
Mosca Blanca (<i>Bemisia tabaci</i>)	22
Relación de tricomas y la oviposición de la mosca blanca en las hojas de soya y tomate	27
Obtención de variedades de soya y tomate con número reducido de tricomas (glabrata intermedias).....	29
Bondades de las mutantes.....	29
2. JUSTIFICACIÓN.....	30
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVOS	31
OBJETIVO GENERAL	31
OBJETIVOS PARTICULARES.....	31
5. METODOLOGÍA.....	32
Obtención de DNA plasmídico	32
Transformación genética de soya	33
Transformación genética de tomate	37
6. RESULTADOS	40
Propagación de variedades glabratas y pubescentes de <i>A. thaliana</i>	40
Filogenia del gen AtGL1 en soya y tomate.....	40
Extracción de RNA total para amplificar los genes candidatos.....	42
Reverso transcripción y amplificación	42
Clonación de ortólogos de GL1 en <i>Solanum lycopersicum</i>	44
Clonación de genes ortólogos a GL1 en <i>Glycine max</i>	45
Recombinación del vector de entrada al vector destino de silenciamiento pB7GW1WG2 (II) y en antisentido para el vector de sobreexpresión pB7WG2.....	46
Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa AGL1 con los vectores de sobreexpresión con las construcciones en antisentido.....	48

Genes ortólogos en vectores binarios	49
Transformación genética de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	49
□ Solyc05g008250.1	49
□ Solyc05g055030.1	60
Regeneración de explantes de soya (<i>Glycine max</i>) <i>in vitro</i>	61
□ Glyma07g16980.1	62
□ Glyma13g16890.1	65
7. DISCUSIÓN.....	67
8. CONCLUSIONES	71
9. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO	71
ANEXOS.....	72
Composición de medios de cultivo.....	72
Medios para transformación genética de soya	73
Medios para transformación genética de tomate.....	75
REFERENCIAS	78

Índice de figuras

Figura 1. Mapa hipotético de la propagación de tomate en el mundo	2
Figura 2. Participación de la producción mundial de tomate.	5
Figura 3. Principales exportadores de tomate en el 2011.	6
Figura 4. Producción nacional de tomate.	7
Figura 5. Mapa hipotético de la propagación de soya en el mundo	8
Figura 6. Producción de soya durante el 2011 a nivel mundial	12
Figura 7. Principales países importadores de soya.....	13
Figura 8. Principales estados productores de soya.....	13
Figura 9. Micrografía de <i>Nicotiana tabacum</i>	15
Figura 10. Tallos de soya pubescentes con tricomas densos, normal, rizado y glabrous.....	20
Figura 11. Enemigos naturales de <i>Bemisia tabaci</i>	26
Figura 12. Fenotipo de <i>Arabidopsis thaliana</i> glabrata y pubescente	40
Figura 13. Árbol Filogenético de GL1 de los genes de <i>A. thaliana</i> , <i>G. max</i> y <i>S. lycopersicum</i>	41
Figura 14. Electroforesis del RNA total soya y tomate.	42
Figura 15. Reverso transcripción y amplificación de los genes candidatos a ortólogos de GL1.....	43
Figura 16. Amplificación del gen Glyma13g16890.1 del segundo exón.	43
Figura 17. Comprobación del inserto por restricción de candidatos a ortólogos de GL1 en <i>Solanum lycopersicum</i>	44
Figura 18. Restricción para confirmar la orientación	44
Figura 19. Restricción para liberar inserto y confirmar la orientación del gen Glyma07g16980.1	45
Figura 20. Confirmación del gen Glyma13g16890.1 por liberación del inserto con enzimas de restricción.....	45
Figura 21. Confirmación del gen Glyma13g16890.1 por PCR punto final.	46
Figura 22. Vectores binarios de expresión en plantas.....	46
Figura 23. Confirmación por PCR del Intrón al p35S del vector de silenciamiento	47
Figura 24. PCR y digestión de los insertos en los vectores de expresión	47
Figura 25. Confirmación de la clonación en el vector de sobreexpresión con los fragmentos invertidos de Glyma07g16980.1 y Solyc05g008250.1.....	48
Figura 26. Presencia en <i>A. tumefaciens</i> del vector recombinante pB7WG2 de los genes en antisentido Glyma07g16980.1 y Solyc05g008250.1.....	48
Figura 27. Construcciones en los vectores de silenciamiento y sobreexpresión..	49
Figura 28. Eficiencia de transformación de tomate con la metodología propuesta.	49
Figura 29. PCR del p35S en las plantas transformadas con la construcción Solyc05g008250.1.....	50
Figura 30. Proceso de regeneración <i>in vitro</i> de tomate.....	50
Figura 31. Comparación de tallos en planta testigo y transformadas.....	51
Figura 32. Comparación de tricomas en hojas jóvenes tanto en haz y como en envés.....	53
Figura 33. Comparación de tricomas en hojas de mediana edad	55

Figura 34. Microscopía electrónica en plantas de tomate con el gen silenciado Solyc05g008250.1	56
Figura 35. Gráfica comparativa de la longitud de los tricomas	56
Figura 36. Gráfica comparativa del ancho de la base de los tricomas	57
Figura 37. Número de tricomas por mm ² en plantas de tomate con el gen silenciado Solyc05g008250.1	58
Figura 38. Peso promedio de frutos de plantas transformadas.....	58
Figura 39. Peso total de frutos de plantas transformadas	59
Figura 40. Comparación de altura y desarrollo de plantas transformadas en relación con el control	59
Figura 41. Regeneración de plantas con el gen silenciado Solyc05g055030.1. ..	60
Figura 42. Plántula con el gen silenciado Solyc05g055030.1 en cultivo <i>in vitro</i> ...	60
Figura 43. Proceso de regeneración <i>in vitro</i> de soya	61
Figura 43. Porcentajes de regeneración en soya del gen Glyma07g16980.1 silenciado	62
Figura 45. Plántulas de soya regeneradas del gen Glyma07g16980.1 silenciado.	63
Figura 46. Confirmación por PCR amplificando el gen Bar (500pb) de las plantas de soya que produjeron semilla.....	63
Figura 47. Fotografías comparativas de los tallos de la segunda generación de las plantas transformadas con el gen Glyma07g16980.1 silenciado	64
Figura 48. Eficiencias de regeneración en plantas de soya con el gen Glyma13g16890.1 silenciado	65
Figura 49. PCR del gen Bar en plantas transformadas con el gen Glyma13g16890.1 silenciado.	66
Figura 50. Adaptación de plantas transformadas con el gen Glyma13g16890.1 silenciado	66
Figura 51. Genes relacionados a los genes candidatos a ortólogos de GL1	69

Índice de tablas

Tabla 1. Funciones aparentes de tricomas simples, glandulares-secretorios e hidátodos.....	17
Tabla 2. Descripción de tricomas en <i>Solanum spp.</i>	19
Tabla 3. Genes candidatos a ortólogos de AtGL1	41

RESUMEN

La soya es la oleaginosa más importante del mundo, como semilla y por los productos obtenidos de ella. Por otro lado, el jitomate es el producto alimenticio de exportación más importante de México por su alto contenido nutricional. Ambos cultivos están cubiertos de tricomas en tallos y hojas, representando un sistema de defensa para estrés biótico y abiótico. Sin embargo, existen reportes que correlacionan el número de tricomas en hojas con la infestación de mosquita blanca (*Bemisia tabaci*), indicando que las variedades pubescentes (alta cantidad de tricomas) tienen una mayor tasa de oviposición, que aquellas que son glabratas. La estrategia propuesta en este estudio es el Silenciamiento Génico Post Transcripcional (PTGS) de los ortólogos de GL1 en soya y tomate, cuyos productos están asociados con la formación de tricomas, generando así variantes con diferente abundancia de tricomas desde glabrata hasta pubescentes, con el fin de disminuir la infestación por mosquita blanca.

El gen candidato a ortólogo Solyc05g008250.1 al ser silenciado en plantas de tomate, generó una reducción en número y longitud de tricomas, pero produjo un ensanchamiento en la base de los mismos. El segundo gen candidato Solyc05g055030.1 generó plantas deficientes en el crecimiento, dando un fenotipo letal. En la transformación de explantes de soya, con el silenciamiento de los genes de soya Glyma13g16890.1 y Glyma07g16980.1, el fenotipo de las Transformantes 1 no pudo ser evaluado por efecto del crecimiento en la transformación, por lo que se deberán realizar evaluaciones en las siguientes generaciones.

1. INTRODUCCIÓN

Tomate (*Solanum lycopersicum*)

El tomate o jitomate (*Solanum lycopersicum*), es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia Solanácea, proviene originalmente de América del Sur de la región andina, entre Ecuador, Bolivia, Chile y Perú. Su domesticación se llevó a cabo en México, donde fue asignado el nombre en náhuatl *xictli*, ombligo y *tomatl*, tomate, que significa tomate de ombligo. Generalmente se consideran como centros de domesticación del tomate los estados de Veracruz y Puebla, a partir de ahí fue introducido a Europa por los españoles a comienzos del siglo XVI. A finales del siglo XVIII el tomate fue introducido desde Europa a Estados Unidos de América (Jenkins, 1948; Rick, 1995; Hancock, 2004).

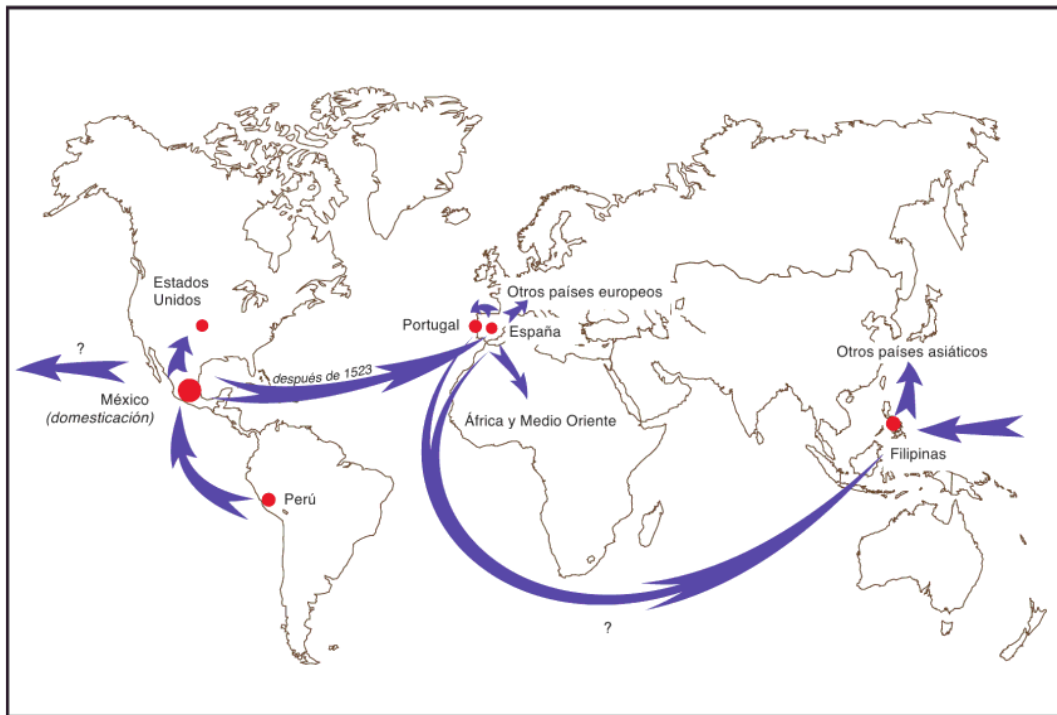


Figura 1. Mapa hipotético de la propagación de tomate en el mundo (Blancard, 2011).

La planta posee un porte erecto o semierecto, arbustivo, siendo un cultivo de tipo anual. Existen dos variedades clasificadas de acuerdo a su crecimiento, que pueden ser de crecimiento limitado (determinadas), y de crecimiento ilimitado

(indeterminadas), cuyo desarrollo se extiende de forma rastrera en este último. Sus frutos son bayas ovaladas, redondas o periformes, con tamaños variantes desde 2.5 cm y 20g de peso, hasta enormes frutos de más de 8.2 cm y 750g de peso. El tallo es anguloso, alcanza 4 cm de diámetro en su base y está recubierto por finos vellos denominados tricomas, en su mayoría de origen glandular y que le otorgan el olor característico (Maroto, 1994). En las primeras etapas es erguido, luego debido al peso, toma un hábito rastrero. Las hojas están dispuestas alternadamente sobre el tallo, se les denomina hojas compuestas, generalmente tienen de siete a nueve folíolos lobulados o dentados y también están cubiertas de tricomas (SAGARPA, 2010; Rick, 1978)

La temperatura óptima de desarrollo del tomate fluctúa entre 23°C durante el día, y entre 13 a 17°C durante la noche. Con una humedad relativa entre 60 y 80%. El sustrato adecuado se clasifica suelos profundos, margosos y bien drenados con un pH ligeramente ácido entre 6.2 y 6.8. La planta de tomate es cultivada por sus frutos comestibles, que pueden ser consumidas frescas, cocidas o procesadas. Se emplean para elaborar sopas, jugos, salsas, "catsup", pastas, purés, y polvo de tomate para almacén. Aunque el fruto es alrededor del 90 al 94% de agua, se considera buena fuente de vitamina A y vitamina C. Uno de los pigmentos que contiene, es el carotenoide licopeno, pigmento antioxidante y benéfico para la salud de quien lo consume (Rubatsky *et al.*, 1999; Cox, 2000).

Principales plagas y enfermedades del tomate

Como todos los cultivos a gran escala, presenta importantes problemas de plagas y enfermedades (Aparicio *et al.*, 1995; SYNGENTA, 2015). Entre las plagas más comunes y de mayor impacto se encuentran:

- Mosca blanca (*Bemisia tabaci*). Succiona la savia de las plantas durante toda su vida, inyecta toxinas a través de la saliva provocando amarillamiento y manchas cloróticas, trasmite gran cantidad de virus, entre los que se encuentran el virus del rizado amarillo del tomate "virus de la

cuchara", el virus del mosaico; produce daños indirectos por la mielecilla en sus excretas desarrollando fumagina. Genera daños en los cultivos de tomate que varían de un 20 a un 100%.

- Trips (*Frankliniella occidentalis*). Transmite el virus del bronceado del tomate.
- Pulgón (*Aphididae spp.*). Forma colonias y se alimenta succionando la savia de los tejidos, así como también son vectores de enfermedades virales.
- Minadores de hoja (*Liriomyza spp*). Sus larvas se desarrollan dentro de las hojas ocasionando daños graves en el tejido a lo largo de sus galerías.
- Polilla del jitomate (*Tuta absoluta*). Ataca cualquier estado de desarrollo del tomate, penetrando hojas, frutos y tallos de los que se alimentan, produciendo necrosis en el tejido afectado.
- Araña roja (*Tetranychus spp*). Produce daños directos en hojas jóvenes, alimentándose de las partes verdes de la planta, ocasionando daño producido por los estiletes y la reabsorción del contenido celular. Este daño va acompañado de una decoloración más o menos intensa de los tejidos.

Por otra parte tenemos las enfermedades en tomate, entre las que destacan:

- Oidiopsis (*Leveillula taurica*). Marchitamiento de hojas y pérdida de las mismas, quemaduras en frutos.
- Podredumbre gris (*Botrytis cinerea*). Lesiones pardas en hojas y flores, podredumbre blanda en frutos con crecimiento gris de micelio.
- Mildiu (*Phytophthora infestans*). Manchado irregular aceitoso y necrosis en hojas, afecta también frutos inmaduros exhibiendo grandes manchas pardas, vítreas de superficie y contorno irregular.
- Marchitamiento vascular (*Fusarium oxysporum*). Caída de hojas superiores, amarillamiento y muerte de hojas inferiores, así como oscurecimiento de los vasos en el tallo (AGROINFORMACIÓN, 2004; Sosa, 2013).

Producción de tomate a nivel mundial e importancia económica en México

La producción de tomate en el 2012 se distribuyó de la siguiente manera: China se ha mantenido como el principal productor de tomate con una participación del 36% y una producción de 50,000,000 toneladas, le sigue India con un 12%, Estados Unidos de América con 9%, Turquía con 8%, mientras que México ocupó el décimo lugar con un 2.5% y una producción de 3,433,567 toneladas (FAO, 2012).

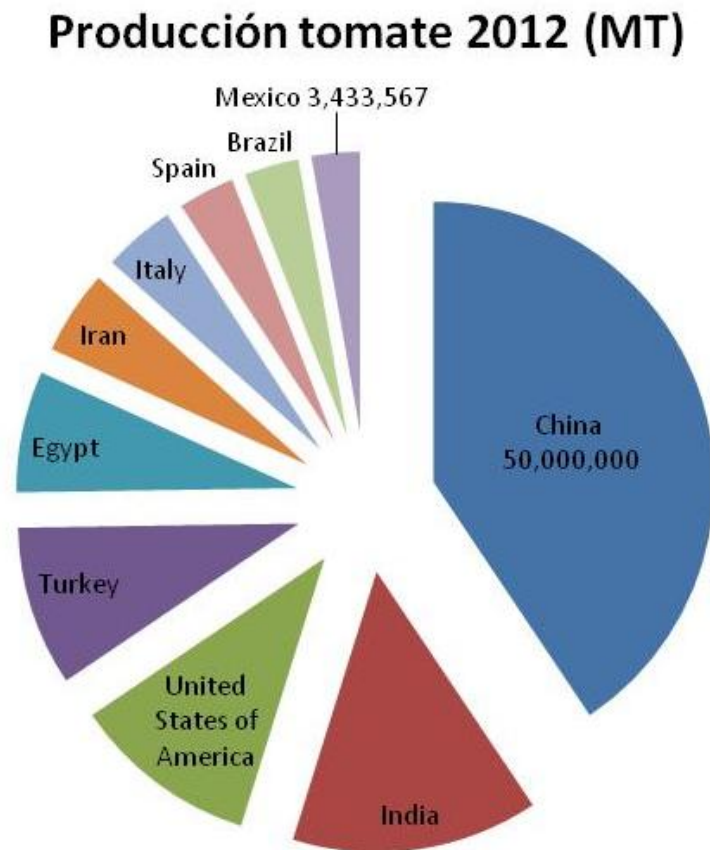


Figura 2. Participación de la producción mundial de tomate. México se posiciona en el décimo lugar (FAO, 2012).

México además se ha posicionado en el primer lugar en exportaciones de tomate, con un total de 1,493,316 toneladas, seguido de los países bajos, España y Turquía (FAO, 2012).

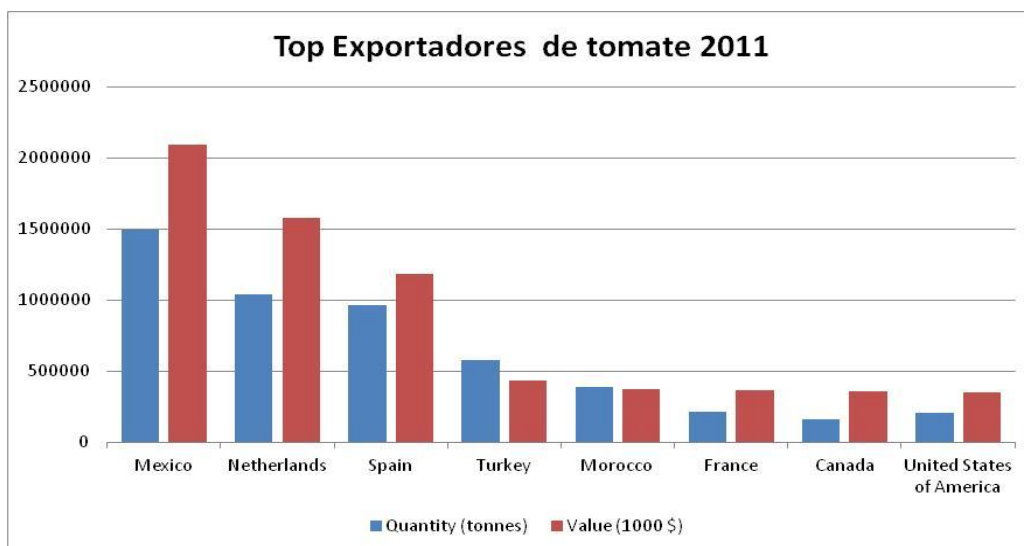


Figura 3. Principales exportadores de tomate en el 2011. México se posiciona en el primer lugar (FAO, 2012).

El tomate es el principal producto agroalimentario de exportación de México con un valor promedio anual de \$899 millones de USD en periodo 2000-2009; Norteamérica es su principal mercado con el 95% (Estados Unidos y Canadá). La oferta de tomate es grande y diversificada ya que en toda la región de Norteamérica (Estados Unidos, Canadá y México), se comercializan variedades producidas a cielo abierto, en casas sombra e invernaderos; tomates cultivados tradicionalmente en suelo, tomates hidropónicos y orgánicos, cuya presencia en el mercado es cada vez mayor. Las principales importaciones de Norteamérica provienen de México 95%, Holanda 3%, y España 1% en la participación del comercio del tomate con un valor de \$1,200 millones de USD promedio al año en periodo 2000-2009 (SAGARPA, 2009a).

En México la oferta de tomate es sustentable con producción de 2 millones de toneladas promedio al año con activos rurales de un poco más de 70 mil hectáreas dedicadas a la siembra de tomate. Los tipos de tomate más importantes producidos, tanto a campo abierto como en agricultura protegida, son: Saladette (el que más se produce), seguido por los tipos Bola, Cherry, Racimo, y otras especialidades como Mimi y Campari.

SAGARPA en el 2009a reporta que en México se produjeron 2.26 millones de toneladas de tomate, siendo el principal estado productor Sinaloa, con un 35% del total nacional, seguido de Baja California con 9%, Michoacán con 8%, San Luis Potosí con 6% y Jalisco con 5%. Se tiene producción a lo largo de todo el territorio nacional; sin embargo la zona con mayor importancia productiva es la del noroeste.

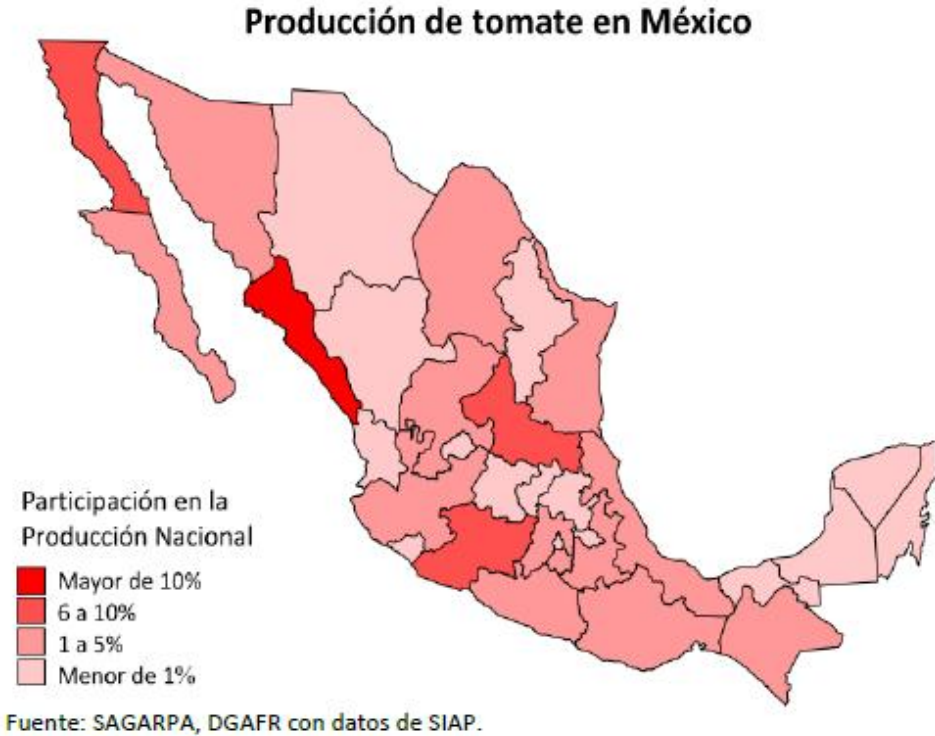


Figura 4. Producción nacional de tomate (SAGARPA, 2009a)

El cultivo de tomate se realiza durante todo el año en la República Mexicana, siendo los primeros meses del año cuando se genera el tope de la producción nacional, principalmente en el estado de Sinaloa que provee al mercado nacional y la mitad de las exportaciones a Estados Unidos de América. Durante el verano, los estados del centro y Baja California se encargan de abastecer la demanda interna y de exportación. Mientras que para los meses de invierno, el resto de los estados productores cubren ambas demandas (SAGARPA, 2009a; Lugo 2007).

Soya (*Glycine max*)

La soya (*Glycine max*), es una especie del grupo de las leguminosas, considerada la oleaginosa de mayor importancia en el mundo, como semilla y por los subproductos que se obtienen de ella. La soya es originaria de China, donde fue domesticada entre los siglos 17 y 11 antes de Cristo, y se considera como una de las cinco semillas sagradas por su importancia alimentaria. Posteriormente, se propagó la soya debido al establecimiento de rutas comerciales terrestres y marítimas. Algunos de los países en los que fue introducida son Japón, Indonesia, Filipinas, Vietnam, Tailandia, Malasia, Birmania, Nepal e India. Fue hasta la década de los 70's que la soya fue introducida a México, como uno de los primeros países latinoamericanos en desarrollar diferentes productos con soya (Torres, 2009; Soya.be, 2014).

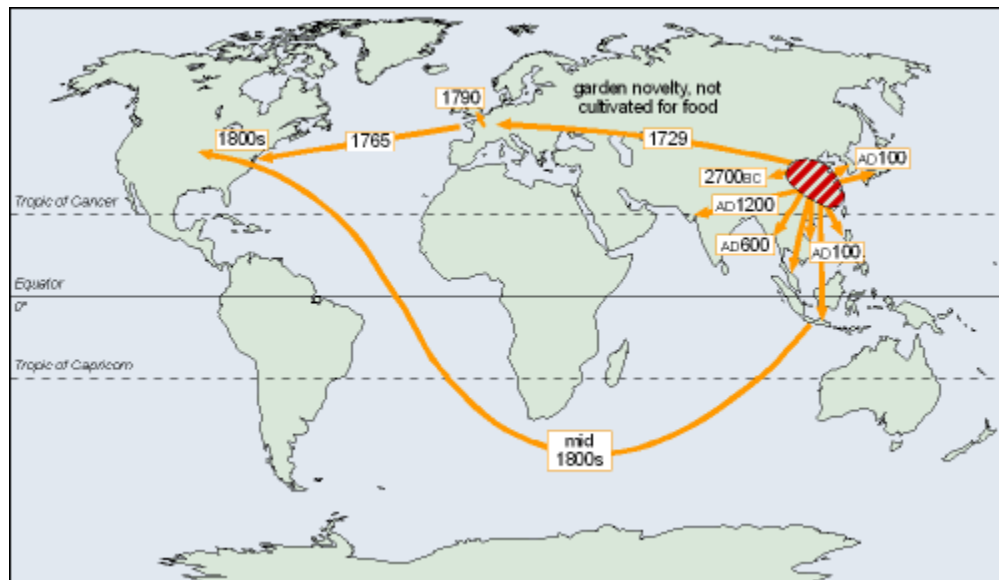


Figura 5. Mapa hipotético de la propagación de soya en el mundo (NHM, 2015).

La soya es una planta herbácea de tipo anual, de la familia *Fabaceae*, generalmente un arbusto erecto con tallos leñosos y con hojas dispuestas alternativamente, hojas que van de 3 a 10 cm de longitud. La planta de soya tiene un ciclo vegetativo de 3 a 7 meses, durante los cuales llega a alcanzar alturas de 20 a 150 cm (InfoAgro, 2015).

La planta de soya produce pequeñas flores blancas o moradas, de las cuales surgen vainas curvas de 3 a 15 cm de longitud que pueden contener entre 1 y 5 semillas. Las semillas pueden ser de una variedad de colores incluyendo amarillo, marrón, verde, negro o moteadas. La semilla es rica en proteínas y aceites pudiendo llegar hasta un 42% y 22% del peso seco, respectivamente (FinancieraRural, 2013).

Las hojas, los tallos y las vainas son pubescentes (presentan una gran cantidad de finos vellos, denominados tricomas), variando el color de los pelos de rubio a pardo más o menos grisáceo. Las hojas en desarrollo de la soya están cubiertas con ambos tipos de tricomas, glandulares y no glandulares (Franceschi and Gianquinta, 1983). Tiene un desarrollo óptimo entre los 20 y 30°C, siendo ideal mantener la temperatura próxima a 30°C. Tiene crecimiento nulo o limitado por debajo de los 10°C, mientras que temperaturas mayores a 40°C aceleran su crecimiento de manera indeseada, causando daños en la floración y reduciendo la retención de las vainas. Las temperaturas óptimas de siembra rondan los 15 a 18°C, y 25°C para la floración. Así mismo, la soya es una planta sensible al fotoperiodo, acostumbrada a días cortos necesarios para la floración (Martin, 1998).

La soya no requiere de suelos ricos en nutrientes, por lo que es una opción de cultivo en regiones poco fertilizadas; debido a su asociación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico. Se desarrolla en suelos neutros ligeramente ácidos con un pH entre 6 y 7. Es sensible a encharcamientos, por lo que no es recomendable hacer uso de suelos arcillosos, mientras que en suelos arenosos requerirá de riego constante. La soya presenta cierta tolerancia a la salinidad (Nafziger,2008).

Toda la planta es aprovechable, por lo que se hace uso integral de tallos y hojas como forraje, las plantas jóvenes se pueden comer como ensaladas, las semillas maduras se consumen como leguminosa. Sin embargo, los usos más importantes los da la semilla de soya que son la obtención de aceite, harina y lecitina.

Principales plagas y enfermedades de la soya

Fernández y Rosales (1986) citan 22 plagas específicas para el cultivo de soya, y 10 plagas generalizadas, de las cuales sólo unas pocas son de importancia económica. Dentro de las principales plagas tenemos:

- Mosquita blanca (*Bemisia tabaci*). Homóptero muy pequeño que se desarrolla sus colonias en el envés de las hojas, causando daño directo al chupar la savia de la planta huésped (afectando hasta en un 100% la producción de variedades susceptibles) y daños indirectos por la transmisión de enfermedades virales (por ejemplo geminivirus), además favorece a la proliferación de fumagina por la mielecilla en sus excretas.
- Gusano terciopelo (*Anticarsia gemmatalis*). Lepidóptero que ataca el follaje durante su estadio larval, causando daños de forma irregular en las hojas, pudiendo acabar con todo el follaje de la planta.
- Pulgón (*Aphis sp.*). Causa daño en hojas y brotes.
- Araña roja (*Tetranychus bimaculatus*). Ataca brotes jóvenes, dando un color característico, pudiendo llegar a defoliar toda la plantación.
- Gardama (*Laphygma exigua*). Produce daños importantes en las hojas, durante el estado larval de este lepidóptero.
- Trips (*Calyothrips brasiliensis*). Chupan la savia, produciendo un engrosamiento en las nervaduras y una coloración plateada.

Las enfermedades más relevantes en los cultivos de soya son marchiteces causadas por hongos y síntomas en las hojas causados por virus:

- Roya asiática (*Phakopsora*). Se inicia en hojas con puntos pequeños verde grisáceos o plomizo, posteriormente se tornan necróticos de color café oscuro o marrón.

- Mancha anillada (*Corynospora cassiicola*). Inicialmente se manifiesta con manchas necróticas de coloración café rodeadas de un halo amarillo, luego estas manchas crecen hasta 10mm de diámetro formando anillos.
- Antracnosis (*Colletotrichum truncatum*). Causa manchas necróticas en cotiledones y seguido de la muerte de plántulas. Semillas fuertemente infectadas presenta manchas deprimidas color castaño-oscuro.
- Mosaico común o sangrado de hilio (VMCS). Reduce el tamaño de las vainas, el tamaño de la planta, y el número de nódulos en las raíces. Las hojas cambian de color en forma de mosaico y se vuelven arrugadas. En semillas se forman manchas café o negras. (Ramos; 2004; Syngenta, 2013; SantaCruz, 2011)

Producción de soya a nivel mundial e importancia económica en México

La mayor producción de soya se concentra en tres países, Estados Unidos de América, Brasil y Argentina con un 82%, que equivale a más de 188 millones de toneladas reportado en el 2012 por la FAO. Siendo además estos tres países junto con Paraguay los principales exportadores de soya sumando un total del 95% a nivel mundial.

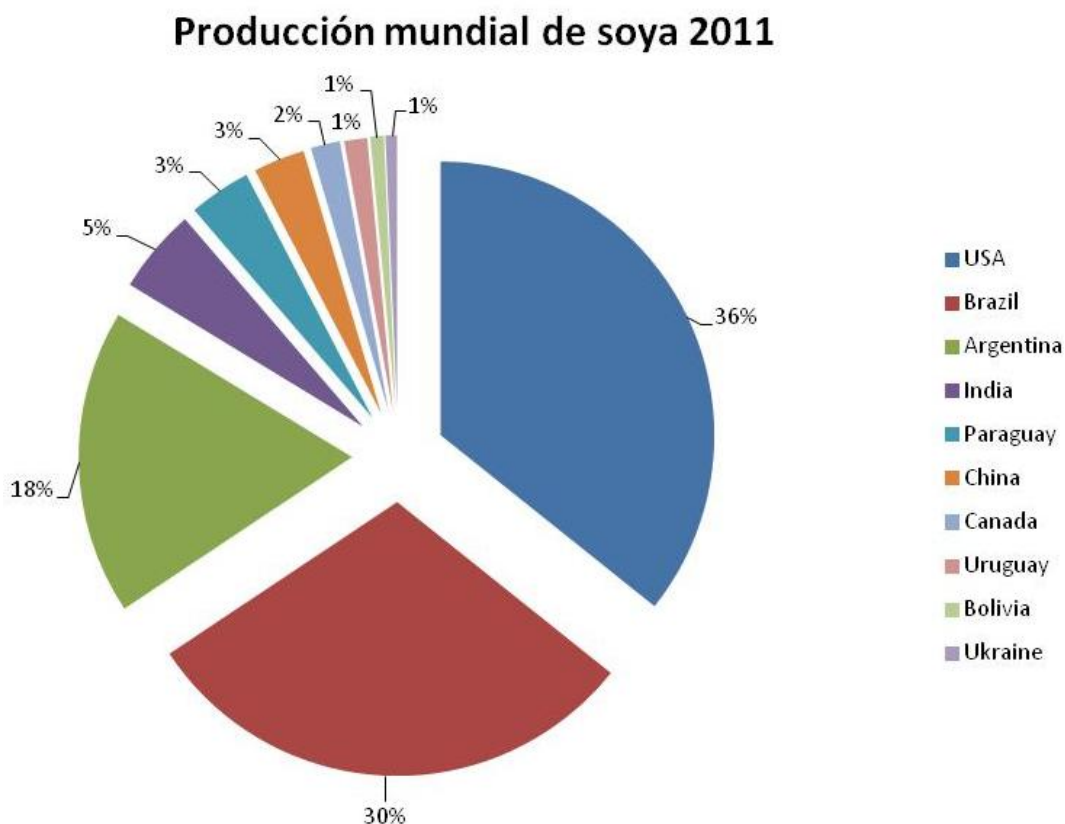


Figura 6. Producción de soya durante el 2011 a nivel mundial (FAO, 2011).

México no se destaca por su producción en soya, siendo además considerado el tercer importador de soya a nivel mundial, después de China y Japón. Las importaciones de México equivalen al 4% de la soya que se comercializa a nivel mundial y en el 2011, se estima que México importó 3.3 millones de toneladas, destinando 98% al sector pecuario, debido a que la producción interna es menor (FAO, 2011).

Importaciones a nivel mundial (MT)

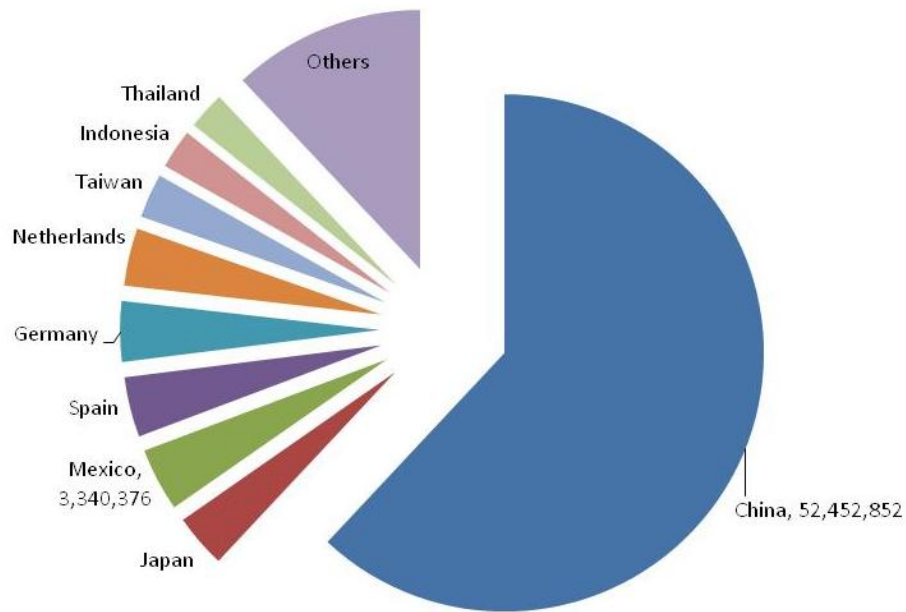


Figura 7. Principales países importadores de soya (FAO, 2011).

Durante el 2008, en México produjeron 153 mil toneladas de soya que equivale al 4.3% del consumo total en el país, por lo que el resto procede de otros países para saciar la demanda nacional. Los principales estados productores son Tamaulipas, Chiapas y San Luis Potosí aportando un 87% del total producidos durante ese año (SAGARPA, 2009b).

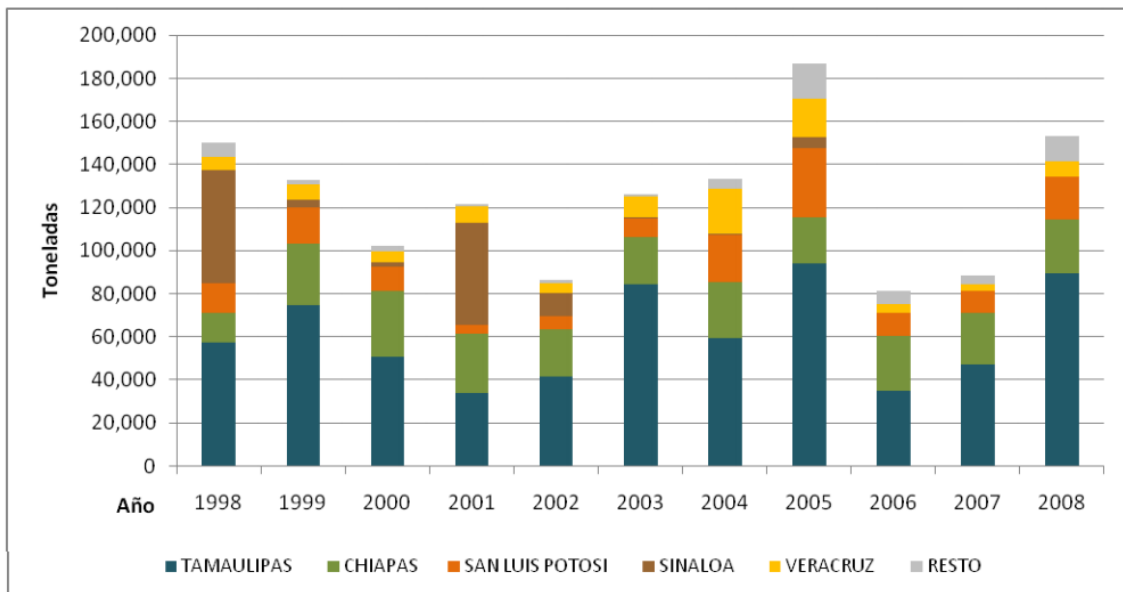


Figura 8. Principales estados productores de soya en el periodo de 1998 al 2008 (SAGARPA, 2009b).

Para el 2008, se tienen registradas un total de 83,093 hectáreas destinadas para la producción de soya en México, de las cuales el 58% corresponde al terreno destinado por Tamaulipas, un 14% por Chiapas y un 11% por San Luis Potosí (SAGARPA, 2009b).

La época de siembra óptima para el cultivo de soya en México comprende entre el 15 de Junio y el 15 de Julio, que es cuando ocurren las lluvias. Si se realiza la siembra antes de estas fechas, el costo por aspersión resulta demasiado elevado. Para el periodo otoño-invierno, se recomienda sembrar entre el 1 al 20 de noviembre, ya que posterior a esta fecha se llegan a presentar graves problemas de plagas que afectan gravemente a la producción (SAGARPA, 2010a; INIFAP, 2014).

La soya tiene múltiples usos, principalmente el uso de sus semillas y su transformación en harina proteica para elaborar alimentos balanceados de consumo animal (Goldberg, 2008). Su producción aumenta aceleradamente a nivel mundial, ya que contribuye en gran parte a la nutrición humana en general, directa o indirectamente, por su elevado contenido de aceites y proteínas. La producción en México aún es baja, por el manejo de campo que aún tiene y por la cantidad de plagas que llegan a atacar los cultivos (Torres and Tovar, 2009).

Tricomas

Los tricomas en plantas fueron las primeras estructuras anatómicas descritas bajo el microscopio, y han jugado una pieza clave en la taxonomía de plantas (Behnke, 1984). Los tricomas han sido definidos como protuberancias de la epidermis que se distinguen por su grosor y altura. Los tricomas se clasifican en dos tipos generales: "simples" o no glandulares y "glandulares-secretorios".

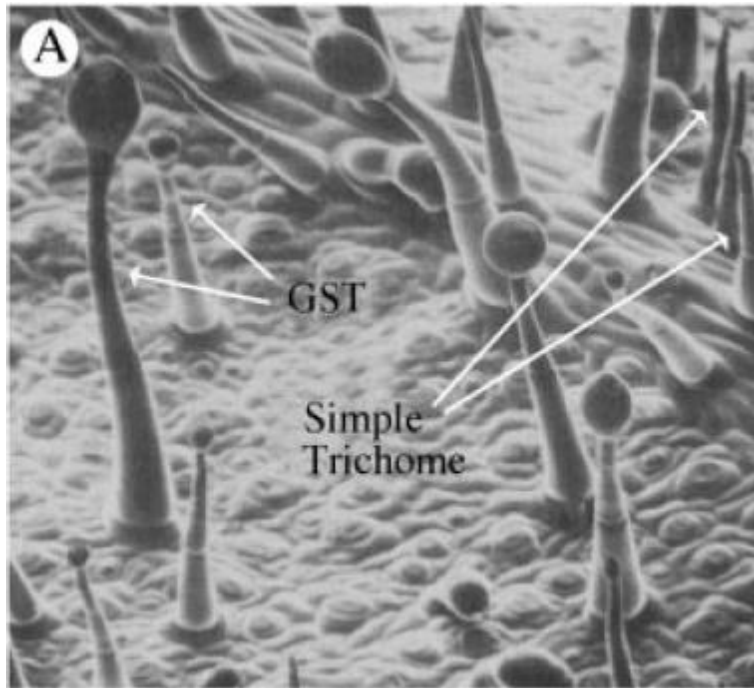


Figura 9. Micrografía de *Nicotiana tabacum*, superficie de la hoja mostrando tricomas glandulares secretorios (GST) y tricomas simples 110x. (Wagner, 2004)

Los tricomas glandulares-secretorios producen a menudo secreciones en la superficie de la planta fuera de la cutícula o bien, se almacenan en glándulas. La morfología de ambos tipos de tricomas varía ampliamente según sea la planta que los posea; por ejemplo algunos tricomas presentan glándulas de sal especializadas, laticíferas, nectarias, de resina o glándulas digestivas (Uphof, 1962; Dell and McComb, 1978; Fahn, 2000; Kronstedt, 1991; Werker, 2000).

Los tricomas simples están presentes en las superficies aéreas de la mayoría de las angiospermas y en algunas gimnospermas y briofitas (Uphof, 1962; Johnson, 1975). En angiospermas, los tricomas se encuentran en hojas, pétalos, tallos,

peciolos, pedúnculos y cubierta de semillas, dependiendo de la especie. Los tricomas glandulares se encuentran en alrededor del 30% de las plantas vasculares (Dell and McComb, 1978; Fahn, 2000).

Los tricomas simples son de utilidad tanto para las plantas como para los humanos en diferentes formas. Las características morfológicas y mecánicas de los tricomas, como su densidad, tamaño, forma, textura superficial y orientación, pueden influenciar en diversos aspectos de la fisiología vegetal y la ecología. Tanto tricomas simples y glandulares se pueden presentar en distintos estadios en el desarrollo de órganos, o al llegar la senescencia cuando los órganos alcanzan su madurez, mientras que en otras permanecen durante toda la vida de la planta. Los tricomas muertos pueden continuar su función de absorción de agua y protección abrasiva (Werker, 2000). Las vellosidades pueden proteger contra insectos en algunas plantas hasta que los fitoquímicos de defensa son producidos (Johnson, 1975). Mientras que los tricomas simples no producen sustancias que repelan insectos, su importancia no deja de ser relevante, tanto para las plantas como para los humanos, un ejemplo claro de ello es el algodón, formado por tricomas simples en los óvulos de la planta de algodón.

Los tricomas glandulares-secretorios poseen la misma influencia de los tricomas simples en relación a la densidad, tamaño y orientación, además de ofrecer defensa contra enfermedades y plagas por efecto de los fitoquímicos secretados. Un ejemplo de ello son los tricomas glandulares en tabaco, los cuales pueden llegar a producir un 17% del peso seco como exudado, y llegan a acumular grandes cantidades de cristales de oxalato de calcio en sus glándulas, sustancia altamente tóxica para las plagas.

Tabla 1. Funciones aparentes de tricomas simples, glandulares-secretorios e hidátodos (Wagner *et al.*, 2004)

FUNCIONES APARENTES	TIPO DE TRICOMA	REFERENCIA
Reduce el movimiento de insectos	TS y TGS	Levin, 1973; Johnson, 1975; Kessler, 2002; Kennedy, 2003
Regulación de temperatura	TS y TGS	Johnson, 1975; Dell and McComb, 1978; Ehleringer, 1984
Aumenta el reflejo luminoso	TS y TGS	Ehleringer, 1984
Reduce la pérdida de agua a través de reflexión	TS y TGS	Ehleringer, 1984
Reduce la abrasión mecánica	TS y TGS	Uphof, 1962; Johnson, 1975
Protección de los organismos del filoplano	TS y TGS	Beattie and Lindow, 1999
Reducción de la humedad en la hoja	TS y TGS	Brewer and Smith, 1997
Reducción de fotosíntesis a través de reflexión	TS y TGS	Ehleringer, 1984
Dispersión de semillas y establecimiento	TS y TGS	Uphof, 1962; Werker, 2000
Homeostasis de Ca ⁺⁺ en epidermis	TS y TGS	DeSilva et al., 2001
Colecta de polen y dispersión	TS y TGS	Uphof, 1962; Werker, 2000
Disuasión de insectos y herbívoros	TGS	Johnson, 1975; Kelsey et al., 1984; Wollenweber, 1984; Bennett and Wallsgrave, 1994; Berenbaum, 1995
Inmovilización de insectos	TGS	Kennedy, 2003
Toxicidad a hongos y bacterias	TGS	Johnson, 1975; Behnke, 1984
Atracción de polinizadores	TGS	Werker, 2000
Secreción de iones y metales contaminantes	TGS	Salt et al., 1995; Choi et al., 2001; Kupper et al., 2000
Retención de agua y disminuye la desecación en semillas	TGS	Werker, 2000
Alelopatía	TGS	Macias et al., 1999; Werker, 2000
Asistir la escalada y el establecimiento de semillas	TS	Uphof, 1962; Werker, 2000
Absorber agua y nutrientes	TS	Uphof, 1962; Sakai et al., 1980; Werker, 2000
Guía a polinizadores	TS	Johnson, 1975
Secreción de agua y iones	HT	Johnson, 1975; Aloni et al., 2003

* TS = Tricomas Simples, TGS= Tricomas Glandulares Secretores, HT= Hidátodos







Las bases genéticas de la producción de tricomas han sido exploradas a detalle en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, trabajos recientes indican que el desarrollo de tricomas y la producción de los mismos ha evolucionado repetidamente entre las angiospermas. Existen diversos reportes sobre los factores bióticos y abióticos que influyen para la generación de tricomas. Por ejemplo, la producción inducida de tricomas con el aumento de ácido jasmónico en *Arabidopsis*; de igual forma el daño producido por insectos herbívoros está relacionado negativamente con la producción de tricomas (Agren and Schemske 1993; Mauricio 1998; Valverde et al. 2001; Hare and Elle 2002; Handley et al. 2005). Y para el caso puntual del fenotipo glabrata de *Arabidopsis lyrata*, se sabe que recibe mayor daño por insectos herbívoros que los fenotipos que producen tricomas conocidos como pubescentes (Løe et al. 2007).


Los estudios genéticos básicos en la iniciación de tricomas han identificado genes que controlan la entrada a la vía de producción de tricomas y al control para la separación de eventos de iniciación. La pérdida de funciones en mutantes de *Arabidopsis thaliana* sugieren que los genes GLABROUS (GL1) y TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1) son importantes para los eventos de iniciación y de separación de los tricomas en hojas. GL1 codifica un factor de transcripción MYB que es expresado de en el desarrollo de las hojas (Oppenheimer et al. 1991). TTG1 se expresa en la mayoría de los órganos de la planta, que codifica para la proteína contenida/repetida WD-40, y es necesaria para la iniciación celular de tricomas en hojas, en la formación de raíces sin vellosidades, biosíntesis de antocianina en hojas, y formación de la cubierta mucilaginosa en semillas germinantes (Koornneef 1981; Walker et al. 1999). Para la iniciación normal de tricomas, son necesarios los genes GLABROUS3 (GL3) y en ENHANCER OF GLABRATA3 (EGL3), que codifican la proteína en hélice-bucle-hélice (bHLH) (Payne et al. 2000; Zhang et al. 2003). GL1 y TTG1 tienen la capacidad de limitar la iniciación de tricomas junto a otros genes como CAPRICE (CPC) y TRIPTYCHON (TRY) que son conocidos por promover el destino de las raíces velludas (Szymanski et al. 2000; Schiefelbein 2003). El gen GLABROUS2 (GL2)

regula cuantitativamente la frecuencia en la iniciación de tricomas y está envuelto en la determinación de separación de tricomas y el desarrollo de vello radicular (Ohashi and Oka 2002), pero está también asociado en el control de acumulación de aceites en las semillas (Shen *et al.* 2006). Así, diversos productos de genes se encuentran involucrados en la iniciación y separación de tricomas, y también se encargan de regular otros rasgos fenotípicos, lo que puede limitar la evolución de los genes y sus características.

La morfología de los tricomas en *Solanum spp* fue descrita originalmente por Luckwill (1943) y posteriormente revisada por Channarayappa *et al.* (1992). Típicamente, se consideran ocho tipos de tricomas, de los cuales 4 (Tipo I, IV, VI y VII) son tricomas glandulares capitados (con forma de cabeza) y cuatro (Tipo II, III, V y VII) son no glandulares. De los tricomas glandulares, tipo I y IV son capitados, mientras que el tipo VI y VII son globulares. Es importante resaltar que hasta el momento no se ha encontrado un gen ortólogo a GL1 en tomate.

Tabla 2. Descripción de tricomas en *Solanum spp.* (Glas *et al.*, 2012)

Tipo	Descripción
I 	Tricoma glandular que consiste en 6-10 células y 2-3mm de longitud. Base globular y multicelular con una célula glandular pequeña y redonda en la punta del tricoma.
II 	Tricoma similar al I pero no glandular y más corto (0.2-1.0mm). Base globular y multicelular.
III 	Tricoma delgado no glandular que consiste en 4-8 células y 0.4-1.0 mm de longitud con una base unicelular plana. Las paredes externas sin secciones intercelulares.
IV 	Similar al tricoma I, pero más corto (0.2-0.4mm) y con una célula glandular pequeña. La base del tricoma es unicelular y plana.
V 	Similar al tipo IV con respecto a la altura y grosor pero no glandular.
VII 	Tricoma glandular muy pequeño (0.05mm) con una cabeza que consiste en 4-8 células.

VIII		Tricoma no glandular compuesto de una célula basal y abultada con una inclinación en la punta de la célula.
------	---	---

El género *Glycine* (Leguminosae) exhibe una variedad de tricomas uni- y multicelulares, en los órganos vegetativos, tanto secretores como no secretores (Akers *et al.*, 1978; Franceschi and Giaquinta, 1983; Retallack and Willson, 1988) y florales (Guard, 1931; Bernard and Singh, 1969; French 1987; Gunasinghe *et al.*, 1988; Healy *et al.*, 2005). En específico, un cultivar diploide de soya llamado Clark tiene alrededor de ocho líneas isogénicas: glabrous, puberulentas, punta afilada vello ralo, denso 1, denso 2, extra denso y normal; que exhiben una variedad de tricomas asociados con el Gineceo (órganos reproductivos femeninos).

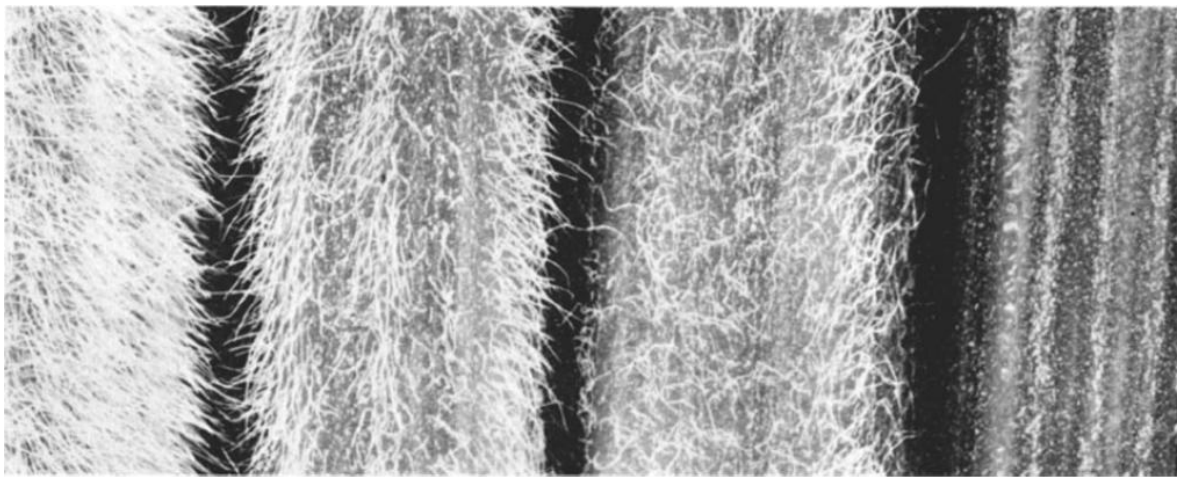


Figura 10. Tallos de soya pubescentes con tricomas densos, normal, rizado y glabrous (de izquierda a derecha) (Bernard, 1969).

Healy *et al.* (2005), describen 3 tipos de tricomas en soya asociados al Gineceo: Unicelulares, de paredes delgadas y no secretoras; multicelulares, pared gruesa y no secretoras; y multicelulares y secretoras. Bernard y Singh (1969) clasificaron sus líneas Pi (glabrous), Pc (rizado pubescente), Pd (denso pubescente), Ps (escaso pubescente), y P2 (puberulentas). Se han demostrado que las líneas Clark y Harosoy de soya muestran ventajas y desventajas agronómicas, incluyendo rendimiento y peso en las semillas (Spech *et al.*, 1985; Hunt, 2009; Singh *et al.*, 1997). De igual forma es importante resaltar que los estudios de los

genes involucrados en el desarrollo de tricomas en soya aún no se tiene muy dilucidado, a excepción de los genes GL2, TTG1 y CPC (Çelik *et al.*, 2014). Variedades glabras (carentes de tricomas) no parecen tener desventajas competitivas cuando se crecen en campo, mostrando una fenología similar a las variedades pubescentes (Taggar & Gill 2012).

Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*)

La mosca blanca, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (*Homóptera: Aleyrodidae*), se ha convertido en una de las plagas con mayor impacto a nivel mundial, afectando más de 500 especies de plantas en las que se incluyen cultivos anuales, ornamentales, frutales y malezas; su distribución abarca desde Asia, África, América, Europa, Rusia, Australia y las Islas del Pacífico (Latif and Akhter, 2013). Una gran cantidad de hortalizas que actúan como huésped de esta plaga son de gran importancia económica como el tomate, soya, algodón, girasol, melón, berenjena, entre otras. (Byrne *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1995; Evans, 2008). La mosca blanca genera daños directos, indirectos y actúa predominantemente como vector viral del género Begomovirus (*Geminiviridae*) (Cohen, 1990; Brown and Bird, 1992; Torres *et al.*, 1996).

Los daños directos provocados por la mosca blanca, se producen por la succión de la savia en la planta huésped por cada uno de los estadios de desarrollo del insecto. Durante este proceso se inyectan toxinas a través de la saliva, lo que genera el debilitamiento de la planta y manchado clorótico. En infestaciones intensas se deshidrata todo el tejido afectado, se merma el crecimiento y se ve afectada la producción de los cultivos (Byrne *et al.*, 1990).

Las afectaciones indirectas producidas por la mosca blanca, se deben a la secreción de melazas (excesos de hidratos de carbono) en sus excretas, que favorece a la proliferación y asentamiento de fumagina (*Cladosporium sp.*) en hojas, flores y frutos; lo que genera asfixia vegetal, reducción en actividad fotosintética, menor calidad en frutos y gastos de comercialización (Brown *et al.*, 1995).

Bemisia tabaci, actúa como vector de una gran cantidad de virus, entre los que destaca un buen número de ellos que afectan los cultivos tratados en este trabajo, tales como:

- Virus del rizado amarillo en hojas de tomate (TYLCV).
- Virus del mosaico amarillo de tomate (TYMV).
- Virus del rizado en hoja de tomate (TLCV).
- Chino del tomate (CdTV).
- Virus del mosaico dorado del tomate (TGMV).
- Virus enano amarillo del tomate (TYDV).
- Virus del rizado en hojas de chile (LCChV).
- Virus del mosaico francés amarillo en frijol (YMFVB).
- Virus del moteado en tomate (TMOV).

De las anteriores, el primero es en la actualidad el más extendido y recalcitrante en áreas mediterráneas, al originar un frenado total en el desarrollo de las plantas afectadas; el virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) o virus de la cuchara, es de introducción reciente, de forma persistente y circulativa, siendo adquirido tanto por larvas como adultos de mosca blanca, al alimentarse de floema de las plantas infectadas. Los adultos son capaces de transmitir el virus antes de las 17 horas después de su primer ingestión, siendo infectivos durante de 8 a 20 días (Latif and Akhter, 2013).

La distribución de la mosca blanca comprende áreas tropicales entre los paralelos treinta, siendo las regiones tropicales y subtropicales, con una altitud de 0 a 1500 metros sobre el nivel del mar, así como los climas semiáridos los ideales para el crecimiento óptimo de esta plaga. Sin embargo, durante las estaciones de lluvia las poblaciones se ven drásticamente reducidas (Duarte, 1992).

El biotipo B de *Bemisia tabaci* o "Poinsettia", se detectó por primera vez en Estados Unidos, Arizona; que se cree que procede de Irak o Pakistán. Este biotipo se extendió rápidamente hacia otras zonas agrícolas como el Valle Imperial de California, Estados Unidos, generando pérdidas de 90 millones de dólares, y hasta el 60% de la producción en cultivos de ajonjolí y algodón (Aguirre and Soria, 1993). Este biotipo fue reconocido en 1980 en las áreas productoras de tomate del

estado de Sinaloa, México, como uno de los más severos por la infección viral que trasmite y por ende, su impacto económico (Brown *et al*, 1992).

Durante el año de 1994, en el Valle del Fuerte, Sinaloa, la mosca blanca causó siniestros totales del 10% de la superficie sembrada de soya (López, 1995). En el sur de Sonora, se vieron afectadas drásticamente 127 mil hectáreas de soya por la mosca blanca, disminuyendo el rendimiento de 2.1 a 1.3 ton/ha; y para 1995 sólo 27 mil hectáreas fueron destinadas a la producción de soya (Ortega, 1999).

En Sinaloa, la mosca blanca genera pérdidas mayores a 80% en superficies de tomate que se establecen en etapas tardías (enero, febrero, marzo, etc.), época en que se incrementa la población del insecto, ocasionando una fuerte incidencia de virosis en este cultivo (Avilés, 1997).

La mosca blanca tiene varias etapas de desarrollo, comenzando por un huevecillo depositado en el envés de las hojas que eclosiona después de 7 a 10 días; posteriormente pasa por cuatro instares ninfales hasta que llega a ser adulto. El primer instar es fácilmente reconocible, ya que es el único que tiene movilidad, conocido también como instar "caminante o gateador"; una vez que encuentra un lugar ideal para su alimentación, la ninfa se instala insertando su estilete para alimentarse de la savia hasta cumplir su desarrollo. Los siguientes estados se diferencian solamente por el tamaño de la ninfa hasta el cuarto instar, denominado "pupa", donde se hacen notorios los ojos con un color rojizo, así como un aspecto corporal abultado y un color blanco pálido. Los adultos son de color amarillo, con secreciones de una cera polvorienta blanca que les cubre el cuerpo, principalmente el dorso, dándoles una apariencia blanca. El tiempo promedio desde la ovoposición hasta el estado adulto es de 17 a 21 días, siendo el tiempo más corto a temperaturas de 32°C (Hilje, 1992a).

La reproducción puede ser tanto sexual o asexual (partenogénesis), por lo que las hembras no necesitan un macho para poder dejar progenie, situación que favorece a su proliferación en los cultivos. Las hembras adultas llegan a depositar

entre 30 a 500 huevecillos a lo largo de su vida, la cual puede durar hasta dos meses (Hilje, 1992b).

El uso de insecticidas ha sido la primera línea de defensa contra la mosca blanca y su rol como plaga directa y vector viral en la mayoría de las regiones a nivel mundial. Desafortunadamente, los primeros insecticidas usados para el control convencional de la mosca blanca fueron productos de amplio espectro aplicados solos o en mezcla con organofosforados y pirenoles, conocidos como cocteles (Liete *et al.*, 2005). Sin embargo, la mosca ha desarrollado resistencia genética a estos insecticidas y se han tenido que desarrollar otros para su control eficiente (Perumal *et al.*, 2009). Otra característica interesante es que la plaga al estar protegida por tricomas hidrófobos, no llega a estar en contacto con los insecticidas de base acuosa.

Otra estrategia para el control de la mosca blanca, es el uso de trampas amarillas pegajosas, que sirven para monitorear y reducir las poblaciones en los campos de cultivo. Las trampas se distribuyen dentro de los cultivos, tanto número como sea posible, con un promedio de 20 trampas por hectárea separadas a 10 o 15m entre sí. Se han registrado capturas promediadas de 420 adultos/trampa a la semana y 26,880 adultos en 16 trampas al mes, presentando productos con menos contaminación de agroquímicos (Prada *et al.*, 1992).

Se han detectado diversos enemigos naturales de la mosca blanca, de los cuales se han detectado al menos 20 especies de depredadores y parasitoides que afectan a *B. tabaci* tanto en sus estados ninfales como adultos (Fig 11). La mayoría son depredadores como *Crysoperla sp.* y *coccinelidos*, y su asociación con la mosca blanca puede ser fortuita. Sin embargo, aunque se conoce gran cantidad de especies que puedan llegar a afectar a esta plaga, es aún incierta la forma de usar varios de estos controles biológicos de forma eficiente (Gerling, 1986). En Cd. Obregón, Sonora, es común la liberación de *Chrysoperla carnea*, con buenos resultados sin afectar la fauna benéfica presente en el área; así como el uso de repelentes a base de plantas aromáticas.

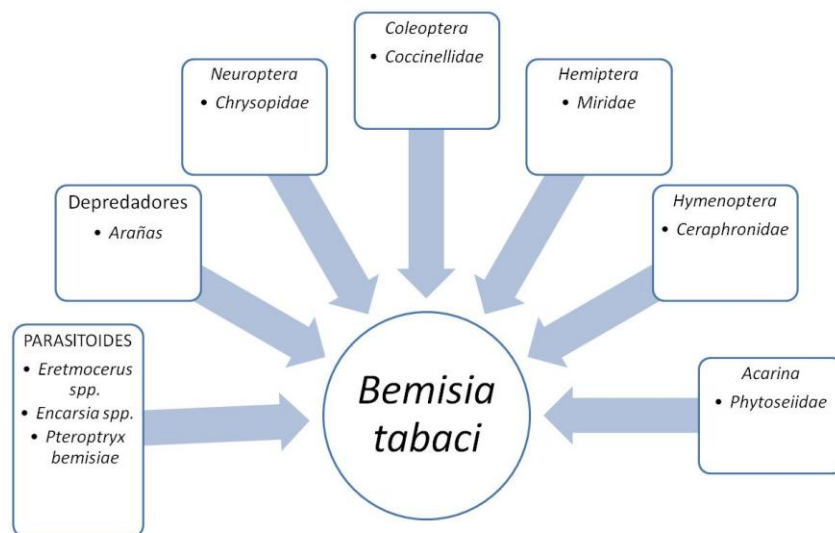


Figura 11. Enemigos naturales de *Bemisia tabaci* (Gerling, 1986).

Otro método efectivo, es el uso de soluciones jabonosas, debido a su bajo costo y al alto control de adultos de *B. tabaci*. Sin embargo, a pesar de ser muy efectivo no es recomendado aplicar altas dosis de jabón, ya que puede generar efectos de fitotoxicidad, por lo que estas aplicaciones deben de ser en periodos semanales con el objeto de impactar las poblaciones presentes en dosis de 2.0 kilogramos o litros/ha (Lope et al., 2011).

Vieira *et al*, en el 2013 mencionan que es obligatorio aplicar insecticidas en los cultivos de soya cuando el número de ninfas presentes en las hojas es de alrededor de 40, siendo notoria una disminución en la calidad de la cosecha, tanto por daños directos, indirectos y virales.

Para el caso de *Arabidopsis*, se tienen registros que cuando la mosca blanca succiona la savia de la planta, se activa una serie de mecanismos de respuesta al estrés, utilizando sistemas de defensa constitutivos e inducidos en un amplio rango de factores bióticos. Los sistemas constitutivos de defensa incluyen barreras como cutícula de la hoja, paredes celulares, almacenamiento de metabolitos que inhiben el crecimiento, alimentación y desarrollo de los insectos herbívoros

(Walling, 2000). Las defensas inducidas de la planta incluyen la activación de mecanismos directos e indirectos para disuadir herbívoros, como la síntesis de metabolitos secundarios o la atracción de insectos parasitarios de los insectos herbívoros (Kessler and Baldwin, 2002; Kliebenstein, 2004). En relación al proyecto, del control de la plaga por disminución de tricomas, también se sabe de la expresión de factores de transcripción que se ven influenciados por el daño ocasionado por *B. tabaci* en *Arabidopsis*, lo cual llevaría a pensar que también se ve reflejado en cualquier otro cultivo que se vea afectado por esta plaga (Kemplema *et al.*, 2007).

Relación de tricomas y la oviposición de la mosca blanca en las hojas de soya y tomate

El fitomejoramiento convencional y la selección de cultivos resistentes a la mosca blanca, son enfoques adecuados para tener un mayor control de esta plaga y que se vea reflejado en una mejor producción en los cultivares de interés comercial.

Diversos autores han denotado características de las hojas (principalmente pubescencia), junto con otros factores químicos constitutivos e inducibles (elementos defensivos y nutricionales) de gran importancia en presencia de la mosca blanca (Inbar and Gerling 2008). Siendo así, un fuerte impacto la morfología de la planta en la dinámica poblacional de la mosca blanca, especialmente sobre la superficie de la hoja, impidiendo físicamente la alimentación, selección para la oviposición y el refugio de los estados ninfales (Taggar and Grill, 2012).

Los tricomas son unos de los factores más importantes de resistencia en un gran número de cultivos. Los tricomas pueden afectar la preferencia de oviposición e interferir con el movimiento del insecto en la superficie de la planta (Johnpeter *et al.* 1995). Los efectos potenciales de los tricomas sobre las moscas blancas pueden variar dependiendo del ángulo del tricoma en la superficie de la hoja, la longitud y el tipo, todos estos factores afectan la oviposición por los adultos, la

adhesión y la alimentación (Channarayappa *et al.* 1992). Se han documentado ambas interacciones positivas y negativas, en relación con el insecto. Más específicamente, en cultivos de algodón donde la relación de mosca blanca varía en relación a la densidad de los tricomas (Butler and Henneberry 1984; Butler *et al.* 1991). Investigaciones con varias cucurbitáceas, sugieren que la densidad de los tricomas pueden no ser tan importantes como lo es el arreglo espacial y la longitud de los tricomas (Kishaba *et al.* 1992). Entre los rasgos morfológicos, la densidad de los tricomas y la arquitectura de las plantas pueden resaltarse como muy importantes (McAuslane, 1996; Sippel *et al.* 1987).

El número, longitud, tipo y arreglo de los tricomas sobre la superficie de las hojas parece influenciar la densidad poblacional de las moscas en diversos cultivos (Heinz and Zalom 1995; Kishaba *et al.* 1992). Ejemplos claros de ellos son el mungo y la soya, donde se observa una mayor cantidad de huevecillos y ninfas de mosca blancas en variedades pubescentes que en aquellas que son glabratas (Chhabra and Kooner 1998; Taggar and Gill, 2012). Para el caso del tomate, la mayoría de los estudios se centra en la producción de metabolitos secundarios (acylsugars) repelentes a la mosca blanca (Nombela *et al.*, 2000; Steinhauser *et al.*, 2010; Lawson *et al.*, 1997; de Resende *et al.*, 2009), sin embargo también se ha observado la misma tendencia que en la soya, siendo las variedades pubescentes las predilectas por la mosca blanca para realizar su oviposición (Morillo *et al.*, 1997. Etoire *et al.*, 2012; McAuslane, 1996; Lambert 1995).

La interpretación de esta evidencia sugiere que el adulto es capaz de ovipositar si encuentra tricomas, los cuales dan protección a las ninfas contra el estrés hídrico e incluso dicha hidrofobicidad puede repeler la llegada de los componentes activos de los insecticidas. La falta de tricomas podría ser desventajoso, sin embargo, las variedades de tomate y soya con menor densidad de tricomas (glabratas o carentes de tricomas) no parecen tener desventajas competitivas cuando se crecen en campo, mostrando una fenología similar a las variedades pubescentes (Kang *et al.*, 2010; Hunt, 2009; Taggar & Gill 2012).

Obtención de variedades de soya y tomate con número reducido de tricomas (glabrata intermedias).

Uno de los genes identificados en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, encargado de la producción de tricomas es el gen GL1 (MYB0|AtMYB0|At3g27920), factor encargado de activar la transcripción cuando se asocia al complejo BHLH2/EGL3/MYC146 o BHLH12/MYC1. Junto con TTG1 y GL3, promueve la formación de tricomas y su endorreplicación. Regula también la expresión de una señal que induce la formación de células precursoras de tricomas (Oppenheimer *et al.* 1991).

La estrategia propuesta es la búsqueda de ortólogos proteicos del gen GL1 en las plantas de soya (*Glycine max*) y tomate (*Solanum lycopersicum*), para posteriormente insertar dichos genes en un vector binario de silenciamiento, que producirá RNA interferente de doble cadena, y que al ser introducidos por *Agrobacterium tumefaciens* a ambas especies, se inducirá el Silenciamiento Génico Post-Transcripcional de dichos genes ortólogos. La expresión de esta construcción permitirá obtener un conjunto de mutantes con diferentes grados de pubescencia, desde glabrata hasta pubescente. Las plantas genéticamente modificadas serán retadas con mosquita blanca y se correlacionará la densidad, y atributos de los tricomas con la presencia de huevecillos, ninfas y adultos de *B. tabaci*.

Bondades de las mutantes

No se emplea ningún gen nuevo, solo se atenúa un gen natural presente en soya y tomate. El marcador de resistencia a utilizar será el gen Bar, que confiere la resistencia a herbicida glufosinato de amonio, cualidad deseada para la producción en campo.

La mutación será estable, pues se obtiene por medio del vector *A. tumefaciens*, que inserta el gen en el genoma de la planta y se segrega de manera mendeliana.

2. JUSTIFICACIÓN

Los cultivos de soya y tomate son muy importantes en el país, los cuales presentan problemas fitosanitarios, entre los que destaca la infestación por la plaga generalizada *Bemisia tabaci*, su control nos permitirá reducir significativamente las pérdidas que causa su daño a la agricultura mexicana.

3. HIPÓTESIS

Es posible disminuir el número de tricomas por silenciamiento génico mediado por RNA en plantas de soya y tomate, para un posible control de infestación por mosquita blanca.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta de la mosca blanca en cultivos pubescentes a glabrata de soya y tomate.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar la estrategia de silenciamiento a través de la identificación de genes ortólogos a *GL1* en soya y tomate.
- Transformar genéticamente soya y tomate vía *Agrobacterium tumefaciens* con vectores de silenciamiento en plantas.
- Analizar el fenotipo de plantas genéticamente modificadas.
- Retar a las plantas genéticamente modificadas frente a *B. tabaci*.

5. METODOLOGÍA

Obtención de DNA plasmídico

De la secuencia conocida GL1|AT3G27920|ATMYB0|**AtGL1**|GLABRA 1, se realizó la búsqueda en Phytozome.net de genes ortólogos sobre la cual se seleccionaron dos genes endógenos para soya y dos para tomate, por su alta similitud y la relación filogenética que presentaban.

Se extrajo el RNA de las plantas de soya y tomate empleando el reactivo Trizol, y se realizaron PCRs tiempo final con los oligos específicos para cada uno de los genes. Para evitar silenciamientos indeseados, los insertos se diseñaron de 350pb del marco de lectura abierto (ORF) de cada uno de los genes seleccionados.

Empleando el vector de clonación pCR8/GW/TOPO se introdujeron cada uno de los insertos previamente amplificados; y por choque térmico, se transformó *E. coli* cepa DH5 α . Se incubó durante 24h a 31°C, en medio sólido LB + espectinomicina (Cf=100 μ g/mL). Se seleccionaron las colonias aisladas para crecerlas en medio líquido LB + espectinomicina (Cf=100 μ g/mL) y se extrajo el DNA plasmídico con el método de Miniprep (Maniatis *et al.*, 1982), consiguiendo DNA de alta pureza.

Para comprobar la presencia del inserto en el vector de clonación, se digirió con la enzima de restricción EcoRI para liberar el inserto. Asimismo se emplearon enzimas que cortan dentro del inserto para corroborar la orientación del mismo con respecto al vector.

Con ayuda de la tecnología Gateway, se realizó la recombinación con LR clonasa, transfiriendo los insertos del vector de clonación (donador) al vector binario (aceptor o destino). Los insertos en posición invertida se introdujeron en el vector de binario de sobreexpresión pB7WG2 y aquellos insertos que estuvieron orientados de 5' a 3' se introdujeron en el vector binario de silenciamiento pB7GW1WG2.

Nuevamente empleando el método de la Miniprep, se obtuvo el DNA plasmídico con el vector binario y se transformó a *A. tumefaciens* por electroporación con la construcción purificada, se incubó en medio LB + espectinomicina (Cf=100µg/mL) durante 24 a 48 horas a 28°C. El electroporador utilizado fue el Easyjet Optima EQUIBIO.

Crecimiento de *Agrobacterium*

1. Los cultivos bacterianos se inician tres días antes de las transformaciones genéticas, a partir de los stocks almacenados a -80°C. Los vectores binarios Gateway confieren resistencia a Espectinomicina (100mg/L), mientras que la cepa AGL1 tiene resistencia a Kanamicina (50mg/L) y Carbenicilina (100mg/L). Por lo que se agregan dichos antibióticos al medio LB y se inocula una azada de la bacteria almacenada a un matraz estéril.
2. Se creció el cultivo bacteriano a 28°C, en una incubadora con agitador a 250rpm durante 24 a 48 horas hasta alcanzar una DO620 = 0.8 - 1.0.
3. Se centrifugaron los cultivos con *Agrobacterium* de 4 - 8 krpm durante 10 - 15 minutos a temperatura ambiente (~25°C). Se descarta el sobrenadante.
4. Se resuspenden los pellets en un volumen equivalente de medio de infección hasta disolver la pastilla.
5. Para adaptar a la bacteria al medio de infección, se incubaron los matraces en agitación a 60 rpm durante al menos 30 minutos antes de su uso.

Transformación genética de soya

Desinfección de semillas

1. Colocar las semillas de soya en cajas Petri de 100x15mm en una sola cara (~130 semillas por caja).
2. Colocar 3-4 cajas en una jarra desecadora dentro de la campana de extracción, permitiendo la entrada de un vaso de precipitados de 250ml.
3. Usando la protección adecuada, agregar 100ml de cloro al vaso de precipitados y gota a gota agregar 3.5ml de HCl concentrado (12N).
4. Cerrar el desecador inmediatamente y dejar durante toda la noche (16h).

5. Después de la exposición a los gases de cloro, cerrar las cajas Petri y retirarlas dentro de la campana de flujo laminar. Abrir las cajas y dejar airear alrededor de 30 minutos para retirar los excesos de gas.

Imbibición de semillas

1. Bajo campana de flujo laminar, aproximadamente 20 horas antes de la infección, agregar agua estéril desionizada a las semillas estériles hasta $\frac{1}{4}$ cm de la tapa de la caja Petri.
2. Cubrir completamente las cajas Petri con papel aluminio para bloquear el paso de luz.

Preparación de explantes e infección

1. Remover el papel aluminio de las semillas. Transferir ~20 semillas a una toalla de papel estéril para diseccionarlas.
2. Usando una hoja de bisturí #15, realizar un corte longitudinal a lo largo del hilo para separar los cotiledones y remover la cubierta de la semilla. Recorte el eje embrionario al final del nodo del cotiledón aproximadamente 3mm y retirar cualquier brote axial o atado al nodo cotiledonal.
3. Diseccionar 60 explantes de media semilla en cajas Petri de 100x25mm y agregar 30ml del medio de infección con *Agrobacterium*. Asegúrese que los explantes están totalmente cubiertos con el medio de infección. Incubar de 20-30 min a temperatura ambiente con agitación ocasional.

Co-Cultivo

1. Después de la infección, remover el exceso de medio de infección con una toalla de papel estéril. Transferir los explantes al medio de co-cultivo (9 por caja), con el lado adaxial tocando el papel filtro.
2. Cerrar las cajas con parafilm o con bolsas plásticas con ventilas. Incubar a 24°C en fotoperiodo 18:6 (140 μ moles s⁻¹ m⁻²) durante 3 a 5 días.

Inducción de brotes

1. Después del cocultivo, remover los explantes y colocarlos sobre una toalla de papel estéril para retirar el exceso de líquido. Lavar con medio de lavado para inducción de brotes (~50 ml en una caja Petri de 100 x 25mm estéril, a temperatura ambiente). Secar en papel estéril. Unas 30 semillas pueden ser lavadas con el medio de lavado.
2. Colocar los explantes en medio de inducción de brotes (6 por caja). Los explantes deben de orientarse con el nodo final del cotiledón embebido en el medio y la región de regeneración a un ángulo de 30°-45°. Transferir sólo los explantes con el embrión axial cortado.
3. Cerrar las cajas con cinta e incubar a 24°C, 18:6 de fotoperiodo durante 14 días.
4. Los explantes deben de ser transferidos al medio de inducción nuevo después de 14 días. Cortar y descartar los brotes del nodo y área apical, y cortar el eje del embrión a 3 mm. Orientar el tejido de tal forma que el corte fresco quede embebido en el medio de inducción de brotes, con la zona en diferenciación hacia la superficie.
5. Mantener en incubadora durante otros 14 días.

Elongación de brotes

1. Después de 4 semanas (2 transferencias) en medio de inducción de brotes, remover los cotiledones de los explantes y realizar un corte nuevo en la base del brote.
2. Transferir los explantes a medio fresco de elongación de brotes e incubar el tejido a 24°C, fotoperiodo 18:6.
3. Transferir a medio fresco de elongación de brotes cada 2 semanas. En cada transferencia, realizar un corte nuevo horizontal en la base del brote. La elongación debe durar al menos 8 semanas.

Enraizamiento de plantas transgénicas

1. Cuando los brotes sobreviven a la presión de selección del glufosinato y alcanzan más de 3 cm, se realiza un nuevo corte en la base del explante.
2. Transferir los brotes a medio de enraizamiento, embebiendo los brotes aproximadamente ½ cm en el medio.
3. Incubar a 24°C, fotoperiodo de 18:6 por 1-2 semanas.

Aclimatación de plantas

1. Después de 1-2 semanas, cuando los brotes tienen más de dos raíces, trasplantar en suelo. Remover gentilmente la planta del medio de enraizamiento y lavar las raíces con agua de grifo para remover cualquier exceso de medio.
2. Colocar las plantas de forma individual en cubetas plásticas de 6 cm, con mezcla de suelo Redi-Earth Peat-Lite. Trasplantar plántulas del suelo y colocarlas en un plano sin agujeros, cubierto con un domo. Permitir que las plántulas crezcan a 24°C, fotoperiodo 18:6 por al menos una semana, regar si es necesario.
3. Cuando las plántulas tienen al menos dos brotes sanos trifoliados, puede aplicarse herbicida para confirmar la resistencia a glufosinato. Transferir plántulas resistentes a macetas de un galón.
4. Llenar 50% arriba de la maceta con 4 orificios de drenaje. Aplicar fertilizantes 16-8-12 de liberación prolongada.
5. Agregar mezcla universal hasta un 80% del volumen de la maceta (poca no se retiene el agua, y con demasiada no se permite realizar el riego).
6. Trasplantar plántulas resistentes a la maceta de galón. El suelo debe cubrir las raíces.
7. Llenar con agua al borde de la maceta, dejar drenar completamente. Agregar agua cada que sea necesario.

Transformación genética de tomate

Desinfección de semillas

1. En un tubo estéril de 2ml depositar 60 semillas de tomate y agregar 1000µl de etanol al 70%, agitar suavemente durante 30 a 60 segundos.
2. Decantar el sobrenadante y agregar solución de hipoclorito de sodio al 15%, dejar en agitación suave durante 15 min a temperatura ambiente.
3. Retirar la solución en campana de flujo laminar y realizar 5 enjuagues con agua destilada estéril para retirar el excedente de hipoclorito de sodio.
4. Colocar las semillas sobre toallas de papel estériles con el fin de secar el exceso de humedad.
5. Transferir de 5 a 6 semillas en frascos traslucidos con medio MS y cubrir con papel aluminio e incubar a 25°C durante 15 a días mientras germina la semilla y elonga el tallo.
6. Descubrir los frascos e incubar en fotoperiodo de 16 horas luz a 25°C durante 10 días hasta obtener formación de pigmentos fotosintéticos.

Preparación de explantes e infección

1. Extraer las plántulas del frasco sobre toallas de papel estériles y retirar con un bisturí las hojas, raíz y cotiledones.
2. Con cortes finos, escindir el hipocotilo en fragmentos de 0.5 a 0.8 cm de largo.
3. Sumergir los explantes en medio líquido de infección con *Agrobacterium* resuspendido e incubar durante 30 minutos en agitación suave.
4. Secar en toallas de papel estéril y transferir a medio de co-cultivo, incubar durante 3 días en oscuridad a 25°C.

Generación de brotes

1. Enjuagar los explantes con agua destilada estéril hasta que deje de haber remanentes que enturbien el agua.
2. Para asegurar que no crezca la bacteria, realizar un enjuague extra con el medio líquido de lavado de explantes.
3. Secar los explantes y transferir a medio de regeneración de brotes (SRM). Incubar a 25°C con fotoperiodo de 16h luz durante 21 días.

Selección de brotes

1. De los explantes que tengan crecimiento de brote, se realiza un corte en la base del brote con cierta cantidad de callo y se transfiere a medio SRM con presión de selección, con el fin de obtener material vegetativo.

Enraizamiento de plantas transgénicas

1. De los brotes sobrevivientes, se trasplantan a medio de enraizamiento, durante 15 a 45 días a 25°C con fotoperiodo de 16h luz.

Acimatación de plantas

1. Cuando la raíz tenga al menos 5cm de longitud, extraer las plántulas cuidadosamente y retirar el medio de cultivo que se tenga adherido cuidando de no romper o dañar las raíces.
2. Lavar las raíces con agua destilada estéril y transferir a suelo estéril (Proporción 2:2:1 de turba: humus: agrolita).
3. Cubrir con domo plástico con el fin de mantener humedad relativa alta y dejar incubar durante una semana a 25°C con fotoperiodo de 16h luz.
4. Retirar el domo y dejar bajo las mismas condiciones una semana más en cámara de luz.

5. Durante las primeras horas de la mañana, antes de que la temperatura se eleve, transferir las plántulas adaptadas a cubetas plásticas (debidamente perforadas para un buen drenaje), y así puedan ser llevadas a invernadero.
6. Cuando las plantas tengan al menos 40 cm de altura, puede aplicarse herbicida para confirmar la resistencia a glufosinato de amonio.

6. RESULTADOS

Propagación de variedades glabratas y pubescentes de *A. thaliana*

Crecimiento en invernadero de variedades glabrata y pubescentes de *Arabidopsis thaliana*, siendo ambas variedades viables para su análisis.



Figura 12. Fenotipo de *Arabidopsis thaliana* glabrata y pubescente. A la izquierda se observa el fenotipo glabrata, mientras que a la derecha se observa el fenotipo pubescente.

Establecimiento de parámetros para el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* en invernadero; la temperatura óptima de desarrollo es de 22°C y una humedad relativa del 60%. La variedad glabrata requiere de una constante aplicación de fertilizantes durante su germinación, siendo esta misma más baja que la variedad pubescente.

Filogenia del gen AtGL1 en soya y tomate

Se realizó la búsqueda de proteínas homólogas a GL1 de *Arabidopsis thaliana* en la base de datos en <http://www.phytozome.net/> (2013), para las especies de *Glycine max* (Soya) y *Solanum lycopersicum* (tomate) empleando la secuencia de aminoácidos de AtGL1.

A partir de la búsqueda, se eligieron los genes con mayor similitud e identidad entre las especies, con los cuales se calculó un árbol filogenético. Se evaluó el superdominio SANT (región conservada de los MYBs candidatos), se alinearon las secuencias con CLUSTALX2, se recortaron con SEAVIEW4, y la reconstrucción filogenética fue hecha con MEGA 6.06 por el Neighbor-Joining Method, con Bootstrap de 100.

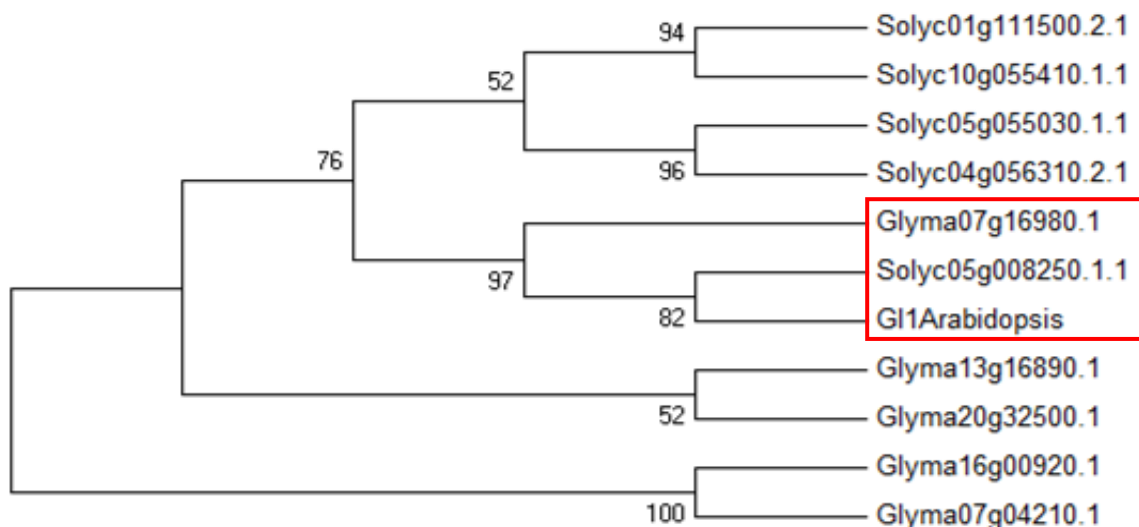


Figura 13. Árbol Filogenético de GL1 de los genes de *A. thaliana*, *G. max* y *S. lycopersicum*. Se obtiene una mayor relación de GL1 de *A. thaliana* con Glyma07g16980.1 para soya y Solyc05g008250.1 para tomate.

Además se eligieron otros dos genes candidatos a ortólogos de AtGL1 para cada una de las especies, de acuerdo a su alta similitud ponderada por Phytozome. Con lo cual se determinaron los siguientes candidatos:

Tabla 3. Genes candidatos a ortólogos de AtGL1

	<i>Glycine max</i>	Similitud	<i>Solanum lycopersicum</i>	Similitud
Phytozome	Glyma13g16890.1	56.1%	Solyc05g055030.1	53.9%
Árbol Filogenético	Glyma07g16980.1	50.4%	Solyc05g008250.1	39.9%

Extracción de RNA total para amplificar los genes candidatos

Utilizando la metodología de extracción de RNA con Trizol, se logró obtener satisfactoriamente el RNA de soya y tomate para posteriormente realizar la reverso transcripción y amplificación con el kit: OneStep SuperScript III RT-PCR / Platinum Taq para obtener los fragmentos a silenciar, los cuales se diseñaron para amplificar fragmentos de ~350 pb de cada uno de los genes candidatos.

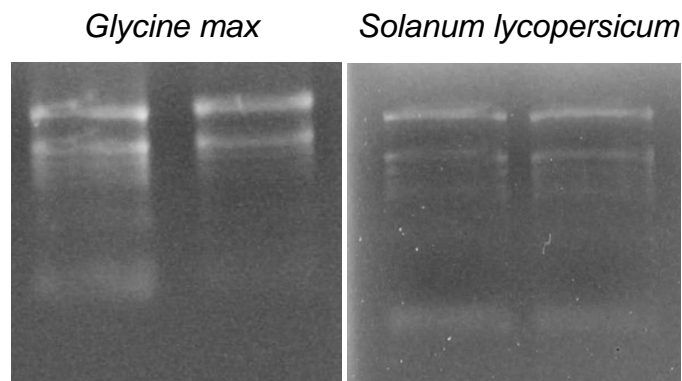


Figura 14. Electroforesis del RNA total soya y tomate. Del lado izquierdo la electroforesis del RNA total de *Glycine max* (soya) y a la derecha de *Solanum lycopersicum* (tomate).

Reverso transcripción y amplificación

Los fragmentos de ~350pb de los genes Glyma07g16980.1, Solyc05g008250.1, Solyc05g055030.1, fueron purificados del gel de agarosa. El gen Glyma13g16890.1 se amplificó a partir de DNA (~800 pb), y tras realizar síntesis de cDNA con el protocolo por LD-PCR, no se pudo obtener amplificación de DNA, por lo que se utilizaron oligos del segundo exón.

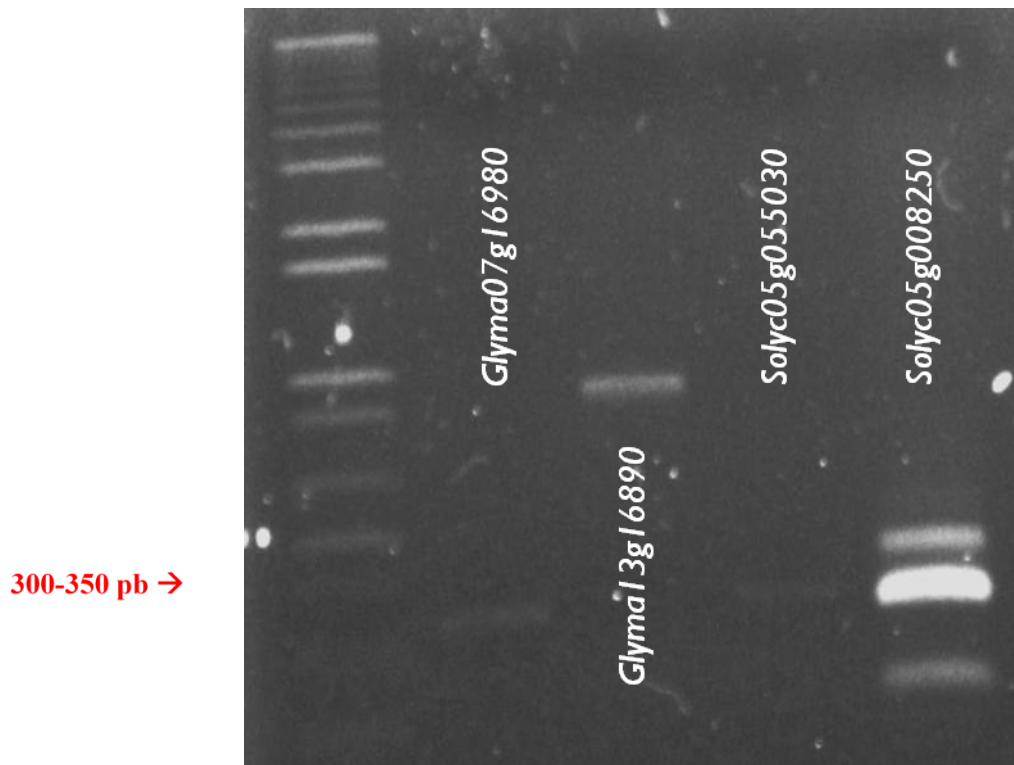


Figura 15. Reverso transcripción y amplificación de los genes candidatos a ortólogos de GL1.

Ya con el segundo exón perteneciente al gen Glyma13g16890.1, se amplificaron nuevamente ~ 350 pb a partir de DNA, para poder proseguir con la selección de candidatos a ortólogos, en este caso de soya.

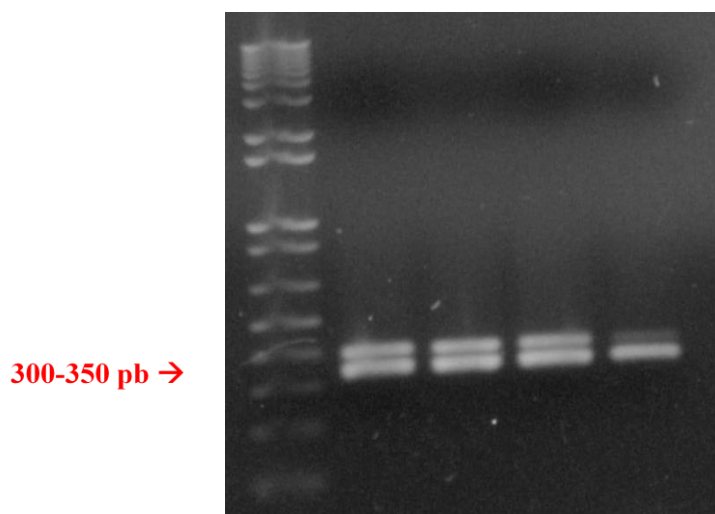


Figura 16. Amplificación del gen Glyma13g16890.1 del segundo exón.

Clonación de ortólogos de GL1 en *Solanum lycopersicum*

Posteriormente se clonaron los fragmentos amplificados por PCR al vector de pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) y se confirmó su presencia en las clonas por restricción con EcoRI que libera el inserto.

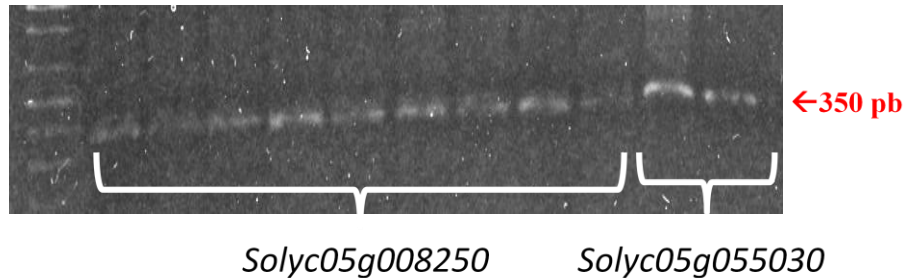


Figura 17. Comprobación del inserto por restricción de candidatos a ortólogos de GL1 en *Solanum lycopersicum*. Del lado izquierdo las clonas con el vector pCR8/GW/TOPO + Solyc05g008250.1 y del lado derecho las clonas con el vector pCR8/GW/TOPO + Solyc05g055030.1

Con la finalidad de corroborar la orientación de los insertos, se realizó la restricción con enzimas que tuvieran un sitio de corte dentro de cada uno de los fragmentos y alguna otra enzima con un solo sitio de corte en el vector. La orientación de los fragmentos nos indicó cual sería el vector destino de cada uno de ellos.

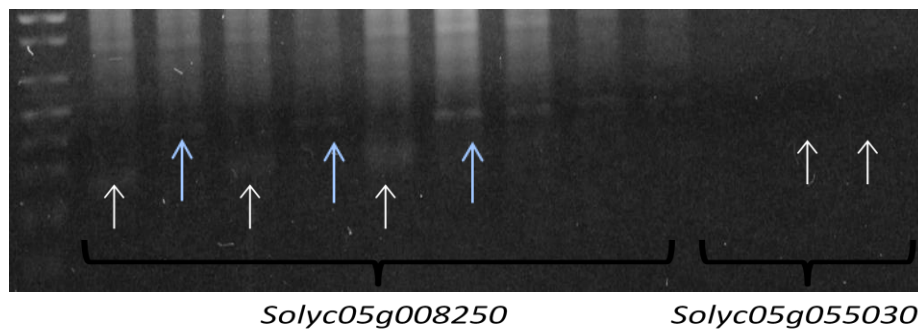


Figura 18. Restricción para confirmar la orientación. Las flechas blancas indican la inserción 5'→3' mientras que las flechas azules indican dirección 3'→5'

Clonación de genes ortólogos a GL1 en *Glycine max*

Al igual que con los genes de tomate, para los genes de soya se realizó la misma metodología usando la enzima de restricción EcoRI para liberar el inserto de ~350pb y las correspondientes enzimas de restricción para conocer la orientación del inserto.

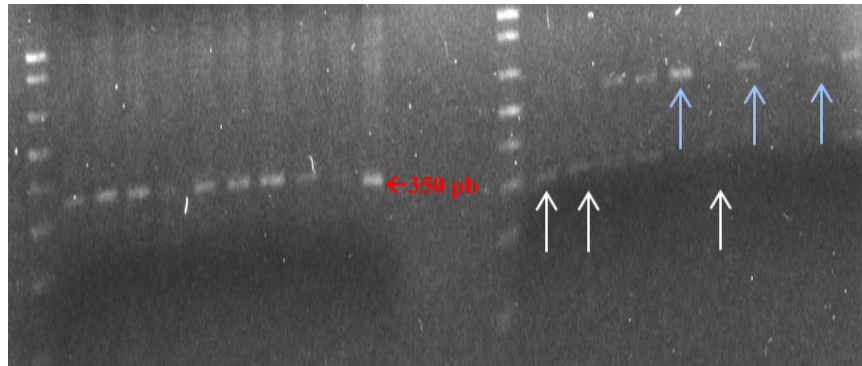


Figura 19. Restricción para liberar inserto y confirmar la orientación del gen Glyma07g16980.1. Las flechas blancas indican la inserción 5'→3' mientras que las flechas azules indican dirección 3'→5'

Del segundo exón del gen Glyma13g16890.1, se realizó la liberación del inserto y a falta de sitios de digestión por enzimas de restricción comerciales dentro del fragmento, no pudo confirmarse la orientación de los mismos. Se realizó una PCR punto final para confirmar la presencia dentro del vector.

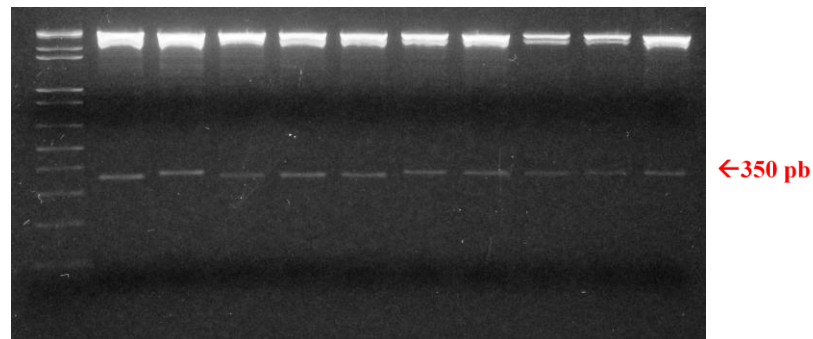


Figura 20. Confirmación del gen Glyma13g16890.1 por liberación del inserto con enzimas de restricción.

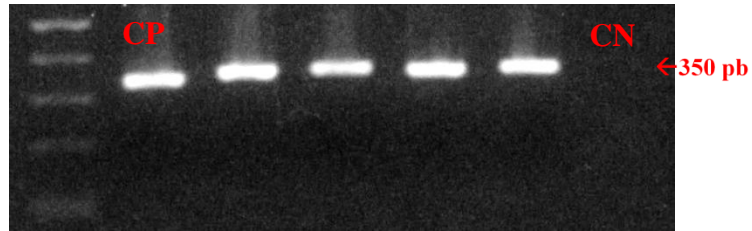


Figura 21. Confirmación del gen Glyma13g16890.1 por PCR punto final.

Recombinación del vector de entrada al vector destino de silenciamiento pB7GW1WG2 (II) y en antisentido para el vector de sobreexpresión pB7WG2

La recombinación se llevó a cabo con la tecnología Gateway, donde los insertos del vector donador pCR8/GW/TOPO fueron transferidos al vector binario de expresión (aceptor). El vector de silenciamiento pB7GW1WG2 adquiere una copia del inserto en sentido 5'→3' y una copia en sentido inverso, mediado por un intrón que permite el plegamiento complementario de RNA de doble cadena que servirá para el silenciamiento génico. Por otra parte, también se empleó el vector binario de sobreexpresión pB7WG2, donde los insertos en antisentido fueron introducidos para obtener un efecto similar de silenciamiento.

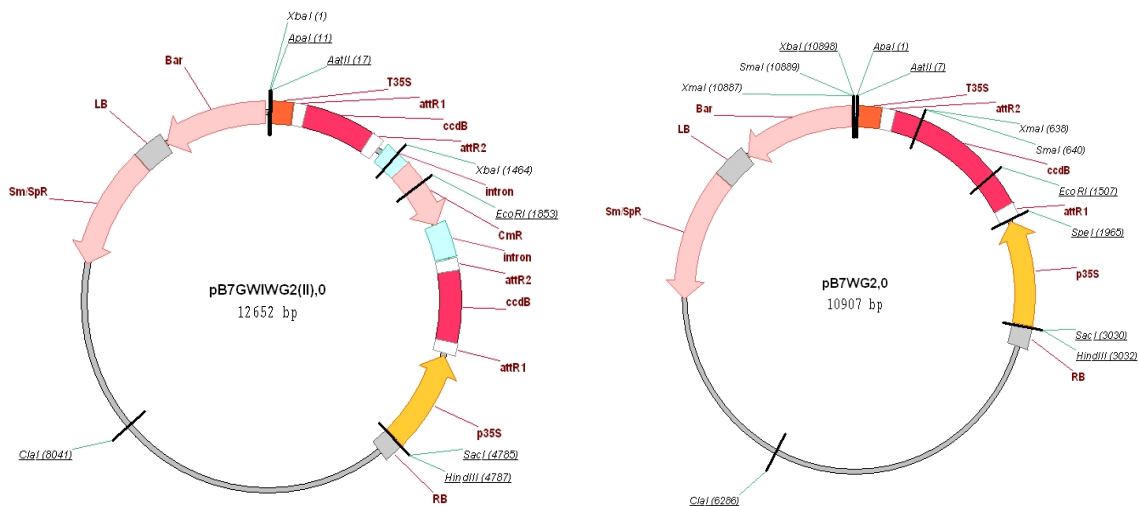


Figura 22. Vectores binarios de expresión en plantas. Del lado izquierdo el vector de silenciamiento pB7GW1WG2 y del lado derecho el vector de sobreexpresión pB7WG2.

Para confirmar la presencia del inserto en el vector de silenciamiento, se diseñaron oligos para amplificar mediante PCR punto final las regiones del intrón al promotor 35s; obteniendo así, muestras positivas para los genes Glyma13g16890.1 y Solyc05g055030.1.

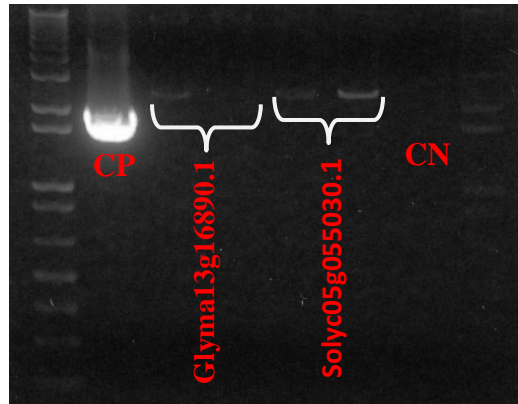


Figura 23. Confirmación por PCR del Intrón al p35S del vector de silenciamiento. Se utilizó como control positivo el vector de silenciamiento vacío sin las construcciones; del lado izquierdo las muestras positivas del gen Glyma13g16890.1; Del lado derecho las muestras positivas para el gen Solyc05g055030.1.

Como confirmación adicional, se realizó una PCR para amplificar las regiones propias del inserto para ambas construcciones de silenciamiento. Sólo un gen para cada una de las especies fue exitosamente recombinado en el vector pB7GW1WG2. En la figura 24 se muestra la electroforesis donde se comparan las PCR específicas para cada fragmento y las digestiones con EcoRI (marcado como “cut”) que liberan el inserto, donde claramente coinciden ambas para cada uno de los genes.

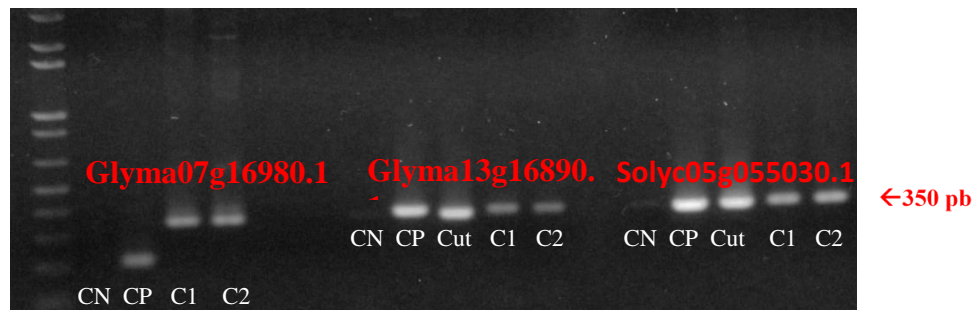


Figura 24. PCR y digestión de los insertos en los vectores de expresión. De izquierda a derecha los insertos de los genes Gyma07g16980.1, Glyma13g16890.1, y Solyc05g055030.1; CN= Control Negativo, CP= Control Positivo, Cut= Digestión con EcoRI, C1 y C2 = Repeticiones de PCR.

Los fragmentos en el vector de clonación de los genes Glyma07g16980.1 y Solyc05g008250.1, después de múltiples intentos de recombinación no pudieron transferirse exitosamente en el vector de silenciamiento, por lo que se optó por elegir aquellos fragmentos en antisentido para recombinarlos en el vector de sobreexpresión pB7WG2. En la figura 25 se muestra la digestión con EcoRI de los insertos en antisentido de los genes mencionados en el vector de sobreexpresión.

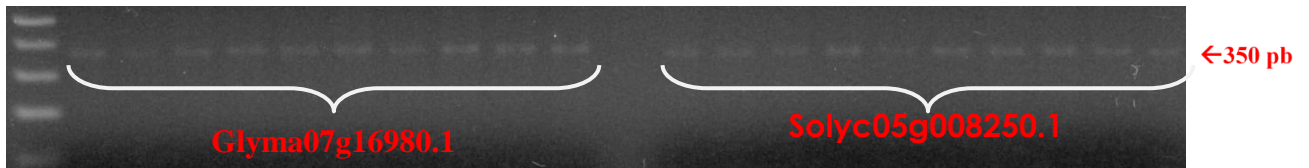


Figura 25. Confirmación de la clonación en el vector de sobreexpresión con los fragmentos invertidos de Glyma07g16980.1 y Solyc05g008250.1

Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL1 con los vectores de sobreexpresión con las construcciones en antisentido

Se transformó por electroporación a *Agrobacterium tumefaciens*, cepa AGL1, con cada uno de los vectores binarios de expresión que contenían los fragmentos de genes previamente mencionados y se realizó una extracción de DNA plasmídico (por Miniprep). Posteriormente se realizó una PCR punto final del gen Bar presente en ambos vectores para confirmar la presencia de los mismos en *A. tumefaciens*.

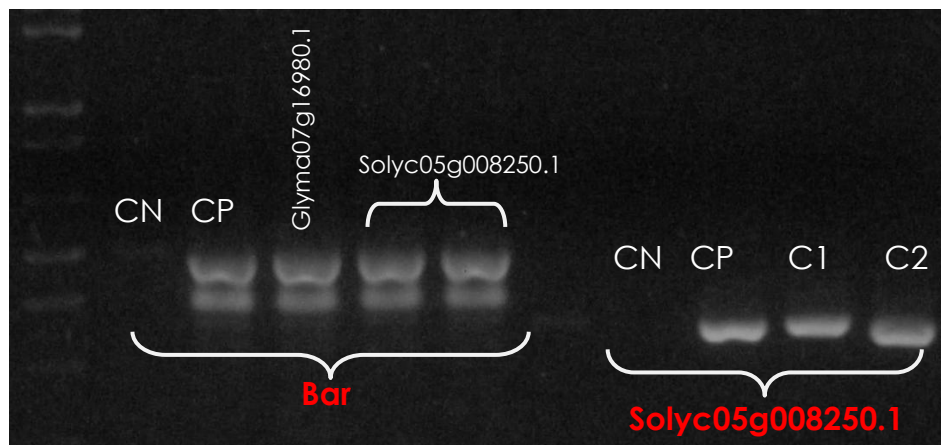


Figura 26. Presencia en *A. tumefaciens* del vector recombinante pB7WG2 de los genes en antisentido Glyma07g16980.1 y Solyc05g008250.1.

Genes ortólogos en vectores binarios

Con los resultados previos, se resume en la figura 27 aquellas construcciones que fueron recombinadas en los vectores de silenciamiento y de sobreexpresión.

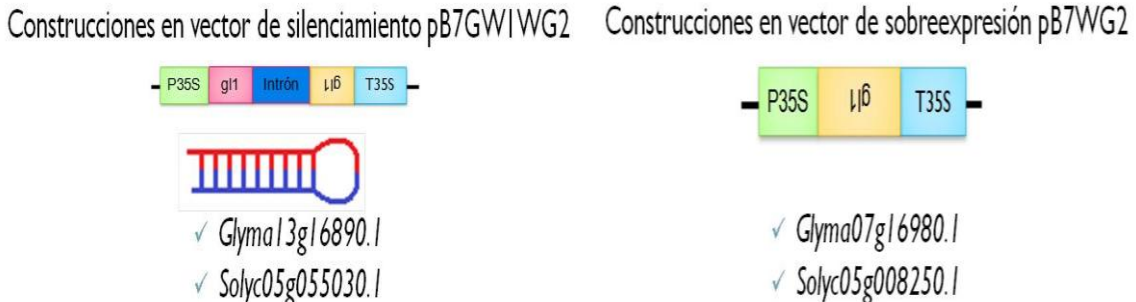


Figura 27. Construcciones en los vectores de silenciamiento y sobreexpresión. Del lado izquierdo la representación esquemática de vector de silenciamiento pB7GW1WG2 con las respectivas construcciones obtenidas en el proyecto; del lado izquierdo la representación esquemática del vector de sobreexpresión pB7WG2 con las construcciones en antisentido.

Transformación genética de tomate (*Solanum lycopersicum*)

- **Solyc05g008250.1**

A través de la metodología planteada se llevó a cabo la transformación genética de 627 explantes de la construcción Solyc05g008250.1 en el vector pB7WG2, de las cuales se han adaptado a invernadero 23 plantas y 20 de ellas ya se ha confirmado su transformación exitosa, amplificando el gen de resistencia a herbicida glufosinato de amonio. Veinte plantas actualmente se encuentran produciendo frutos, de los cuales se obtuvieron semillas y servirán para evaluar a futuro los fenotipos de interés en el proyecto.

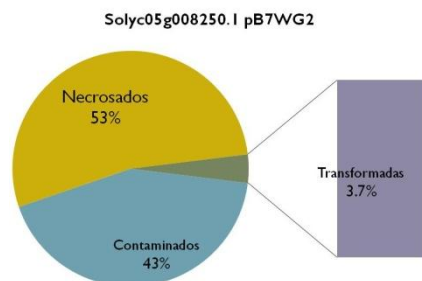


Figura 28. Eficiencia de transformación de tomate con la metodología propuesta. Un alto índice de explantes sufren de necrosis y reincidencia del crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*, inhibiendo el crecimiento vegetativo.

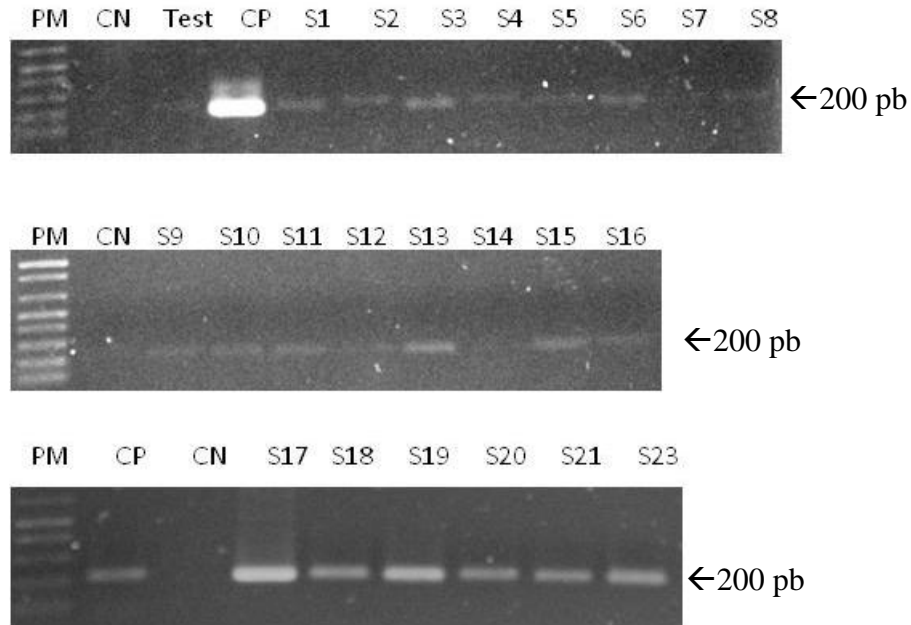


Figura 29. PCR del p35S en las plantas transformadas con la construcción Solyc05g008250.1. Región amplificada de 200 pb del promotor 35S. Test = Planta testigo, CN = Control Negativo, CP = Control Positivo, S1-S23 = Plantas transformadas.

En la regeneración de explantes, los tiempos promedio fueron los siguientes: de 15 a 30 días en generación de brotes en medio de regeneración (SRM); de 30 a 60 días en obtener una plántula de más de 4 cm con raíz suficiente para ser traspasada a suelo. Asimismo, un periodo de 2 a 3 meses en tener una planta adaptada totalmente al sustrato y capaz de producir frutos.

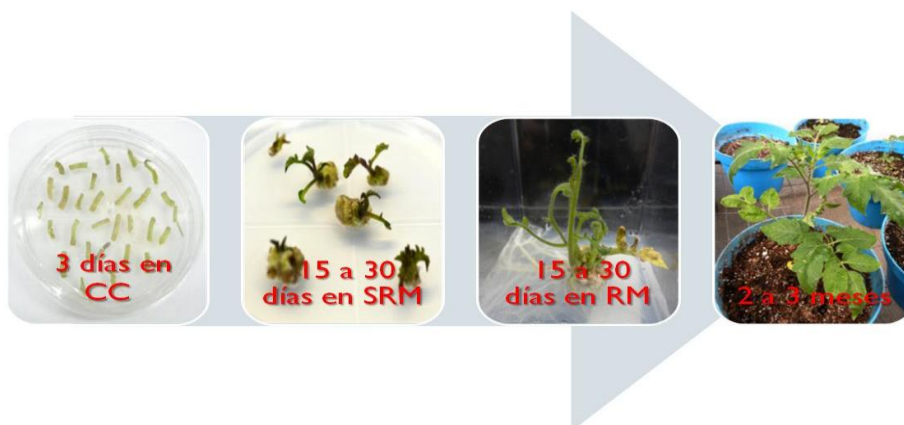


Figura 30. Proceso de regeneración *in vitro* de tomate. Tiempos de 3 días en co-cultivo en presencia de *A. tumefaciens*, de 15 a 30 días en medio de regeneración y de 15 a 30 días en medio de enraizamiento; después de 2 a 3 meses la planta es apta para producir frutos bajo condiciones de invernadero.

Se realizó la evaluación de los fenotipos de las plantas regeneradas, principalmente en la epidermis de las hojas y tallos en búsqueda de una reducción de tricomas. Aunque se obtuvo una alta eficiencia de transformación, no todas las plantas presentaban una misma abundancia de tricomas. En las figuras 31, 32 y 33 se aprecian atributos cualitativos claros de la reducción de tricomas en plantas transformadas.

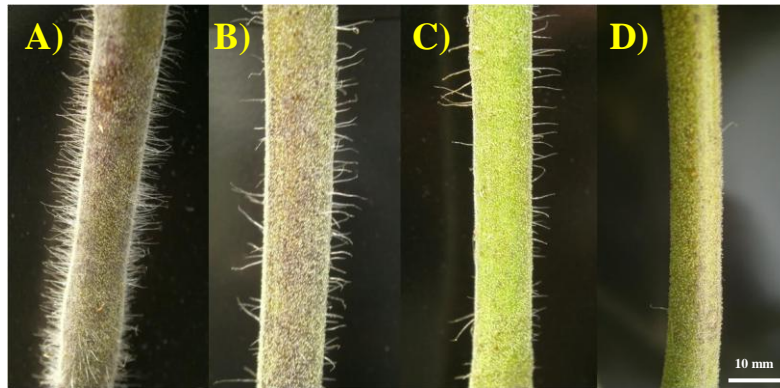
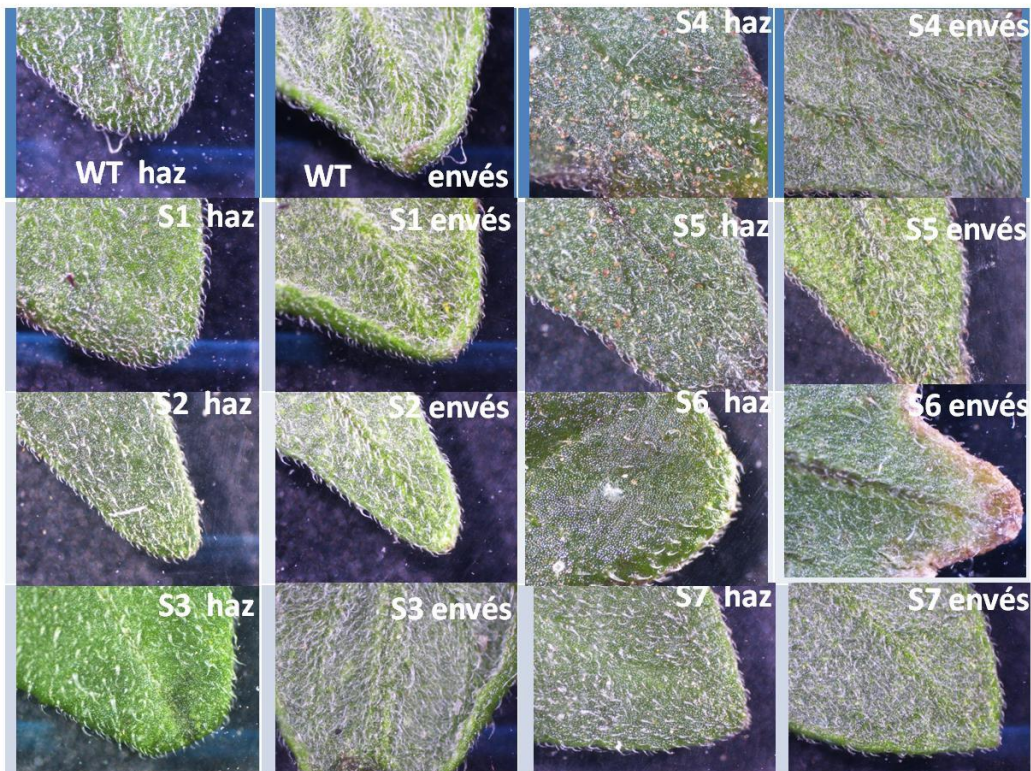
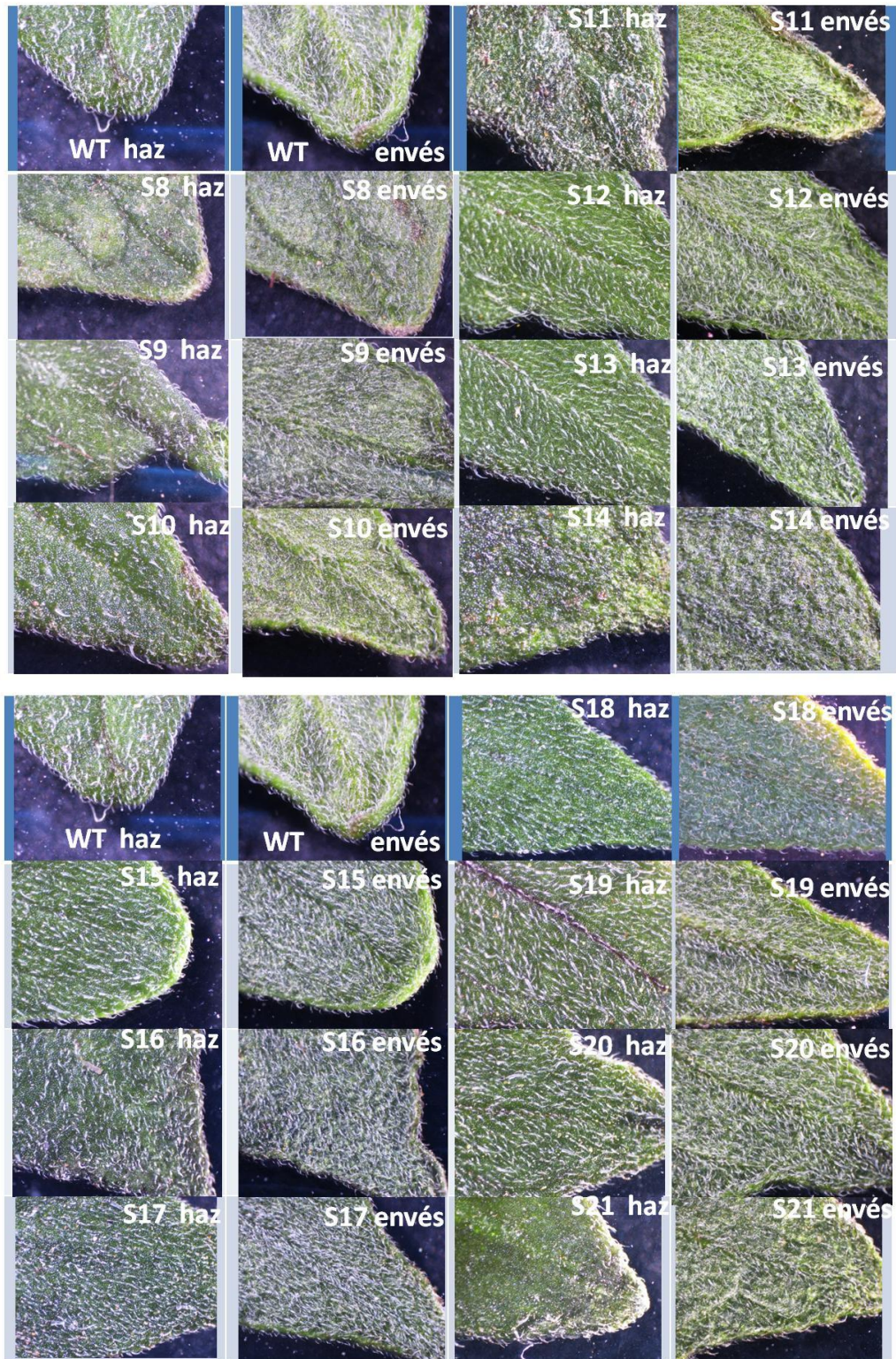


Figura 31. Comparación de tallos en planta testigo y transformadas. Se muestra una clara reducción de tricomas en las líneas transformadas de tomate con el gen silenciado Solyc05g008250.1. A) Testigo, B) S23, C) S13, D) S1.

HOJAS JÓVENES





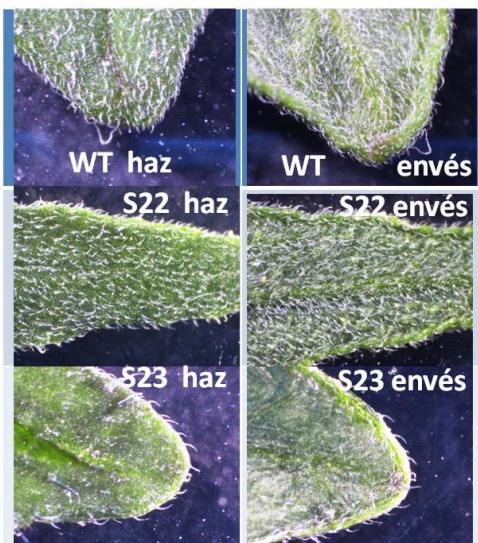
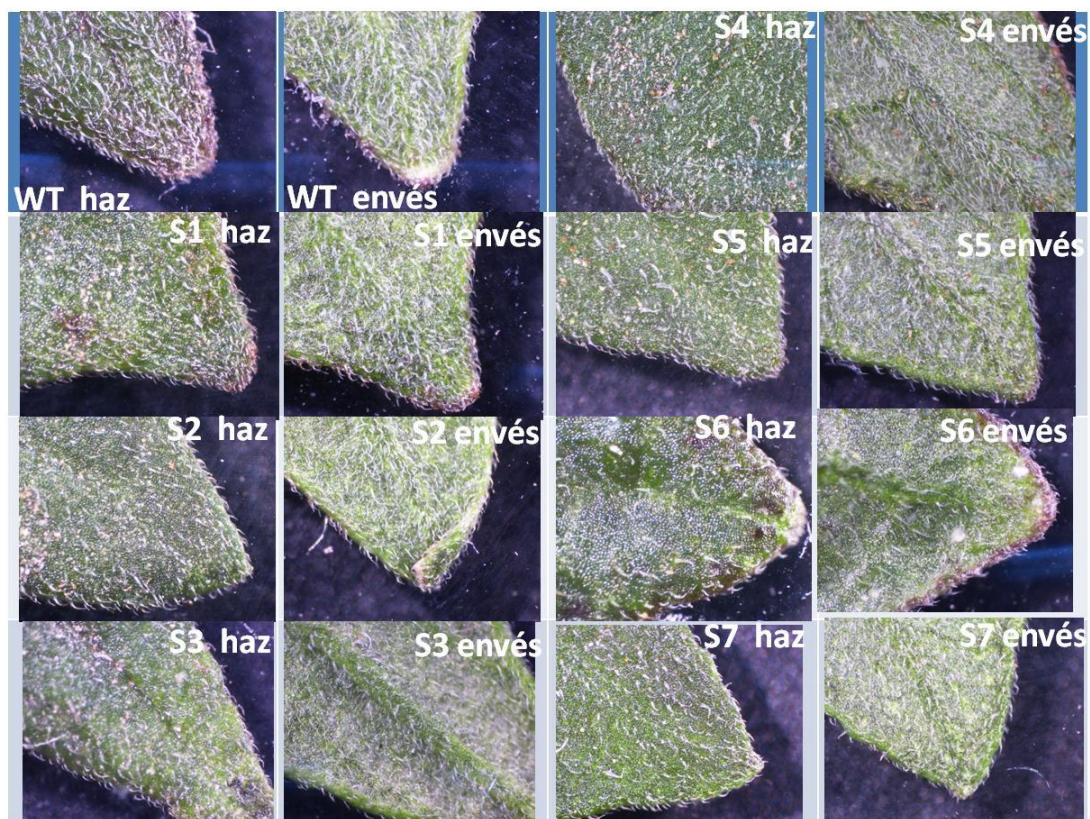
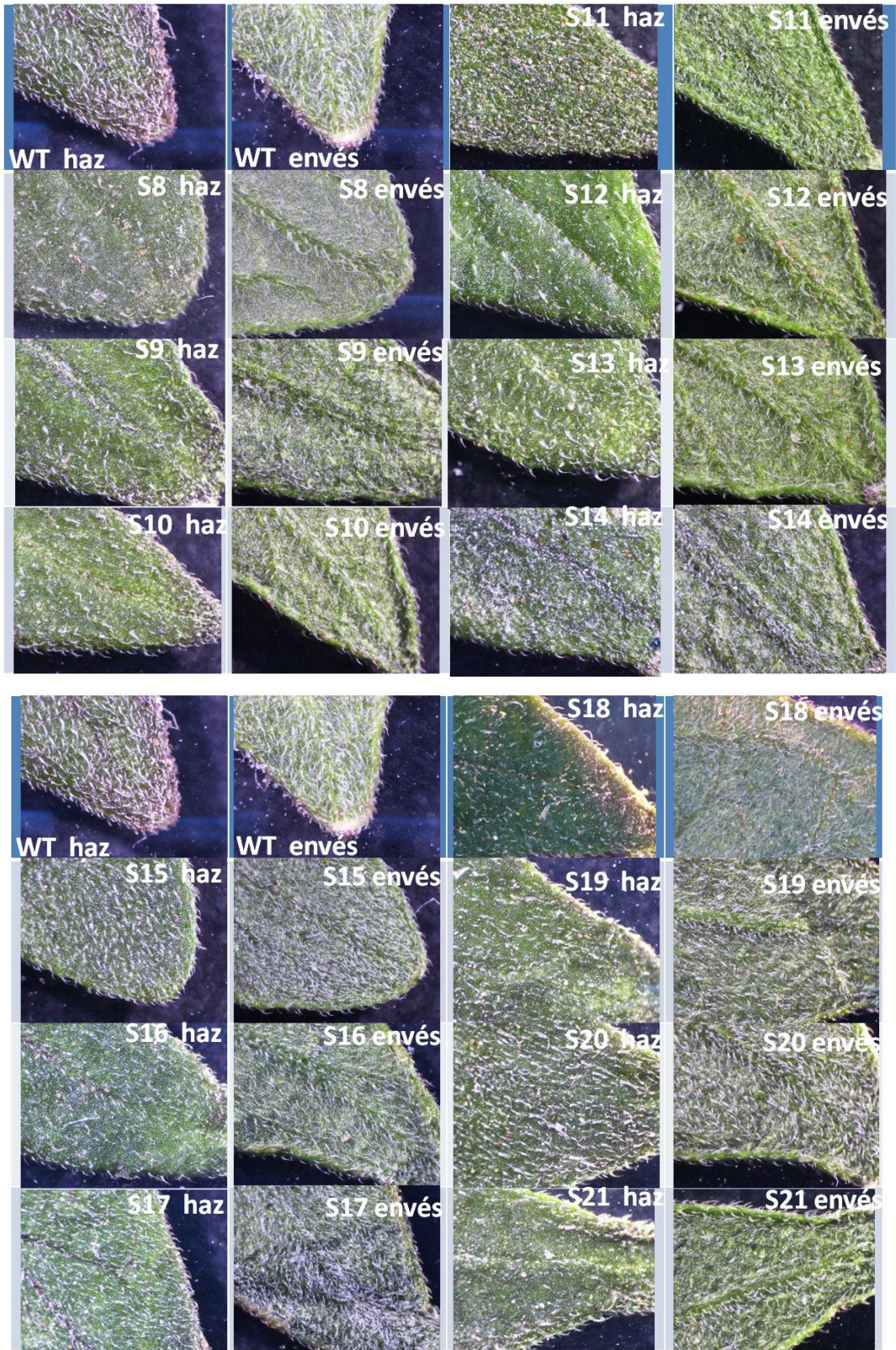


Figura 32. Comparación de tricomas en hojas jóvenes tanto en haz y como en envés. Fotografías ópticas 10x de hojas jóvenes de las plantas transformadas, notando la reducción de tricomas en abundancia y longitud.

HOJAS MEDIAS





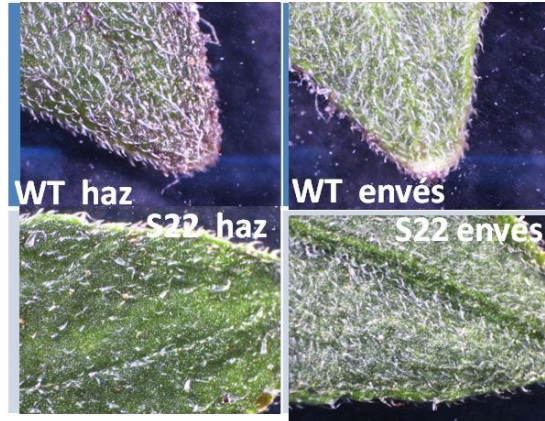
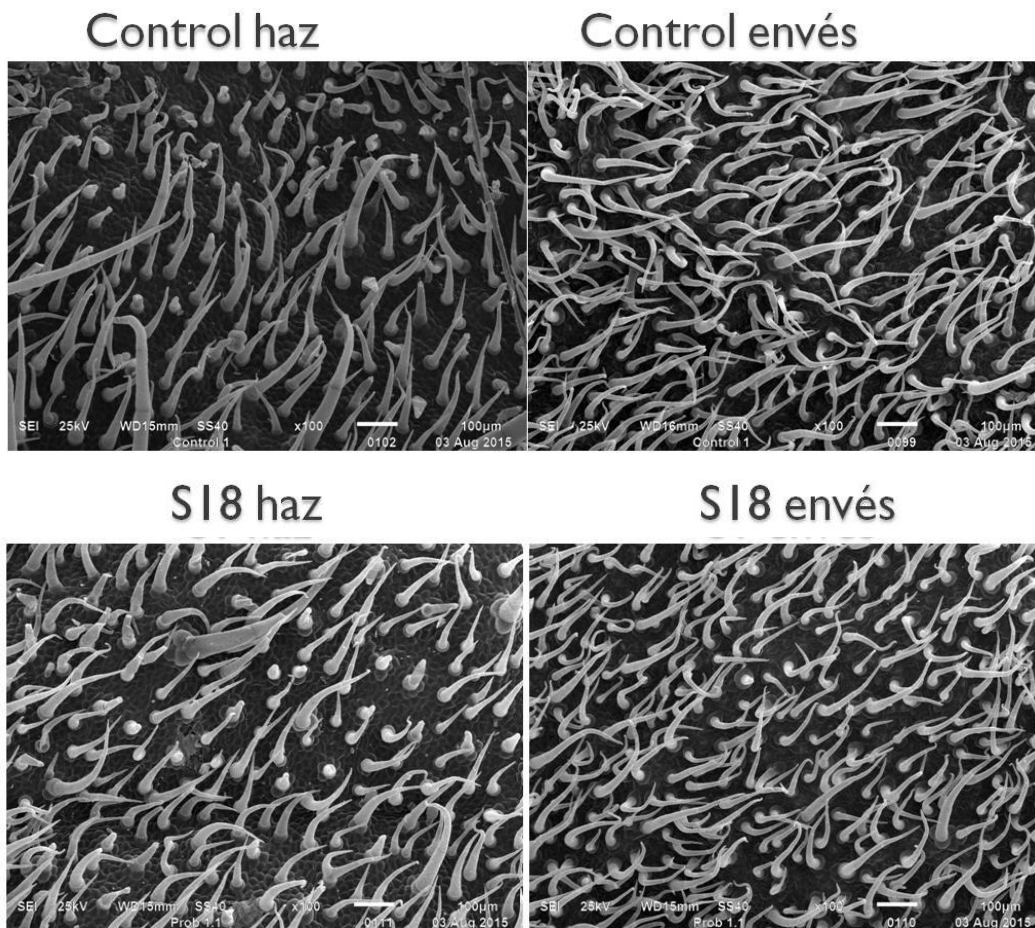


Figura 33. Comparación de tricomas en hojas de mediana edad. Fotografías ópticas 10x en haz y envés de hojas de mediana edad de plantas transformadas, notando la reducción de tricomas en densidad y longitud.

Para obtener datos estadísticos más confiables y hacer una evaluación cuantitativa de la longitud, ancho de la base y número de tricomas, se evaluaron dos muestras y un testigo en microscopía electrónica (LaNSE CINVESTAV).



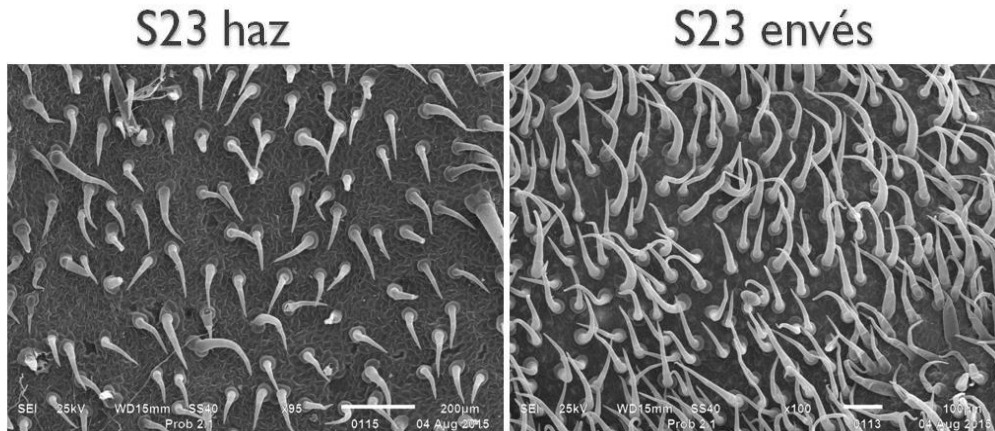


Figura 34. Microscopía electrónica en plantas de tomate con el gen silenciado Solyc05g008250.1. En el haz de la hoja S23 se aprecia claramente una reducción en número de tricomas.

Se seleccionaron hojas jóvenes de las plantas S23 y S18 por mostrar un bajo número de tricomas aparentes bajo el microscopio óptico. Ya que a simple vista no se logra apreciar una diferencia entre el control y la planta S18 se procedió a un análisis estadístico entre el control y cada una de las muestras (T-Student $\alpha=0.05$).

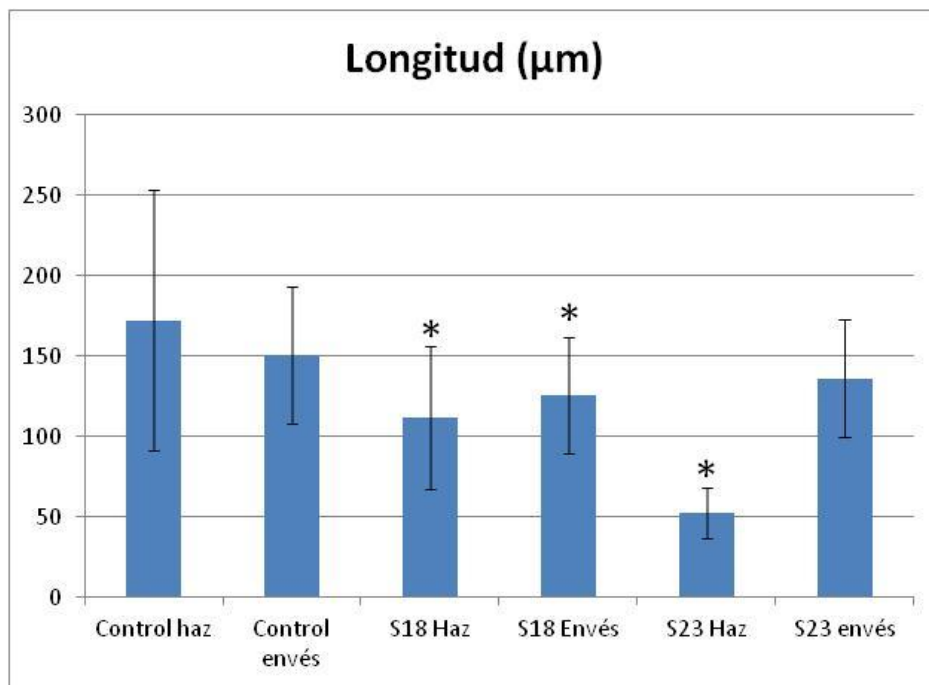


Figura 35. Gráfica comparativa de la longitud de los tricomas. De acuerdo al análisis estadístico, el haz y el envés de la planta S18, al igual que el haz de la planta S23 muestran diferencias significativas con referencia al control.

Es importante recalcar que la desviación estándar en las mediciones del control son grandes debido a que existían tricomas muy variables con longitudes de hasta 250 μm . La muestra S23 en su haz presenta una drástica reducción en la longitud de tricomas.

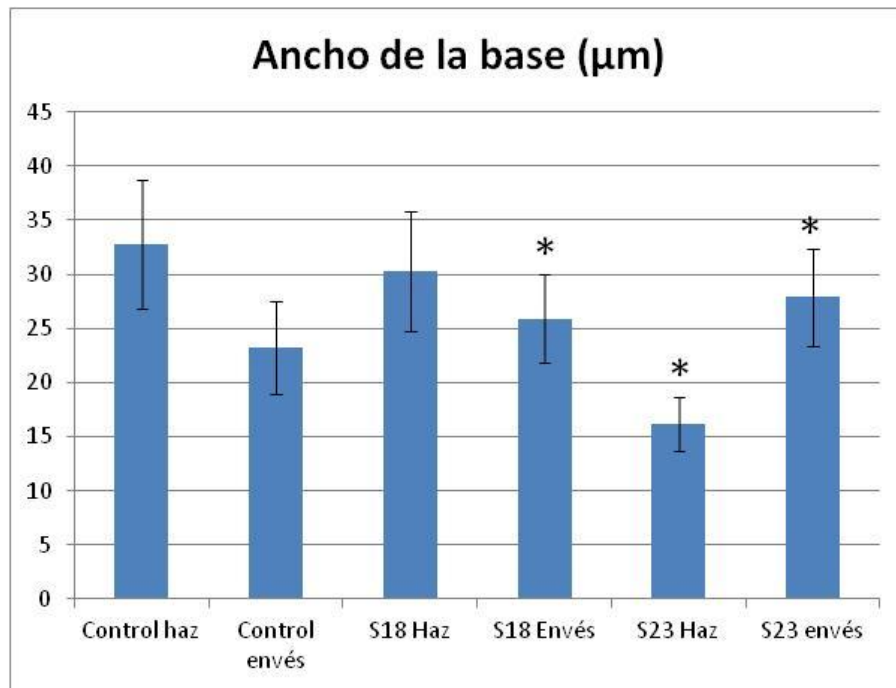


Figura 36. Gráfica comparativa del ancho de la base de los tricomas. El análisis estadístico, nos indica diferencias significativas en el envés de S18, el haz y envés de S23 con respecto al control.

Después de realizar las mediciones del ancho de la base, se denota una diferencia significativa en el haz de la planta S23 al ser menor al control; sin embargo en el envés de S18 y S23 la diferencia es significativa porque es mayor al control.

Como uno de los planteamientos iniciales del proyecto una de las principales características deseadas del fenotipo silenciado es la disminución del número de tricomas, por ello se realizó la medición del número de tricomas del control y de ambas muestras tanto en haz como en envés. Por cuestiones en número de imágenes obtenidas, sólo se pudo realizar un conteo total de tricomas por muestra, dando la figura 37; sin poder hacer posible un análisis estadístico más completo.

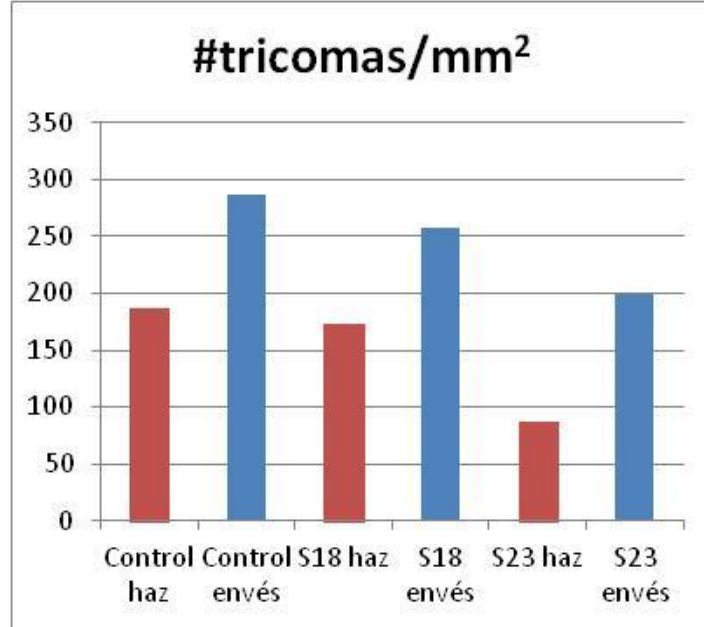


Figura 37. Número de tricomas por mm^2 en plantas de tomate con el gen silenciado Solyc05g008250.1. De color rojo se muestra el haz y de azul el envés de las hojas; Se aprecia una reducción notable de tricomas en relación al control.

Gracias a que fue posible la regeneración total de plantas de tomate con el gen Solyc05g008250.1 silenciado, e incluso se llegó a la producción de frutos, se realizó el pesado de los mismos y se hizo una evaluación de productividad que podría ser considerado como valorable en campo.

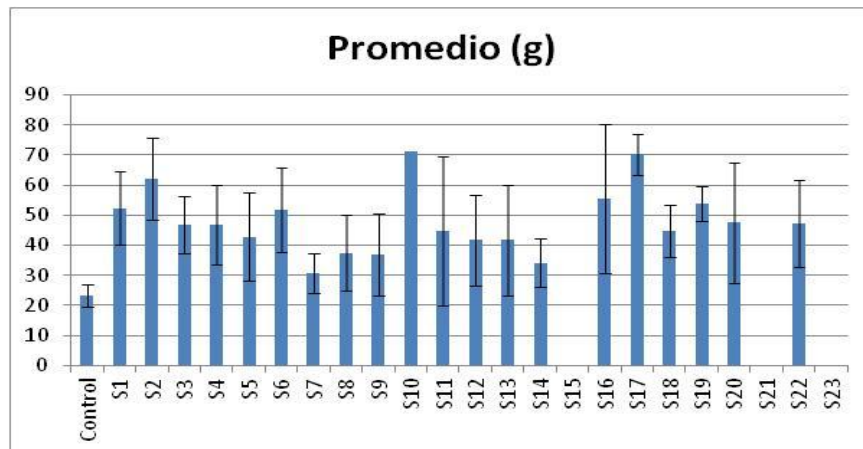


Figura 38. Peso promedio de frutos de plantas transformadas. Bajo condiciones de invernadero, los frutos dieron un rango de 20 a 75g; considerados en el mercado como frutos de tamaño pequeño.

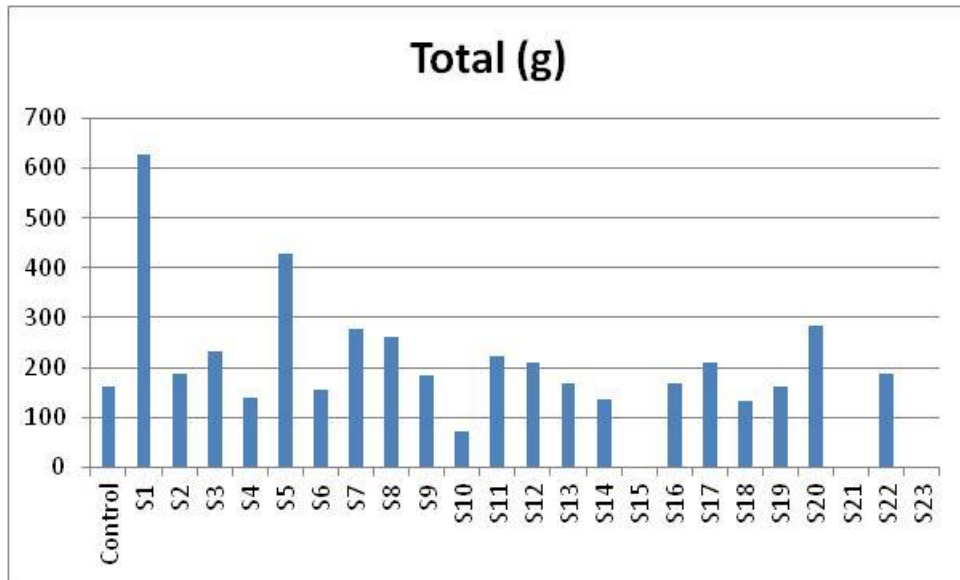


Figura 39. Peso total de frutos de plantas transformadas. En un periodo de 8 meses en total, las plantas dieron una productividad de 13.5 Ton/Ha.

Se logró obtener una productividad de 13.5 Ton/Ha en un periodo de 8 meses desde que las primeras plantas fueron transformadas, siendo baja en relación a lo sugerido por el productor que es de 40 a 50 Ton/Ha. Esto podría atribuirse a la reducida disponibilidad del sustrato en invernadero. Sin embargo, comparando la productividad con el control bajo las mismas condiciones, se logró obtener una mayor eficiencia, en especial las plantas S1 y S5.



Figura 40. Comparación de altura y desarrollo de plantas transformadas en relación con el control. A) Control de 55cm de altura, B) S23 de 45cm de altura, C) S1 midiendo 1.8m de altura.

- **Solyc05g055030.1**

Se realizó la transformación del segundo gen ortólogo a GL1 de *Arabidopsis* en tomate, Solyc05g055030.1 usando la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens*; sin embargo, sólo 5 plantas lograron regenerarse in vitro, pero no se lograron adaptar a sustrato bajo condiciones controladas.

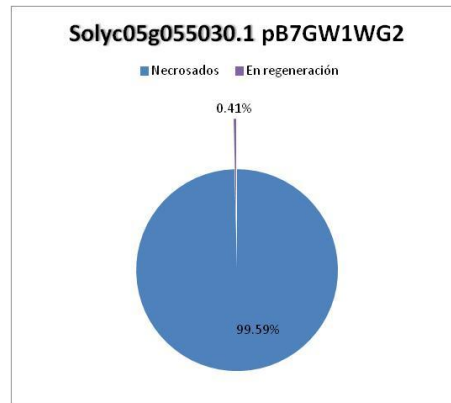


Figura 41. Regeneración de plantas con el gen silenciado Solyc05g055030.1. El silenciamiento parece conferir deficiencias en el desarrollo de la planta transformada.

Debido a la nula eficiencia de regeneración que se obtuvo de los explantes transformados, se considera que el silenciamiento del gen Solyc05g055030.1 podría estar generando deficiencias en el desarrollo de las plántulas, siendo un factor de transcripción que podría estar regulando procesos importantes en el desarrollo vegetativo.



Figura 42. Plántula con el gen silenciado Solyc05g055030.1 en cultivo *in vitro*. Se logra apreciar una fina capa de tricomas en tallo y hojas de la plántula, y lo denominamos un fenotipo letal al no poder regenerarse totalmente.

Regeneración de explantes de soya (*Glycine max*) *in vitro*

Después de los 3 a 5 días de cocultivo, se traspasaron los explantes a medio de regeneración hasta que se producen pigmentos fotosintéticos y se generan los primeros brotes, durante esta etapa se pierden una gran cantidad de explantes por el manejo delicado que deben tener los cotiledones, gran parte de ellos jamás se desarrollaron. Posteriormente, se transfirieron al medio de elongación de brotes, donde se forma el tallo y comienza a crecer, listos para ser llevados al medio de enraizamiento en el que se incubó durante 15 a 20 días hasta tener raíces de más de 5 cm de largo.



Figura 43. Proceso de regeneración *in vitro* de soya. Tiempos de 2 a 5 días en cocultivo en presencia de *A. tumefaciens*, de 15 a 30 días en medio de regeneración, de 15 a 30 días en medio de elongación de brotes y de 15 a 30 días en medio de enraizamiento; después de 4 meses totales, las plantas concluyeron su ciclo de vida produciendo una semilla por planta.

- **Glyma07g16980.1**

A través de la metodología planteada se llevó a cabo la transformación de 160 explantes con la construcción antisentido Glyma07g16980.1, ortólogo a GL1 de *Arabidopsis* en *Glycine max*, 80 para alto contenido de proteínas (HP) y 80 para alto contenido de aceites (HO). El porcentaje de regeneración va desde el 7% para HO, hasta el 12% para HP. Después de dos meses en suelo, se hizo cosecha de 4 semillas HP y 1 para HO.

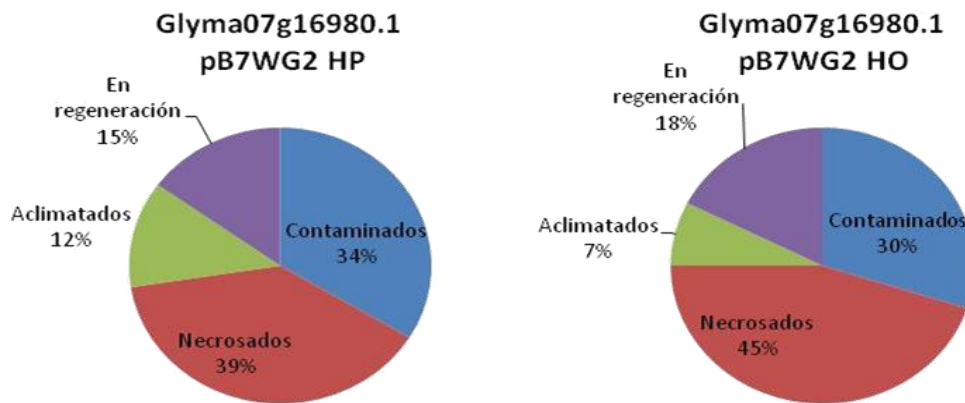


Figura 44. Porcentajes de regeneración en soya del gen Glyma07g16980.1 silenciado. Se obtuvieron eficiencias relativamente altas de regeneración, sin embargo no todas las plantas produjeron semillas.

Durante el proceso de regeneración, la mayor parte de los explantes totalmente regenerados comenzaron a producir vainas aún dentro de los recipientes de cultivo *in vitro* con una altura de los 5 a 10 centímetros; se traspasaron a sustrato, retirando a la mitad de las plantas su vaina para observar si había crecimiento y al resto se les dejó intacta la vaina para permitir el desarrollo de la semilla. Sólo cuatro plantas de soya con la construcción Glyma07g16980.1 con alto contenido de proteínas y una para alto contenido de aceites lograron producir una semilla por planta, semillas que servirán para el análisis posterior del proyecto.

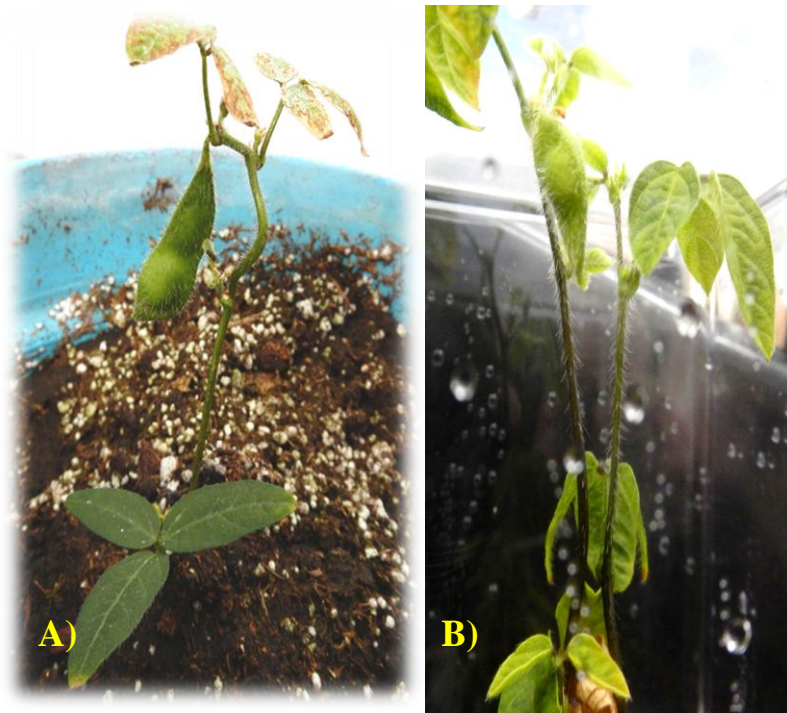


Figura 45. Plántulas de soya regeneradas del gen Glyma07g16980.1 silenciado. El proceso de transformación afecta por sí mismo el adecuado desarrollo de las plántulas, produciendo vainas de sólo una semilla y no elongando el tallo más de 20 cm. A) Plántula adaptada a sustrato produciendo una vaina, B) Plántula produciendo vaina en cultivo *in vitro*.

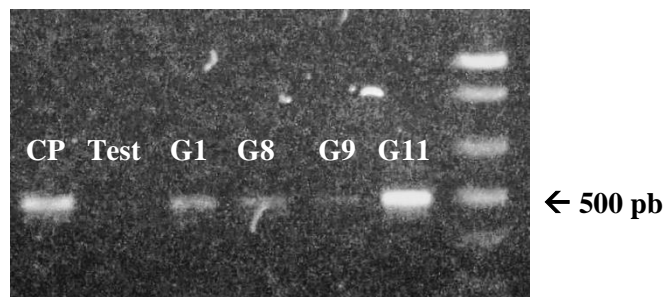


Figura 46. Confirmación por PCR amplificando el gen Bar (500pb) de las plantas de soya que produjeron semilla. CP = Control Positivo, Test = Planta sin transformación, G1, G8, G9, G11= plantas transformadas que produjeron semilla.

Se confirmó por PCR punto final la presencia del gen Bar del vector binario, indicando la transformación de las plantas de soya que produjeron semillas viables.

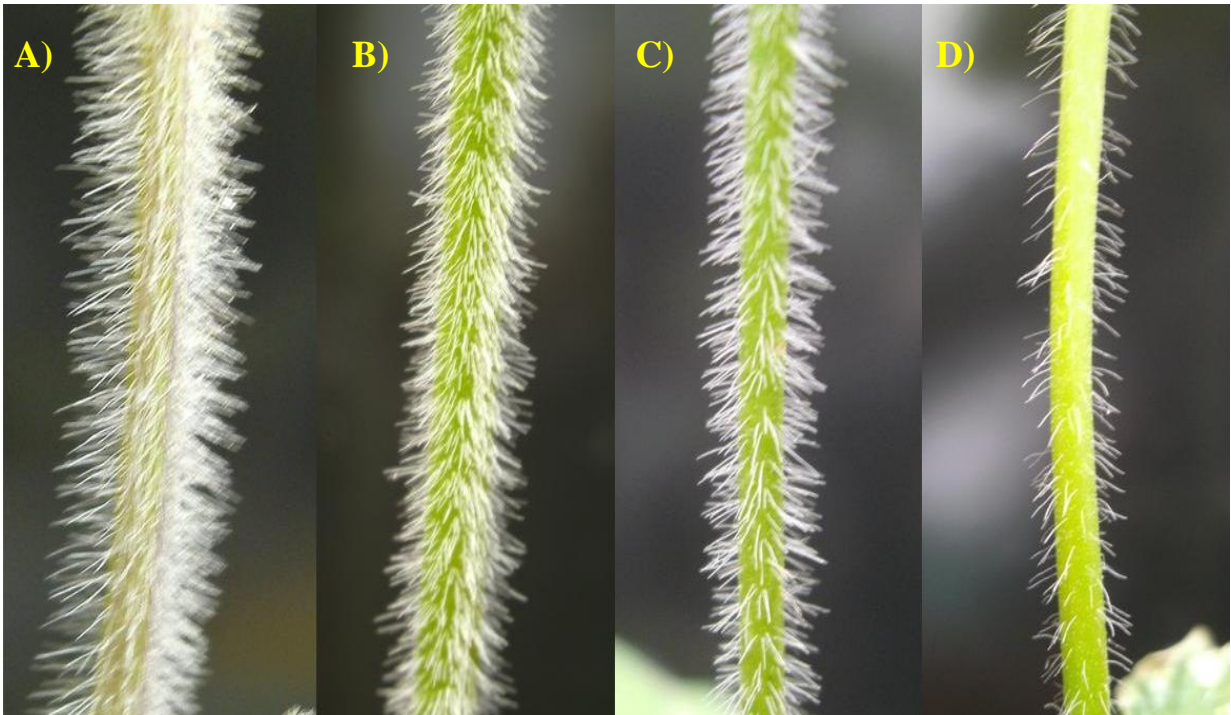


Figura 47. Fotografías comparativas de los tallos de la segunda generación de las plantas transformadas con el gen Glyma07g16980.1 silenciado. A) Control, B) G8 HP, C) G1 HO, C) G9 HP.

En base a las fotografías de los tallos, se nota una reducción en tamaño y abundancia de los tricomas en relación al control, sin embargo es necesario esperar a que las plantas tengan mayor desarrollo para poder hacer una evaluación más completa.

- **Glyma13g16890.1**

La transformación de soya con el vector de silenciamiento del segundo gen candidato a ortólogo de GL1, se realizó empleando la misma cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 y bajo las mismas condiciones que la construcción antisentido. De igual forma se emplearon las variedades con alto contenido de proteína y alto contenido de aceites.

Se han transformado 193 explantes usando las semillas con alto contenido de proteínas y 203 explantes con alto contenido de aceites. Se obtuvieron 8 semillas de plantas de soya con alto contenido de proteína y 4 semillas de las plantas de soya con alto contenido de aceites. El tiempo en producir semillas viables es de 4 meses, semejante a la construcción anterior.

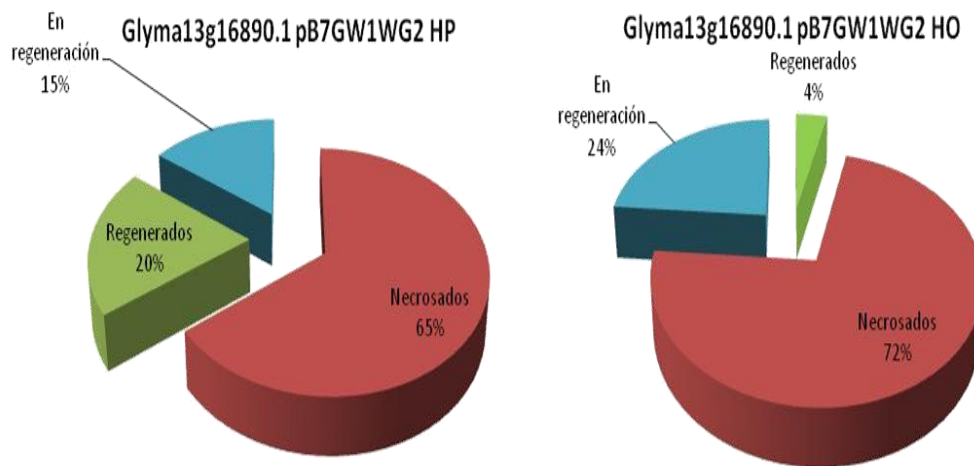


Figura 48. Eficiencias de regeneración en plantas de soya con el gen Glyma13g16890.1 silenciado. En color verde se indica el porcentaje de regeneración de plantas que se obtuvo, siendo mayor en la variedad con alto contenido de proteína.

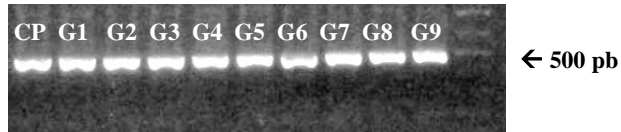


Figura 49. PCR del gen Bar en plantas transformadas con el gen Glyma13g16890.1 silenciado. CP = Control Positivo, G1-G9 = Plantas de soya que produjeron semilla.

El análisis molecular se confirmó mediante una PCR punto final, dando positivo el gen Bar del vector binario en las plantas de soya que produjeron semilla.



Figura 50. Adaptación de plantas transformadas con el gen Glyma13g16890.1 silenciado. Las plantas de soya T1 (Transformantes 1) presentan un desarrollo limitado en su crecimiento.

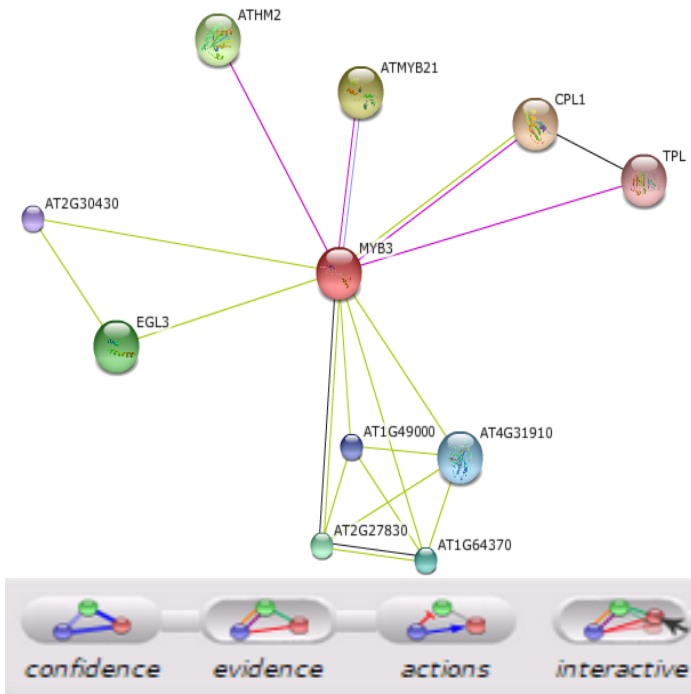
Debido a las plantas T1 presenta deficiencias en su desarrollo por la metodología empleada, no se puede realizar una valoración apropiada para el análisis de tricomas en hojas y tallos; por lo que será necesario germinar las semillas obtenidas, crecer las plantas T2 y así poder hacer una evaluación del fenotipo por efecto del silenciamiento del gen Glyma13g16890.1.

7. DISCUSIÓN

Como se mencionó en la introducción, el gen AtGL1 o MYB0 se encuentra ampliamente estudiado en *Arabidopsis thaliana*, sin embargo hasta el momento no se ha determinado experimentalmente un gen en soya o tomate que sean capaces de emular los mismos efectos que se tiene en *A. thaliana*. En el análisis filogenético y en BLAST no se encuentran genes idénticos (en secuencia de nucleótidos o aminoácidos) a MYB0; sin embargo con el análisis realizado en este proyecto se realizó la estimación de genes candidatos a ortólogos a GL1 en *Solanum lycopersicum* y *Glycine max*, que al ser procesadas las secuencias nucleotídicas en BLAST, se tienen predicciones comparativas a genes ya designados en *A. thaliana*, como factores de transcripción MYB-like. A continuación se enlistan los genes candidatos a ortólogos y la evidencia experimental que se tiene en relación a otros genes en *A. thaliana*, que podrían influenciar de manera directa o indirecta en el desarrollo de tricomas.

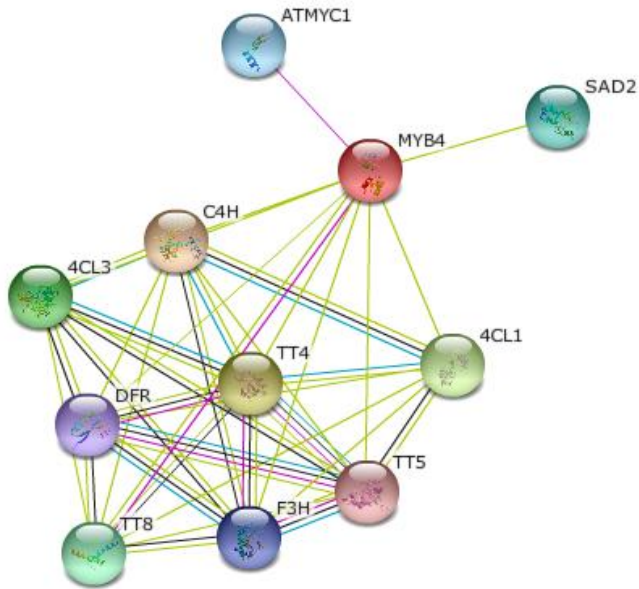
Solanum lycopersicum

- Solyc05g008250.1 → Factor de transcripción MYB3-like



Gen	Descripción
AT2G30430	Sin caracterizar
EGL3	ENHANCER OF GLABRA 3, promueve la formación de tricomas.
ATHM2	Participa en reacciones redox.
ATMYB21	Factor de transcripción envuelto en la fotomorfogénesis.
CPL1	Regulador multifuncional que modula el crecimiento de la planta, respuestas a estrés de fitohormonas.
TPL	Co-represor transcripcional.
AT1G49000	Sin caracterizar
AT4G31910	Relación con Acyl-transferasa
AT2G27830	Sin caracterizar
AT1G64370	Sin caracterizar

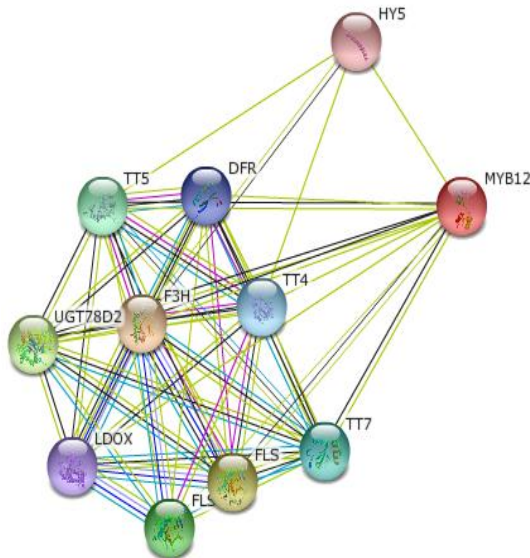
- Solyc05g055030.1 → Proteína relacionada a Myb, Myb4-like



Gen	Descripción
SAD2	Importina.
ATMYC1	Activador de la transcripción
4CL1	Ligasa 1 CoA
C4H	Controla el flujo de carbono esencial de los pigmentos para polinización y protección UV.
TT4	Chalcona sintasa
TT5	Transparent Testa 5
F3H	Flavanona 3-hydroxylasa
TT8	Transparent testa 8; activador de la transcripción
DFR	Dihydroflavonol 4-reductasa
4CL3	Ligasa 3 CoA

Glycine max

- Glyma13g16890 → Factor de transcripción MYB12-like



Gen	Descripción
HY5	Factor de transcripción que promueve la fotomorfogénesis en luz.
DFR	Dihydroflavonol 4-reductasa
TT4	Chalcona sintasa
TT5	Transparent Testa 5
TT7	Transparent Testa 7
F3H	Flavanona 3-hydroxylasa
FLS	Flavonol sintasa
LDOX	Involucrado en biosíntesis de antocianinas y protoanthocyanidin.
UGT78D2	UDP glucosil transferasa.

- Glyma07g16980 → Factor de transcripción MYB113-like

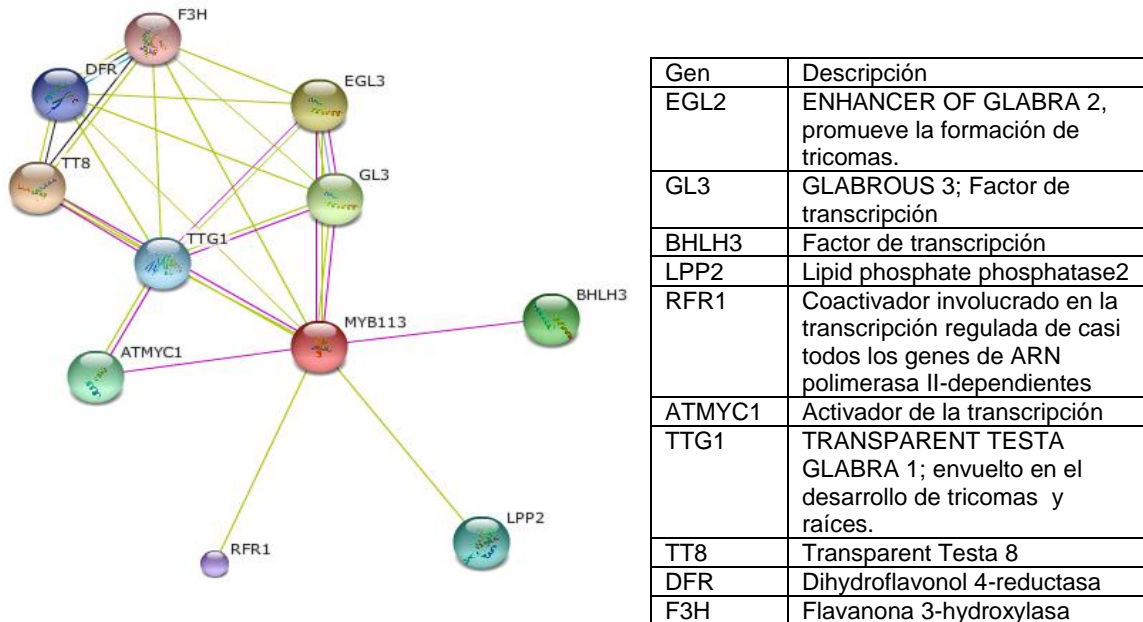


Figura 51. Genes relacionados a los genes candidatos a ortólogos de GL1. Se nota una mayor cantidad de genes relacionados al desarrollo de tricomas en aquellos genes establecidos por la filogenia, que los genes sugeridos por Phytozome.net (STRING 10; <http://string-db.org>)

Se tiene un mayor número de coincidencias en los genes calculados por el árbol filogenético en cuanto a la producción de tricomas, que aquellos genes sugeridos por Phytozome.net para ser los ortólogos proteicos de GL1; de igual forma se podría hacer un planteamiento hipotético del porque las plantas de tomate con el gen Solyc05g055030.1 silenciado, presentaron deficiencias en su desarrollo: se encuentra muy relacionado a la producción de componentes importantes para la planta (antocianinas, flavonoides, isoflavonoides, lignina, suberina, cumarinas y compuestos fenólicos), los flujos de carbono y la protección contra la radiación UV. Las plantas de soya con los genes silenciados aún deben de ser evaluados y posiblemente a futuro pueda realizarse una correlación con los genes reportados en STRING 10.

La mayoría de las metodologías de transformación de tomate usan el mismo sistema de desinfección de semillas, pero varían los protocolos en el material vegetativo de elección para poder tomar los explantes, transformarlos y

regenerarlos hasta tener una planta adulta; algunos obtienen sus explantes a partir de cotiledones (1.0 mg/L BAP y 0.1 AIA mg/L) (Sarker *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009), otros de hojas (Chandra *et al.*, 2013), y el empleado en este proyecto fue a partir de hipocótilos por su alto porcentaje de regeneración (Chaudhry *et al.*, 2010). En el caso de la transformación genética de soya, el procedimiento tiene un protocolo ya estandarizado, que se emplea en la mayoría de las investigaciones relacionadas a la transformación de soya mediada por *A. tumefaciens*; ese mismo protocolo se empleó en este trabajo, obteniendo los explantes a partir de embriones (Paz *et al.*, 2006).

Se obtuvieron buenas eficiencias de transformación siendo del 3.7% para el tomate, y entre un 4 y 20% para la soya; dando la oportunidad de cosechar frutos y extraer las semillas para realizar evaluaciones correspondientes al proyecto con las siguientes generaciones. Es posible que la infestación por la mosquita blanca transfiera virus letales a las plantas huésped, por lo que es preciso obtener líneas genéticamente estables de cada una de las construcciones, almacenar un stock de semillas y de acuerdo a la normatividad, esclarecer las condiciones en las que se realizarán las pruebas frente a la plaga *B. tabaci*.

Las metodologías de evaluación de la mosquita blanca en relación a la cantidad de tricomas consiste en dos criterios: confinar 30 mosquitas blancas en un ambiente cerrado con la planta huésped (control o planta transformada); y el segundo en colocar ambas plantas, tanto control como transformada, dentro del mismo ambiente confinado e introducir el mismo número de mosquitas. Transcurrido cierto tiempo, de 15 a 30 días, se colectan hojas y se contabilizan el número de ninfas en el envés, número de adultos y de huevecillos; posteriormente se hace un análisis estadístico para determinar si es o no significativo el número de moscas en sus distintos instares de desarrollo de acuerdo al número de tricomas en el envés de las hojas (Silva *et al.*, 2008; do Valle *et al.*, 2012; Taggar and Gill, 2012).

8. CONCLUSIONES

- Se lograron identificar genes ortólogos a GL1 en soya y tomate; se clonaron en vectores binarios.
- El silenciamiento del gen Solyc05g008250.1 produjo plantas con menor número de tricomas.
- El silenciamiento del gen Solyc05g055030.1 generó deficiencias en el desarrollo de las plantas, dando un fenotipo letal.
- Es necesario propagar generaciones T2 para su análisis.

9. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

Retar plantas transformadas genéticamente ante la infestación por *B. tabaci* para asociar la cantidad de mosquitas que pueden estar presentes en los diferentes fenotipos.

ANEXOS

Composición de medios de cultivo.

Medio MS

Solución stock inorgánica (10x)

Reactivo	Conc. Final	1 L	3 L
CaCl₂ 2H₂O	0.440 g/L	4.400 g	13.200 g
KNO₃	1.900 g/L	19.000 g	57.000 g
NH₄NO₃	1.650 g/L	16.500 g	49.500 g
KH₂PO₄	0.170 g/L	1.700 g	5.100 g
FeSO₄ 7H₂O	27.860 g/L	0.280 g	0.840 g
NA₂ EDTA 2H₂O	37.250 mg/L	0.373 g	1.110 g
MnSO₄ H₂O	16.880 mg/L	0.169 g	0.507 g
KI	0.830 mg/L	0.0083 g	0.025 g
ZnSO₄ 7H₂O	8.600 mg/L	0.086 g	0.258 g
H₃BO₃	6.200 mg/L	0.062 g	0.186 g
MgSO₄ 7H₂O	0.370 g/L	3.700 g	11.100 g
CoCl₂ 6H₂O *	0.025 mg/L	0.025mL	0.075 mL
CuSO₄ 5H₂O *	0.025 mg/L	0.025 mL	0.075 mL
Na₂MoO₄ 2H₂O *	0.250 mg/L	0.250 mL	0.750 mL

*Estos reactivos se preparan a partir de una solución stock de 10 mg/mL.

De la solución inorgánica, se utilizan 100mL para preparar un litro de medio de cultivo.

Solución stock orgánica (100x)

Reactivo	Conc. Final	0.5 L	1 L
GLICINA	2.0 mg/L	0.100 g	0.200 g
MIOINOSITOL	100.0 mg/L	5.000 g	10.000 g
TIAMINA – HCl	0.1 mg/L	0.005 g	0.010 g
PIRIDOXINA – HCl	0.5 mg/L	0.025 g	0.050 g
AC. NICOTINICO	0.5 mg/L	0.025 g	0.050 g

De esta solución orgánica, se utilizan 10mL filtrados para preparar un litro de medio de cultivo.

Medio LB

A 950 mL de agua destilada, agregar:

10 g de triptona

5 gramos de extracto de levadura

10 g de NaCl

Agitar hasta disolución. Ajustar pH a 7 con NaOH 1N. Ajustar el volumen de la solución a 1 litro con agua desionizada. Esterilizar.

Medio para germinar semillas

A un litro de medio MS, agregar:

30 g de sacarosa

2 g de gelrite

1 mL de Sol. Orgánica 100x después de esterilizar.

TBE 5x

A 900 ml de agua destilada agregar:

54 g de Tris base.

27.5 g de ácido bórico.

20 ml de EDTA 0.5 M (pH 8).

Medios para transformación genética de soya

Medio de cocultivo

Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración:
<ul style="list-style-type: none">• 1/10X Gamborg B5• 1/10 vitaminas B5• 2.8 mg/L Sulfato ferroso• 3.8 mg/L NaEDTA• 30 g/L Sacarosa	<ul style="list-style-type: none">• GA₃ (0.25 mg/L)• BAP (1.67 mg/L)• Cysteine (400 mg/L)• Dithiothreitol (154.2 mg/L)

<ul style="list-style-type: none"> • 3.9 g/L MES • 4.25 g/L Noble agar, pH 5.4. 	<ul style="list-style-type: none"> • 40 mg/L Acetosyringona
---	--

Colocar un papel filtro estéril sobre el medio de cultivo para evitar la proliferación de bacterias.

Medio de infección

Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración:
<ul style="list-style-type: none"> • 1/10 X Gamborg B5 Basal Medium • 30 g/L Sacarosa • 3.9 g/L MES, pH 5.4. 	<ul style="list-style-type: none"> • GA₃ (0.25 mg/L) • BAP (1.67 mg/L) • 40 mg/L Acetosyringona

Medio de lavado para inducción de brotes

Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración:
<ul style="list-style-type: none"> • 1X Gamborg B5 Basal Medium • 30 g/L Sacarosa • 0.59 g/L MES, pH 5.7 	<ul style="list-style-type: none"> • BAP (1.11 mg/L) • Meropenen (100 mg/L)

Medio de inducción de brotes

Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración:
<ul style="list-style-type: none"> • 1X Medio MS • 30 g/L Sacarosa • 0.59 g/L MES • 7 g/L Noble agar, pH 5.7 	<ul style="list-style-type: none"> • BAP (1.11 mg/L) • Meropenen (100 mg/L) • Glufosinato (8 mg/L) • 1X Sol Orgánica B5

Medio de elongación de brotes

Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración:
<ul style="list-style-type: none"> • 1X MS 	<ul style="list-style-type: none"> • Asparagina (50 mg/L)

<ul style="list-style-type: none"> • 30 g/L Sacarosa • 0.59 g/L MES • 7 g/L Noble agar, pH 5.7 	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido L-Pyrog glutámico (100 mg/L) • IAA (0.1 mg/L) • GA3 (0.5 mg/L) • 1X Organic B5 • Zeatin-R (1 mg/L) • Meropenen (100 mg/L) • Glufosinato (8 mg/L)
---	--

Medio de enraizamiento

Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración:
<ul style="list-style-type: none"> • ½ X MS • 20 g/L Sacarosa • 0.59 g/L MES • 7 g/L Noble agar, pH 5.6 	<ul style="list-style-type: none"> • IBA (1 mg/L) • Glufosinato (3 mg/L) • ½ X Sol. Orgánica B5

Medios para transformación genética de tomate

Medio para germinar semillas de tomate

Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración:
<ul style="list-style-type: none"> • 1X MS • 2.8 mg/L Sulfato ferroso • 3.8 mg/L NaEDTA • 0.59 g/L MES • 30 g/L Sacarosa • *****pH 5.8 • 2 g/L gelrite o phytogel 	<ul style="list-style-type: none"> • 1X Vitaminas B5

Medio líquido de infección

Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración:
<ul style="list-style-type: none">• 1/10 X MS• 30 g/L Sacarosa• *****pH 5.8	<ul style="list-style-type: none">• IAA (1 mg/L)• Zeatina (1 mg/L)• Acetosyringona (40 mg/L)

Medio de Co-cultivo para tomate

Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración:
<ul style="list-style-type: none">• 1X MS• 2.8 mg/L Sulfato ferroso• 3.8 mg/L NaEDTA• 0.59 g/L MES• 30 g/L Sacarosa• *****pH 5.8• 0.8% Agar	<ul style="list-style-type: none">• 1X Vitaminas B5• IAA (1 mg/L)• Zeatina (1 mg/L)• Acetosyringona (40 mg/L)

Medio líquido de lavado de explantes** en caso de infección masiva.

Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración:
<ul style="list-style-type: none">• 1 X MS• 30 g/L Sacarosa• ****pH 5.8	<ul style="list-style-type: none">• Cefotaxima 500 mg/L• Meropenen 100 mg/L• Vancomicina 250 mg/L

Medio de Regeneración de brotes e inhibición de crecimiento de *Agrobacterium*

Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración:
<ul style="list-style-type: none">• 1X MS• 2.8 mg/L Sulfato ferroso• 3.8 mg/L NaEDTA	<ul style="list-style-type: none">• 1X Vitaminas B5• IAA (1 mg/L)• Zeatina (1 mg/L)

<ul style="list-style-type: none"> • 0.59 g/L MES • 30 g/L Sacarosa • ****pH 5.8 • 0.8% Agar 	<ul style="list-style-type: none"> • Meropenen (100 mg/L)
--	--

Medio SRM con presión de selección

Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración:
<ul style="list-style-type: none"> • 1X MS • 2.8 mg/L Sulfato ferroso • 3.8 mg/L NaEDTA • 0.59 g/L MES • 30 g/L Sacarosa • ****pH 5.8 • 0.8% Agar 	<ul style="list-style-type: none"> • 1X Vitaminas B5 • IAA (1 mg/L) • Zeatina (1 mg/L) • Glufosinato (0.5 mg/L)*

Medio de Enraizamiento

Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración:
<ul style="list-style-type: none"> • 0.5X MS • 2.8 mg/L Sulfato ferroso • 3.8 mg/L NaEDTA • 0.59 g/L MES • 30 g/L Sacarosa • ****pH 5.8 • 7 g/L Agar 	<ul style="list-style-type: none"> • 1X vitaminas B5 • IBA (0.5 mg/L) • Glufosinato (0.5 mg/L)

REFERENCIAS

- Akers C.P., J.A. Weybrew, R.C. Long (1978) Ultrastructure of glandular trichomes of leaves of *Nicotiana tabacum* L., cv Xanthi. *Am J Bot* 65: pp 282–292.
- Aparicio, V.; Rodríguez, M.D.; Gómez, V.; Sáez, E.; Belda J.E.; Casado, E. & Lastres, J., (1995). Plagas y enfermedades del tomate en la provincia de Almería: control racional. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla: 182 pp.
- AGROINFORMACIÓN. (2004) Métodos de control de la mosca blanca *B. tabaci*. Fecha de consulta 13/01/14. <http://www.infoagro.com/abonos/moscablanca.htm>
- Aguirre, U. L. A. y J. Soria M. 1993. Generalidades sobre mosquita blanca. Memorias del II Taller sobre control biológico de mosquita blanca. SARH-CNRCBFS. Culiacán, Sinaloa. 80 pp.
- Avilés, G.M. 1997. Distribución vertical de mosquita blanca *Bemisia Tabaci* Geen (Homóptera: Aleyrodidae) en tomate. Tesis de Maestro en Ciencias. Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Agronomía. Culiacán, Rosales, Sinaloa. pp140.
- Blancard, D. (2011). Enfermedades del tomate. Mundi-Prensa Libros. 19pp
- Behnke HD. 1984. Plant trichomes-structure and ultrastructure: general terminology, taxonomic applications, and aspects of trichomebacterial interaction in leaf tips of *Dioscorea*. In: Rodriguez E, Healey PL, Mehta I, eds. *Biology and chemistry of plant trichomes*. New York: Plenum Press, pp 1-21.
- Bernard R.L., B.B. Singh. (1969) Inheritance of pubescent type in soybeans: glabrous, curly, dense, sparse, and pubescent. *Crop Sci* 9: pp 192– 197.
- Brown, J., D. Frohlich & R. Rosell. 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex. *Annu. Rev.Entomol.* 40: 511-534.

- Brown, K. J. (1992). Evaluación crítica sobre biotipos de mosca blanca en América. Memorias del Taller Centroamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas. Turrialba, Costa Rica. pp 1-9.
- Brown, J. & J. Bird. 1992. Whitefly transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean basin. *Plant Dis.*76: pp 200-225.
- Butler, G. D., Jr., & Henneberry, T. J. (1984). *Bemisia tabaci*: effect of cotton leaf pubescence on abundance. *Southwest Entomologist*, 9, pp 91–94.
- Butler, G. D., Jr., Wilson, F. D., & Fishler, G. (1991). Cotton leaf trichomes and populations of *Empoasca lubica* and *Bemisia tabaci*. *Crop Protection*, 10, pp 461–464.
- Byrne, D., T. Bellows & M. Parrella. 1990. Whiteflies in agricultural systems. *Whiteflies: their bionomics, pest status and management*. Intercept, Andover UK, pp. 227-261.
- Çelik, Ö., Atak, Ç., & Suludere, Z. (2014). Response of soybean plants to gamma radiation: Biochemical analyses and expression patterns of trichome development. *Plant Omics*, 7(5), 382-391.
- Chandra, I., Singh, P., Bhattacharya, A., Singh, P., Javed, S., & Singhamahapatra, A. (2013). In vitro callus induction, regeneration and micropropagation of *Solanum lycopersicum*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*,2(12), pp 192-197.
- Channarayappa, S.G.; Muniyappa, V.; Frist, R.H. (1992) Resistance of *Lycopersicon* species to *Bemisia tabaci*, a tomato leaf curl virus vector. *Can. J. Bot.*, 70, 2184–2192.
- Chhabra, K. S., & Kooner, B. S. (1998). Insect pest management in mungbean and black gram: Status and strategies. *IPM System in Agriculture*, Vol. 4, pp. 233–310.
- Chaudhry, Z., Abbas, S., Yasmin, A., Rashid, H., Ahmed, H., & Anjum, M. A. (2010). Tissue culture studies in tomato (*Lycopersicon esculentum*) var. Moneymaker. *Pak. J. Bot.*, 42(1), 155-163.

- Cohen, S. 1990. Epidemiology of whitefly-transmitted viruses, Whiteflies: their bionomics, pest status and management. Intercept, Andover UK, pp. 211-225.
- Cox S. (2000). From discovery to modern commercialism: the complete story behind *Lycopersicon esculentum*. <http://www.landscapeimagery.com/articles.html>
- Dell B, McComb AJ. 1978. Plant Resins-their formation, secretion and possible functions. *Advances in Botanical Research* 6: 227-316.
- Duarte, R.M. (1992). "Generalidades sobre mosquitas blancas." *Memorias. Métodos de control de mosquita blanca en hortalizas. SARH-DGVS-CNRDF-UABC*. pp 1-8.
- Evans, G. A. 2008. The whiteflies (Hemiptera: *Aleyrodidae*) of the world and their host plants and natural enemies. *Ver. 070606*: pp 249-508.
- Fahn A. 2000. Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research* 31: 37-75.
- FAO (2011). Producción y exportación de soya a nivel mundial durante el 2011. Fecha de consulta 20/01/14. <http://faostat.fao.org/>
- FAO (2012). Producción y exportación de tomate a nivel mundial durante el 2012. Fecha de consulta 20/01/14. <http://faostat.fao.org/>
- Fernández Yépez, F., Rosales, C. J. (1986). *Guía de Entomología Económica*. Maracay, Venezuela, Universidad Central de Venezuela. Multigrafiado.145 pp
- FinancieraRural (2013). *Semilla para Siembra de Soya*. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial Dirección Ejecutiva de Análisis Sectorial. 1-10pp.
- Franceschi, V. R., & Giaquinta, R. T. (1983). Glandular trichomes of soybean leaves: cytological differentiation from initiation through senescence. *Botanical Gazette*, 175-184.
- French J.C. (1987). Structure of ovular and placental trichomes of Araceae. *Bot Gaz* 148: pp 198–208.

- Gerling, D. (1986). Natural enemies of *Bemisia tabaci*, biological characteristics and potential as biological control agents: a review. *Agriculture, ecosystems & environment*, 17(1), pp 99-110.
- Glas, J. J., Schimmel, B. C., Alba, J. M., Escobar-Bravo, R., Schuurink, R. C., & Kant, M. R. (2012). Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. *International journal of molecular sciences*, 13(12), 17077-17103.
- Goldberg, B. (2008). Genetics and genomics of soybean (Vol. 2). G. Stacey (Ed.). Springer Science & Business Media. pp 211- 293.
- Guard A.T. (1931). Development of floral organs of the soy bean. *Bot Gaz* 91: pp 97–102.
- Gunasinghe U.B., M.E. Irwin, G.E. Kampmeir. (1988) Soybean leaf pubescence affects aphid vector transmission and field spread of soybean mosaic virus. *Ann Appl Biol* 112:259–272.
- Heinz, K. M., & Zalom, F. G. (1995). Variation in trichomebased resistance to *Bemisia argentifolii* (Homoptera:*Aleyrodidae*) oviposition on tomato. *Journal of Economic Entomology*, 88, pp 1494–1502.
- Hancock J.F. (2004) Plant evolution and the origin of crop species, CABI Publ, Wallingford, Oxon, UK, pp 313.
- Healy R.A., H.T. Horner, T.B. Bailey, R.G. Palmer. (2005). A microscopic study of trichomes on gynoecia of normal and tetraploid Clark cultivars of *Glycine max* and seven near-isogenic lines. *Int J Plant Sci* 166:pp 415–425.
- Healy, R. A., Palmer, R. G., & Horner, H. T. (2009). Multicellular secretory trichome development on soybean and related *Glycine* gynoecia. *International journal of plant sciences*, 170(4), pp 444-456.
- Hilje, L.; Arboleda, O. (1992a) Las Moscas Blancas en América Central y el Caribe. CATIE. pp 65.
- Hilje, L. (1992b). Plan de Acción Regional para le manejo de las moscas blancas en América Central y el Caribe. CATIE, Turrialba, Costa Rica. pp 27.

- Hunt, M. R. (2009). Molecular Analyses of the Soybean Glabrous Mutation (P1) and of Transgenic Lines Designed to Modify Seed Composition. ProQuest. pp 1-8.
- InfoAgro. (2015) El cultivo de la Soya, Morfología y Taxonomía. Fecha de consulta 21/07/15. <http://www.infoagro.com/herbaceos/industriales/soja.htm>
- INIFAP (2014) Guía para la asistencia Técnica Agrícola de Nayarit- Soya. 2-6 pp.
fupronay.org.mx/guia%20tecnica/guia/ArchivosPDF/SOYA.pdf
- Jenkins J.A. (1948). The origin of the cultivated tomato. *Econ Bot* 2: pp 379–392
- Johnson HB. 1975. Plant pubescence: an ecological perspective. *Botanical Review* 41: 233-253.
- Johnpeter, A., Shanower, T. G., & Romes, J. (1995). The role of plant trichomes in insect resistance: a selective review. *Phytophaga*, 7, pp 41–64.
- Kang, J. H., Shi, F., Jones, A. D., Marks, M. D., & Howe, G. A. (2010). Distortion of trichome morphology by the hairless mutation of tomato affects leaf surface chemistry. *Journal of experimental botany*, 61(4), 1053-1064
- Kauffman W.C., Kennedy G.G. (1989). Relationship between trichome density in tomato and parasitism of *Heliothis spp.* (Lepidoptera, *Noctuidae*) eggs by *Trichogramma spp* (Hymenoptera, *Trichogrammatidae*). *Environ Entomol* 18: pp 698–704.
- Kempema, L. A., Cui, X., Holzer, F. M., & Walling, L. L. (2007). Arabidopsis transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. *Plant Physiology*, 143(2), pp 849-865.
- Kessler A., Baldwin I.T. (2002). Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu Rev Plant Biol* 53: pp 299–328.
- Kishaba, A. N., Castle, S., McCreight, J. D., & Desjardins, P. R.(1992). Resistance of white-flowered gourd to sweetpotato whitefly. *Horticultural Science*, 27, pp 1217–1221.

- Kliebenstein D.J. (2004) Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant Cell Environ* 27: pp 675–684.
- Koornneef M. (1981). The complex syndrome of ttg mutants. *Arabid Inf Serv* 18: pp 45–51.
- Kronestedt-Robards E, Robards AW. (1991). Exocytosis in glands cells. Society for Experimental Biology, Seminar Series 45: 199-232.
- Lam W-K.F., Pedigo L.P. (2001) Effect of Trichome Density on Soybean Pod Feeding by Adult Bean Leaf Beetles (Coleoptera: *Chrysomelidae*). *Journal of Economic Entomology* 94(6): pp 1459-1463.
- Lambert A.L., McPherson R.M., Sparks B. (1995) Evaluation of selected soybean genotypes for resistance to two whitefly species(Homoptera: *Aleyrodidae*) in the greenhouse. *J Entomol Sci*30: pp 519–526.
- Latif, M. A., & Akhter, N. (2013). Population dynamics of whitefly on cultivated crops and its management. *International Journal of Bio-resource and Stress Management*, 4(4), 576-581.
- Lawson, D. M., Lunde, C. F., & Mutschler, M. A. (1997). Marker-assisted transfer of acylsugar-mediated pest resistance from the wild tomato, *Lycopersicon pennellii*, to the cultivated tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Molecular Breeding*, 3(4), pp 307-317.
- Lope, M. C., Militza, O. E. X., Alberto, A. M. N., & Antonio, C. A. J. (2011). Guía para Producir Soya en el Sur de Sonora. pp 25-30.
- López A.B. (1995). Periodos de protección en soya contra la mosquita blanca de la hoja plateada (*Bemisia tabaci* biotipo “B” Bellows & Perring), en el Valle del Fuerte, Sin. *Memoria Científica No. 3. Mosquita Blanca en el Noroeste de México.* pp 24.
- Luckwill, L.C. The genus *Lycopersicon*: A historical, biological and taxonomic survey of the wild and cultivated tomato. *Aberd. Univ. Stud.* 1943, pp 120, 1–44.
- Lugo, M. D. L. (2007) Conjunto Tecnológico para la Producción de Tomate de Ensalada. Universidad de Puerto Rico. 9-12 pp.

- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J.(1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY,143(426), pp 219-101.
- Maroto, J. 1994. Horticultura Herbácea Especial. 4ª. ed. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa. 611 p.
- Martin, F. W. (1998). Soybean. ECHOCommunity Technical note. pp 1-5.
- McAuslane, H. J. (1996). Influence of leaf pubescence on ovipositional preference of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) on soybean. *Environmental Entomology*, 25,834–841.
- McAuslane, H. J., Johnson, F. A., Colvin, D. L., & Sojack, B. (1995). Influence of foliar pubescence on abundance and parasitism of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) on soybean and peanut. *Environmental Entomology*, 24(5), pp 1135-1143.
- Morillo E.F., and Marcano R.V. (1997). Estudio del desarrollo de la mosca blanca en diferentes genotipos de tomate. *Agronomía Trop.* 47(3): pp 271-286.
- Nafziger, E. Soybean. (2008) In: Illinois Agronomy Handbook. Illinois College of Aces Department of Crop Sciences. pp 27-36.
- NHM (2015). Transfer and spread. A map of the origination, transfer and spread of soya. Natural History Museum. Fecha de consulta 21/07/15. <http://www.nhm.ac.uk/search.html?q=soybean#sthash.XHhVKy7B.dpuf>
- Nombela, G., Beitia, F., & Muñoz, M. (2000). Variation in tomato host response to *Bemisia tabaci* (Hemiptera: *Aleyrodidae*) in relation to acyl sugar content and presence of the nematode and potato aphid resistance gene Mi. *Bulletin of entomological research*, 90(02), 161-167.
- Ohashi Y, Oka A (2002) Entopically additive expression of GLABRA2 alters the frequency and spacing of trichome initiation. *Plant J* 29:359–369
- Oppenheimer D.G., Herman P.L., Sivakumaran S., Eschm J., Marks M.D. (1991). A myb gene required for leaf trichome differentiation in *Arabidopsis* is expressed in stipules. *Cell* 67:pp 483–493.

- Ortega A., L.D. 1999. Mosca blanca vectora de virus en hortalizas (Homoptera: Aleyrodidae) pp: 149–176.
- Payne CT, Zhang F, Lloyd AM (2000) GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in Arabidopsis through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics* 156:pp 1349–1362.
- Paz, M., Martinez, J. C., Kalvig, A., Fonger, T., Wang, K. (2006). Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient Agrobacterium-mediated soybean transformation. *Plant Cell Reports*, 25: pp 206-213.
- Ramos F. (2004). Principales insectos plagas de la soya. Divulgativo CENIAP. Vol 4. 1-3 pp. Fecha de consulta: 21/08/15.
http://www.sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/Divulgativo_Ceniap/ipsoya.html
- Retallack B., J.H.M. Willson. (1988) Morphology, anatomy, and distribution of capitate glandular trichomes on selected Trifolium species. *Crop Sci* 28: pp 677–680.
- de Resende, J. T., Maluf, W. R., Cardoso, M. D. G., Gonçalves, L. D., Faria, M. V., & do Nascimento, I. R. (2009). Resistance of tomato genotypes to the silverleaf whitefly mediated by acylsugars. *Horticultura Brasileira*, 27(3), 345-348.
- Rick C.M. (1995) Tomato: *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae). In: Smartt J, Simmonds NW(eds) *Evolution of crop plants*. Longman, Harlow, Essex, England, UK, pp 452–457
- Rick C. M. (1978). The tomato. *Scientific American*, Vol 239, No.2 pp 76-87.
- Rubatsky V. E. y Yamagochi M. (1999). *World Vegetables - Principles, Production and Nutritive Values*, 2da Ed. Aspen Publishers Inc. pp 532-553.
- SAGARPA. (2009a). Estudio de Oportunidades de Mercado e Inteligencia Comercial y Estudio de Logística Internacional de Tomate. Fecha de consulta 13/01/14
http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/documents/estudios_promercado/tomate.pdf

- SAGARPA (2009b). Informe producción de GRANOS 1998-2008. Estudio de gran visión y factibilidad económica y financiera para el desarrollo de infraestructura de almacenamiento y distribución de granos y oleaginosas para el mediano y largo plazo a nivel nacional. pp 224.
- SAGARPA. (2010) Monografía de cultivos "Jitomate". Secretaría de Fomento a los Agronegocios. 3-10 pp.
- SAGARPA (2010a). La Importancia del Frijol Soya. Dirección General de Operaciones Financieras, Dirección de Estudios y Análisis de Mercados.
- <http://www.infoaserca.gob.mx/fichas/ficha30-Soya201007.pdf>
- Santa Cruz (2011). Cartilla de difusión técnica: Enfermedades de cultivo de soya. Fecha de consulta: 21/08/15.
https://rhes.ruralhorizon.org/uploads/documents/cartilla_4_enfermedades.pdf
- Sarker, R. H., Islam, K., & Hoque, M. I. (2009). In vitro regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 19(1), pp 101-111.
- Schaller, A. (2008). Induced plant resistance to herbivory. Germany: Springer. pp 89-105.
- Schiefelbein J (2003) Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot. *Curr Opin Plant Biol* 6:74–78.
- Sharma, M. K., Solanke, A. U., Jani, D., Singh, Y., & Sharma, A. K. (2009). A simple and efficient *Agrobacterium*-mediated procedure for transformation of tomato. *Journal of biosciences*, 34(3), pp 423-433.
- Shen B, Sinkevicius KW, Selinger DA, Tarczynski MC (2006) The homeobox gene GLABRA2 affects seed oil content in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 60: pp 377–387.
- Silva, M. S., Lourenção, A. L., de Souza-Dias, J. A. C., Miranda Filho, H. D. S., Ramos, V. J., & Schammas, E. A. (2008). Resistance of potato genotypes (*Solanum spp.*) to *Bemisia tabaci* biotype B. *Horticultura Brasileira*, 26(2), pp 221-226.

- Singh BB, Hadley HH, Bernard RL (1971) Morphology of Pubescence in Soybeans and Its Relationship to Plant Vigor. *Crop Science* 11: 13-16.
- Sippel, D.W., Bindra, O. S., & Khalifa, H. (1987). Resistance to whitefly (*Bemisia tabaci*) in cotton (*Gossypium hirsutum*) in Sudan. *Crop Protection*, 6, pp 171–178.
- Sosa Alejandra. (2013) Guía para el Reconocimiento de Enfermedades en el Cultivo de Tomate. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. pp 11-26.
- Soya.be (2014). Information about Soy and Soya Products. History of soybeans. Fecha de consulta 20/01/14. <http://www.soya.be/history-of-soybeans.php>
- Steinhauser, M. C., Steinhauser, D., Koehl, K., Carrari, F., Gibon, Y., Fernie, A. R., & Stitt, M. (2010). Enzyme activity profiles during fruit development in tomato cultivars and *Solanum pennellii*. *Plant Physiology*, 153(1), pp 80-98.
- Styrsky, J. D., Kaplan, I., & Eubanks, M. D. (2006). Plant trichomes indirectly enhance tritrophic interactions involving a generalist predator, the red imported fire ant. *Biological Control*, 36(3), 375-384.
- Syngenta. (2013). Enfermedades de importancia económica en soya. Fecha de consulta: <http://www.syngenta.com.mx/soya-enfermedades.aspx>
- SYNGENTA. (2015) Enfermedades y plagas del tomate. Fecha de consulta 13/01/14. <http://www3.syngenta.com/country/es/sp/cultivos/tomate/Paginas/home.aspx>
- Szymanski DB, Lloyd AM, Marks MD (2000) Progress in the molecular genetic analysis of trichome initiation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 5:214–219.
- Taggar, G. K., & Gill, R. S. (2012). Preference of whitefly, *Bemisia tabaci*, towards black gram genotypes: Role of morphological leaf characteristics. *Phytoparasitica*, 40(5), pp 461-474.
- Torres, I., J. Garzón, J. Brown, A. Becerra & R. Rivera. 1996. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the southern United States. *Phytopathology* 86: pp 1186-1192.

- Torres y Torres, N., & Tovar-Palacio, A. R. (2009). La historia del uso de la soya en México, su valor nutricional y su efecto en la salud. *salud pública de México*, 51(3), 246-254.
- Uphof J.C.T. 1962. Plant hairs. *Encyclopedia of Plant Anatomy IV*, 5: 1-206.
- do Valle, G. E., Lourenção, A. L., & Pinheiro, J. B. (2012). Adult attractiveness and oviposition preference of *Bemisia tabaci* biotype B in soybean genotypes with different trichome density. *Journal of pest science*, 85(4), pp 431-442.
- Vejar-Cota, G., Ortega-Arenas, L. D., & Carapia-Ruiz, V. E. (2009). Primer registro de la mosca blanca de los cereales *Aleurocybotus occiduus* Russell (Hemiptera: Aleyrodidae) y su impacto potencial como plaga de gramíneas en el norte de Sinaloa. *Acta zoológica mexicana*, 25(1), 33-48.
- Vieira, S. S., Bueno, R. C., Bueno, A. D. F., Boff, M. I. C., & Gobbi, A. L. (2013). Different timing of whitefly control and soybean yield. *Ciência Rural*, 43(2), 247-253.
- Wagner, G. J., Wang, E., & Shepherd, R. W. (2004). New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany*, 93(1), pp 3-11.
- Walling L.L. (2000). The myriad plant responses to herbivores. *J Plant Growth Regul* 19: pp 195–216.
- Werker E. 2000. Trichome diversity and development. *Advances in Botanical Research* 31: 1-35.
- Zhang F., Gonzales A., Zhao M.Z., Payne C.T., Lloyd A. (2003). A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*. *Development* 130:pp 4859–4869.