



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

“Physiological and biochemical insights into pepper (*Capsicum annuum* L.) responses to green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer)”

Victoria Florencio Ortiz



Tesis **Doctorales**

UNIVERSIDAD de ALICANTE

Unitat de Digitalització UA

Unidad de Digitalización UA



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Instituto Universitario de Investigación CIBIO
(Centro Iberoamericano de la Biodiversidad)

**“Physiological and biochemical insights into
pepper (*Capsicum annuum* L.) responses to
green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer)”**

Victoria Florencio Ortiz

Tesis presentada para optar al grado de
DOCTORA POR LA UNIVERSIDAD DE ALICANTE
MENCIÓN DE DOCTORA INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN

Dirigida por:
José Luis Casas Martínez
Profesor Titular de Fisiología Vegetal
I.U.I. CIBIO

Agradecimientos

Los trabajos de esta Tesis han sido financiados por el proyecto PROMETEO/2013/034 de Generalitat Valenciana y por el proyecto CGL2016-79054-R del Ministerio de Economía y Competitividad. Por otro lado, para la realización de este trabajo de investigación he disfrutado de una beca-contrato para la Formación de Doctores del Vicerrectorado de Investigación, Desarrollo e Innovación de la Universidad de Alicante (Referencia UAFPU: 2013-5793). De manera adicional, dentro del programa de investigación de dicha Universidad, he disfrutado de financiación para dos estancias de investigación en centros extranjeros y poder optar así a la mención de Doctorado Internacional.

Los resultados recogidos en la presente memoria de Tesis han generado las siguientes publicaciones en revistas científicas indexadas:

- Florencio-Ortiz V, Sellés-Marchart S, Zubcoff-Vallejo J, Jander G, Casas JL. 2018. Changes in the free amino acid composition of *Capsicum annuum* (pepper) leaves in response to *Myzus persicae* (green peach aphid) infestation. A comparison with water stress. *PLoS ONE* 13(6): e0198093.
- Florencio-Ortiz V, Novák O, Casas JL. 2018. Local and systemic hormonal responses in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves under green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) infestation. *Journal of Plant Physiology* 231: 356–363.

Durante los años 2015-2016 realicé dos estancias, de una duración de tres meses cada una, en los siguientes centros de investigación:

- *Boyce Thompson Institute for Plant Research* (Ithaca, Nueva York, Estados Unidos). En el grupo de investigación “*Biotic Interactions*”, bajo la supervisión del Dr. Georg Jander. El aprendizaje realizado durante esta estancia fue la base para el desarrollo de los experimentos realizados en el capítulo 1 de la presente Tesis Doctoral.
- *Palaky University Olomouc & Institute of Experimental Botanics AS CR* (Olomouc, República Checa). En el grupo de investigación “*Laboratory of*

Growth Regulators”, bajo la supervisión del Dr. Ondřej Novák. Durante esta estancia se realizaron los análisis fitoquímicos de las muestras preparadas en la Universidad de Alicante, los cuales se encuentran plasmados en los capítulos 2, 3 y 5 de la presente Tesis Doctoral.

En primer lugar quiero agradecer a mi director de Tesis, el **Dr. José Luis Casas Martínez**, el haberme dado la oportunidad de iniciar mi carrera en el mundo de la investigación en la interacción planta-insecto con la realización de esta Tesis Doctoral, así como por su valiosa ayuda y apoyo durante todos estos años. Gracias al **Dr. Georg Jander** y al **Dr. Ondřej Novák** por acogerme tan cálidamente en sus respectivos laboratorios donde pude aprender muchísimo y obtener parte de los resultados de esta Tesis. Al **Dr. Jiří Grúz** (Investigador en el “*Laboratory of Growth Regulators*” en la República Checa) le agradezco el haberme dado la oportunidad de realizar juntos los análisis de ácidos fenólicos. Gracias a la **Dra. Susana Sellés Marchart** (profesora del Departamento de Agroquímica y Bioquímica de la UA) por su enorme e indispensable ayuda en lo que respecta a los análisis proteómicos y el desarrollo del método de análisis de aminoácidos. De igual manera, quiero agradecer al **Dr. José Jacobo Zubcoff Vallejo** (profesor del Departamento de Ciencias del mar y Biología Aplicada de la UA) el soporte en parte de los análisis estadísticos de esta Tesis Doctoral. También me gustaría agradecer a la **Dra. M^a Ángeles Marcos García** su interés y seguimiento cercano de esta Tesis.

Por último, quiero agradecer todo el cariño y los consejos que he recibido durante estos años por parte de mis familiares, amigos, compañeros de trabajo en el CIBIO y compañeros en Ithaca y en Olomouc. Sin su paciencia, comprensión y apoyo incondicional este trabajo no habría sido posible. Mención especial requiere el **Dr. Jorge Juan Vicedo**, no solo por haber sido mi hermano mayor en el laboratorio sino, además, por su ayuda en incontables ocasiones cuando faltaban manos para la preparación del material vegetal utilizado en esta Tesis Doctoral.

¡ MUCHÍSIMAS GRACIAS A TODOS!

*Esta Tesis Doctoral
está dedicada a mis padres,
Carmen y Matías.*



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Índice

SECCIÓN I

Resumen	3
Summary	25
Introducción general: Bases teóricas para el estudio de la interacción planta-pulgón	53

SECCIÓN II: TRABAJOS PUBLICADOS

Capítulo 1. Changes in the free amino acid composition of <i>Capsicum annuum</i> (pepper) leaves in response to <i>Myzus persicae</i> (green peach aphid) infestation. A comparison with water stress.	117
Capítulo 2. Local and systemic hormonal responses in pepper (<i>Capsicum annuum</i> L.) leaves under green peach aphid (<i>Myzus persicae</i> Sulzer) infestation.	153

SECCIÓN III: TRABAJOS NO PUBLICADOS

Capítulo 3. Phytohormone responses in pepper (<i>Capsicum annuum</i> L.) leaves under a high density of aphid infestation.	183
Capítulo 4. Proteome changes in pepper (<i>Capsicum annuum</i> L.) leaves induced by the green peach aphid (<i>Myzus persicae</i> Sulzer).	203
Capítulo 5. Changes in the free phenolic acid composition of pepper (<i>Capsicum annuum</i> L.) leaves in response to green peach aphid (<i>Myzus persicae</i> Sulzer) infestation.	273

SECCIÓN IV

Conclusiones	297
Conclusions	301
Curriculum Vitae	305

SECCIÓN I



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

RESUMEN

Las plantas y los insectos han convivido desde hace más de 350 millones de años. Aunque algunas de las interacciones entre plantas e insectos que existen en la naturaleza son mutuamente beneficiosas (por ejemplo, la polinización), la gran mayoría de ellas implica la depredación de las plantas y la posterior reacción de estas para defenderse (Gatehouse, 2002). Esta lucha evolutiva entre plantas e insectos ha resultado en el desarrollo de múltiples sistemas de defensa altamente sofisticados en las plantas. Algunas de estas defensas se expresan de forma constitutiva (llamadas defensas constitutivas) mientras que otras se expresan solo después del ataque de los herbívoros (conocidas como defensas inducidas) (Howe y Jander, 2008; War *et al.*, 2012; Wu y Baldwin, 2010).

Las defensas inducidas por los herbívoros se inician cuando compuestos elicitors o inductores son reconocidos por receptores específicos de la planta, llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRR, *Pattern Recognition Receptors*), que activan en la planta la defensa basal, conocida como PTI (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Estos inductores pueden clasificarse en tres tipos: patrones moleculares asociados a herbívoros (HAMPs, *Herbivore-Associated Molecular Patterns*), patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs, *Microbe-Associated Molecular Patterns*) los cuales son liberados en los fluidos de los herbívoros juntos con los endosimbiontes asociados a su intestino, y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, *Damage-Associated Molecular Patterns*), que

Resumen

derivan del daño a los tejidos de la planta como consecuencia de la infestación (Bonaventure, 2012; Hogenhout y Bos, 2011; Santamaria et al., 2018). Posteriormente, las respuestas de defensa están mediadas por complejas redes de señalización que incluyen influjos de calcio (Ca^{+2}), cascadas de quinasas, especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) y vías de señalización de fitohormonas, las cuales conducen, finalmente, a la activación de factores de transcripción que regulan la expresión génica de una amplia gama de productos defensivos. Estos eventos tempranos de reconocimiento y respuestas rápidas tienen lugar en cuestión de minutos a horas después del inicio de la herbivoría. Además, la reacción de defensa no solo se activa en la región dañada, sino también en las regiones no dañadas de las hojas atacadas y en las hojas intactas distales o sistémicas (Howe y Jander, 2008; Morkunas et al., 2011; Santamaria et al., 2018; Wu y Baldwin, 2010).

En un segundo paso, se desencadena la producción de defensas directas e indirectas. Estas incluyen estructuras morfológicas especializadas o metabolitos secundarios y proteínas con efectos antinutricionales, repelentes y/o tóxicos en los herbívoros. Las defensas directas incluyen la protección mecánica de la superficie de las plantas (por ejemplo, mediante pelos, tricomas, pinchos, espinas o engrosamiento de las hojas) así como una gran diversidad de metabolitos de diversas clases químicas (por ejemplo, glucosinolatos, alcaloides, terpenoides, compuestos fenólicos e inhibidores de la proteasas, entre muchos otros). Por otro lado, las defensas indirectas incluyen la liberación de sustancias volátiles, conocidas como HIPVs (*Herbivore-Induced Plant Volatiles*) que atraen a los enemigos naturales de los herbívoros, así como la provisión de alimentos (por ejemplo, néctar extrafloral) y alojamiento que mejoran la efectividad de los enemigos naturales (Howe y Jander, 2008; Mithöfer y Boland, 2012; Santamaria et al., 2018; War et al., 2012; Wu y Baldwin, 2010). Generalmente, la producción de compuestos defensivos tras el ataque de insectos se asocia con una alteración significativa del metabolismo primario, la cual puede servir para la provisión de energía, equivalentes reductores y esqueletos de carbono que respalden las respuestas de defensa (Schwachtje y Baldwin, 2008; Zhou et al., 2015). Además, la reconfiguración del metabolismo

primario puede apoyar los ajustes fisiológicos que permiten a las plantas tolerar la herbivoría. Finalmente, también algunos metabolitos primarios pueden tener propiamente un papel defensivo (Schwachtje y Baldwin, 2008).

Las respuestas de las plantas a los insectos herbívoros son complejas y se correlacionan, en gran medida, con el modo de alimentación del herbívoro y el grado de daño causado en el sitio de alimentación (Walling, 2000). Con respecto al modo de alimentación, los pulgones (Hemiptera: Aphididae), que constituyen el mayor grupo de insectos floépagos, son probablemente uno de los herbívoros más desafiantes. Son considerados como una "plaga sigilosa", ya que penetran el tejido de las plantas con sus estiletes, principalmente a través de la ruta apoplástica, para establecer su lugar de alimentación en una célula cribosa del floema, donde pueden ingerir savia del floema continuamente durante numerosas horas o incluso días. Por tanto, dado el limitado el daño tisular ocasionado y las prolongadas interacciones del estilete con las células vegetales, las respuestas de las plantas a los pulgones son considerablemente diferentes a aquellas producidas frente a insectos masticadores (Giordanengo *et al.*, 2010; Guerrieri y Digilio, 2008; Tjallingii, 2006).

Desde el inicio de la penetración del estilete los pulgones inyectan saliva en los tejidos de la planta, la cual puede clasificarse en dos tipos diferentes: gelificante o acuosa (Moreno *et al.*, 2011; Tjallingii, 2006). La saliva gelificante es densa y proteinácea, compuesta principalmente de proteínas (fenoloxidasas, peroxidasas, pectinasas y glucosidasas), fosfolípidos y carbohidratos conjugados. Esta se secreta continuamente durante el tránsito apoplástico, formando una vaina de lubricación y endurecimiento alrededor de los estiletes que los protege durante la penetración del tejido y, al mismo tiempo, los aísla de los tejidos de la planta evitando la reacción de defensa en el sitio de alimentación. Además, la saliva gelificante también sella las células perforadas durante el tránsito del estilete hacia los tubos cribosos (Giordanengo *et al.*, 2010, van Bel y Will, 2016, Will *et al.*, 2013). Por otro lado, la composición química de la saliva acuosa es más compleja y depende tanto de la especie de pulgón como de su dieta. Entre las proteínas de la saliva acuosa, las pectinasas, las pectinometilesterasas, las poligalacturonasas y las celulasas se encargan de facilitar el progreso del estilete en el tejido vegetal mediante la

Resumen

degradación de las paredes celulares. Además, las proteínas de unión a Ca^{2+} y las peroxidasas pueden prevenir la oclusión de los tubos cribosos mediante la agregación de proteínas, un mecanismo dependiente de influjos de Ca^{2+} y de cambios en las condiciones redox. Por otro lado, las proteasas salivales están probablemente involucradas en la descomposición de las proteínas de los tubos cribosos con la finalidad de suprimir las defensas de la planta o aumentar la disponibilidad de compuestos orgánicos de nitrógeno; mientras que las polifenoxidasas, peroxidasas y oxidorreductasas sirven para desintoxicar compuestos de defensa de las plantas (por ejemplo, fenoles) (Giordanengo *et al.*, 2010; van Bel y Will, 2016; Will *et al.*, 2007; 2009; 2013).

Durante los últimos años, se ha incrementado el número de proteínas salivales categorizadas bajo el término "efector", que se refiere a las proteínas que interactúan con la PTI suprimiéndola. Recientemente, Yates y Michel (2018) han revisado los efectores conocidos en Hemiptera. En el caso de los pulgones, la proteína salival mejor caracterizada es la *Coo2*, la cual es específica de la familia Aphididae (Mutti *et al.*, 2008). El silenciamiento del gen *Coo2* reduce la aptitud física de los pulgones (Mutti *et al.*, 2006; Pitino *et al.*, 2011), mientras que la sobreexpresión de *Coo2* aumenta su reproducción (Bos *et al.*, 2010). Diferentes estudios en el pulgón verde del melocotonero *Myzus persicae* (Sulzer) y en el pulgón del guisante *Acyrtosiphon pisum* (Harris) han demostrado que los efectores de los pulgones actúan de manera especie-específica (Elzinga y Jander, 2013; Hogenhout y Bos, 2011; Pitino y Hogenhout, 2013). En la lucha coevolutiva entre los pulgones y las plantas, algunas plantas han adquirido una segunda línea de defensa basada en proteínas de resistencia (R) que reconocen los efectores específicos del pulgón e inducen la denominada inmunidad activada por efectores (ETI, *Effector-Triggered Immunity*). Curiosamente, los genes identificados que confieren resistencia a pulgones, *Mi-1.2* y *Vat*, presentan los dos dominios característicos de los genes R que confieren resistencia a patógenos: el sitio de unión a nucleótidos (NBS, *Nucleotide Binding Sites*) y repeticiones ricas en leucina (LRR, *Leucine-Rich Repeats*). El gen del tomate *Mi-1.2* ha mostrado conferir resistencia a ciertos clones del pulgón de la patata *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas), pero no a *M. persicae*, y también a

dos biotipos de mosca blanca, a un psílido y a tres especies de nematodos patógenos. Por otro lado, el gen Vat del melón confiere resistencia a un biotipo del pulgón del algodón *Aphis gossypii* (Glover), así como a su transmisión de virus. El hecho de que la resistencia mediada por gen R se limite a menudo a un clon de una especie de insecto sugiere que biotipos específicos de pulgón pueden evadir y/o suprimir las defensas de las plantas, de acuerdo con el modelo “gen por gen” de las interacciones planta-patógeno (Bonaventure, 2012, Hogenhout y Bos, 2011, Howe y Jander, 2008, Wu y Baldwin, 2010, Yates y Michel, 2018).

También se ha sugerido que los pulgones manipulan las respuestas de defensa de las plantas mediante la interacción entre las rutas hormonales de señalización, amplificando la ruta del ácido salicílico (SA, *Salicylic Acid*) (que controla en gran medida las defensas de las plantas contra patógenos) y suprimiendo, por tanto, la ruta del ácido jasmónico (JA, *Jasmonic Acid*) que es biológicamente más eficaz contra los insectos (Giordanengo *et al.*, 2010; Morkunas *et al.*, 2011; Thompson y Goggin, 2006; Walling, 2008). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado la participación de ambas rutas de señalización en la respuesta a los pulgones, lo que sugiere que el papel de las rutas del SA y JA puede variar según la interacción específica planta-pulgón (Coppola *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2008; Kuśnierczyk *et al.*, 2008; Martínez de Ilarduya *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2010; Studham y Macintosh, 2013; Zhu-Salzman *et al.*, 2004). Además, los pulgones también afectan al metabolismo primario modificando notablemente el metabolismo del nitrógeno, lo que podría ser una estrategia para adaptar la composición del floema a sus propios requerimientos nutricionales. Se ha observado en algunas interacciones planta-pulgón que la infestación por pulgones aumenta el contenido en aminoácidos esenciales de la savia del floema, los cuales están presentes a baja concentración en condiciones normales (Giordanengo *et al.*, 2010, Sandström *et al.*, 2000; Thompson y Goggin, 2006). Finalmente, los pulgones también suprimen la emisión de HIPVs (Pareja *et al.*, 2012; Schwartzberg *et al.*, 2011), pudiendo resultar en la disminución de las defensas directas e indirectas de la planta y beneficiando al pulgón (Walling, 2008).

Resumen

Los pulgones representan una de las plagas más importantes económicamente en la agricultura mundial. Su impacto negativo se relaciona, en parte, con su capacidad de reproducirse por partenogénesis junto con un tiempo de generación corto, lo que les permite alcanzar altas densidades de población. Además, los pulgones pueden colonizar prácticamente cualquier parte de la planta, consumen grandes cantidades de fotoasimilados del floema, alteran las relaciones fuente-sumidero en la planta, son vectores de casi el 30% de todas las especies de virus de plantas descritas hasta el momento y son capaces de resistir una gran cantidad de insecticidas (Brault *et al.*, 2010; Giordanengo *et al.*, 2010; Guerrieri y Digilio, 2008; Sorensen, 2009), por lo que han sido catalogados como "la plaga extraordinaria" (Nalam *et al.*, 2018). Entre las más de 4000 especies de pulgones conocidas, aproximadamente 250 representan una amenaza importante para la agricultura en todo el mundo (Nalam *et al.*, 2018; Simon and Peccoud, 2018). Los síntomas de la infestación por pulgón pueden ser diversos (clorosis, necrosis, marchitamiento, retraso del crecimiento y malformación del nuevo crecimiento), por lo tanto, es probable que la respuesta molecular de la planta hospedadora sea específica para una determinada interacción planta-pulgón (Coppola *et al.*, 2013; Goggin, 2007). Además de sus efectos directos, la melaza excretada por los pulgones puede llegar a acumularse en cantidades suficientes en la planta para afectar la fotosíntesis y promover el desarrollo de enfermedades fúngicas (Guerrieri y Digilio, 2008; Sorensen, 2009).

Presumiblemente originado en China, *M. persicae* es la plaga de pulgón más importante del mundo a nivel económico. Destaca especialmente por ser altamente polífago ya que se alimenta de más de 400 especies de plantas de 50 familias diferentes, afectando a importantes cultivos agrícolas y hortícolas. Esta especie se clasifica como pulgón asintomático, al no producir cambios macroscópicos en sus plantas hospedadoras. Se trata de un pulgón de pequeño a mediano tamaño y altamente polimórfico, con colores que varían de verde a rojo, e incluye también formas aladas. *M. persicae* suele tener un ciclo vital heteroecio y holocíclico, con la fase sexual de invierno en el melocotón (*Prunus persica* (L.) Batsch) y las generaciones de verano partenogenéticas en un gran número de plantas herbáceas

como hospedadores secundarios. Sin embargo, bajo ciertas condiciones (temperatura, disponibilidad de alimento y ubicación geográfica), puede presentar un ciclo anholocíclico (partenogénesis continua durante todo el año) (Bass *et al.*, 2014; Saguez *et al.*, 2013). Además, *M. persicae* es vector de más de 100 enfermedades virales (Louis y Shah, 2013) y es la especie de pulgón que ha desarrollado más mecanismos (al menos seis tipos) de resistencia a insecticidas (Simon y Peccoud, 2018). Por lo tanto, resulta de vital importancia la identificación de factores moleculares y mecanismos que contribuyan a las defensas de la planta y limiten la infestación del pulgón.

El crecimiento de la población mundial y de la consiguiente demanda de alimentos requiere un mayor rendimiento de los cultivos, así como una mayor resistencia de estos a los estreses ambientales. Además, existe una tendencia social creciente a mejorar la producción de los cultivos a través de medios seguros y sostenibles que reduzcan el uso de pesticidas (Ciura y Kruk, 2018; War *et al.*, 2012). En este sentido, comprender la naturaleza química de las complejas interacciones planta-pulgón resulta indispensable para optimizar la producción de nuevos cultivos. A pesar de la importancia de los pulgones como plagas agrícolas, nuestra comprensión de los mecanismos de defensa de las plantas contra los pulgones se ha visto demorada en comparación con los patógenos y lepidópteros (Nalam *et al.*, 2018). Además, los estudios realizados hasta el momento muestran que tanto la señalización como las respuestas de defensa son altamente específicas de interacciones planta-pulgón concretas. Esto destaca la importancia de estudiar sistemas específicos en lugar de basarse en los mecanismos descritos en plantas modelo.

El pimiento (*Capsicum annuum* L.) se cultiva en regiones de clima cálido en todo el mundo. La producción mundial de este cultivo se incrementó en un 25% en la década de 2006 a 2016, siendo actualmente uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia económica (Baenas *et al.*, 2019). España es el cuarto país productor de pimiento a nivel mundial, por detrás de China, México e Indonesia (FAOSTAT, 2017). A nivel estatal, la zona del Levante (Alicante, Murcia y Almería) alberga el 71% de la superficie total de cultivo de pimiento donde se genera el 60.4% de la producción

total (Datos estadísticos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2017). El pimiento es una planta de gran interés para las industria agroalimentaria, cosmética y farmacéutica ya que, además de su uso como verdura, especia y colorante, ha mostrado ser una importante fuente de compuestos bioactivos potencialmente beneficiosos para la salud (Baenas *et al.*, 2019).

En este contexto, el **objetivo principal de esta Tesis Doctoral** es caracterizar las respuestas químicas de las hojas del pimiento (*Capsicum annuum* L.) a la infestación por el pulgón verde del melocotonero *Myzus persicae* (Sulzer, 1776), utilizando para ello cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. Para lograr este objetivo se han realizado diferentes experimentos que incluyen un seguimiento detallado del curso temporal de la infestación, así como el análisis a nivel local y sistémico. La finalidad es, por lo tanto, obtener una visión integrada de la dinámica espacial y temporal de la interacción planta-pulgón en una especie no modelo, pero de gran relevancia en la agricultura Mediterránea, como es el pimiento.

Este objetivo principal se puede subdividir en los siguientes **objetivos específicos**, todos ellos referidos a la interacción pimiento-pulgón y a las hojas como material vegetal de estudio:

- Determinar los cambios en los aminoácidos libres, como metabolitos primarios con función dual en las interacciones planta-pulgón. (Capítulo 1).
- Investigar la participación de las principales fitohormonas implicadas en la señalización de la defensa de la planta. (Capítulos 2 y 3).
- Describir los cambios en el metabolismo global del pimiento mediante un análisis a gran escala a través de un enfoque proteómico. (Capítulo 4).
- Determinar los cambios en los ácidos fenólicos libres, como metabolitos secundarios con funciones en defensa. (Capítulo 5)

Con el fin de cumplir las directrices marcadas por la Universidad de Alicante para la elaboración de Tesis Doctorales por compendio de publicaciones, **la presente Tesis Doctoral está organizada en cuatro secciones**. La Sección I contiene

el Resumen y la Introducción General, la Sección II contiene los Capítulos 1 y 2 (artículos ya publicados en revistas indexadas), la Sección III contiene los Capítulos 3, 4 y 5 (manuscritos en preparación) y la Sección IV contiene las Conclusiones.

- CAPÍTULO 1. **Victoria Florencio-Ortiz**, Susana Sellés-Marchart, José Zubcoff-Vallejo, Georg Jander and José L. Casas. 2018. Changes in the free amino acid composition of *Capsicum annuum* (pepper) leaves in response to *Myzus persicae* (green peach aphid) infestation. A comparison with water stress. *PLoS ONE*, 13(6):e0198093. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198093>
- CAPÍTULO 2. **Victoria Florencio-Ortiz**, Ondřej Novák and José L. Casas. 2018. Local and systemic hormonal responses in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves under green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) infestation. *Journal of Plant Physiology*, 231: 356–363.
- CAPÍTULO 3. **Victoria Florencio-Ortiz**, Ondřej Novák and José L. Casas. Phytohormone responses in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves under a high density of green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) infestation. Manuscrito en preparación.
- CAPÍTULO 4. **Victoria Florencio-Ortiz**, Susana Sellés-Marchart and José L. Casas. Proteome changes in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves induced by the green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer). Manuscrito enviado a *Journal of Proteome Research*.
- CAPÍTULO 5. **Victoria Florencio-Ortiz**, Jiří Grúz and José L. Casas. Changes in the free phenolic acid composition of pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves in response to green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) infestation. Manuscrito en preparación.

En el **Capítulo 1** de esta Tesis Doctoral, determinamos los cambios en los aminoácidos libres (FAA, *Free Amino Acids*) en plantas de pimiento en respuesta a baja (20 pulgones adultos/planta) y alta (200 pulgones adultos/planta) densidad inicial de pulgón, estudiando el curso temporal desde 3 horas post-infestación (hpi) hasta 7 días post-infestación (dpi). Los aminoácidos desempeñan un papel dual en las interacciones planta-pulgón. Por un lado, son los principales nutrientes que

limitan el crecimiento de los insectos y, por otro lado, son precursores para la producción de diversos compuestos de defensa en plantas. Por lo tanto, se ha sugerido que las plantas deben incrementar la biosíntesis de FAA en respuesta a la infestación por pulgón pero, al mismo tiempo, limitar el acceso de los herbívoros a estos nutrientes (Zhou *et al.*, 2015). Nuestros resultados muestran que a baja densidad de pulgón, *M. persicae* provoca pequeñas variaciones en la composición de FAA de las hojas de pimiento; sin embargo, el contenido total de FAA disminuye significativamente al final del período de estudio (7 dpi). Curiosamente, la glutamina (Gln) es el único aminoácido que muestra un cambio significativo a lo largo del período completo de tiempo estudiado. La Gln es un importante compuesto de transporte de nitrógeno en las plantas. Por tanto, su acumulación sugiere la posible movilización de los aminoácidos en la planta, alejándolos de los pulgones, que en consecuencia provocaría la disminución significativa del contenido total de FAA observada a 7 dpi. Por el contrario, a alta densidad *M. persicae* produce un gran incremento en el contenido total de FAA. Estos resultados coinciden con estudios previos realizados con diferentes pulgones asintomáticos, que muestran poco o ningún efecto sobre el contenido de FAA de sus plantas hospedadoras (Eleftherianos *et al.*, 2006; Leroy *et al.*, 2011 Sandström *et al.*, 2000), especialmente en comparación con especies de pulgones sintomáticos que causan lesiones cloróticas o agallas en sus hospedadores (Dardeau *et al.*, 2015; Sandström *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2009; Telang *et al.*, 1999). Sin embargo, en este estudio hemos detectado que la interacción tiempo x densidad es significativa. Así pues, no solo la densidad de infestación es importante para definir las respuestas en aminoácidos de las plantas, sino también el tiempo de exposición.

Los resultados de este capítulo también muestran que todos los FAA aumentan su contenido en respuesta a una alta densidad de pulgón a excepción del glutamato (Glu), el cual mayoritariamente disminuye su concentración a lo largo del período de estudio. El metabolismo del Glu se utiliza para la producción rápida de metabolitos asociados a estrés (Galili *et al.*, 2008). Por tanto, la disminución del contenido en Glu puede explicarse por su extenso uso en la síntesis de otros aminoácidos fuertemente inducidos en nuestro estudio. En términos cuantitativos,

los aminoácidos que se acumulan en mayor medida en respuesta a una alta densidad de pulgón son los aromáticos fenilalanina (Phe) y tirosina (Tyr), los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA, *Branched-Chain Amino Acids*), valina (Val), isoleucina (Ile) y leucina (Leu), y un grupo misceláneo con alanina (Ala), arginina (Arg), lisina (Lys), metionina (Met) y treonina (Thr), los cuales alcanzan sus máximos a diferentes tiempos post-infestación. Cabe destacar que Ala es el aminoácido que muestra un mayor incremento en su contenido en respuesta al ataque del pulgón. Ala puede acumularse como un subproducto del ciclo del ácido γ -aminobutírico, el cual se ha asociado con la defensa contra insectos (Bouché y Fromm, 2004).

En el Capítulo 1 también determinamos si los cambios en FAA inducidos por *M. persicae* son similares a los producidos frente a estrés hídrico. Diversos estudios en plantas han demostrado la acumulación de FAA, especialmente prolina (Pro), en respuesta al estrés hídrico (Pratelli y Pilot, 2014). Los pulgones pueden reducir el potencial hídrico de las plantas e inducir síntomas de estrés por sequía, ya que necesitan ingerir grandes volúmenes de savia para adquirir suficiente nitrógeno para su desarrollo (Riedell, 1989). Por lo tanto, se ha sugerido que algunos de los cambios fenotípicos asociados a la infestación por pulgón pueden ser inducidos por el estrés hídrico ocasionado y no directamente por los propios pulgones (Corcuera et al., 1993). Además, la ruta de señalización del ácido abscísico (ABA, *abscisic acid*), que es importante para las respuestas al estrés por sequía en plantas, se induce en respuesta a la alimentación por pulgones (Hillwig et al., 2016), también en nuestro sistema de estudio (Capítulo 3). Al comparar las plantas infestadas con pulgón con las plantas sometidas a estrés hídrico, los resultados muestran que la mayoría de las diferencias son de tipo cuantitativo. La diferencia más relevante se observa en el contenido total de FAA, cuyo incremento es de mayor magnitud en el caso del estrés hídrico que en respuesta a la infestación por pulgón, principalmente debido a una gran acumulación de Pro y su derivado la hidroxiprolina (Hyp). Curiosamente, el contenido de Pro en plantas se ha correlacionado negativamente con el desarrollo de los pulgones (Mostefaoui et al., 2014; Van Emden y Bashford, 1969) y la Hyp puede ser utilizada para la síntesis de glicoproteínas ricas en Hyp, las cuales han mostrado conferir resistencia contra insectos (Ren et al., 2006). Por lo tanto, la

ausencia de una acumulación sustancial de Pro e Hyp a tiempos más largos de infestación (a partir de 2 dpi) puede estar relacionada con una manipulación metabólica de la planta por los pulgones, evitando así la inducción de rutas de señalización de defensas.

Finalmente, en este capítulo también mostramos que el aumento en el contenido total de FAA, en respuesta tanto a la infestación por pulgón como al estrés hídrico, se debe principalmente a un incremento en los aminoácidos esenciales (EAA, *Essential Amino Acids*) más que en los no esenciales (NEAA, *Non-Essential Amino Acids*). En algunos casos, se ha descrito que la infestación por pulgón incrementa específicamente el contenido de EAA, que en condiciones normales se encuentran en una abundancia relativamente baja en la savia del floema (Douglas, 2003; Guerrieri y Digilio, 2008). Estos resultados han impulsado la hipótesis de que los pulgones pueden manipular la composición de la savia del floema de su hospedador en su propio beneficio (Sandström *et al.*, 2000; Telang *et al.*, 1999). En este estudio nosotros sugerimos que, aunque la acumulación de EAA puede ser una consecuencia de una manipulación adaptativa por parte del pulgón, también debe considerarse la posibilidad de que se trate de una respuesta general de las plantas a estrés. Así pues, los EAA para el pulgón incluyen aminoácidos que son también precursores de una gran variedad de metabolitos secundarios con funciones defensivas o de señalización en las plantas (Häusler *et al.*, 2014; Pratelli y Pilot, 2014; Zeier, 2013).

Dado el papel de las fitohormonas como elementos clave en las redes de señalización que integran las señales ambientales y las traducen en las respuestas de defensa apropiadas para la planta, en el **Capítulo 2** investigamos la acumulación de hormonas en hojas de pimiento en respuesta a la infestación por pulgón. Realizamos un seguimiento temporal, desde 3 hasta 96 hpi, tanto a nivel local como sistémico mediante el confinamiento de los pulgones en hojas concretas con jaulas de tipo clip (*clip cages*). Las fitohormonas analizadas son: ácido cis-12-oxo-fitodienoico (OPDA, *cis-12-oxo-phytodienoic acid*), JA, jasmonoil-isoleucina (JA-Ile, *jasmonoyl-L-isoleucine*), SA, ABA y ácido indolacético (IAA, *indole-3-acetic acid*). Los resultados muestran que la infestación por pulgón no altera el contenido en OPDA,

precursor del JA, aunque los niveles endógenos de JA y de su forma bioactiva JA-Ile aumentan significativamente desde 8 a 96 hpi en las hojas infestadas a nivel local. Los efectos sistémicos en jasmonatos se muestran solo a 48 hpi para JA, y a 8 y 48 hpi en el caso de JA-Ile. El SA se acumula solo en las hojas infestadas locales tras 96 hpi, cuando el nivel de JA-Ile disminuye en estas hojas. El contenido endógeno de IAA es mayor en las hojas infestadas sistémicas en relación con las locales a las 3 y 24 hpi, aunque no se observan cambios significativos en el contenido de ambas en comparación con las hojas control. El contenido en ABA es menor en las hojas infestadas locales en relación con el control a 24 hpi, pero es mayor a 48 hpi cuando también aumenta sistémicamente. Por lo tanto, nuestros resultados indican que tanto la ruta del SA como la del JA están involucradas en las respuestas moleculares del pimiento a la infestación por *M. persicae*. También se observan cambios espacio-temporales en el ABA y el IAA que pueden contribuir a ajustar y afinar las respuestas de la planta. El intervalo de tiempo observado entre la acumulación de JA y SA en las hojas de pimiento sugiere una posible interacción antagónica entre ambas rutas de señalización, aunque otras rutas podrían también estar involucradas.

Además, los resultados del Capítulo 2 muestran que las respuestas de fitohormonas se producen principalmente a nivel local, lo que puede atribuirse al sigiloso estilo de alimentación de los pulgones que limita la inducción de respuestas de defensa a un número mínimo de células. En este sentido, la acumulación de JA observada en este estudio es similar a los valores reportados hasta el momento en otros sistemas planta-pulgón (Gosset *et al.*, 2009; Mai *et al.*, 2014; Stewart *et al.*, 2016) pero es considerablemente más baja a la llamada “explosión de JA” comúnmente inducida por insectos masticadores (Diezel *et al.*, 2009; Stork *et al.*, 2009; Tschardtke *et al.*, 2001; von Dahl y Baldwin, 2004). Este hecho podría explicar parcialmente por qué los pulgones son tan exitosos en la colonización y el establecimiento de largos períodos de alimentación en las plantas. Así pues, estudios anteriores han demostrado una correlación positiva entre el contenido de JA en la planta y su producción de defensas directas (Baldwin *et al.*, 1997) e indirectas (Schmelz *et al.*, 2003) contra herbívoros masticadores. La metodología empleada en este capítulo, basada en el uso de jaulas de tipo clip, permite restringir

el movimiento de los pulgones a hojas individuales e investigar las diferencias entre las respuestas locales y sistémicas de la planta. Sin embargo, esta metodología no permite lograr una alta densidad de infestación por pulgón, la cual se fijó en una infestación inicial de 20 pulgones adultos/planta en el interior de la jaula.

De manera complementaria, en el **Capítulo 3** investigamos la acumulación de fitohormonas en plantas de pimiento en respuesta a una alta densidad (inicialmente 200 pulgones adultos/planta) de infestación por pulgón, desde 3 hpi hasta 7 dpi. Observaciones previas habían mostrado que este nivel de infestación causa efectos visibles en el crecimiento de las plantas. Un creciente número de evidencias destaca la estrecha relación existente entre el control de la regulación del crecimiento y las defensas por parte de las redes de señalización del sistema inmunitario de la planta. Así pues, la aptitud de la planta se optimiza cuando se priorizan adecuadamente el crecimiento o la defensa en respuesta a las diferentes señales ambientales y de desarrollo. La ruta del JA desempeña un papel clave en la mediación de las compensaciones entre crecimiento y defensa a través de la interferencia con otras rutas hormonales (Campos *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2018; Havko *et al.*, 2016; Howe *et al.*, 2018; Karasov *et al.*, 2017; Kleibestein *et al.*, 2016; Züst y Agrawal, 2017). Los resultados de este capítulo muestran que una alta densidad de infestación por pulgón causa una reducción en la longitud del tallo, en el número de hojas y en el ancho de la hoja tras 7 dpi. Sin embargo, dicha inhibición del crecimiento no se observa tras 2 y 4 dpi, ni tampoco en respuesta a una menor densidad de pulgones (una infestación inicial de 20 pulgones adultos/planta). Las compensaciones entre crecimiento y defensa se producen de una manera contexto-dependiente y pueden manifestarse solo cuando el flujo de metabolitos primarios hacia las rutas de defensa excede un cierto umbral, probablemente elevado (Guo *et al.*, 2018), tal y como parece suceder en nuestro estudio en respuesta a una alta densidad de pulgón tras 7 dpi. La inhibición del crecimiento observada en este estudio puede explicarse parcialmente por los altos niveles de JA presentes en las plantas infestadas por pulgón, aunque también pueden estar implicadas otras hormonas. Se ha demostrado que el JA reduce la expansión foliar (Attaran *et al.*, 2014; McConn *et al.*, 1997), la elongación del tallo (Heinrich *et al.*, 2013), la acumulación de biomasa

(Leone *et al.*, 2014; Robson *et al.*, 2010; Zhang y Turner, 2008) y el crecimiento de la raíz (Feys *et al.*, 1994; Staswick *et al.*, 1992). En las hojas de pimiento, los contenidos de JA y JA-Ile aumentan considerablemente en respuesta a una alta densidad de pulgón a partir de 3 hpi. En consecuencia, los niveles de cisOPDA muestran una reducción significativa tras 1 dpi, aunque se recuperan los niveles control posteriormente. A pesar de que la acumulación de JA y JA-Ile es superior a la obtenida en el experimento del Capítulo 2, sigue siendo considerablemente baja en comparación con la respuesta comúnmente observada frente a insectos masticadores (Diezel *et al.*, 2009; Stork *et al.*, 2009; Tschardt *et al.*, 2001; Von Dahl y Baldwin, 2004). El JA es reconocido como un regulador clave de las defensas inducibles, incluyendo prácticamente todas las principales clases de metabolitos secundarios (fenilpropanoides, policétidos, terpenoides, alcaloides y derivados de aminoácidos), así como algunas proteínas de defensa y compuestos volátiles (Campos *et al.*, 2014; Dar *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2018; Howe *et al.*, 2018; Wang y Wu, 2013). Además, se ha observado que el JA conduce a la producción de compuestos de defensa y a la inhibición del crecimiento de manera dosis-dependiente (Baldwin *et al.*, 1997; Havko *et al.*, 2016; Schmelz *et al.*, 2003). Por lo tanto, el hecho de que incluso niveles considerablemente altos de infestación por pulgón no provoquen una gran acumulación de JA en la planta puede tener implicaciones decisivas en la defensa de las plantas de pimiento frente a pulgones.

Los resultados del Capítulo 3 también muestran que los niveles de SA en las plantas de pimiento permanecen inalterados como consecuencia de la infestación hasta 7 dpi cuando estos se incrementan significativamente. Este resultado coincide con nuestros resultados anteriores en el capítulo 2 y también con estudios realizados en otros sistemas planta-pulgón (Mai *et al.*, 2014; Mohase y Van der Westhuizen, 2002; Stewart *et al.*, 2016), los cuales muestran una acumulación de SA en plantas en la etapa tardía de la infestación por pulgón. Dicha inducción tardía del SA concuerda con la hipótesis que sugiere que la inducción de la ruta del SA es parte de la estrategia de manipulación del pulgón. Sin embargo, también podría explicarse, en parte, por la interacción antagónica entre las rutas del JA y del SA. Por otro lado, el ABA se acumula en las plantas infestadas a 2 y 4 dpi. De igual forma, ha

sido sugerido que la inducción de la ruta del ABA también podría formar parte de la estrategia de manipulación del pulgón para interferir con las defensas efectivas de la planta (Hillwig *et al.*, 2016). No obstante, cabe destacar que el ABA también puede contribuir al equilibrio entre el crecimiento y las respuestas al estrés (Wang *et al.*, 2018). Finalmente, y a pesar de la alta densidad de infestación, los niveles de IAA no se alteraron en las plantas en respuesta al ataque del pulgón. Este resultado coincide con los resultados mostrados en el capítulo 2 y, además, con otros estudios que muestran que la interrupción de la señalización por auxinas se asocia con una mayor resistencia a pulgones (Marimuthu y Smith, 2012; Sattar *et al.* 2016; Smith *et al.*, 2010). Así pues, dado que no se observan cambios en los niveles de IAA en nuestro estudio, resultaría de gran interés analizar las respuestas de otras hormonas de crecimiento que han mostrado estar implicadas en las compensaciones entre crecimiento y defensa, como las citoquininas (Albrecht y Argueso, 2017; Naseem *et al.*, 2015), los brasinoesteroides (De Bruyne *et al.*, 2014; Lozano-Durán *et al.*, 2013) y, especialmente, las giberelinas (Heinrich *et al.*, 2013; Leone *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2012).

En el **Capítulo 4** de esta Tesis Doctoral, se describen los cambios en el metabolismo de las plantas de pimiento como consecuencia de la infestación por pulgón, mediante un análisis a gran escala a través de un enfoque proteómico. Para ello, estudiamos las respuestas del proteoma de las hojas de pimiento contra la infestación de *M. persicae* desde 3 hpi hasta 7 dpi, siguiendo dos enfoques diferentes. Cuando las plantas se infestan con una baja densidad inicial de pulgón (20 pulgones adultos/planta), solo 14 proteínas muestran una expresión diferencial a algún tiempo de infestación en comparación con las plantas control, incluso teniendo en cuenta que la respuesta proteómica se estudia a nivel local utilizando jaulas de tipo clip. Por el contrario, cuando las plantas se infestan con una alta densidad inicial de pulgón (200 pulgones adultos/planta), 201 proteínas muestran una expresión diferencial a algún tiempo de infestación en comparación con las plantas control. Estos resultados concuerdan con el modo de alimentación de los pulgones, que implica un daño tisular limitado y la inyección en el tejido de la planta

de secreciones salivales que derivan o suprimen las defensas de la planta (Furch *et al.*, 2015; Giordanengo *et al.*, 2010; Nalam *et al.*; 2018; Van Bel y Will, 2016).

En este capítulo observamos un patrón general en las respuestas proteómicas a la infestación por pulgón, tanto a baja como a alta densidad de pulgón. A tiempos cortos de infestación la expresión de la mayoría de las proteínas se encuentra inducida mientras que con el progreso de la infestación su expresión se reprime. Además, observamos un bajo solapamiento entre las proteínas moduladas a los diferentes tiempos de infestación, indicando que la mayoría de las proteínas se regulan solo de forma transitoria. Este patrón dinámico de expresión de proteínas puede atribuirse a la cascada de eventos que tienen lugar tras producirse el ataque por insectos y que implica la integración de diferentes moléculas de señalización, incluyendo Ca^{+2} , ROS, proteínas quinasas y fitohormonas (Arimura *et al.*, 2011; Maffei *et al.*, 2007a; 2007b). Por otro lado, puede reflejar el ajuste de las respuestas de defensa de la planta para sobrellevar la progresión de una infestación exitosa y/o manifestar también la capacidad de los pulgones para suprimir algunas respuestas de defensa de la planta en estados avanzados de la infestación (Coppola *et al.*, 2013; Tzin *et al.*, 2015).

En el Capítulo 4 también mostramos que una gran cantidad de las proteínas moduladas en las plantas infestadas son cloroplásticas, destacando la relevancia de este orgánulo en las respuestas de la planta al pulgón. Además, la mayoría de los cambios se producen en proteínas que son críticas para el funcionamiento de la planta en condiciones normales, incluyendo proteínas involucradas en la fotosíntesis y la fotorrespiración, en el metabolismo de aminoácidos y carbohidratos, en la traducción y el plegamiento y degradación de proteínas. Otras de las proteínas moduladas en respuesta al ataque del pulgón están implicadas en el metabolismo de los lípidos y las hormonas, la transcripción, el transporte, la organización celular, la producción de energía y el estrés. Sin embargo, las proteínas directamente involucradas en la defensa son escasas y su expresión está mayoritariamente reprimida en respuesta a la infestación por pulgón. En último lugar, también detectamos por primera vez en la interacción planta-pulgón algunas proteínas que parecen ser relevantes y que estimularán su futura investigación.

Finalmente, en el **Capítulo 5** determinamos los cambios en ácidos fenólicos libres en plantas de pimiento en respuesta a la infestación por pulgón, desde las 2 hpi hasta los 7 dpi, en las dos situaciones (alta y baja densidad de pulgones) estudiadas en esta Tesis. Los ácidos fenólicos son un grupo de metabolitos clave en la defensa de las plantas frente al ataque de pulgones ya que han mostrado afectar fuertemente su comportamiento, fisiología y metabolismo (Chrzanowski *et al.*, 2012; Cipollini *et al.*, 2008; Gantner *et al.*, 2019; Wójcicka *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado una correlación positiva entre el contenido en ácidos fenólicos de las plantas y su resistencia a pulgones (Chrzanowski *et al.*, 2012; Ciepiela y Chrzanowski, 2001; Gantner *et al.*, 2019; Wójcicka, 2010). En nuestro estudio, cuando las plantas se infestan con una densidad inicial baja (20 pulgones adultos/planta) de pulgón, confinados además en jaulas de tipo clip para evitar su movimiento, se observan escasos cambios significativos en los ácidos fenólicos libres de las hojas de pimiento. Por el contrario, cuando las plantas se infestan con una densidad inicial alta (200 pulgones adultos/planta) de pulgón, la concentración de todos los ácidos fenólicos, con excepción del ácido clorogénico, se ve alterada a algún tiempo post-infestación. Estos resultados son consistentes con el sigiloso modo de alimentación del pulgón, así como con otros resultados de esta Tesis Doctoral (Capítulos 1-4).

Los resultados del Capítulo 5 muestran también que los ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, cafeico, p-cumárico y sinápico incrementan significativamente su concentración a 1 dpi en las hojas de pimiento sometidas a una alta densidad de pulgón. Dado que los ácidos fenólicos son altamente tóxicos en su estado libre (Reis Giada, 2013), el aumento de estos compuestos puede actuar como una defensa directa contra *M. persicae* en las hojas de pimiento. Además, el ácido cafeico, sinápico y p-cumárico, todos ellos ácidos hidroxicinámicos, son los compuestos que más incrementan su concentración, lo cual puede estar relacionado con su elevada actividad antioxidante. Una de las respuestas tempranas al ataque de insectos es la generación de ROS (Maffei *et al.*, 2007a; 2007b). Mai *et al.* (2013) demostraron que plantas de guisante infestadas por *Acyrtosiphon pisum* acumulaban una gran cantidad de H₂O₂, que alcanzaba su máxima concentración a 1 dpi. Sin embargo, el contenido de ácido gálico, p-hidroxibenzoico, cafeico y p-cumárico disminuye por

debajo de los niveles control a tiempos posteriores (4 y 7 dpi). Esto puede explicarse ya que los ácidos fenólicos son precursores de otros compuestos fenólicos, como los flavonoides o las quinonas. Sin embargo, la saliva del pulgón contiene enzimas polifenoloxidasas y peroxidasas, las cuales pueden convertir los ácidos fenólicos en estructuras menos tóxicas. Por lo tanto, también debe considerarse la posibilidad de que la disminución en el contenido de algunos ácidos fenólicos forme parte de la contra-defensa del pulgón.

Un resultado significativo en este capítulo es el patrón de variación opuesto encontrado entre el ácido protocatéquico y el ácido salicílico en las hojas de pimiento en respuesta a una alta densidad de pulgón. Mientras que el ácido protocatéquico disminuye progresivamente su contenido en las hojas de pimiento a partir de las 8 hpi, el ácido salicílico incrementa progresivamente su contenido a partir de los 2 dpi, aunque aumenta drásticamente a los 7 dpi. La inducción tardía del ácido salicílico en respuesta a la infestación del pulgón concuerda con otros resultados de esta Tesis Doctoral (Capítulos 2 y 3) y también con los estudios realizados en otras interacciones planta-pulgón (Mai *et al.*, 2014; Mohase y Van der Westhuizen, 2002, Stewart *et al.*, 2016). Además, los resultados del experimento con jaulas de tipo clip demuestran que la acumulación de ácido salicílico ocurre solo a nivel local, coincidiendo con los resultados descritos en el Capítulo 2.

En definitiva, esta Tesis Doctoral constituye un avance en la comprensión de las respuestas de las plantas frente a pulgones en un cultivo agrícola de gran importancia como es el pimiento.

Las **conclusiones derivadas de esta Tesis Doctoral** son las siguientes:

1. Diferentes análisis fitoquímicos, incluyendo hormonas involucradas en las rutas de señalización que controlan el crecimiento y las respuestas de defensa de las plantas, el estudio proteómico a gran escala, y el análisis de metabolitos primarios (aminoácidos) y secundarios (ácidos fenólicos), han demostrado que el pulgón verde del melocotonero *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) a una baja densidad de infestación permanece sin ser detectado o no desencadena una respuesta de gran magnitud en las plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). (Conclusión general).

2. *M. persicae* induce cambios significativos en la composición de aminoácidos libres de las hojas de pimiento, dependiendo tanto de la densidad de infestación como del tiempo post-infestación. (Capítulo 1).

3. Mientras que a alta densidad *M. persicae* produce un gran incremento en el contenido total de aminoácidos libres, a baja densidad el contenido de aminoácidos libres disminuye considerablemente a los 7 días post-infestación. (Capítulo 1).

4. El aumento en el contenido total de aminoácidos libres se debe principalmente a un incremento en los aminoácidos esenciales. En términos cuantitativos, los aminoácidos con mayor incremento en su contenido son los aromáticos fenilalanina y tirosina, los aminoácidos de cadena ramificada, valina, leucina e isoleucina, y un grupo formado por alanina, arginina, lisina, metionina y treonina. (Capítulo 1).

5. El análisis de fitohormonas ha demostrado que la mayor parte de las respuestas ocurren a nivel local. (Capítulo 2).

6. Las vías de señalización del ácido jasmónico y el ácido salicílico están ambas involucradas en las respuestas moleculares del pimiento a *M. persicae*. (Capítulo 2 y 3).

7. La ruta de señalización del ácido jasmónico responde más rápidamente y con una mayor magnitud que la del ácido salicílico, la cual se induce sólo en las últimas etapas de la infestación. (Capítulo 2 y 3).

8. Los niveles endógenos del ácido indolacético no se alteran significativamente en las plantas de pimiento en respuesta al pulgón, incluso bajo una elevada densidad de infestación. (Capítulo 3).

9. Las plantas de pimiento infestadas con una alta densidad de pulgón muestran una reducción en la longitud del tallo, el número de hojas y el ancho de la hoja a los 7 días post-infestación. (Capítulo 3).

10. El análisis proteómico ha revelado un patrón general en las respuestas de las proteínas de las hojas de pimiento al ataque del pulgón, según el cual la

expresión de la mayor parte de las proteínas aumenta a tiempos cortos pero disminuye con el progreso de la infestación. (Capítulo 4).

11. El pobre solapamiento observado entre las proteínas con expresión diferencial a diferentes tiempos de infestación indica que la mayoría de las proteínas se regulan solo de forma transitoria. (Capítulo 4).

12. Un elevado número (46,8%) de las proteínas con expresión diferencial son cloroplásticas, lo que subraya la relevancia de este orgánulo en la respuesta de la planta a los pulgones. (Capítulo 4).

13. La mayoría de los cambios se producen en proteínas que son necesarias para el funcionamiento de la planta en condiciones normales, incluyendo proteínas involucradas en fotosíntesis y fotorrespiración, metabolismo de aminoácidos y carbohidratos, traducción, y plegamiento y degradación de proteínas. Sin embargo, el número de proteínas directamente involucradas en la defensa de la planta es bajo y su expresión está mayoritariamente reprimida en respuesta al ataque del pulgón. (Capítulo 4).

14. El análisis de los ácidos fenólicos libres ha revelado que una alta densidad de infestación por pulgón induce la alteración en el contenido de todos los ácidos fenólicos libres analizados en algún momento de la infestación, con excepción del ácido clorogénico. (Capítulo 5).

15. Los ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, cafeico, p-cumárico y sinápico aumentan su contenido en las hojas de pimiento a tiempos cortos de infestación (1 día) pero disminuyen por debajo del control (excepto el ácido sinápico) a tiempos más largos. (Capítulo 5).

16. Los ácidos protocatéquico y salicílico muestran un patrón de variación opuesto en las hojas de pimiento en respuesta al pulgón. (Capítulo 5).

SUMMARY

Plants and insects have been living together for more than 350 million years. Although some of the interactions between plants and insects (e. g., pollination) existing in nature are mutually beneficial, a great majority of them involve predation of plant parts and the subsequent reaction of plants to defend themselves (Gatehouse, 2002). This evolutionary arms race between plants and insects has resulted in the development of multiple and highly sophisticated defence systems in plants. Some of the defences are expressed constitutively (i. e. constitutive defence) whereas others are expressed only after herbivore attack (i. e. induced defences) (Howe and Jander, 2008; War *et al.*, 2012; Wu and Baldwin, 2010).

The herbivory-induced defences are initiated when elicitor compounds are recognised by plant specific receptors (Pattern Recognition Receptors; PRRs) activating the basal plant defence, known as PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns)-Triggered Immunity (PTI). These elicitors can be classified in three different types: Herbivore-Associated Molecular Patterns (HAMPs), Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs) released with gut-associated endosymbionts by herbivores in their fluids and compounds derived from damage to plant tissues as a consequence of infestation (Damage-Associated Molecular Patterns; DAMPs) (Bonaventure, 2012; Hogenhout and Bos, 2011; Santamaria *et al.*, 2018). Then, defence responses are mediated by elaborated signalling networks, including calcium (Ca^{2+}) influxes, kinase cascades, reactive oxygen species (ROS),

and phytohormone signalling pathways, which lead to the activation of transcription factors that regulate gene expression of a wide range of defensive products. These early events of recognition and rapid responses take place within minutes to hours after the initiation of herbivory. Moreover, the defence reaction is activated not only in the wounded region but also in undamaged regions in the attacked leaves and in distal intact (systemic) leaves (Howe and Jander, 2008; Morkunas *et al.*, 2011; Santamaria *et al.*, 2018; Wu and Baldwin, 2010).

In a second step, the production of direct and indirect defences is triggered. These include specialized morphological structures or secondary metabolites and proteins with antinutritional, repellent and/or toxic effects on the herbivores. Direct defences include mechanical protection on the surface of the plants (e.g., hairs, trichomes, thorns, spines, and thicker leaves) and a huge diversity of plant metabolites of diverse chemical classes (e. g., glucosinolates, alkaloids, terpenoids, phenolics and proteinase inhibitors, just to mention some). On the other hand, indirect defences are mediated by the release of volatiles (Herbivore-Induced Plant Volatiles; HIPVs) that attract herbivore's natural enemies and/or by providing food (e.g., extrafloral nectar) and housing to enhance the effectiveness of the natural enemies (Howe and Jander, 2008; Mithöfer and Boland, 2012; Santamaria *et al.*, 2018; War *et al.*, 2012; Wu and Baldwin, 2010). The production of defensive compounds is usually associated with significant alterations in primary metabolism following insect attack, which may serve for the provision of energy, reducing equivalents, and carbon skeletons to support the defence responses (Schwachtje and Baldwin, 2008; Zhou *et al.*, 2015). Moreover, the reconfiguration of primary metabolism could support the physiological adjustments that allow the plants to tolerate herbivory and also some primary metabolites may have themselves a defensive role (Schwachtje and Baldwin, 2008).

Plant responses to insect herbivores are complex and also correlate to a large extent with the herbivore's feeding mode and the degree of damage caused at the feeding site (Walling, 2000). Regarding the feeding mode, aphids (Hemiptera: Aphididae) -the largest group of phloem-feeding insects- are probably one of the most challenging herbivores. They are considered as a "stealthy pest" given that

they penetrate plant tissue with their stylets primarily via the apoplastic route to establish feeding sites in a phloem sieve element, where they can ingest phloem sap continuously for many hours or even days. Thus, given the limited tissue damage and the prolonged stylet interactions with plant cells, plant responses to aphids are considerable distinct from that of chewing insects (Giordanengo *et al.*, 2010; Guerrieri and Digilio, 2008; Tjallingii, 2006).

From the onset of stylet penetration aphids secrete saliva into the plant tissues which can be classified in two different types: gelling and watery saliva (Moreno *et al.*, 2011; Tjallingii, 2006). The gelling saliva is dense and proteinaceous, composed mainly of proteins (including phenoloxidases, peroxidases, pectinases, and glucosidases), phospholipids and conjugated carbohydrates. This is continuously secreted during the apoplastic transit, forming a lubricating and hardening sheath around the stylets that protects them during the tissue penetration and, at the same time, isolates them from the plant tissues and avoids the reaction of the plant in the feeding site. In addition, the gelling saliva also seals the perforated cells during the transit of the stylet towards the sieve tubes (Giordanengo *et al.*, 2010; van Bel and Will, 2016; Will *et al.*, 2013). On the other hand, the chemical composition of watery saliva is more complex and depends on both the aphid species and its diet. Between the aqueous salivary proteins, pectinases, pectinmethylsterases, polygalacturonases and cellulases are aimed to facilitate the progress of the stylet in the plant tissue by the degradation of cell walls. Moreover, Ca^{2+} binding proteins and peroxidases can prevent the sieve-tube occlusion by protein aggregation, which depends on Ca^{2+} influxes and changes in redox conditions. Salivary proteases are likely involved in the breakdown of sieve-element proteins to suppress plant defences or to increase the availability of organic nitrogen compounds; and polyphenoloxidases, peroxidases and oxidoreductases are suggested to detoxify plant defence compounds (e. g., phenols) (Giordanengo *et al.*, 2010; van Bel and Will, 2016; Will *et al.*, 2007; 2009; 2013).

During the last years, an increasing number of salivary proteins have been categorized under the term “effector”, which refers to proteins that interact with

and suppress PTI. Recently, Yates and Michel (2018) have reviewed the known effectors in Hemiptera. In the case of aphids, the best characterized salivary protein is Coo2, which is specific of the family Aphididae (Mutti *et al.*, 2008). Silencing of Coo2 gene reduces the physical aptitude of aphids (Mutti *et al.*, 2006; Pitino *et al.*, 2011), while Coo2 overexpression increases their reproduction (Bos *et al.*, 2010). Different studies in the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer) and in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris) have shown that aphid effector proteins act in a species-specific manner (Elzinga and Jander, 2013; Hogenhout and Bos, 2011; Pitino and Hogenhout 2013). In the coevolutionary struggle between aphids and plants, some plants have acquired a second line of defence based on resistance proteins (R) that recognize aphid-specific effectors and induce the Effector- Triggered Immunity (ETI). Interestingly, the identified genes that confer resistance to aphids, Mi-1.2 and Vat, contain the two characteristic domains of R genes that confer resistance to pathogens: Nucleotide Binding Sites (NBS) and Leucine-Rich Repeats (LRR). The Mi-1.2 tomato gene has been shown to confer resistance to certain clones of the potato aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas), but not to *M. persicae*, and also two white fly biotypes, one psyllid, and three species of nematode pathogens. On the other hand, the Vat melon gene confers resistance to a biotype of the cotton aphid *Aphis gossypii* (Glover), as well as to its virus transmission. The fact that R-gene mediated resistance is often limited to one clone of an insect species suggests that specific aphid biotypes may evade and/or suppress plant defences, consistent with the “gene-for-gene” model of plant–pathogen interactions (Bonaventure, 2012; Hogenhout and Bos, 2011; Howe and Jander, 2008; Wu and Baldwin, 2010; Yates and Michel, 2018).

Aphids have also been suggested to manipulate plant defence responses, through hormonal crosstalk, amplifying the salicylic acid (SA) signalling pathway (which largely controls plant defences against pathogens) and thus suppressing the more biologically effective jasmonic acid (JA) pathway against insects (Giordanengo *et al.*, 2010; Morkunas *et al.*, 2011; Thompson and Goggin, 2006; Walling, 2008). More recent studies, however, have shown the involvement of both signalling pathways in response to aphids, suggesting that the role of SA and JA pathways may vary

according to specific plant-aphid interactions (Coppola *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2008; Kuśnierczyk *et al.*, 2008; Martinez de Ilarduya *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2010; Studham and Macintosh, 2013; Zhu-Salzman *et al.*, 2004). In addition, aphids also affect the plant primary metabolism by notably modifying nitrogen metabolism, which could be a strategy to adapt the phloem composition to its own nutritional requirements. It has been observed in some plant-aphid interactions that aphid infestation increases the content in essential amino acids in the phloem sap, which normally are present at low concentration (Giordanengo *et al.*, 2010; Sandström *et al.*, 2000; Thompson and Goggin, 2006). Finally, aphids are also able to suppress the emission of HIPVs (Pareja *et al.*, 2012; Schwartzberg *et al.*, 2011) which may be beneficial for the aphid as it may result in less direct and indirect defences by the plant (Walling, 2008).

Aphids represent one of the most economically important pests in world agriculture. Their negative impact is related in part to their capacity to reproduce parthenogenically along with a short generation time that allow them to reach high population densities. Moreover, aphids are able to colonize virtually any part of the plant, consume profuse amounts of photoassimilates from the phloem, alter source-sink relationships, vector nearly 30% of all plant virus species described to date and resist to a large number of insecticides (Brault *et al.*, 2010; Giordanengo *et al.*, 2010; Guerrieri and Digilio, 2008; Sorensen, 2009), being thus considered as “the pest extraordinary” (Nalam *et al.*, 2018). Among the more than 4000 known aphid species, about 250 represent a major threat to agriculture worldwide (Nalam *et al.*, 2018; Simon and Peccoud, 2018). The signs and symptoms of aphid attack can be diverse (chlorosis, necrosis, wilting, stunting, and malformation of new growth), therefore, it is likely that host molecular response is specific for a certain plant-aphid interaction (Coppola *et al.*, 2013; Goggin, 2007). Additionally to their direct effects, aphid honeydew excrement can build enough on plants to impair photosynthesis and promote the development of fungal diseases (Guerrieri and Digilio, 2008; Sorensen, 2009).

Presumed to originate from China, *M. persicae* is the most economically important aphid crop pest worldwide. It specially stands out for being highly

polyphagous. It feeds on over 400 plant species belonging to nearly 50 plant families, affecting several important agricultural and horticultural crops. This species is classified as an asymptomatic aphid, because it does not cause macroscopic changes in their host plants. It is a small to medium-sized aphid and highly polymorphic, with colors varying from green to red and including also winged forms. *M. persicae* is usually heteroecious and holocyclic, with the winter sexual phase on peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) and the parthenogenetic (asexual) summer generations on a wide number of secondary herbaceous summer hosts. However, under some conditions (temperature, food availability, and geographical location), it can be anholocyclic (continual parthenogenesis throughout the year) (Bass *et al.*, 2014; Saguez *et al.*, 2013). Moreover, *M. persicae* is vector for more than 100 viral diseases (Louis and Shah, 2013) and is the aphid specie that has developed more (at least six types) mechanisms of insecticide resistance (Simon and Peccoud, 2018). Thus, the identification of the molecular factors and mechanism that contribute to plant defence and limit aphid infestation is pivotal.

An increasing human population and food demand require an increased plant yield and resistance to environmental stresses. Moreover, there is also an increasing focus on improving crop production through safe and sustainable means by reducing the reliance on pesticide (Ciura and Kruk, 2018; War *et al.*, 2012). Understanding the chemical nature of the complex plant-aphid-interactions is mandatory to optimize the production of new crops. Despite the importance of aphids as agricultural pests, the understanding of plant defence mechanism against aphids has lagged that of plant defence against pathogens and lepidopterans (Nalam *et al.*, 2018). Moreover, both signaling and defense responses can be highly specific to particular aphid–plant interactions. This highlights the relevance of study specific systems instead of rely on the mechanisms described in model plants.

Pepper (*Capsicum annuum* L.) is grown in warm climate regions around the world. The world production of its fruit increased by 25% in the decade from 2006 to 2016 and is currently one of the most economically important horticultural crops (Baenas *et al.*, 2019). Spain is the fourth pepper producer country worldwide, after China, Mexico and Indonesia (FAOSTAT, 2017). At the state level, the region of

Levante (Alicante, Murcia and Almeria) hosts 71% of the total area of pepper cultivation, with generation of 60.4% of the total production (Statistical data of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 2017). Pepper plant is of great interest for the agri-food, cosmetic and pharmaceutical industries since, in addition to its use as vegetable, spice and colouring, it is an important source of bioactive compounds with a health-promoting potential (Baenas *et al.*, 2019).

In this context, **the main objective of this PhD Thesis** is to characterize the chemical responses of pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves to green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) infestation, using high-resolution liquid chromatography–mass spectrometry analysis. In order to achieve this objective we included detailed time course experiments and also analyses at both local and systemic level. Our goal therefore is to gain an integrated view on the spatial and temporal dynamics of the plant-aphid interactions in a non-model plant species, such as pepper, very relevant in Mediterranean agriculture.

This main objective can be sub-divided into the following **specific objectives**, all of them referred to the pepper-aphid interaction and using leaves as plant material for the analyses:

- To determine the changes in free amino acids, as primary metabolites with dual function in plant-aphid interactions. (Chapter 1).
- To investigate the participation of the main phytohormone involved in plant defence. (Chapters 2 and 3)
- To describe the global changes in pepper metabolism using a proteomic approach. (Chapter 4)
- To determine the changes in free phenolic acids, as secondary metabolites with well-known functions in plant defence. (Chapter 5).

In order to fulfill the guidelines indicated by the University of Alicante for the elaboration of PhD Theses by Compendium of Publications, **this PhD Thesis is organized into four sections**. Section I contains the Summary and the General Introduction, Section II contains Chapters 1 and 2 (papers already published in

indexed journals), Section III contains Chapters 3, 4 and 5 (manuscripts in preparation) and Section IV contains the Conclusions.

- CHAPTER 1. **Victoria Florencio-Ortiz**, Susana Sellés-Marchart, José Zubcoff-Vallejo, Georg Jander and José L. Casas. 2018. Changes in the free amino acid composition of *Capsicum annuum* (pepper) leaves in response to *Myzus persicae* (green peach aphid) infestation. A comparison with water stress. *PLoS ONE*, 13(6):e0198093. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198093>.
- CHAPTER 2. **Victoria Florencio-Ortiz**, Ondřej Novák and José L. Casas. 2018. Local and systemic hormonal responses in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves under green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) infestation. *Journal of Plant Physiology*, 231: 356–363.
- CHAPTER 3. **Victoria Florencio-Ortiz**, Ondřej Novák and José L. Casas. Phytohormone responses in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves under a high density of green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) infestation. Manuscript in preparation.
- CHAPTER 4. **Victoria Florencio-Ortiz**, Susana Sellés-Marchart and José L. Casas. Proteome changes in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves induced by the green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer). Manuscript send to *Journal of Proteome Research*.
- CHAPTER 5. **Victoria Florencio-Ortiz**, Jiří Grúz and José L. Casas. Changes in the free phenolic acid composition of pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves in response to green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) infestation. Manuscript in preparation.

In **Chapter 1** of this PhD Thesis we determine the changes in free amino acids (FAA) in pepper plants in response to low (20 adult aphids/plant) and high (200 adult aphids/plant) density of aphids in time course experiments ranging from 3 hours post-infestation (hpi) to 7 days post-infestation (dpi). Amino acids play a dual role in plant-aphid interactions as major growth-limiting nutrients for insects and as precursors for the production of many plant defence compounds. Thus, plants are hypothesized to upregulate FAA biosynthesis in response to aphid infestation but,

at the same time, limit herbivore access to these nutrients (Zhou *et al.*, 2015). Our results show that at low aphid density *M. persicae* provokes minor variations in the FAA composition of pepper leaves, but total FAA content significantly decreases at the end of the study period (7 dpi). Interestingly, glutamine (Gln) is the only amino acid showing a significant change throughout the complete period under study. Its accumulation may suggest mobilization of amino acids away from aphids (as Gln is a major nitrogen-transport compound in plants), leading to the significant decrease in total FAA observed at 7 dpi. Conversely, at high density *M. persicae* produces a large increase in total FAA content. These results are in line with previous studies with different asymptomatic aphids, which show little or no effect on the FAA content of their host plants (Eleftherianos *et al.*, 2006; Leroy *et al.*, 2011; Sandström *et al.*, 2000), especially when compared to symptomatic aphid species that cause chlorotic lesions or galls in their plant hosts (Dardeau *et al.*, 2015; Sandström *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2009; Telang *et al.*, 1999). Nevertheless, we have observed a significant interaction of time x density. Therefore, not only the density of infestation is important to define plant amino acid responses, but also the time of exposure.

Results from this chapter also show that all FAA increase their content in response to a high density of aphid infestation, with exception of glutamate (Glu), which mostly decrease during the entire study period. Glu metabolism is used for rapid production of stress-associated metabolites (Galili *et al.*, 2008). Thus, the decrease in Glu content in our study may be explained by its extensive use for the synthesis of the other strongly induced amino acids. In quantitative terms, the amino acids that accumulate to a greater extent in response to a high density of aphids are the aromatics Phe and Tyr, the branched-chain amino acids (BCAA), Val, Ile, and Leu, and a miscellaneous group with alanine (Ala), arginine (Arg), lysine (Lys), methionine (Met) and threonine (Thr), which peaked at different times post-infestation. It is worth mentioning that Ala is the amino acid that increases the most in response to aphid feeding. Ala may accumulate as a by-product of the γ -aminobutyric acid shunt, which has been associated with defence against insects (Bouché and Fromm, 2004).

In Chapter 1 we also determine whether changes in FAA induced by *M. persicae* are similar to those occurring during water stress. Many plant studies have demonstrated FAA accumulation, especially proline (Pro), in response to water stress (Pratelli and Pilot, 2014). Aphids can reduce the water potential and induce drought-stress symptoms in plants, given that they need to ingest large volumes of sap to acquire sufficient nitrogen for its development (Riedell, 1989). Therefore, it has been suggested that some of the phenotypic changes associated with aphid infestation may be induced by water stress rather than directly by the aphids themselves (Corcuera *et al.*, 1993). Moreover, the abscisic acid (ABA) signalling pathway (which is important for drought stress responses in plants) is induced by aphid feeding (Hillwig *et al.*, 2016), also in our system (Chapter 3). Our results show that comparing aphid-infested with water-stressed plants, most of the observed differences were quantitative. The most relevant difference was found in the total FAA fold change, which was much higher under water stress than in response to aphid infestation, mainly due to a huge accumulation of Pro and Hyp. Interestingly, Pro content in plants has been negatively correlated with aphid development (Mostefaoui *et al.*, 2014; Van Emden and Bashford, 1969) and Hyp can be used for the synthesis of Hyp-rich glycoproteins, which have been shown to confer resistance against insects (Ren *et al.*, 2006). Thus, the absence of a substantial accumulation of Pro and Hyp under high aphid density at longer times of infestation (from 2 dpi) may be related to a metabolic manipulation of aphids, thus preventing the release of defence signalling pathways.

Finally in this chapter we also show that increase in the total FAA content is mainly due to an increase in essential (EAA) rather than non-essential (NEAA) amino acids in response to both aphid infestation and water stress. In some cases, aphid infestation has been reported to specifically increase the content of EAA, which normally have relatively low abundance in the phloem sap under unstressed conditions (Douglas, 2003; Guerrieri and Digilio, 2008). This finding has driven the intriguing hypothesis that aphids may manipulate the composition of phloem sap for their own benefit (Sandström *et al.*, 2000; Telang *et al.*, 1999). We suggest that, although EAA accumulation may be a consequence of an adaptive manipulation by

the aphids, the possibility that it is a general plant response to stress must be also considered. EAA for aphids include amino acids that are precursors for a large array of secondary metabolites with defensive or signalling functions in plants (Häusler *et al.*, 2014; Pratelli and Pilot, 2014; Zeier, 2013).

Given the role of phytohormones as key elements in the signalling networks that integrate environmental signals into the appropriate plant defence responses, in **Chapter 2** of this PhD Thesis we investigate local and systemic hormone accumulation in pepper leaves in response to aphid infestation, taking advantage of the use of clip cages. Six phytohormones are analyzed in a time course experiment ranging from 3 to 96 hpi, including: cis-12-oxo-phytodienoic acid (OPDA), JA, jasmonoyl-L-isoleucine (JA-Ile), SA, ABA and indole-3-acetic acid (IAA). Results show that aphid infestation do not alter the content of the JA precursor OPDA, even though endogenous levels of JA and its bioactive form JA-Ile significantly increase from 8 to 96 hpi in local infested leaves. Systemic effects in jasmonates are only showed at 48 hpi for JA, and 8 and 48 hpi in the case of JA-Ile. SA accumulates only in local infested leaves after 96 hpi, when the level of JA-Ile decreases in these leaves. Endogenous level of IAA is higher in systemic relative to local infested leaves at 3 and 24 hpi, although no significant changes in its content are found compared to control leaves. ABA content is lower in local infested relative to control leaves at 24 hpi, but higher at 48 hpi when it also increases systemically. Thus, our findings demonstrate that both SA and JA pathways are involved in the molecular responses of pepper to *M. persicae*. ABA and IAA also show spatial-temporal changes which may contribute to the fine-tuning of the plant response. The time lag observed between JA and SA accumulation in pepper leaves suggests an antagonistic interaction between both signalling pathways, although other pathways may be also implicated.

Results from Chapter 2 also show that phytohormone responses are mainly produced at local level, which may be ascribed to the stealthy feeding style of aphids that limit the induction of defence responses to a minimal number of cells. In this sense, the JA accumulation observed in this study is similar to the values reported so far in other aphid-plant systems (Gosset *et al.*, 2009; Mai *et al.*, 2014;

Stewart *et al.*, 2014) but considerably lower to the “JA burst” commonly induced by chewing insects (Diezel *et al.*, 2009; Stork *et al.*, 2009; Tschardtke *et al.*, 2001; von Dahl and Baldwin, 2004). This fact may partially explain why aphids are so successful colonising and establishing long feeding periods on plants. Previous studies have shown a positive correlation between the JA content in the plant and the production of direct (Baldwin *et al.*, 1997) and indirect (Schmelz *et al.*, 2003) defences against chewing herbivores. The methodology employed in this chapter, based on the use of clip cages, allows restricting aphid movement to individual leaves and investigating the differences between local and systemic responses. However, this methodology does not allow achieving high densities of aphid infestation in the plant, which was fixed to an initial aphid infestation of 20 adult aphids/plant inside the clip cage.

In the **Chapter 3** we investigate the accumulation phytohormones in pepper plants in response to a high density (initially 200 adult aphids/plant) aphid infestation in a time course experiment ranging from 3 hpi to 7 dpi. Previous observations had showed that this level of aphid infestation causes visible effects on plant growth. An emerging consensus highlights the close regulatory control of growth and defence by the plant immune signalling networks. Plant fitness is optimized when growth and defence are appropriately prioritized in response to both environmental and developmental cues. The JA pathway plays a key role in mediating growth-defence tradeoffs through crosstalk with other hormone pathways (Campos *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2018; Havko *et al.*, 2016; Howe *et al.*, 2018; Karasov *et al.*, 2017; Kleibenstein *et al.*, 2016; Züst and Agrawal, 2017). The results of this chapter show that a high density of aphid infestation causes a reduction in the stem length, number of leaves and leaf width after 7 dpi, but not at 2 and 4 dpi and neither in response to an initially low density of infestation (20 aphids/plant). It has been suggested that growth-defence tradeoffs occur in a context-dependent manner and may be manifested only when the flux of primary metabolites into defence pathways exceeds a certain likely high threshold (Guo *et al.*, 2018), such as it seems to occur in our study after 7 days in response to a high density of infestation. Growth inhibition may be partially explained by the high levels of JAs

present in aphid-infested plants, although other hormones may be also implicated. JAs have been shown to reduce leaf expansion (Attaran *et al.*, 2014; McConn *et al.*, 1997), stem elongation (Heinrich *et al.*, 2013), biomass accumulation (Leone *et al.*, 2014; Robson *et al.*, 2010; Zhang and Turner, 2008) and root elongation (Feys *et al.*, 1994; Staswick *et al.*, 1992). In pepper leaves, JA and JA-Ile contents increase considerably from 3 hpi onwards in response to a high density of aphids and, consequently, cisOPDA levels show a significant reduction after 1 dpi, recovering the control levels thereafter. Even though the accumulation in JA and JA-Ile was higher than in the experiment of Chapter 2 it was still considerably lower compared to chewing insects (Diezel *et al.*, 2009; Stork *et al.*, 2009; Tschardt *et al.*, 2001; von Dahl and Baldwin, 2004). JA has become recognized as key regulator of inducible defences, including virtually all major classes of secondary metabolites (phenylpropanoids, polyketides, terpenoids, alkaloids and amino acid derivatives) as well as some defence proteins and volatile compounds (Campos *et al.*, 2014; Dar *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2018, Howe *et al.*, 2018; Wang and Wu, 2013) and JA led to the production of defence compounds and also the inhibition of growth in a dose-dependent manner (Baldwin *et al.*, 1997; Havko *et al.*, 2016; Schmelz *et al.*, 2003). Thus, the fact that even considerably high levels of aphid infestation do not trigger a strong JA accumulation in the plant may have determining implications in pepper defence responses to aphids.

Results from Chapter 3 also show that SA levels in pepper plants remain unaltered as a consequence of aphid infestation until its significant increase at 7 dpi. This result coincides with our previous results in chapter 2 and also with studies in other plant-aphid systems (Mai *et al.*, 2014; Mohase and Van der Westhuizen, 2002; Stewart *et al.*, 2016) showing a SA accumulation in plants at late stages of aphid infestation. This late SA induction is in good agreement with the hypothesis that the induction of the SA pathway is part of the aphid' manipulation strategy. However, it may also be partially explained by the antagonistic interaction between JA and SA pathways. ABA accumulates in aphid-infested plants at 2 and 4 dpi. The induction of the ABA pathway has been suggested to be also part of the aphid's decoy strategy to interfere with effective defences (Hillwig *et al.*, 2016), although ABA may also

contribute to the balance between plant growth and stress responses (Wang *et al.*, 2018). Finally, despite the high density of aphid infestation IAA levels were not altered in aphid-infested plants. This coincides with the results showed in chapter 2 and it is accordance with studies showing that auxin signalling disruption is associated with enhanced aphid resistance (Marimuthu and Smith, 2012; Sattar *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2010). Given that IAA levels are unchanged in our study it is interesting to further examine the responses in other growth hormones that have been implicated in growth–defence tradeoffs, including cytokinins (Albrecht and Argueso, 2017; Naseem *et al.*, 2015) brassinosteroids (De Bruyne *et al.*, 2014; Lozano-Durán *et al.*, 2013) and, especially, gibberellins (Heinrich *et al.*, 2013; Leone *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2012).

In **Chapter 4** of this PhD Thesis we describe changes in pepper metabolism as a consequence of aphid infestation in a large-scale analysis through a proteomic approach. For that, we study pepper leaf proteome responses against *M. persicae* infestation in time course experiments (from 3 hpi to 7 dpi) following two different approaches. When plants are infested with an initially low density of aphids (20 adult aphids/plant) only 14 proteins result differentially expressed relative to control plants at some time of infestation, even given the fact that the proteome response is studied at local level taking the advantage of clip cages. Conversely, when plants are infested with a high density of aphids (200 adult aphids/plant) 201 proteins resulted differentially expressed relative to control leaves, at some time of infestation. These results are in good agreement with the stealthy feeding mode of aphids which involves only limited plant tissue damage and also the secretion of saliva into the plant tissue in order to divert or suppress plant defenses (Furch *et al.*, 2015; Giordanengo *et al.*, 2010; Nalam *et al.*; 2018; Van Bel and Will, 2016).

In this chapter we show a general pattern in proteomic responses to aphid infestation with most proteins being upregulated at short times but downregulated with the progress of infestation, at both low and high aphid density. Moreover, there was poor overlap between the proteins modulated at each time point of infestation, which indicates that most of the proteins were only transiently regulated. This dynamic protein expression pattern can be ascribed to the cascade

of events that follows insect attack and that involves an integrative crosstalk between signaling molecules, such as Ca^{2+} , ROS, protein kinases and phytohormones (Arimura *et al.*, 2011; Maffei *et al.*, 2007a; 2007b). In addition, it may reflect the adjustment of plant defense responses to handle the progression of a successful infestation and/or the ability of aphids to suppress some plant defense responses during long-term feeding (Coppola *et al.*, 2013; Tzin *et al.*, 2015).

In Chapter 4 we also show that a large amount of the regulated proteins by aphid infestation are chloroplastic, which highlights the relevance of this organelle in the plant response to aphids. Moreover, most of the changes are produced in proteins that are critical for function under normal conditions, including proteins involved in photosynthesis and photorespiration, amino acid and carbohydrate metabolism, translation and protein folding and degradation. Other regulated proteins in response to aphids are involved in lipid and hormone metabolism, transcription, transport, cell organization, energy production and stress. However proteins directly involved in defense are scarce and are mostly downregulated in response to aphid infestation.

Finally, in the **Chapter 5** we determine the changes in free phenolic acids in pepper plants in response to aphid infestation from 2 hpi to 7 dpi. Phenolic acids seem to be a key group of metabolites responsible for protecting the plants from aphid attack. They can seriously affect aphid behaviour, physiology, and metabolism (Chrzanowski *et al.*, 2012; Cipollini *et al.*, 2008; Gantner *et al.*, 2019; Wójcicka *et al.*, 2010). A positive association has also been showed between the content of phenolic acids and the resistance to aphids (Chrzanowski *et al.*, 2012; Ciepiela and Chrzanowski, 2001; Gantner *et al.*, 2019; Wójcicka, 2010). In our study, when plants are infested with an initially low (20 adult aphids/plant) density of aphids and confined into clip cages to prevent their movement, only few significant changes are found in the free phenolic acids of pepper leaves. Conversely, when pepper plants are infested with a high (200 adult aphids/plant) density of aphids the concentration of all phenolic acids, with exception of chlorogenic acid, is altered at some times of infestation. These results are in accordance with the stealthy nature of aphid feeding and also are in good agreement with other results of this PhD Thesis (Chapters 1-4).

Results from Chapter 5 show that gallic, p-hydroxybenzoic, caffeic, p-coumaric and sinapic acid all significantly increase their content in pepper leaves at 1 dpi under a high density of aphids. Given that phenolic acids are highly toxic in their free state (Reis Giada, 2013), the increase in these compounds may be seen as a direct defence against *M. persicae* in pepper leaves. Moreover, caffeic, sinapic and p-coumaric acid, all of them hydroxycinnamic acids, are the compounds that increase the most in pepper leaves in response to aphid attack, which may be ascribed to their high antioxidant activity. One of the earliest responses of plants to insect attack is the generation of reactive oxygen species (Maffei *et al.*, 2007a; 2007b). Mai *et al.* (2013) demonstrated a high H₂O₂ production in pea plants under *Acyrtosiphon pisum* feeding, which peaked at 1 dpi. However, the content of gallic, p-hydroxybenzoic, caffeic and p-coumaric acid decrease under the control levels at later times of aphid infestation (4 and 7 dpi). This can be explained because phenolic acids are the precursors of other phenolic compounds, like flavonoids or quinones. However, aphid saliva contains polyphenol oxidase and peroxidase enzymes that can convert phenolic acids into less toxic structures. Thus, the possibility that the reduction in the content of some of phenolic acids may be part of an aphid counter-defence strategy should also be considered.

A significant finding in this chapter is the opposite pattern of variation between protocatechuic and salicylic acid found in pepper leaves in response to a high density of aphid infestation. Whereas protocatechuic acid decreases its content progressively from 8 hpi onwards, salicylic acid increases its content progressively from 2 dpi but drastically at 7 dpi. The induction of salicylic acid at late times of aphid infestation is in good agreement with other results in this PhD Thesis (Chapters 2 and 3) and also with the results reported for other plant-aphid interactions (Mai *et al.*, 2014; Mohase and Van der Westhuizen, 2002; Stewart *et al.*, 2016). Moreover, the results of the experiment with clip cages demonstrate that SA accumulation occurs only at local level, which is also in accordance with the results in Chapter 2.

In summary, this PhD Thesis provides insights in the understanding of the plant responses to aphids using a very valuable Mediterranean crop as pepper.

The **conclusions derived from this PhD Thesis** are the following:

1. Different phytochemical analysis, including hormones involved in signaling pathways that control plant growth and defence responses, a large-scale proteomic study and the analysis of primary (amino acids) and secondary (phenolic acids) metabolites have revealed that the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) at low aphid density either remain undetected or do not trigger a strong response in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. (General conclusion).

2. *M. persicae* induces significant changes in the free amino acid composition of pepper leaves, depending on both aphid density and time post-infestation. (Chapter 1).

3. Whereas at high density *M. persicae* produces a large increase in total free amino acid content, at low density the free amino acid content significantly decreases at 7 days post-infestation. (Chapter 1).

4. The increase in the total free amino acid content is mainly due to an increase in essential rather than in non-essential amino acids. In quantitative terms, major responses are found in the aromatic amino acids phenylalanine and tyrosine, the branched-chain amino acids, valine, leucine and isoleucine, and a miscellaneous group with alanine, lysine, methionine and threonine. (Chapter 1).

5. Phytohormone analysis has shown that most responses occur at local level (Chapter 2).

6. Both jasmonic and salicylic acid signaling pathways are involved in the molecular responses of pepper to *M. persicae*. (Chapter 2 and 3).

7. The jasmonic acid signaling pathway responds faster and strongly whereas the salicylic acid signaling pathway is induced only at late stages of infestation. (Chapter 2 and 3).

8. Endogenous levels of indoleacetic acid are not significantly changed in pepper plants in response to aphids even under high density of infestation. (Chapter 3).

9. Pepper plants infested with a high density of aphids show reduction in stem length, number of leaves and leaf width at 7 days post-infestation. (Chapter 3).

10. Proteomic analysis has revealed a general pattern of pepper proteomic responses to *M. persicae* with most proteins being upregulated at short times but downregulated as infestation progress. (Chapter 4).

11. The poor overlapping observed between the differentially expressed proteins at each time point of infestation indicates that most of these proteins are only transiently regulated. (Chapter 4).

12. A large amount (46.8%) of the regulated proteins are chloroplastic, which highlights the relevance of this organelle in the plant response to aphids. (Chapter 4).

13. Most changes are produced in proteins that are critical for functioning under normal conditions, including proteins involved in photosynthesis and photorespiration, amino acid and carbohydrate metabolism, translation and protein folding and degradation. However, proteins directly involved in defense are scarce and are mostly downregulated in response to aphids. (Chapter 4).

14. Analysis of free phenolic acids has revealed that a high density of aphid infestation induce the alteration of all free phenolic acids, but not chlorogenic acid, at some time of the infestation. (Chapter 5).

15. Gallic, p-hydroxybenzoic, caffeic, p-coumaric and sinapic acids increase their content in pepper leaves at short times (1 day) post-infestation but decrease below controls (with the exception of sinapic acid) at longer times. (Chapter 5).

16. An opposite pattern of variation has been shown between protocatechuic and salicylic acid in response to aphids. (Chapter 5).

REFERENCIAS

- Albrecht T, Argueso CT. 2017. Should I fight or should I grow now? The role of cytokinins in plant growth and immunity and in the growth–defence trade-off. *Ann. Bot.* 119: 725–735.
- Arimura G-I, Ozawa R, Maffei M. E. 2011. Recent advances in plant early signaling in response to herbivory. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 3723-3739.
- Attaran E, Major IT, Cruz JA, Rosa BA, Koo AJK, Chen J, Kramer DM, He SY, Howe GA. 2014. temporal dynamics of growth and photosynthesis suppression in response to jasmonate signalling. *Plant Physiol.* 165: 1302–1314.
- Baenas N, Belovic M, Ilic N, Moreno DA, García-Vigera C. 2019. Industrial use of pepper (*Capsicum annuum* L.) derived products: Technological benefits and biological advantages. *Food Chem.* 274: 872-885.
- Baldwin IT, Zhang Z-P, Diab N, Ohnmeiss TE, McCloud ES, Lynds GI, Schmelz EA. 1997. Quantification, correlations and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. *Planta.* 201: 397-404.
- Bass C, Puinean AM, Zimmer CT, Denholm I, Field LM, Foster SP, Gutbrod O, Nauen R, Slater R, Williamson MS. 2014. The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 51: 41-51.
- Bonaventure G, 2012. Perception of insect feeding by plants. *Plant Biol.* 14: 872-880.
- Bos JIB, Prince D, Pitino M, Maffei ME, Win J, Hogenhout SA. 2010. A Functional Genomics Approach Identifies Candidate Effectors from the Aphid Species *Myzus persicae* (Green Peach Aphid). *PLoS Genet*, 6(11): e1001216. doi:10.1371/journal.pgen.1001216.
- Brault V, Uzest M, Monsion B, Jacquot E, Blanc S. 2010. Aphids as transport devices for plant viruses. *C. R. Biol.* 333: 524–538.
- Bouché N, Fromm H. 2004. GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci.* 9: 1360-1385.
- Campos ML, Kang J-H, Howe GA. 2014. Jasmonate-triggered plant immunity. *J. Chem. Ecol.* 40: 657–675.
- Chrzanowski G, Leszczynski B, Czerniewicz P, Sytykiewicz H, Matok H, Krzyzanowski R, Sempruch C. 2012. Effect of phenolic acids from black currant, sour cherry and walnut on grain aphid (*Sitobion avenae* F.) development. *Crop Prot.* 35: 71-77.
- Ciepiela AP, Chrzanowski G. 2001. Accumulation of ferulic, gallic, o-coumaric and salicylic acid in winter triticale of different resistance to grain aphid (*Sitobion avenae* F., Homoptera: Aphididae). In: Aphids and Other Homopterous Insects, Polish Research Council (KBN), University of Podlasie, Poland, vol. 8, pp. 205-212

Resumen

- Cipollini D, Stevenson R, Enright S, Eyles A, Bonello P. 2008. Phenolic metabolites in leaves of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, and their potential phytotoxic and antiherbivore effects. *J Chem Ecol.* 34: 144–152.
- Ciura J, Kruk J. 2018. Phytohormones as targets for improving plant productivity and stress tolerance. *J Plant Physiol.* 229: 32–40.
- Coppola V, Coppola M, Rocco M, Digilio MC, D'Ambrosio C, Renzone G, Martinelli R, Scaloni A, Pennacchio F, Rao R, Corrado G. 2013. Transcriptomic and proteomic analysis of a compatible tomato-aphid interaction reveals a predominant salicylic acid-dependent plant response. *BMC Genomics* 14, 515. doi: 10.1186/1471-2164-14-515.
- Dar TA, Uddin M, Khan MMA, Hakeem KR, Jaleel H. 2015. Jasmonates counter plant stress: A Review. *Env. Exp. Bot.* 115: 49-57.
- Dardeau F, Body M, Berthier A, Miard F, Christidès J-P, Feinard-Duranceau M, et al. 2015. Effects of fertilisation on amino acid mobilisation by a plant-manipulating insect. *Ecol Entomol.* 40: 814-822.
- De Bruyne L, Höfte M, De Vleeschauwer D. 2013. Connecting growth and defense: the emerging roles of brassinosteroids and gibberellins in plant innate immunity. *Mol. Plant.* 7: 943–959.
- Diezel C, von Dahl C, Gaquerel E, Baldwin IT. 2009. Different lepidopteran elicitors account for cross-talk in herbivory-induced phytohormone signaling. *Plant Physiol.* 150: 1576–1586.
- Douglas AE. 2003. The nutritional physiology of aphids. *Adv In Insect Phys.* 31: 73-140.
- Eleftherianos I, Vamvatsikos P, Ward D, Gravanis F. 2006. Changes in the levels of plant total phenols and free amino acids induced by two cereal aphids and effects on aphid fecundity. *J. Appl. Entomol.* 130(1), 15-19.
- Elzinga DA, Jander G. 2013. The role of protein effectors in plant–aphid interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16: 451–456.
- Feys B, Benedetti CE, Penfold CN, Turner JG. 1994. Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *The Plant Cell* 6: 751-759.
- Furch ACU, van Bel AJE, Will T. 2015. Aphid salivary proteases are capable of degrading sieve-tube proteins. *J. Exp. Bot.* 66: 533–539.
- Galili S, Amir R, Galili G. Genetic engineering of amino acid metabolism in plants. In: Bohnert H, Nguyen H, Lewis N, editors. *Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology* Vol. 1: Bioengineering and Molecular Biology of Plant Pathways. Elsevier Ltd; 2008, pp. 49-80.

- Gantner M, Najda A, Piesik D. 2019. Effect of phenolic acid content on acceptance of hazel cultivars by filbert aphid. *Plant Protect Sci.* <https://doi.org/10.17221/150/2017-PPS>
- Gao LL, Klingler JP, Anderson JP, Edwards OR, Singh KB. 2008. Characterization of pea aphid resistance in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 146: 996–1009.
- Gatehouse JA. 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytol.* 156: 145–169.
- Giordanengo P, Brunissen L, Rusterucci C, Vincent C, van Bel A, Dinant S, Girousse C, Faucher M, Bonnemain J-L. 2010. Compatible plant-aphid interactions: How aphids manipulate plant responses. *C. R. Biol.* 333: 516–523.
- Goggin FL. 2007. Plant-aphid interactions: molecular and ecological perspectives. *Curr Opin Plant Biol.* 10: 399–408.
- Gosset V, Harmel N, Göbel C, Francis F, Haubruge E, Wathelet JP, du Jardin P, Feussner I, Fauconnier ML. 2009. Attacks by a piercing-sucking insect (*Myzus persicae* Sultzer) or a chewing insect (*Leptinotarsa decemlineata* Say) on potato plants (*Solanum tuberosum* L.) induce differential changes in volatile compound release and oxylipin synthesis. *J. Exp. Bot.* 60: 1231–1240.
- Guerrieri E, Digilio MC. 2008. Aphid-plant interactions: a review. *J Plant Interact.* 3: 223-232.
- Guo Q, Major IT, Howe GA. 2018. Resolution of growth–defense conflict: mechanistic insights from jasmonate signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 44: 72–81.
- Häusler RE, Ludewig F, Krueger S. 2014. Amino acids±A life between metabolism and signalling. *Plant Sci.* 229: 225-237. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.09.011> PMID: 25443849.
- Havko NE, Major IT, Jewell JB, Attaran E, Browse J, Howe GA. 2016. Control of carbon assimilation and partitioning by jasmonate: an accounting of growth-defense tradeoffs. *Plants.* 5 (7) <https://doi:10.3390/plants5010007>.
- Heinrich M, Hettenhausen C, Lange T, Wünsche H, Fang J, Baldwin IT, Wu J. 2013. High levels of jasmonic acid antagonize the biosynthesis of gibberellins and inhibit the growth of *Nicotiana attenuata* stems. *Plant J.* 73: 591–606.
- Hillwig MS, Chiozza M, Casteel CL, Lau ST, Hohenstein J, Hernández E, Jander G, Macintosh GC. 2016. Abscisic acid deficiency increases defence responses against *Myzus persicae* in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Pathol.* 17: 225–235.
- Hogenhout SA, Bos JIB. 2011. Effector proteins that modulate plant–insect interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 422–428.
- Howe GA, Jander G. 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 41–66.

Resumen

- Howe GA, Major IT, Koo AJ. 2018. Modularity in jasmonate signaling for multistress resilience. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69: 20.1-20.29.
- Karasov TL, Chae E, Herman JJ, Bergelson J. 2017. Mechanisms to mitigate the trade-off between growth and defense. *Plant Cell.* 29: 666–680.
- Kliebestein DJ. 2016. False idolatry of the mythical growth versus immunity tradeoff in molecular systems plant pathology. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 95: 55-59.
- Kuśnierczyk A, Winge P, Jørstad TS, Troczyńska J, Rossiter JT, Bones AM. 2008. Towards global understanding of plant defence against aphids – timing and dynamics of early *Arabidopsis* defence responses to cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) attack. *Plant Cell Environ.* 31: 1097–1115.
- Leroy PD, Wathelet B, Sabri A, Francis F, Verheggen FJ, Capella Q, et al. 2011. Aphid-host plant interactions: does aphid honeydew exactly reflect the host plant amino acid composition? *Arthropod Plant Interact.* 5:193-199.
- Leone M, Keller MM, Cerrudo I, Ballar CL. 2014. To grow or defend? Low red: far-red ratios reduce jasmonate sensitivity in *Arabidopsis* seedlings by promoting DELLA degradation and increasing JAZ10 stability. *New Phytol.* 204: 355–367.
- Louis J, Shah J. 2013. *Arabidopsis thaliana*—*Myzus persicae* interaction: shaping the understanding of plant defense against phloem-feeding aphids. *Front. Plant Sci.* 4, doi: 10.3389/fpls.2013.00213.
- Lozano-Durán R, Macho AP, Boutrot F, Segonzac C, Somssich IE, Zipfel C. 2013. The transcriptional regulator BZR mediates trade-off between plant innate immunity and growth. *eLife* 2013; 2: e00983. DOI: 10.7554/eLife.00983.
- Machado RAR, Baldwin IT, Erb M. 2017. Herbivory-induced jasmonates constrain plant sugar accumulation and growth by antagonizing gibberellin signalling and not by promoting secondary metabolite production. *New Phytol.* 215: 803–812.
- Mai VC, Bednarski W, Borowiak-Sobkowiak B, Wilkaniec B, Samardakiewicz S, Morkunas I, 2013. Oxidative stress in pea seedling leaves in response to *Acyrtosiphon pisum* infestation. *Phytochemistry.* 93, 49-62.
- Mai VC, Drzewiecka K, Jeleń H, Narożna D, Rucińska-Sobkowiak R, Kęsy J, Floryszak-Wieczorek J, Gabryś B, Morkunas I. 2014. Differential induction of *Pisum sativum* defense signaling molecules in response to pea aphid infestation. *Plant Sci.* 221–222: 1–12.
- Maffei ME, Mithöfer A, Boland W. 2007a. Before gene expression: early events in plant–insect interaction. *Trends Plant Sci.* 12, 310-316.

- Maffei ME, Mithöfer A, Boland W. 2007b. Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*. 68: 2946–2959.
- Marimuthu M, Smith CM. 2012. Barley tolerance of Russian wheat aphid (Hemiptera: Aphididae) biotype 2 herbivory involves expression of defense response and developmental genes. *Plant signal behav.* 7: 382–391.
- Martinez de Ilarduya O, Xie Q, Kaloshian I. 2003. Aphid-induced defense responses in Mi-1-mediated compatible and incompatible tomato interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 699–708.
- Mcconn M, Creelman RA. 1997. Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 5473–5477.
- Mithöfer A, Boland W. 2008. Recognition of herbivory-associated molecular patterns. *Plant Physiol*, 146: 825–831.
- Mohase, L., Van der Westhuizen, A.J., 2002. Salicylic acid is involved in resistance responses in the Russian wheat aphid-wheat interaction. *J. Plant Physiol.* 159: 585–590.
- Moreno A, Garzo E, Fernandez-Mata G, Kassem M, Aranda MA, Fereres A. 2011. Aphids secrete watery saliva into plant tissues from the onset of stylet penetration. *Entomol. Exp. Appl.* 139: 145–153.
- Morkunas I, Mai VC, Gabrys B. 2011. Phytohormonal signaling in plant responses to aphid feeding. *Acta Physiol. Plant.* 33: 2057–2073.
- Mostefaoui H, Allal-Benfekih L, Djazouli ZE, Petit D, Saladin G. 2014. Why the aphid *Aphis spiraecola* is more abundant on clementine tree than *Aphis gossypii*? *C.R. Biol.* 337: 123–133.
- Mutti NS, Park Y, Reese JC, Reek GR. 2006. RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Sci.* 6, doi: 10.1673/031.006.3801:38.
- Mutti NS, Louis J, Pappan LK, Pappan K, Begum K, Chen M-S, Park Y, Dittmer N, Marshall J, Reese JC, Reek GR. 2008. A protein from the salivary glands of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, is essential in feeding on a host plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105: 9965-9969.
- Nalam V, Louis J., Shah J. 2018. Plant defense against aphids, the pest extraordinaire. *Plant Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.04.027>.
- Naseem M, Kaldorf M, Dandekar T. 2015. The nexus between growth and defence signalling: auxin and cytokinin modulate plant immune response pathways. *J. Exp. Bot.* 66: 4885–4896.

Resumen

- Pareja M, Qvarfordt E, Webster B, Mayon P, Pickett J, Birkett M, Glinwood R. 2012. Herbivory by a phloem-feeding insect inhibits floral volatile production. *PLoS ONE*, 7, doi:10.1371/journal.pone.0031971
- Pratelli R, Pilot G. Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. 2014. *J Exp Bot.* 65: 5535-5556. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru320> PMID: 25114014.
- Pitino M, Coleman AD, Maffei ME, Ridout CJ, Hogenhout SA. 2011. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. *PLoS ONE*, 6, doi: 10.1371/journal.pone.0025709.
- Pitino M, Hogenhout SA. 2013. Aphid protein effectors promote aphid colonization in a plant species-specific manner. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26: 130-139.
- Reis Giada ML. 2013. Food Phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power, in: Morales-Gonzalez JA. Oxidative stress and chronic degenerative diseases. *IntechOpen.* <http://dx.doi.org/10.5772/51687>.
- Riedell WE. 1989. Effects of Russian wheat aphid infestation on barley plant response to drought stress. *Physiol. Plant.* 77: 87-92.
- Robson F, Okamoto H, Patrick E, Harris S-R, Wasternack C, Brearley C, JG Turner. 2010. Jasmonate and phytochrome A signaling in *Arabidopsis* wound and shade responses are integrated through JAZ1 Stability. *Plant Cell.* 22: 1143–1160.
- Saguez J, Giordanengo P, Vicent C. 2013. Aphids as major potato pest, en: Giordanengo P, Vicent C, Alyokhin A. *Insect pests of potato*. Elsevier, Oxford, UK. 31-63.
- Sandström J, Telang A, Moran NA. 2000. Nutritional enhancement of host plants by aphids—a comparison of three aphid species on grasses. *J. Insect Physiol.* 46: 33-40.
- Santamaria ME, Arnaiz A, Gonzalez-Melendi ID, Martinez M, Diaz I. 2018. Plant perception and short-term responses to phytophagous insects and mites. *Int. J. Mol. Sci.* 19, doi:10.3390/ijms19051356.
- Sato D, Akashi H, Sugimoto M, Tomita M, Soga T. 2013. Metabolomic profiling of the response of susceptible and resistant soybean strains to foxglove aphid, *Aulacorthum solani* Kaltenbach. *J. Chromatogr. B.* 925: 95-103.
- Sattar S, Addo-Quaye C, Thompson GA. 2016. miRNA-mediated auxin signalling repression during Vat-mediated aphid resistance in *Cucumis melo*. *Plant Cell Environ.* 39: 1216–1227.
- Schwachtje J, Baldwin IT. 2008. Why Does herbivore attack reconfigure primary metabolism? *Plant Physiol.* 146: 845–851.
- Schwartzberg EG, Böröczky K, Tumlinson JH. 2011. Pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*, suppress induced plant volatiles in broad bean, *Vicia Faba*. *J Chem Ecol.* 37: 1055–1062.

- Simon J-C, Peccoud J. 2018. Rapid evolution of aphid pests in agricultural environments. *Curr. Opin. Insect Sci.* 26: 17–24.
- Schmelz, E. A., Alborn, H. T., Banchio, E., Tumlinson. J. H., 2003. Quantitative relationships between induced jasmonic acid levels and volatile emission in *Zea mays* during *Spodoptera exigua* herbivory. *Planta.* 216: 665–673.
- Smith CM, Liu X, Wang LJ, Liu X, Chen MS, Starkey S, Bai J. 2010. Aphid feeding activates expression of a transcriptome of oxylipin-based defense signals in wheat involved in resistance to herbivory. *J. Chem. Ecol.* 36, 260–276.
- Sorensen JT. 2009. Aphids, en: Resh VH, Cardé RT. *Encyclopedia of Insects.* Elsevier, Oxford, UK. pp. 27–31.
- Staswick PE, Su W, Howell SH. 1992. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 6837-6840.
- Stewart SA, Hodge S, Bennett M, Mansfield JW, Powell G. 2016. Aphid induction of phytohormones in *Medicago truncatula* is dependent upon time post-infestation, aphid density and the genotypes of both plant and insect. *Arthropod-Plant Interact.* 10: 41–53.
- Stork W, Diezel C, Halitschke R, Gális I, Baldwin I. T., 2009. An ecological analysis of the herbivory-elicited JA burst and its Metabolism: plant memory processes and predictions of the moving target model. *PLoS ONE* 4(3): e4697. doi:10.1371/journal.pone.000469.
- Studham ME, Macintosh GC, 2013. Multiple phytohormone signals control the transcriptional response to soybean aphid infestation in susceptible and resistant soybean plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26: 116 –129.
- Suzuki DK, Fukushi Y, Akimoto S. 2009. Do aphid galls provide good nutrients for the aphids?: Comparisons of amino acid concentrations in galls among *Tetraneura* species (Aphididae: Eriosomatinae). *Arthropod-Plant Interact.* 3: 241-247.
- Telang A, Sandström J, Dyreson E, Moran NA. 1999. Feeding damage by *Diuraphis noxia* results in a nutritionally enhanced phloem diet. *Entomol. Exp. Appl.* 91: 403-412.
- Thompson GA, Goggin FL. 2006. Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects. *J. Exp. Bot.* 57: 755–766.
- Tjallingii WF. 2006. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *J. Exp. Bot.* 57: 739–745
- Tscharntke T, Thiessen S, Dolch R, Boland W. 2001. Herbivory, induced resistance, and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa*. *Biochem. Syst. Ecol.* 29: 1025–1047.

Resumen

- Tzin V, Fernandez-Pozo N, Richter A, Schmelz EA, Schoettner M, Schäfer M, Ahern KR, Meihls LN, Kaur H, Huffaker A, Mori N, Degenhardt J, Mueller A, Jander G. 2015. Dynamic maize responses to aphid feeding are revealed by a time series of transcriptomic and metabolomic assays. *Plant Physiol.* 169: 1727–1743.
- van Bel AJE, Will T. 2016. Functional evaluation of proteins in watery and gel saliva of aphids. *Front Plant Sci*, 7, doi: 10.3389/fpls.2016.01840.
- von Dahl, C., Baldwin, I. T. 2004. Methyl jasmonate and cis-jasmone do not dispose of the herbivore-induced jasmonate burst in *Nicotiana attenuata*. *Physiol. Plant.* 120: 474-481.
- Van Emden HF, Bashford MA. 1969. A comparison of the reproduction of *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae* in relation to soluble nitrogen concentration and leaf age (leaf position) in the Brussels sprout plant. *Entomol. Exp. Appl.* 12: 351-364.
- Walling LL. 2000. The myriad plant responses to herbivores. *J. Plant Growth Regul.* 19: 195-216.
- Walling LL. 2008. Avoiding effective defenses: Strategies employed by phloem-feeding insects. *Plant Physiol.* 146: 859–866.
- Wang L, Wu J. 2013. The essential role of jasmonic acid in plant-herbivore interactions - Using the wild tobacco *Nicotiana attenuata* as a model. *J. GeneT. Genomics* 40: 597-606.
- Wang P, Zhao Y, Li Z, Tao WA, Xiong Y, Zhu J-K. 2018. Reciprocal Regulation of the TOR kinase and ABA receptor balances plant growth and stress response. *Mol. Cell.* 69: 100–112.
- War AR., Paulraj MG., Ahmad T., Buhroo AA., Hussain B., Ignacimuthu S., Sharma HC. 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav.* 7: 1306-1320.
- Will T, Tjallingii WF, Thönnessen A, van Bel AJE. 2007. Molecular sabotage of plant defense by aphid saliva. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 10536–10541.
- Will T, Kornemann SR, Furch ACU, Tjallingii WF, van Bel AJE. 2009. Aphid watery saliva counteracts sieve-tube occlusion: a universal phenomenon? *J. Exp. Biol.* 212: 3305–3312.
- Will T, Furch ACU, Zimmermann MR. 2013. How phloem-feeding insects face the challenge of phloem-located defences. *Front. Plant Sci.* 4, doi: 10.3389/fpls.2013.00336.
- Wójcicka A. 2010. Cereal phenolic compounds as biopesticides of cereal aphids. *Polish J. of Environ. Stud.* 19: 1337-1343.

- Wu J, Baldwin IT. 2010. New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annu. Rev. Genet.* 44: 1–24.
- Yang D-L, Yao J, Mei C-S, Tong X-H, Zeng L-J, Li Q, Xiao L-T, Sun T-P, Li J, Deng X-W, Lee CM, Thomashow MF, Yang Y, He Z, He SY. 2012. Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109(19):E1192-200. doi: 10.1073/pnas.1201616109.
- Yates AD, Michel A. 2018. Mechanisms of aphid adaptation to host plant resistance. *Curr. Opin. Insect Sci.* 26: 41–49.
- Zhang Y, Turner JG. 2008. Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PLoS ONE* 3(11): e3699. doi:10.1371/journal.pone.0003699.
- Zeier J. 2013. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant Cell Environ.* 36: 2085-2103 <https://doi.org/10.1111/pce.12122>
- Zhou S, Lou YR, Tzin V, Jander G. 2015. Alteration of plant primary metabolism in response to insect herbivory. *Plant Physiol.* 169: 1488-1498.
- Zhu-Salzman K, Salzman RA, Ahn J-E, Koiwa H. 2004. Transcriptional regulation of sorghum defense determinants against a phloem-feeding aphid. *Plant Physiol.* 134: 420–431.
- Züst and Agrawal. 2017. Trade-offs between plant growth and defense against insect herbivory: an emerging mechanistic synthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 68: 513–34.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Bases teóricas para el estudio de la interacción planta-pulgón



CONTENIDOS

1. Principios básicos de la interacción planta – insecto fitófago	59
1.1. Introducción a la fitofagia por insectos	59
1.2. Clasificación de los insectos fitófagos según su estrategia de alimentación	60
1.3. Clasificación de las defensas de las plantas	62
2. El fitófago <i>Myzus persicae</i> (pulgón del melocotonero)	65
2.1. Clasificación taxonómica	65
2.2. Biología y ciclo vital	67
2.3. Alimentación y adaptaciones	71
2.4. Importancia económica en la agricultura	76
3. Defensas inducidas en las plantas frente a la fitofagia	79
3.1. Percepción y reconocimiento del fitófago	81
3.2. Respuestas tempranas que preceden a la expresión génica	84
3.2.1. Despolarización de membranas e influjo de calcio	84
3.2.2. Activación de la vía de las MAPKs	85
3.2.3. Producción de ROS	86
3.3. Rutas de señalización de fitohormonas	88
3.4. Biosíntesis de metabolitos de defensa	91
3.5. Reconfiguración del metabolismo primario	93
4. Manipulación de las defensas de la planta por parte del pulgón	95
5. El cultivo de pimiento (<i>Capsicum annuum</i> L.)	101
5.1. Clasificación taxonómica y descripción botánica	101
5.2. Importancia económica en la agricultura	102
Referencias	103

ABREVIATURAS

- ABA, *Abscisic Acid*
- ATP, *Adenosine Triphosphate*
- CDPK, *Calcium-Dependent Protein Kinases*
- DAMPs, *Damage-Associated Molecular Patterns*
- ET, *Ethylene*
- ETI, *Effector-Triggered Immunity*
- FACS, *Fatty Acid-Amino Acid Conjugates*
- GLVs, *Green Leaf Volatiles*
- GOX, *Glucose oxidase*
- HAMPs, *Herbivore-Associated Molecular Patterns*
- HIPVs, *Herbivore-Induced Plant Volatiles*
- JA, *Jasmonic Acid*
- LRR, *Leucine-Rich Repeat*
- MAMPs o PAMPs, *Microbial or Pathogen-Associated Molecular Patterns*
- MAPKs, *Mitogen-Activated Protein Kinases*
- NBS, *Nucleotide-Binding Site*
- PIs, *Protease Inhibitors*
- PTI, *PAMP-Triggered Immunity*
- PRRs, *Pattern Recognition Receptors*
- ROS, *Reactive Oxygen Species*
- SA, *Salicylic Acid*
- SIPK, *Salicylic Acid-Induced Protein Kinase*
- VOCs, *Volatile Organic Compounds*
- WIPK, *Wound-Induced Protein Kinase*

NOTA: en la redacción de este capítulo se ha optado por el uso de las abreviaturas en inglés para facilitar la lectura y comprensión de la tesis. El uso de las siglas en español en algunos casos resultaba extraño y poco reconocible. Puesto que el resto de capítulos se encuentran redactados en inglés, al corresponderse con artículos científicos, el uso de las abreviaturas en inglés facilita la relación conceptual entre los contenidos de la tesis.

1. Principios básicos de la interacción planta-insecto fitófago

1.1. Introducción a la fitofagia en insectos

Durante los más de 350 millones de años de coexistencia entre las plantas terrestres y los insectos se han desarrollado toda una serie de interacciones entre estos que afectan a los organismos en todos sus niveles, desde la bioquímica básica hasta la genética poblacional. Algunas de estas interacciones pueden ser beneficiosas para las plantas, como es el caso de la polinización o la dispersión de semillas. Sin embargo, la interacción más frecuente entre ambos es la herbivoría o fitofagia por parte de los insectos y la defensa de las plantas hacia estos (Gatehouse, 2002; Mithöfer y Boland, 2008). Existen descritas casi un millón de especies de insectos en el planeta y cerca de la mitad se alimentan de plantas (Wu and Baldwin, 2010). Tan común es la interacción predador-hospedador que virtualmente cada especie de planta es depredada por al menos una especie de insecto (Gatehouse, 2002). Además, de acuerdo a la Teoría de la Coevolución de Ehrlich y Raven (1964), la fitofagia por insectos ha sido un factor determinante en el incremento de la diversidad de especies en ambos grupos, insectos y plantas.

Durante su coevolución con las plantas, los insectos han desarrollado diferentes mecanismos que les permiten ser capaces de localizar a sus plantas hospedadoras mediante señales físicas y químicas procedentes de la planta. Por su parte, las plantas han desarrollado defensas que pueden influir en el asentamiento de los insectos, así como en su alimentación, oviposición, desarrollo y/o fecundidad (Walling, 2000; Wu y Baldwin, 2010). La producción de defensas por parte de las plantas es un proceso costoso e implica el flujo de recursos de carbono y nitrógeno desde procesos de crecimiento vegetativo y reproductivo hacia mecanismos de defensa. Además, en sus ambientes naturales, las plantas se encuentran sometidas al ataque por diversos tipos de organismos (virus, bacterias, hongos, nematodos, insectos...) cada uno de los cuales requiere la activación de múltiples vías de transducción de señales. Por tanto, las plantas deben ser capaces de identificar y priorizar cada vía de señalización con el fin de desarrollar una respuesta de defensa espacial y temporalmente efectiva, que les permita minimizar el daño a ataques

inmediatos y futuros pero, al mismo tiempo, preservar su crecimiento vegetativo y éxito reproductivo (Pieterse *et al.*, 2012; Walling, 2000).

Entre los diferentes grupos de insectos, los fitófagos aparecen en los órdenes Coleoptera (como los escarabajos y picudos), Lepidoptera (mariposas y polillas), Hemiptera (pulgones, moscas blancas y saltahojas), Orthoptera (saltamontes y langostas) y Thysanoptera (trips). Aproximadamente el 90% de estos son especialistas, alimentándose de un número limitado de especies de plantas dentro de una misma familia taxonómica (insectos olífagos) o incluso de un único hospedador (insectos monófagos). Tan solo una minoría de los fitófagos, conocidos como generalistas, son altamente polífagos y se alimentan de numerosas plantas pertenecientes a familias taxonómicas diferentes (Howe y Jander, 2008; Mithöfer y Boland, 2012; Walters, 2015; Wu y Baldwin, 2010). Tal grado de especialización sugiere una gran eficacia de los mecanismos de defensa de las plantas, pues la mayoría de plantas son resistentes a la mayoría de especies de insectos (Hogehout y Bos, 2011). Por otro lado, los diferentes fitófagos usan diversas estrategias de alimentación para obtener nutrientes de las partes aéreas o subterráneas de la planta. Aunque todos ellos inducen daño mecánico, la cantidad y calidad del daño provocado en los tejidos de la planta depende enormemente del modo de alimentación del fitófago y, a su vez, condiciona en gran medida las respuestas de defensa desarrolladas por la planta (Howe y Jander, 2008; Walling, 2000).

1.2. Clasificación de los insectos fitófagos según su estrategia de alimentación

Dependiendo de sus estructuras bucales, y por tanto de su modo de alimentación, los fitófagos se clasifican generalmente en dos grandes grupos: masticadores y picadores-chupadores (Fig 1). En primer lugar, los insectos masticadores poseen dos mandíbulas, una a cada lado de la cabeza, situadas entre el labro y las maxilas. Las mandíbulas son comúnmente las partes bucales más grandes en estos insectos, mediante las cuales mastican el alimento. Al arrancar el tejido vegetal, la respuesta defensiva de las plantas a insectos masticadores se solapa parcialmente con la respuesta producida frente a daño mecánico. Ejemplos de este tipo de insectos

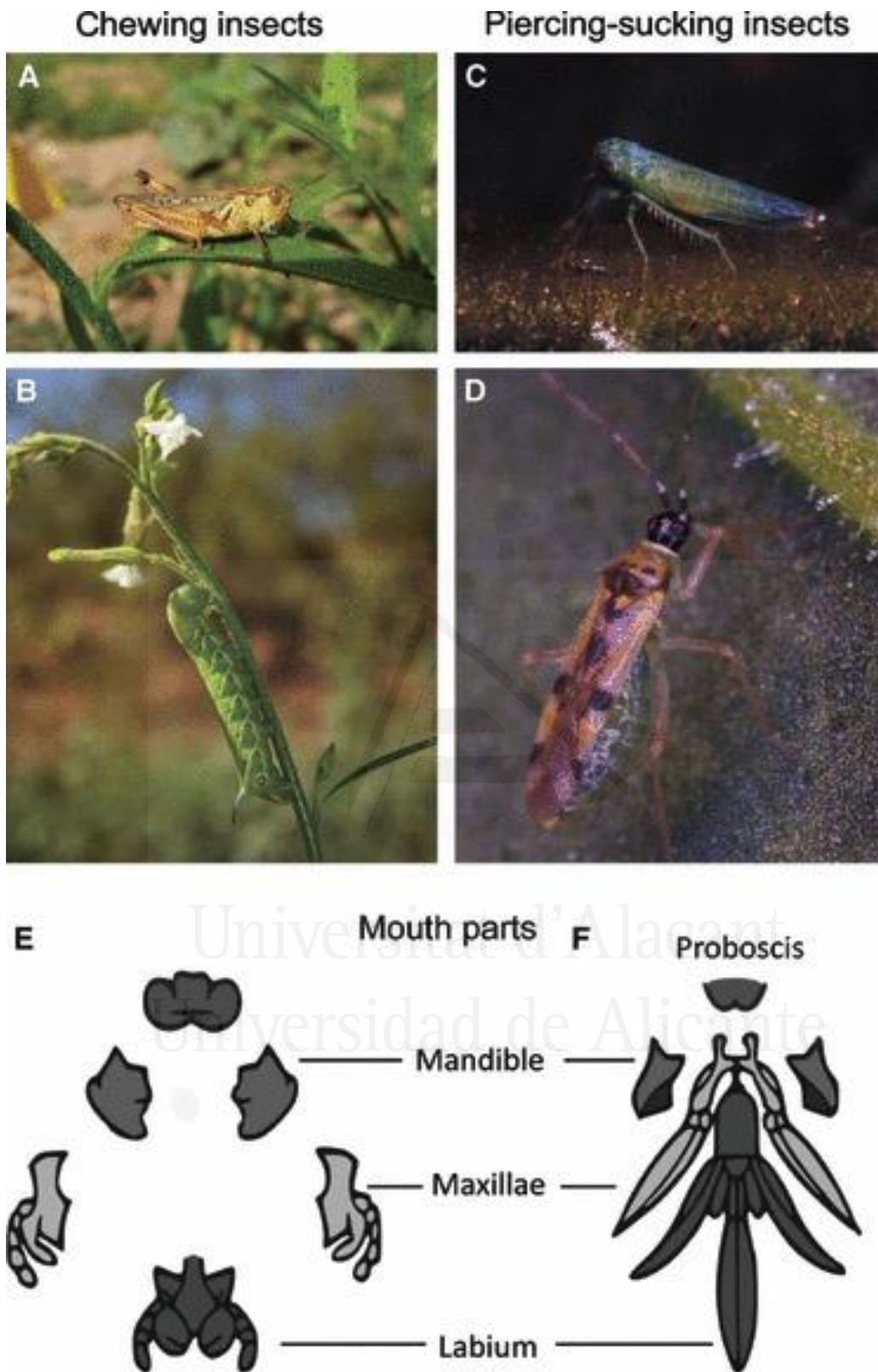


Fig 1. Insectos masticadores y picadores-chupadores y sus estructuras bucales. (A) saltamontes (orden Orthoptera); (B) orugas (orden Lepidoptera); (C) saltahojas (orden: Hemiptera); (D) míridos (orden: Hemiptera); (E) aparato bucal insecto masticador y (F) aparato bucal insecto picador-chupador. Imagen extraída de Bonaventure, 2012.

incluyen los saltamontes (orden Orthoptera) y los escarabajos (orden Coleoptera). Algunos no presentan estructuras bucales en sus formas adultas pero sí en estado larvario, como las polillas y las mariposas (orden Lepidoptera). Por otro lado, los insectos picadores-chupadores poseen una estructura bucal donde las mandíbulas y las maxilas se encuentran modificadas formando una probóscide, que se encuentra enfundada en el interior de un labio modificado. Esta estructura les permite perforar los tejidos vegetales y succionar el líquido del interior de las células o del floema (Bonaventure, 2012; 2014; Howe y Jander, 2008; Walters, 2015).

En contraposición a la masticación, la alimentación de los insectos picadores-chupadores no arranca tejido sólido de la planta, por lo que las defensas de las plantas en este caso no están asociadas a una fuerte respuesta a daño mecánico. No obstante, la cantidad de daño provocada por estos fitófagos varía enormemente en función del tejido específico del que se alimenten. Algunos de ellos, como los trips (orden Thysanoptera), son insectos laceradores y se alimentan mediante su estilete del contenido celular de las células epidérmicas o del parénquima de la planta. En cambio los insectos floéfagos, como los pulgones y la mosca blanca (orden Hemiptera), insertan su estilete entre las células para alimentarse del floema. El estilete se encuentra en continuo contacto con las células de la planta y, una vez establecido el lugar de alimentación en el floema, este puede ser utilizado durante horas o incluso semanas (Bonaventure, 2012; 2014; Howe y Jander, 2008; Walters, 2015; Walling, 2008). Dado el limitado daño tisular provocado y las prolongadas interacciones del estilete con las células vegetales, no es extraño que las respuestas de las plantas a los insectos floéfagos sean distintas a las de los insectos masticadores y laceradores, siendo en cierto modo más similares a las respuestas inducidas por patógenos (Findastef *et al.*, 1999; Walling, 2000).

1.3. Clasificación de las defensas de las plantas

Como organismos sésiles, las plantas no tienen la posibilidad de escapar de los ataques sufridos por otros organismos por lo que, a largo de su historia evolutiva, han tenido que desarrollar otras estrategias para defenderse (Mithöfer y Boland, 2012). Así pues, las plantas poseen un sistema de defensa altamente sofisticado que,

de manera similar al sistema inmune innato animal, reconoce moléculas ajenas o señales de sus propias células lesionadas y responde activando una respuesta inmune efectiva contra el organismo atacante (Pieterse *et al.*, 2012).

Las defensas de las plantas pueden clasificarse atendiendo a diferentes criterios. En primer lugar, podemos distinguir las defensas **físicas** de las **químicas**. Las defensas físicas incluyen barreras físicas como las espinas, los tricomas, la cutícula, la lignificación y la producción de resina. Por otro lado, entre las defensas químicas se incluyen numerosos compuestos con funciones defensivas, que pueden actuar tanto disuadiendo a los fitófagos (antixenosis) como reduciendo su supervivencia o reproducción (antibiosis) (Gatehouse, 2002; Goggin, 2007; Santamaría *et al.*, 2013; War *et al.*; 2012; Wu y Baldwin, 2010). Entre las defensas químicas presentan un papel relevante los metabolitos secundarios, es decir, aquellos compuestos de las plantas que no son requeridos para su crecimiento normal o reproducción y que son a menudo únicos o característicos de un linaje específico de plantas (Howe y Jander, 2008; War *et al.*; 2012). Se ha estimado que existen más de 500000 metabolitos secundarios en plantas y diversos estudios han revelado su importancia crucial en las interacciones planta-fitófago (Wu y Baldwin, 2010). La extraordinaria diversidad de metabolitos secundarios especializados sugiere que gran parte de dicha diversidad es también producto de la lucha coevolutiva entre los fitófagos y las plantas, para comer y no ser comidas, respectivamente (Howe y Jander, 2008).

En segundo lugar, las defensas pueden clasificarse en **directas**, cuando actúan directamente sobre el fitófago, o **indirectas** si su efecto sobre el fitófago se produce mediante la atracción a la planta del enemigo natural del mismo (depredador o parasitoide). Las defensas directas incluyen aquellos compuestos con actividad repelente, antinutritiva o tóxica sobre el fitófago, pero también las barreras físicas de las plantas que aumentan su aptitud ante la presencia de fitófagos. Por otro lado, las defensas indirectas incluyen las mezclas de volátiles liberados por las plantas, así como las recompensas de néctar extrafloral (Howe y Jander, 2008; Mithöfer y Boland, 2012; War *et al.*; 2012; Wu y Baldwin, 2010). Los volátiles liberados por las plantas respuesta a herbivoría se conocen con el nombre

de HIPVs (*Herbivore-Induced Plant Volatiles*) y forman un subconjunto dentro de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs, *Volatile Organic Compounds*) emitidos por las plantas. Cabe destacar además que la liberación de HIPVs puede funcionar como defensa directa afectando a la fisiología y comportamiento de los herbívoros debido a sus propiedades tóxicas repelentes o disuasorias (Arimura *et al.*, 2005; Howe y Jander, 2008; Mithöfer y Boland, 2012; War *et al.*, 2012).

Finalmente, el tercer nivel de clasificación de las defensas se realiza en función del momento de liberación y actuación de las mismas. Así pues, las defensas **constitutivas** o estáticas son aquellas defensas físicas o químicas que las plantas tienen independientemente de la presencia de herbívoros, es decir, son expresadas de manera continua o constitutiva. Los tejidos reproductivos, por ejemplo, presentan típicamente una gran acumulación de proteínas y metabolitos defensivos. Por otro lado, las defensas **inducidas** o activas son expresadas solamente en respuesta a la herbivoría, aunque los compuestos involucrados son a menudo los mismos (Gatehouse, 2002; Howe y Jander 2008, Wu y Baldwin, 2010). Mientras que la expresión de defensas inducidas tiene aspectos comunes a todas las plantas, la acumulación de defensas constitutivas es especie-específica (Gatehouse, 2002). Además, en la gran mayoría de los casos, tras la herbivoría las defensas inducidas se establecen no solo en las regiones dañadas de la hoja (defensas locales) sino también en las regiones no dañadas de la hoja y en hojas distales (defensas sistémicas), aunque en algunos casos con intensidades más bajas (Howe y Jander, 2008; Mithöfer y Boland, 2012; Wu y Baldwin, 2010).

Desde un punto de vista funcional, las defensas de las plantas pueden ser definidas como los rasgos que reducen el impacto negativo de los herbívoros sobre el éxito reproductivo de las plantas, es decir, sobre su producción de descendencia fértil. Por otro lado, desde un punto de vista evolutivo, las defensas son rasgos que incrementan la aptitud física de las plantas en presencia de herbivoría, es decir, su contribución a la variedad genética de la siguiente generación (Erb, 2018). Además, como estrategia alternativa o adicional a la elaboración de defensas, las plantas pueden desarrollar una tolerancia a la herbivoría, donde esta produce poca o ninguna reducción en la aptitud física de la planta. Así pues, la tolerancia puede

definirse como la capacidad de las plantas para volver a crecer y/o reproducirse tras la herbivoría. Un genotipo se denomina tolerante si puede mantener la pérdida de tejido con poca o ninguna disminución en su aptitud con respecto al estado no dañado (Kessler y Baldwin, 2002; Stowe *et al.*, 2000; Strauss y Agrawal, 1999).

En comparación con la producción de defensas la tolerancia a la herbivoría ha sido pobremente estudiada y su genética y mecanismos son todavía ampliamente desconocidos. Entre los mecanismos que han sido relacionados con una mayor tolerancia a la herbivoría se encuentran: el incremento en la actividad fotosintética, incremento en la detoxificación de especies reactivas del oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), incremento en la absorción de nutrientes, altas tasas de crecimiento relativo (crecimiento compensatorio), reactivación de meristemas durmientes, mayor ramificación o macollamiento una vez eliminada la dominancia apical, almacenamiento de fotoasimilados en estructuras subterráneas y en el tallo y la posterior capacidad de derivarlos a los brotes una vez transcurrida la herbivoría (Kessler y Baldwin, 2002; Nalam *et al.*; 2018; Peterson *et al.*, 2017; Strauss y Agrawal, 1999; Stowe *et al.*, 2000; Tiffin, 2000).

2. El fitófago *Myzus persicae* (pulgón del melocotonero)

2.1. Clasificación taxonómica

El término de pulgón o áfido es el nombre común empleado para referirse a los insectos pertenecientes de la superfamilia Aphidoidea, dentro del orden Hemiptera (Guerrieri y Digilio, 2008). La superfamilia Aphidoidea pertenece al suborden Sternorrhyncha junto con las superfamilias Aleyrodoidea (moscas blancas), Psylloidea (psílidos o piojos saltarines) y Coccoidea (insectos escama y cochinillas). A su vez, Aphidoidea incluye tres familias: Adelgidae (adélgidos), Phylloxeridae (filoxéridos) y Aphididae (pulgones verdaderos). Los adélgidos y filoxéridos son grupos más antiguos de “pulgones primitivos”, con unas 50 especies cada uno. Algunos autores organizan Adelgidae y Phylloxeroidea juntos en una superfamilia separada, Phylloxeroidea. Estos presentan un ovipositor y reproducción ovípara, mientras que los Aphididae carecen de ovipositor y son vivíparos, reproduciéndose

partenogenéticamente. Los adélgidos están restringidos a las coníferas de la familia *Pinaceae*, donde algunos forman agallas características. Dentro de los filoxéridos, que también pueden formar agallas, destaca la tribu Phylloxerini en *Salicaceae* o la tribu Phylloxerini en *Fagaceae*, *Juglandaceae*, *Rosaceae*, *Ulmaceae* y *Vitaceae* (Sorensen, 2009).

La taxonomía de la familia Aphididae es compleja y su división en subfamilias ha sido discutida a través de muchas clasificaciones. La clasificación de Remaudiere y Remaudiere (1997) reconoce alrededor de 25 subfamilias de pulgones con agrupaciones tribales de alrededor de 600 géneros y 4700 especies. Muchos linajes de pulgones coevolucionaron y sufrieron radiación adaptativa entre sus grupos de plantas hospedadoras y, con frecuencia, durante su historia filogenética algunos cambiaron de forma oportunista a grupos de hospedadores no relacionados filogenéticamente. Entre las subfamilias más grandes e importantes encontramos: Chaitophorinae en *Salicaceae* y *Gramineae*; las estrechamente relacionadas Myzocallidinae, Drepanosiphinae y Phyllaphidinae (a menudo consideradas una única subfamilia) en árboles dicotiledóneos pero también en bambú y *Fabaceae*; la subfamilia Lachninae, principalmente en *Pinaceae*, pero también *Fagaceae*, *Rosaceae* y raíces de *Asteraceae*; y la subfamilia Pemphiginae, a menudo en raíces y alterando con árboles dicotiledóneos formando agallas. No obstante, la subfamilia más grande y la más reciente evolutivamente es Aphidinae (Sorensen, 2009).

La subfamilia Aphidinae, contiene dos grandes tribus diversas y de gran importancia agrícola: Macrosiphini y Aphidini. La tribu Macrosiphini es diversa en géneros y sus especies generalmente carecen de la asistencia de las hormigas. Por otro lado, Aphidini es diversa en especies, que a menudo son asistidas por hormigas, pero es menos diversa en géneros. La tribu Aphidini a su vez contiene dos subtribus importantes: Rhopalosiphina, con alternancia entre *Rosaceae* y *Gramineae* o *Cyperaceae*; y Aphidina con alternancia principalmente entre Rosidae y Asteridae (Saguez et al., 2013; Sorensen, 2009). La especie objeto de estudio de la presente tesis doctoral, *Myzus persicae* Sulzer (1776), pertenece a la subtribu Aphidina.

2.2. Biología y ciclo vital

Los pulgones son insectos fitófagos muy eficientes capaces de colonizar gran parte del ecosistema terrestre. Entre las más de 5000 especies pulgones identificadas se encuentran desde generalistas extremos, que infestan a cientos de plantas hospedadoras de diversas familias, a especialistas que se alimentan solo de un pequeño número de especies vegetales estrechamente relacionadas (Elzinga y Jander, 2013). Los pulgones se caracterizan por un alto grado de polimorfismo (Fig 2) y su color puede ser muy variable dentro de una población determinada. Los pulgones presentan también diversas estructuras morfológicas especializadas que varían entre los grupos. Los más singulares son los sifúnculos o cornículas (Fig 3), que distinguen a los pulgones de otros insectos, a través de los cuales liberan su feromona de alarma, el β -farneseno. La estructura de las cornículas varía desde meros poros en la superficie abdominal hasta tubos muy alargados y en ocasiones elaborados. Los pulgones también presentan una cauda en el término abdominal, que puede ser redondeada, nudosa o alargada, y es utilizada para distribuir la melaza que excretan. Además, producen tanto formas ápteras como aladas (Fig 2 y 3), apareciendo estas últimas en diferentes momentos durante el año con una función colonizadora, utilizando el viento para dispersarse y localizar nuevos hospedadores. Finalmente, algunos pulgones producen excreciones cutáneas cerosas y pueden parecerse a otros Sternorrhyncha (Fig 2) (Flint, 2000; 2013; Sorensen, 2009).

El ciclo de vida del pulgón es complejo (Fig 4) y su clasificación se realiza de acuerdo a la alternancia de hospedadores y a su modo de reproducción. De acuerdo a la alternancia de hospedadores, los pulgones se clasifican en heteroecios o monoecios en función de si existe o no alternancia, respectivamente. Los pulgones heteroecios viven en un hospedador primario durante el invierno y colonizan hospedadores secundarios durante el resto del año, antes de volver a su hospedador primario. La heteroecia ocurre solo en el 10% de las especies de pulgones que generalmente colonizan las plantas herbáceas, incluyendo cultivos de importancia económica. Por el contrario, en la mayoría de las especies se da la

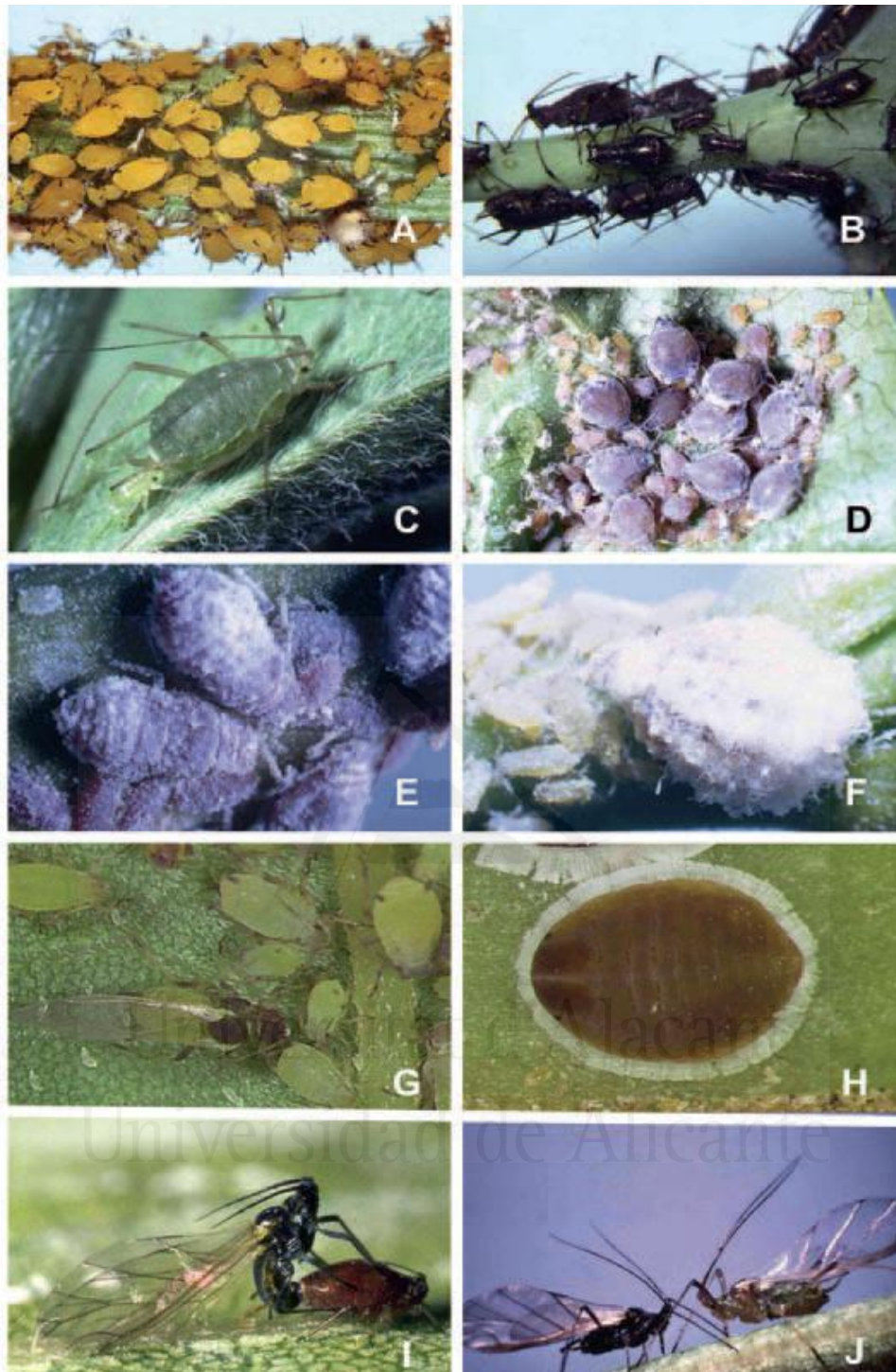


Fig 2. Diversidad de pulgones y formas. (A) *Aphis nerii* (Boyer de Fonscolombe), áptero; (B) *Uroleucon ambrosiae* (Thomas), áptero; (C) *Acyrtosiphon kondoi* (Shinji), áptero pariendo; (D) *Dysaphis plantaginea* (Passerini) áptero; (E) *Neophyllaphis podocarpi* (Takahashi), áptero con cera floculante; (F) *Prociphilus americanus* (Walker), áptero con cera filamentosa y apariencia de cochinilla (superfamilia Coccoidea); (G) *Aphis spiraeicola* (Patch), alado y áptero; (H) *Cerataphis orchidearum* (Westwood), áptero con franja de cera simulando una mosca blanca (superfamilia Aphidoidea); (I) *Rhopalosiphum nymphae* (Linnaeus) hembra ovípara y macho alado en cópula; (J) *Acyrtosiphon kondoi* (Shinji) a la izquierda y *A. pisum* (Harris) alado a la derecha. Imagen extraída de Sorensen, 2009.



Fig 3. Formas y fases del ciclo de *M. persicae*. (A) adultos alados y áptero; (B) adulto áptero y sus ninfas; (C) ninfa y exuvia de la muda; (D) cornículas. Fotografías realizadas por Victoria Florencio Ortiz.

monoecia y los pulgones viven en la misma planta durante todo el año, siendo algunos monófagos y otros olífagos o polífagos migrando entre especies de plantas. Por otro lado, en cuanto al modo de reproducción los pulgones se clasifican en **anholocíclicos** u **holocíclicos**, según si se reproducen únicamente por partenogénesis o en combinación con la reproducción sexual, respectivamente. La mayoría de las especies son holocíclicas, produciéndose la partenogénesis desde la aparición de la primera generación en primavera hasta la aparición de las formas sexuales en otoño, la cual se desencadena por los cambios de temperatura y fotoperíodo. Por el contrario, los ciclos de vida anholocíclicos pueden ocurrir cuando las condiciones climáticas son favorables, para mantener poblaciones en varias plantas durante el invierno. Las hembras paren ninfas que pueden alimentarse inmediatamente de las plantas. Este modo de reproducción vivípara confiere una

tasa de reproducción muy rápida con tiempos de desarrollo cortos, que resulta en un crecimiento poblacional anormalmente alto, incluso para los insectos. Por ejemplo, Dixon (1971) estimó que las poblaciones de pulgones en campos de patata pueden alcanzar densidades de 2×10^9 individuos por hectárea (Flint, 2000; 2013; Saguez *et al.*, 2013; Williams y Dixon 2007).

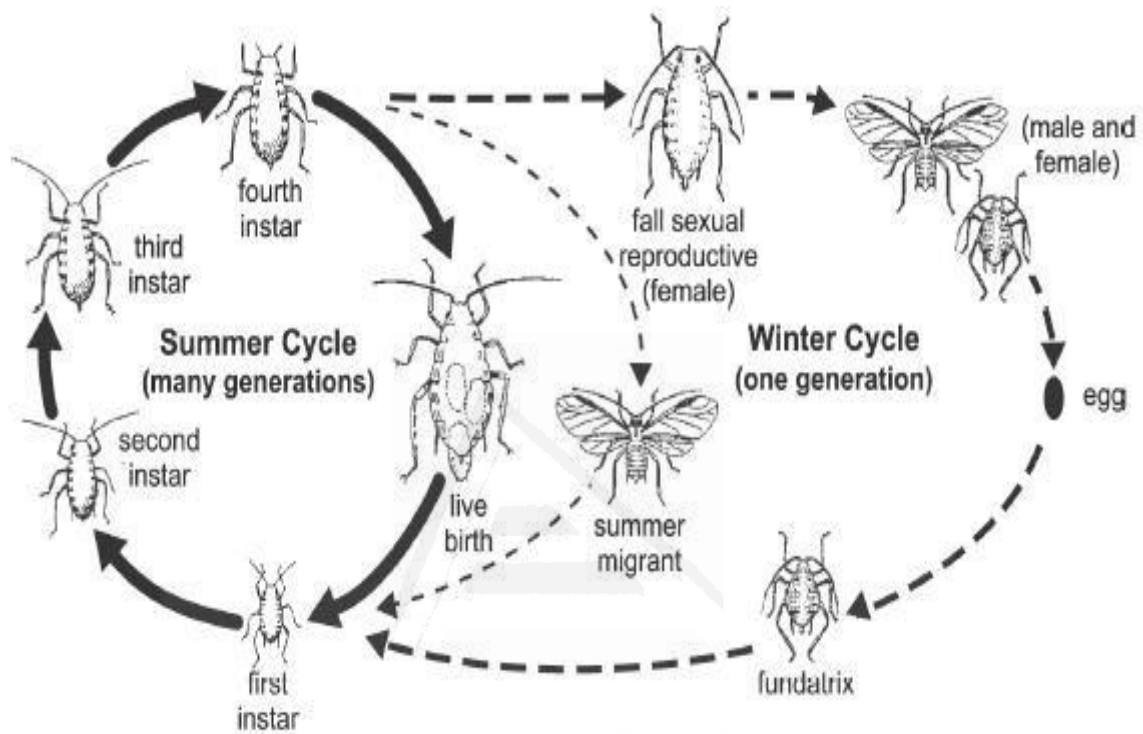


Fig 4. Ciclo de vida del pulgón. Imagen extraída de Flint, 2000.

M. persicae, presuntamente originado en China, se conoce comúnmente como el pulgón verde del melocotonero o el pulgón del melocotonero y la patata. Se trata de un pulgón de tamaño pequeño a mediano, con una longitud de 1.2-2.1 mm tanto en sus formas aladas como ápteras. Es altamente polimórfico y su color puede variar desde verde a rojo. Los alados tienen una mancha abdominal dorsal negra brillante, y los alados inmaduros son generalmente rojos o rosas. *M. persicae* es una especie altamente polífaga que coloniza con éxito cientos de especies de plantas pertenecientes a 40 familias diferentes. Su ciclo de vida depende del clima, la disponibilidad de su hospedador principal de invierno *Prunus* spp. (especialmente el melocotonero, *P. persica* (L.) Batsch) y el linaje genotípico. En las regiones templadas del mundo, donde *P. persica* está disponible y las temperaturas de otoño

son lo suficientemente bajas, *M. persicae* suele presentar un ciclo heteroecio y holocíclico, con la fase sexual invernal en *P. persica* y las generaciones de verano partenogenéticas en un gran número de plantas herbáceas como hospedadores secundarios. Sin embargo, en muchos países donde *P. persica* está ausente y/o un clima más cálido lo permite, el ciclo de vida es a menudo anholocíclico. Este último ciclo de vida, combinado con un corto tiempo de generación, permite que las poblaciones aumenten rápidamente en condiciones favorables y alcance rápidamente un número perjudicial para las plantas (Bass *et al.*, 2014; Saguez *et al.*, 2013).

2.3. Alimentación y adaptaciones

Los pulgones están especializados en la alimentación de la savia del floema por lo que son conocidos, junto con otros insectos hemípteros, como insectos floéfagos (Goggin, 2007). El orden Hemiptera es el único grupo de animales que incluye miembros cuya fuente de alimentación única o dominante es el floema. Este estilo de vida se ha desarrollado múltiples veces en Hemiptera a lo largo de la evolución, dándose actualmente en la mayoría de Sternorrhyncha (incluyendo moscas blancas, pulgones, cochinillas y psílidos), muchos Auchenorrhyncha (por ejemplo, la mayoría de los cicadélidos y delfácidos, conocidos como saltahojas y saltapuntas respectivamente) y la mayoría de los Heteroptera fitófagos (incluidos los ligaeidos, pentatómidos y coreideos). Otros pocos grupos de animales consumen savia del floema ocasionalmente, pero ninguno lo requiere como un componente de su dieta. Por ejemplo, algunos trips y lepidópteros entre los insectos, los chupasavias y colibríes entre las aves y algunos primates (Douglas, 2006).

Los apéndices bucales (maxilares y mandíbulas) de los pulgones se alargan formando un haz de estiletes que perfora los tejidos de la planta para llegar al sitio de alimentación en el floema, mientras que la punta distal del labio ayuda a la penetración del estilete desde el exterior, actuando como guía (Guerrieri y Digilio, 2008). Los maxilares se interdigitan formando formado dos canales (Fig 5): el canal **alimentario** se usa para ingerir los fluidos vegetales, mientras que el canal **salival** se usa para liberar saliva a lo largo del camino del estilete y hacia el sitio de

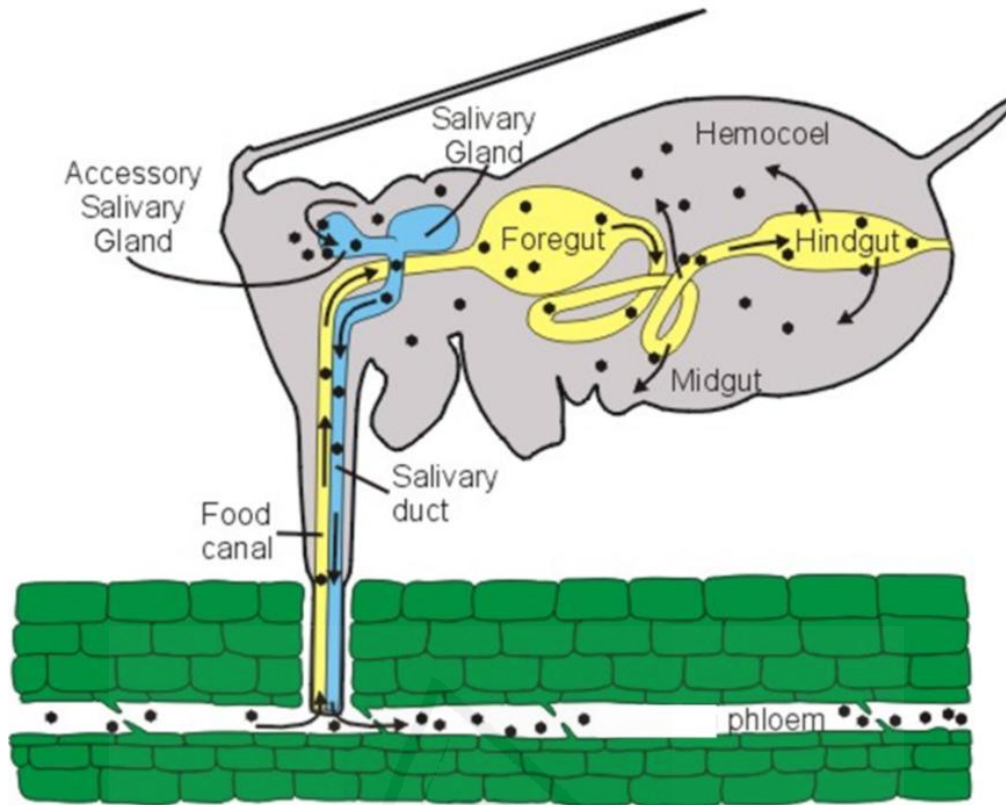


Fig 5. Estructura del canal salival y alimentario del estilete del pulgón, así como de su tracto digestivo. Imagen extraída de Gergerich y Dolja, 2006.

alimentación (Kaloshian y Walling, 2005). Las primeras inserciones de los estiletes duran menos de un minuto, son probablemente solo epidérmicas y parecen proporcionar suficiente información para el rechazo o aceptación de la planta. La inserción del estilete en la planta (Fig 6) ocurre entre dos células epidérmicas y, posteriormente, sigue una ruta apoplástica o extracelular entre las capas de la pared celular primaria y secundaria. Dicha inserción intercelular en lugar de perforar las células puede minimizar el daño celular y así evitar la inducción de una respuesta a daño en la planta (Gatehouse, 2002). Sin embargo, durante la prueba de la planta, los estiletes perforan transitoriamente las células epidérmicas, del mesófilo y del parénquima, produciendo un daño mecánico que puede influir en las respuestas de las plantas al pulgón. Estas pruebas intracelulares no solo son decisivas para la aceptación de la planta, sino también para ubicar la posición de los estiletes dentro de los tejidos vegetales (Giordanengo *et al.*, 2010; Goggin, 2007; Tjallingii, 2006).

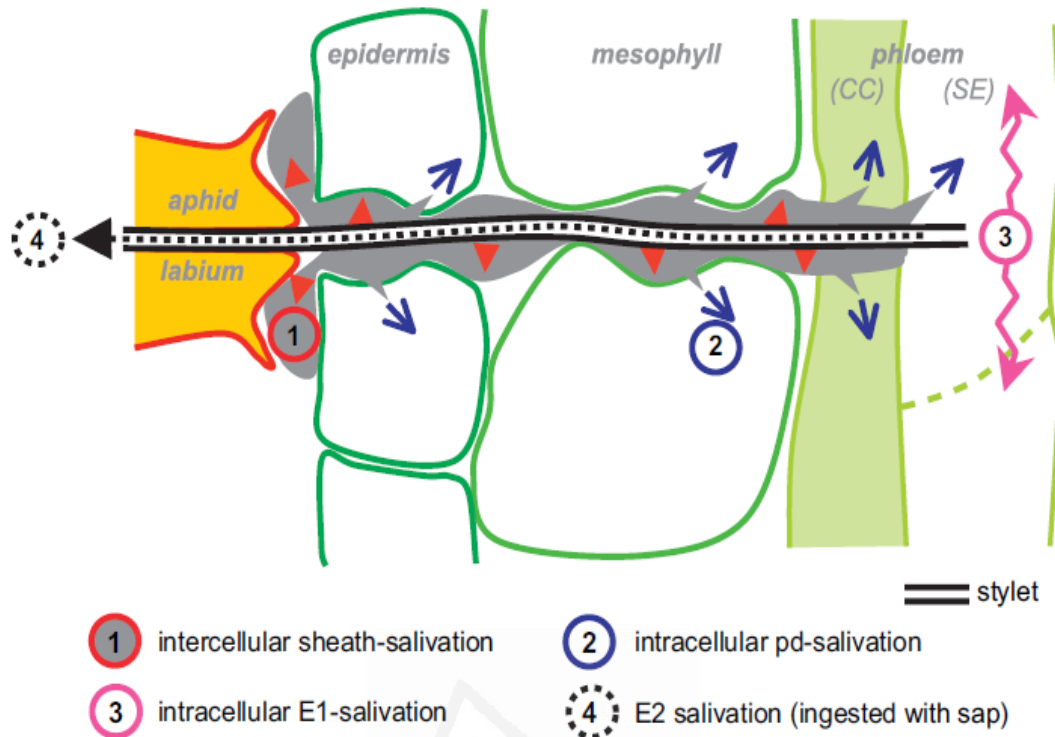


Fig 6. Penetración del estilete del pulgón a través de la epidermis, el mesófilo, y las células acompañantes (CC) hasta llegar al tubo criboso (SE) del floema. Se observan los diferentes periodos de salivación: (1) salivación gelificante (área gris con triángulos rojos), (2) Salivación acuosa intercelular (flechas azules), (3) salivación dentro del tubo criboso (flechas rosas) y (4) salivación acuosa de alimentación (línea punteada negra). Imagen extraída de Tjallingii, 2006.

En la mayoría de los casos, la alimentación del floema se produce de forma pasiva gracias a la alta presión en el interior de los tubos cribosos (Guerrieri y Digilio, 2008). Desde la penetración del estilete los pulgones secretan saliva de manera continua dentro de los tejidos de la planta, la cual puede clasificarse en dos tipos conocidos como saliva gelificante y saliva acuosa (Moreno *et al.*, 2011; Tjallingii, 2006). La saliva gelificante es densa y proteínica, compuesta principalmente de proteínas (incluyendo fenoxidasas, peroxidasas, pectinasas, y glucosidasas), fosfolípidos y carbohidratos conjugados. Esta se secreta de manera continuada durante el tránsito apoplástico, formando una vaina lubricante y endurecedora alrededor de los estiletes, por lo que protege los estiletes durante la penetración del tejido y, al mismo tiempo, los aísla de los tejidos vegetales evitando la reacción de la planta en el sitio de alimentación. Además, la saliva gelificante también sella las células perforadas durante el tránsito del estilete hacia los tubos cribosos

(Giordanengo et al., 2010; van Bel y Will, 2016; Will et al., 2007; 2009; 2013). Por otro lado, la composición química de la saliva acuosa es muy compleja y depende tanto de la especie de pulgón como de su dieta. Está compuesta principalmente de enzimas que facilitan la penetración del estilete en el tejido vegetal, mediante la alteración de las células o la manipulación o represión de las defensas de la planta (Ver apartado 4) (Giordanengo et al., 2010; van Bel y Will, 2016; Will et al., 2013).

La savia del floema es rica en nutrientes, en comparación con otros muchos productos vegetales, y, generalmente, carece de toxinas y elementos disuasivos para la alimentación. Sin embargo, su composición, basada principalmente en azúcares y aminoácidos, supone dos problemas nutricionales para su utilización por parte de los pulgones conocidas como la **barrera del nitrógeno** y la **barrera del azúcar**. Tales barreras han dado lugar a adaptaciones específicas en estos insectos (Douglas, 2006).

En primer lugar, la barrera del nitrógeno para la utilización de la savia del floema se refiere a la baja calidad de su composición en nitrógeno, ya que, la proporción entre aminoácidos esenciales y no esenciales en la savia es entre 1:4 y 1:20, considerablemente inferior a la proporción 1:1 encontrada en las proteínas animales. Puesto que los animales carecen de la capacidad de sintetizar los aminoácidos esenciales (histidina, leucina, isoleucina, valina, treonina, lisina, metionina, fenilalanina y triptófano), la escasez de cualquiera de estos limita la síntesis proteica y, en consecuencia, su crecimiento y fecundidad (Dinant et al., 2010; Douglas, 2006, Saguez et al., 2013). Diversos estudios que incluyen aspectos nutricionales, fisiológicos y genómicos, han demostrado que los pulgones superaron evolutivamente la barrera del nitrógeno mediante la adquisición de endosimbiontes, lo cual se estima que tuvo lugar hace entre 160 y 280 millones de años. Estos son microorganismos con los que presentan una relación mutualista, cercana y continua, es decir, una interacción mutuamente beneficiosa. Algunos simbioses son obligados o primarios mientras que otros son facultativos o secundarios. En los pulgones el simbionte obligado es *Buchnera aphidicola*, el cual es indispensable al proporcionarle aminoácidos esenciales que no pueden obtener del floema de las plantas (Douglas, 2006; Guo et al., 2017; Saguez et al., 2013). Por

ejemplo, en el pulgón del guisante, *Acyrtosiphon pisum* (Harris), *B. aphidicola* contribuye con hasta 90% de los aminoácidos esenciales requeridos por el pulgón alimentándose en *Vicia faba* L. (Douglas, 2006). Se trata de una γ -proteobacteria cocoide obligatoriamente intracelular que se encuentra restringida al citoplasma de células especializadas llamadas bacteriocitos, en el hemocele del pulgón. Esta bacteria representa el 90-99% del microbiota de los pulgones y se transmite verticalmente, es decir de la madre a las crías, a través del ovario (Douglas, 1998; 2006). Por otro lado, los simbioses facultativos son numerosos y presentan diversos efectos sobre los pulgones, los cuales pueden ser beneficiosos o perjudiciales para estos. Por ejemplo, algunos simbioses afectan a la pigmentación del cuerpo del pulgón, a la producción de descendencia o confieren resistencia al choque térmico, a parasitoides u hongos (Goggin, 2007; Guo et al., 2017; Saguez et al., 2013).

En segundo lugar, la barrera del azúcar para la utilización de la savia del floema se refiere a su alta concentración en azúcares, principalmente en forma de sacarosa, derivados de la fijación de carbono en la fotosíntesis. La concentración de azúcares en el floema puede ser de hasta 1M, creando una presión osmótica de 2 a 5 veces mayor que la de los fluidos corporales del pulgón. Además, los pulgones ingieren savia a gran velocidad, en parte, por la alta presión hidrostática y, en parte, para garantizar un suministro suficiente de otros nutrientes del floema a bajas concentraciones, como los aminoácidos. Este flujo continuo de fluido a alta presión osmótica en el intestino, de no ser regulado, provocaría la transferencia de agua de los fluidos corporales al contenido intestinal y el colapso osmótico del insecto. En consecuencia, la regulación de la presión osmótica representa un desafío para los pulgones. En estos insectos, el tracto digestivo es simple y está compuesto por un esófago, un intestino medio y un intestino posterior proximal. A su vez, el intestino medio está compuesto por un estómago y un intestino en bucle, yuxtapuestos y formados por una única capa de células epiteliales unidas por una lámina y músculos (Fig 5). Esta organización anatómica puede favorecer la digestión de azúcares y el intercambio de agua en pulgones (Douglas, 2006). Además, la tolerancia de estos insectos al elevado contenido en azúcares y la elevada presión osmótica de la savia

del floema está facilitada por la presencia de actividad sacarasa-transglucosidasa en su intestino. Dicha actividad transforma el exceso de azúcar ingerido en oligosacáridos de cadena larga, reduciendo así la presión osmótica en el intestino. Para ello, en primer lugar, la sacarosa es metabolizada por α -glucosidasas localizadas en el intestino proximal liberando los monosacáridos fructosa y glucosa. La fructosa es asimilada rápidamente por el epitelio digestivo para ser utilizada preferentemente como sustrato respiratorio. Posteriormente, enzimas transglucosidasas transforman la glucosa en oligosacáridos, los cuales son excretados en forma de melaza (Douglas, 2006; Saguez *et al.*, 2013). Finalmente, también ha sido sugerido el consumo de agua del xilema por parte de los pulgones como estrategia para diluir el contenido en azúcar en el intestino y, por tanto contribuir a la osmorregulación (Louis y Shah, 2013).

2.4. Importancia económica en la agricultura

Los pulgones son una de las plagas más importantes a nivel mundial en la agricultura desde el punto de vista económico. De las cerca de 5000 especies conocidas de pulgón alrededor de 450 prosperan en plantas cultivadas y unas 100 representan una gran amenaza en la agricultura. En climas templados, son considerados la plaga más importante, especialmente en aquellos casos en que su ataque está asociado con la transmisión de virus fitopatógenos (Guerrieri y Digilio, 2008; Simon y Peccoud, 2018). Debido a su extremadamente especializado modo de alimentación, explorando todos los tejidos vegetales desde la epidermis hasta el floema y el xilema, los pulgones son los vectores de virus más importantes, transmitiendo cerca del 30% de todas las especies de virus de plantas descritas hasta la fecha (Brault *et al.*, 2010). Los síntomas causados por la infestación de pulgón varían ampliamente según el pulgón y la planta en cuestión. Los síntomas más comunes incluyen clorosis, necrosis, marchitez, restricción del crecimiento y atrofia (Fig 7). Los pulgones formadores de agallas, de los cuales existen más de 400 especies, representan el mejor ejemplo de la capacidad de estos insectos para modificar la morfología de su hospedador. Además, incluso las especies que no desencadenan síntomas visibles, como es el caso de *M. persicae*, provocan cambios

fisiológicos menos aparentes pero igualmente profundos en sus huéspedes, afectando al equilibrio hormonal de la planta, manipulando el metabolismo de la planta su propio beneficio y, esencialmente, secuestrando las funciones fisiológicas de la planta (Ver apartado 4) (Goggin, 2007; Sorensen, 2009).

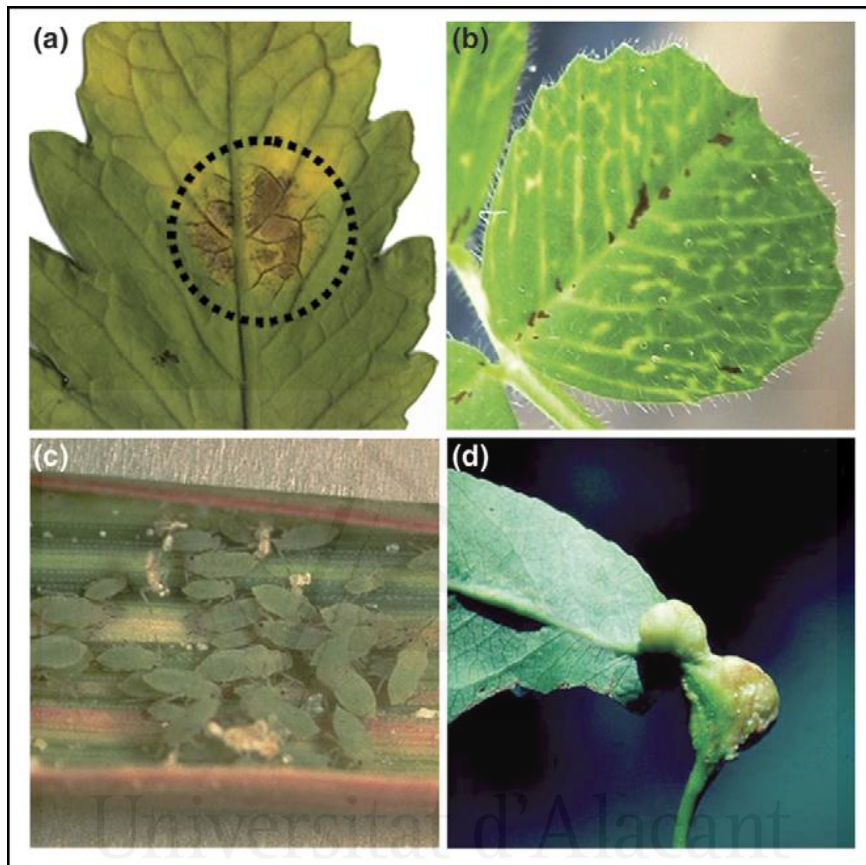


Fig 7. Síntomas desarrollados en la planta en respuesta a la infestación con pulgón. (a) Elevadas densidades de población de *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) puede causar clorosis y necrosis. La línea punteada representa la posición de la trampa donde fueron confinados los pulgones. La necrosis se restringe al lugar de alimentación de los pulgones mientras que los síntomas de clorosis se pueden extender fuera de este; (b) La alimentación de *Therioaphis trifolii* f. *maculata* (Buckton) sobre la alfalfa (*Medicago sativa* L.) causa clorosis venosa sistémica; (c) *Diuraphis noxia* (Mordvilko) en trigo (*Triticum aestivum* L.) causa el enrollamiento de hojas y manchas longitudinales debido a la pérdida de clorofila; (d) *Pemphigus betae* (Doane) induce agallas foliares en su hospedador de invierno, el álamo, *Populus angustifolia* Torrey. Imagen extraída de Goggin, 2007.

El impacto económico de los pulgones en la agricultura está relacionado con su altamente eficiente colonización y asentamiento en los cultivos, gracias a la existencia de generaciones de alados que colonizan nuevas plantas hospedadoras y

a la reproducción por partenogénesis, que les confiere una alta tasa reproductiva con un corto periodo pre-reproductivo (Ver apartado 2.2.). Las altas densidades de población alcanzadas conducen a una importante extracción de nutrientes del floema, que puede causar marchitez y, en última instancia, la muerte de la planta (Giordanengo *et al.*, 2010; Perring *et al.*, 2018). Además, independientemente de los tipos de daño directo, los pulgones producen gran cantidad de melaza, la cual sirve como medio de cultivo para el crecimiento de hongos saprófitos que pueden bloquear los estomas, limitan la fotosíntesis y promueven otras enfermedades fúngicas. También la melaza forma cristales que durante los días soleados actúan de lupa quemando el tejido vegetal. En muchos casos, todos estos daños indirectos son mucho peores que la propia sustracción de la savia de la planta (Guerrieri y Digilio, 2008; Perring *et al.*, 2018; Sorensen, 2009). Así pues, el manejo del pulgón resulta muy complicado debido a sus ciclos de vida cortos y sus tasas de reproducción extremadamente altas, por lo que se han utilizado grandes cantidades de insecticidas para su control. Estos productos son costosos de aplicar, dañan los ecosistemas y el medio ambiente, y destruyen de forma no selectiva a los insectos beneficiosos (depredadores, parasitoides y polinizadores). Además, la intensa y regular exposición a los insecticidas a la que han estado sometidos los pulgones ha generado la aparición de múltiples formas de resistencia a las principales clases de productos químicos, lo que complica aún más su control. De hecho se han identificado hasta el momento 14 especies de pulgón que han desarrollado resistencia a insecticidas (Dogimont, 2010; Simon y Peccoud, 2018).

En el caso particular de *M. persicae*, estamos ante la plaga de pulgón más importante en todo el mundo desde el punto de vista económico, debido a su capacidad para transmitir enfermedades víricas y causar importante daños directos y cosméticos en la producción. Es polífago y se alimenta de más de 50 familias de plantas, causando pérdidas en cultivos agroindustriales (incluyendo la patata, la caña de azúcar y el tabaco), cultivos hortícolas (incluyendo diversas brassicáceas, solanáceas y cucurbitáceas) y frutas de hueso (melocotón, albaricoque y cereza, entre otros). Numerosos factores entre los que se incluye su amplia distribución y rango de huéspedes, sus mecanismos de daño a las plantas, su ciclo de vida y

capacidad de dispersión y su gran capacidad de evolución de resistencia insecticidas han potenciado su posición como plaga (Bass *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2012). *M. persicae* exhibe una sorprendente capacidad de rápida adaptación a los insecticidas, desarrollando resistencia a más compuestos activos que cualquier otro insecto conocido. Se ha estimado que presenta resistencia, al menos, a 70 compuestos sintéticos (incluyendo organofosfatos, carbamatos neonicotinoides y organoclorados) y se han caracterizado seis mecanismos de resistencia distintos (Foster *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2012; Simon y Peccoud, 2018).

3. Defensas inducidas de las plantas a la fitofagia

La implementación con éxito de una respuesta de defensa inducida que permita la defensa o tolerancia al ataque de fitófagos requiere que las plantas respondan de una forma rápida y precisa. Cuando las plantas perciben señales físicas y químicas asociadas a herbivoría, se produce la activación en la planta de respuestas específicas para defenderse o tolerar el ataque del insecto. Estas respuestas incluyen cambios específicos en la expresión génica, metabolismo y patrón de crecimiento y desarrollo de la planta. Para ello, antes de la expresión génica y la activación del metabolismo, se producen una serie de cambios que son conocidos como **acontecimientos de señalización temprana**, comunes o conservados en las respuestas de las plantas a diferentes insectos y patógenos, y que son críticos en el proceso de reconocimiento del atacante. Estas respuestas tempranas, que ocurren entre los primeros minutos / horas desde inicio de la herbivoría, incluyen desequilibrios iónicos, variaciones en los potenciales de membrana, señalización por calcio, producción de ROS y activación de la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, *Mitogen-Activated Protein Kinases*). Así pues, las defensas inducidas constan de tres componentes (Fig 8): un componente de percepción, que activa una red de regulación posterior basada en la señalización por fitohormonas, que finalmente media la biosíntesis de metabolitos que funcionan como defensas directas o indirectas (Fig 9) (Bonaventure *et al.*, 2011; Bonaventure, 2012; Howe y Jander, 2008; Maffei *et al.*, 2007a; Santamaria *et al.*, 2013; 2018; Wu y Baldwin, 2010).

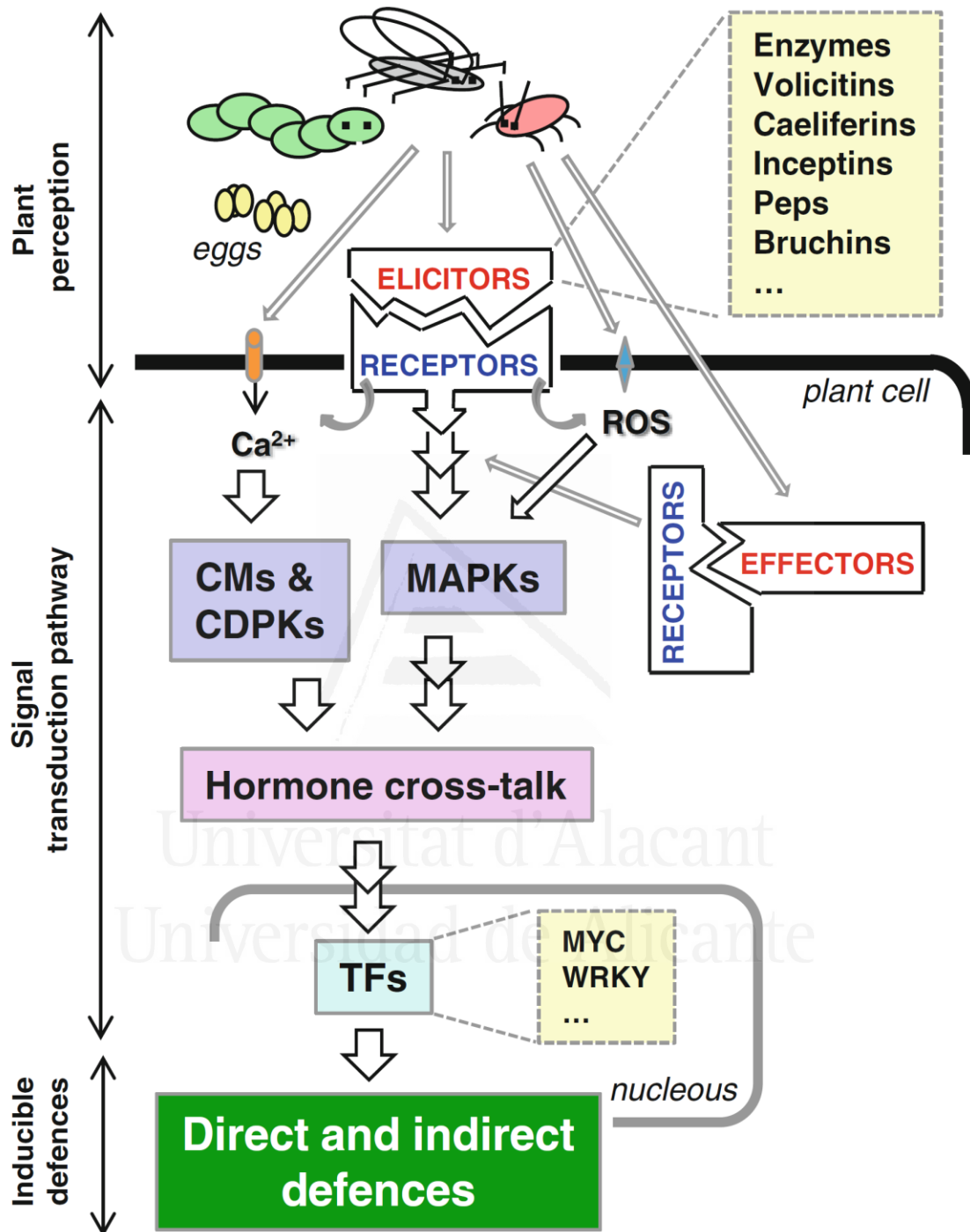


Fig 8. Modelo que resume los diferentes componentes de las defensas inducidas en plantas frente al ataque de fitófagos. Imagen extraída de Santamaria et al., 2013.

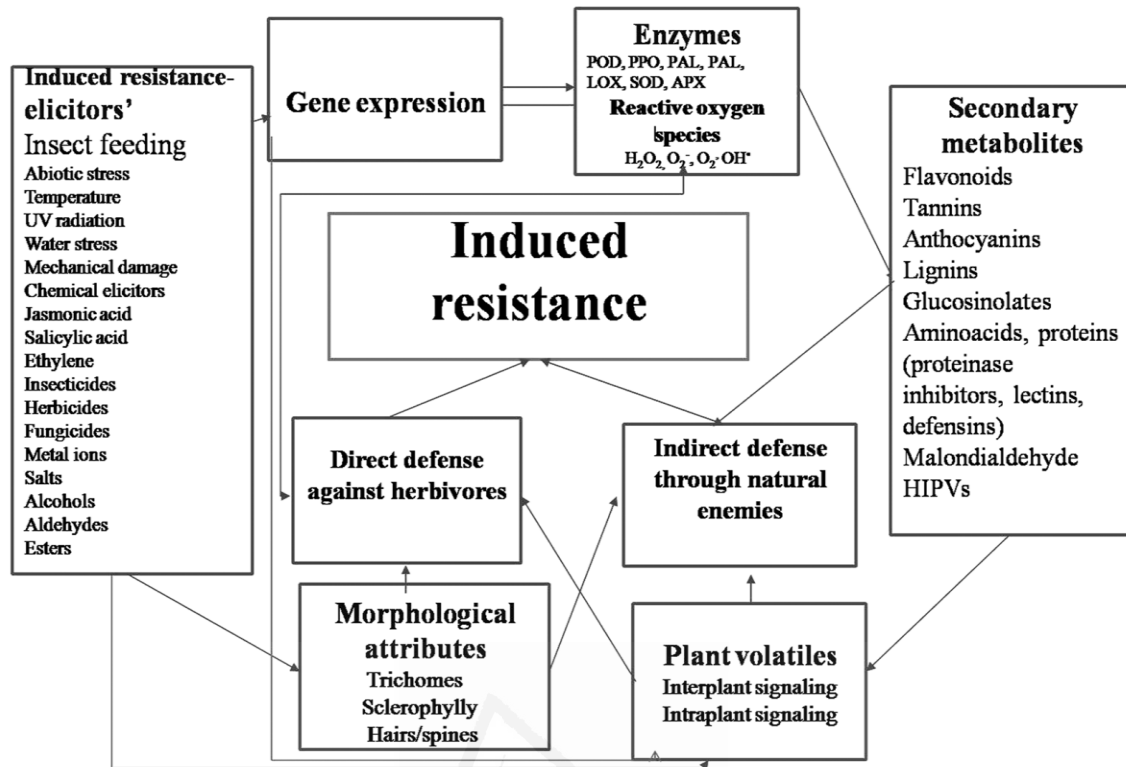


Fig 9. Modelo que resume los diferentes tipos de defensas inducidas en plantas frente al ataque de fitófagos. Imagen extraída de War *et al.*, 2012.

3.1. Percepción y reconocimiento del fitófago

En respuesta al daño tisular, se producen señales endógenas conocidas como **patrones moleculares asociados a daño** (DAMPs, *Damage-Associated Molecular Patterns*), que juegan un papel importante en la percepción del agente agresor. Existen diversos compuestos que actúan como DAMPs en plantas, incluyendo oligosacáridos, adenosina 5'-trifosfato extracelular (eATP), oligogalacturónidos y péptidos escindidos de proteínas más grandes (Maffei *et al.*, 2012; Schmelz, 2015). Puesto que la inducción de defensas es un proceso costoso para las plantas, la capacidad de distinguir entre el daño mecánico casual y la fitofagia resulta crucial para estas (Howe y Jander, 2008). En efecto, aunque tanto el daño mecánico como la herbivoría provocan en la planta daño y pérdida tisular, diversos estudios han demostrado que las plantas responden de manera diferente a ambos estreses (Alborn *et al.*, 1997; Halitschke *et al.*, 2001; Reymond *et al.*, 2000). Existen dos teorías principales para explicar cómo las plantas discriminan la herbivoría del simple daño mecánico. La primera incluye el reconocimiento por parte de la planta de señales

derivadas de los fitófagos, mientras que la segunda propone que las plantas también podrían ser capaces de discernir entre ambos estreses a través del uso de mecanismos, aún desconocidos, que miden la cantidad y calidad del daño tisular. Los diferentes herbívoros tienen patrones específicos de alimentación, que incluyen tanto la forma en que se elimina el tejido vegetal como la frecuencia y el período de tiempo de alimentación. Estos patrones podrían ser reconocidos y utilizados por las plantas para producir respuestas específicas a la herbivoría. Por otro lado, las señales derivadas de herbívoros, que son reconocidas por la planta y activan respuestas defensivas, se conocen con el nombre de elicitores o inductores (Howe y Jander, 2008; Wu y Baldwin, 2009).

De manera análoga a los patrones moleculares asociados a microorganismos o patógenos (MAMPs o PAMPs, *Microbial- or Pathogen-Associated Molecular Patterns*), se ha utilizado el término de **patrones moleculares asociados a herbívoros** (HAMPs, *Herbivore-Associated Molecular Patterns*) para hacer referencia a todos los elicitores de herbívoros que pueden ser potencialmente percibidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, *Pattern Recognition Receptor*) de las plantas e inducir la denominada inmunidad activada por PAMP (PTI, *PAMP-Triggered Immunity*). Actualmente, los HAMPs conocidos se pueden clasificar en dos categorías: elicitores derivados de las secreciones orales o los fluidos de oviposición del herbívoro y elicitores originados en la planta a partir de patrones específicos de daño. El primer elicitore completamente caracterizado fue la **volicitina** [N-(17-hydroxylinolenoyl)-L-glutamine], identificada en las secreciones orales de *Spodoptera exigua* (Hübner) y perteneciente al grupo de los conjugados de ácidos grasos y aminoácidos (FACs, *Fatty acid-Amino acid Conjugates*). Curiosamente, el ácido graso procede de la planta (pudiendo ser ácido linoleico, ácido linoléico o un derivado de estos) mientras que el aminoácido (glutamato o glutamina) procede del insecto, y la síntesis del FAC ocurre en el intestino medio del insecto. Posteriormente, los FACs fueron aislados en otras especies de lepidópteros y también en otros insectos como *Teleogryllus taiwanemma* (Ohmachi et Matsuura) y *Drosophila melanogaster* (Meigen). A pesar de que los FACs son los más conocidos, se han descrito diversos grupos de elicitores. Por ejemplo, en las secreciones orales

de distintos insectos se han descrito las **caeliferinas** (ácidos grasos saturados y monoinsaturados α -hidroxisulfatados) y las enzimas **β -glucosidasa** y **glucosa oxidasa**, mientras que en los fluidos de oviposición se han descrito las **bruchinas** (ácido 3-hidroxiopropanoico mono o diesterificado con dioles C22 monoinsaturados o dioles C24 mono y diinsaturados) y el **cinauro de bencilo**. Por otro lado, las **inceptinas** (productos proteolíticos de la subunidad G de la ATP sintasa cloroplástica) y los **oligourónidos** y **pectinas** (producto ambos de la degradación de las paredes celulares de la planta) se generan en la planta como consecuencia de la herbivoría (Bonaventure *et al.*, 2011; Bonaventure, 2012; Hogenhout y Bos 2011; Howe y Jander, 2008; Maffei *et al.*, 2012; Mithöfer y Boland, 2008; Santamaría *et al.*, 2018; Schmelz, 2015; Wu y Baldwin, 2009; 2010).

En cuanto a los pulgones, existen evidencias de que algunas enzimas presentes en las secreciones salivares que son liberadas durante su alimentación pueden ser elicitores de las respuestas de defensa de las plantas (Howe y Jander, 2008; Maffei *et al.*, 2012; Wu y Baldwin 2009). Liu *et al.* (2009) demostraron que la pectinasa presente en la saliva acuosa de *Sitobion avenae* (Fabricius) desencadena la liberación de volátiles del trigo que atraen al enemigo natural parasitoide *Aphidius avenae* (Haliday). Por otro lado, De Vos y Jander (2009) demostraron que factores de carácter proteico presentes en la saliva de *M. persicae* producen una disminución de la población de pulgón en plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh en las que se infiltra esta saliva. Diversos estudios proteómicos han identificado numerosas proteínas en la saliva de pulgones (Carolan *et al.*, 2009; Cooper *et al.*, 2011; Nicholson *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2013), incluido *M. persicae* (Harmel *et al.*, 2008). Sin embargo, alrededor de la mitad de las proteínas identificadas se encuentran aparentemente solo en pulgones y no tienen funciones conocidas. Entre las proteínas salivales con funciones conocidas identificadas en varias especies de pulgón se encuentran la glucosa deshidrogenasa, proteasas, fosfatasa y proteínas de unión a calcio (Elzinga y Jander, 2013). En el caso de *M. persicae*, las proteínas Mp10 (Bos *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2014), Mp42 (Bos *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2014) y Mp56-58 (Elzinga *et al.*, 2014) han demostrado inducir las respuestas defensivas de la planta disminuyendo el rendimiento del pulgón.

Es necesario todavía profundizar en el estudio de los mecanismos por los cuales los elicitores activan las rutas de señalización de la planta y las posteriores respuestas de defensa. Además, dada la gran diversidad de interacciones planta-insecto, es esperable que se descubran nuevos grupos de elicitores derivados de insectos, que pueden activar respuestas de defensa específicas en especies de plantas particulares (Hettenhausen *et al.*, 2015).

3.2. Respuestas tempranas que preceden a la expresión génica

3.2.1. Despolarización de membranas e influjo de calcio

La percepción del elicitador es rápidamente seguida por la despolarización de la membrana celular y el influjo de iones de calcio (Ca^{+2}). El Ca^{+2} actúa como segundo mensajero intracelular en diversas vías de señalización en plantas, transfiriendo una amplia gama de estímulos ambientales y de desarrollo a las respuestas fisiológicas apropiadas. En condiciones normales, el contenido de Ca^{+2} citosólico se mantiene entre 100-200nM, 10^4 veces menor que en el fluido apoplástico y 10^4 - 10^5 menor que en los orgánulos celulares, proporcionando así el potencial para la importación inmediata de Ca^{+2} en el citosol, donde actúa como un segundo mensajero. La concentración de Ca^{+2} se regula rigurosamente mediante la coordinación tanto de flujos pasivos (canales de Ca^{+2}) como de transporte activo (Ca^{+2} -ATPasas y Ca^{+2} -antiportadores) a través de la membrana plasmática y/o endomembranas, así como la capacidad de amortiguación del citosol. En respuesta a estrés se produce un influjo de Ca^{+2} hacia el citosol que activa la calmodulina y otras proteínas sensibles a calcio, como proteínas de unión a calmodulina, proteínas quinasas dependientes de calcio (CDPKs) y proteínas de unión a Ca^{+2} con/sin motivos en mano EF. Estas proteínas promueven eventos de señalización posteriores como la fosforilación de proteínas y las respuestas transcripcionales (Edel *et al.*, 2017; Lecourieux *et al.*, 2006; Maffei *et al.*, 2007a; 2007b; Santamaría *et al.*, 2018; War *et al.*; 2012; Wu y Baldwin, 2010).

Existen algunos estudios que resaltan la importancia de la señalización de Ca^{+2} en las respuestas a herbivoría. En *Phaseolus lunatus* L., el tratamiento con un quelante de Ca^{+2} extracelular suprime la expresión de genes relacionados con

defensa tanto en plantas directamente expuestas a *Tetranychus urticae* (Koch) (Arimura *et al.*, 2002) como en plantas vecinas que reciben los volátiles emitidos por plantas dañadas (Arimura *et al.*, 2000). En *A. thaliana*, la sobreexpresión de IQD1 (una proteína nuclear que se une a calmodulina de forma Ca^{+2} -dependiente) reduce la herbivoría por *M. persicae* y *Trichoplusia ni* (Hübner), lo que sugiere que esta proteína está involucrada en la percepción de las señales de Ca^{+2} para modular las respuestas de defensa de las plantas (Levy *et al.*, 2005). En interacciones planta-plugón, *D. noxia* en trigo y *M. persicae* en *A. thaliana* inducen la expresión de proteínas de unión a calmodulina (Smith y Boyko, 2007). También se ha demostrado la implicación de las CDPKs en las respuestas de las plantas a herbivoría participando en la generación de ROS, en la reprogramación transcripcional y en las rutas de señalización de fitohormonas (Romeis y Herde, 2014; War *et al.*; 2012). En plantas de soja, diferentes CDPKs mostraron patrones de expresión diferenciales en respuesta a la herbivoría por *S. exigua* o *Aphis glycines* (Matsumura) (Hettenhausen *et al.*, 2016).

3.2.2. Activación de la vía de MAPKs

La cascada de las MAPKs es una vía altamente conservada en todos los eucariotas que regula diversos procesos celulares a estímulos externos y endógenos. Cada cascada de MAPKs está compuesta de un conjunto de tres proteínas quinasas que actúan de manera secuencial: una MAPK, que es fosforilada y, por lo tanto, activada, por su MAPK quinasa cadena arriba (MAPKK), la cual es a su vez regulada por fosforilación por una MAPKK quinasa (MAPKKK) que recibe la señal de los receptores de manera directa o indirecta. Las MAPKs activadas fosforilan sus dianas, muchas de las cuales son factores de transcripción y enzimas, desencadenando respuestas relacionadas con el estrés. En plantas, las cascadas de MAPKs están involucradas en diversos aspectos de la fisiología de la planta, como la división celular, la regulación del crecimiento y desarrollo y la muerte celular programada. También participan en respuestas a diversos estímulos ambientales como frío, calor, estrés oxidativo, luz UV y sequía, así como la infección por patógenos (Liu y He, 2017; Pitzschke *et al.*, 2009; Xu y Zhang, 2015).

Cada vez más estudios bioquímicos y genéticos están revelando que las MAPKs desempeñan un papel fundamental en la resistencia de las plantas al ataque de insectos herbívoros (Hettenhausen *et al.*, 2015). En plantas al menos dos MAPKs, la proteína quinasa inducida por ácido salicílico (SIPK, *Salicylic acid-Induced Protein Kinase*) y la proteína quinasa inducida por daño (WIPK, *Wound-Induced Protein Kinase*), son rápidamente activadas por daño o por elicitores de insectos. Diversos estudios genéticos realizados utilizando plantas transgénicas o mutantes alterados en la señalización de MAPKs, han resaltado su papel crítico en la regulación de fitohormonas inducidas por herbivoría, como el ácido jasmónico, el etileno y el ácido salicílico. Las MAPKs son también necesarias para la activación transcripcional de genes relacionados con la defensa a herbívoros y la acumulación de metabolitos defensivos. Además, existen indicios de que la activación sistémica de MAPKs es una parte importante de los eventos de señalización que conducen a la activación de defensas en los tejidos no dañados (Hettenhausen *et al.*, 2015).

La función de las MAPKs en la defensa de plantas contra insectos masticadores ha sido estudiada en diversas interacciones planta-fitófago. Ejemplos concretos incluyen la participación de MAPKs en las defensas contra *Manduca sexta* (Johannsen) de *Solanum lycopersicum* L. (Kandoth *et al.*, 2007) y *Nicotiana attenuata* (S.Watson) Torrey (Wu *et al.*, 2007). Además, las funciones de las MAPKs parecen ser específicas en interacciones planta-fitófago concretas (Hettenhausen *et al.*, 2013). En cambio, la implicación de la señalización por MAPKs en las interacciones entre las plantas y los insectos picadores-chupadores es relativamente desconocida. Li *et al.* (2006) demostraron que las MAPKs (MPK1, MPK2 y MPK3) de *S. lycopersicum* confieren resistencia a pulgones, aunque se desconoce el mecanismo subyacente. Por otro lado, en el arroz silvestre, *Oryza minuta* C.B.Presl, la expresión de una MAPKK putativa es inducida por la alimentación de *Nilaparvata lugens* (Stål), así como por el tratamiento con JA y SA (You *et al.*, 2007).

3.2.3. Producción de ROS

Las llamadas especies reactivas del oxígeno (ROS) se forman con la reducción parcial del oxígeno (O₂) e incluyen el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el radical

hidroxilo (HO^\bullet), el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). En las células vegetales las ROS se generan en diferentes compartimentos celulares, principalmente en los cloroplastos y peroxisomas, pero también en la mitocondria, membrana plasmática, pared celular, retículo endoplasmático y núcleo. Las ROS se generan inevitablemente como los subproductos de la respiración celular, la fotosíntesis, el plegamiento de proteínas y diversas reacciones del metabolismo; desempeñando además un papel importante en la regulación del crecimiento y desarrollo y en la señalización de vías que regulan respuesta a estrés de tipo biótico o abiótico. Sin embargo, la producción y acumulación de ROS debe estar estrictamente controlada debido a su elevada reactividad y toxicidad a altas concentraciones. Elevados niveles de estas sustancias pueden generar efectos perjudiciales de manera directa o indirecta, conocidos como estrés oxidativo, incluyendo la peroxidación de lípidos en las membranas celulares, la desnaturalización de proteínas, la oxidación de carbohidratos, degradación de pigmentos, cambios en la expresión génica e incluso la muerte celular (Czarnocka y Karpiński, 2018; Liu y He, 2017; War et al.; 2012). En ausencia de estrés y en condiciones fisiológicas, el nivel de ROS se mantiene bajo gracias a la actividad de sistemas antioxidantes que incluyen metabolitos secundarios, como el glutatión y el ascorbato, y múltiples enzimas antioxidantes, como catalasa, superóxido dismutasa, peroxidasa, ascorbato peroxidasa, glutatión peroxidasa y dehidroascorbato reductasa. Sin embargo, diversos factores bióticos y abióticos, inducen cambios en el equilibrio de ROS y desencadenan cascadas de señales que finalmente conducen a un aumento de la producción de ROS y/o a una disminución de la actividad antioxidante. Tal acumulación de ROS se conoce con el nombre de “explosión oxidativa” (Liu y He, 2017; Maffei et al., 2007b).

Las secreciones salivales de los pulgones pueden alterar el equilibrio oxidativo de las plantas (Walling, 2000) y ha sido propuesto que el daño ocasionado por la alimentación del pulgón induce la producción de ROS tanto a nivel local como de manera sistémica en el floema (Moran et al., 2002; Divol et al., 2005; Zhu-Salzman et al., 2004). Así pues, se ha observado la acumulación de H_2O_2 en plantas de cebada infestadas con *Schizaphis graminum* (Rondani) (Argandoña et al., 2001), en plantas

de trigo infestadas con *D. noxia* (Moloi y van der Westhuizen, 2006) y en plantas patata infestadas con *M. persicae* (Kerchev *et al.*, 2012a). También *A. pisum* induce la acumulación de H_2O_2 y $O_2^{\bullet -}$ en plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) (Mai *et al.*, 2013).

Existe una compleja relación entre el influjo de Ca^{+2} y la producción de ROS. El influjo de Ca^{+2} parece ser tanto anterior como posterior a la producción de ROS, y las relaciones son probablemente específicas del tipo de célula y de la vía de señalización (Wu y Baldwin, 2010). De igual manera, existe también una relación entre las cascadas MAPKs y la señalización por ROS, en la que no solo las ROS pueden inducir la activación de MAPKs, sino también la alteración de las cascadas MAPKs puede modular la producción y las respuestas de ROS (Liu y He, 2017).

3.3. Rutas de señalización de fitohormonas

Un elemento posterior de la ruta de transducción de señales que se desencadena tras el daño por fitófagos es la activación de fitohormonas. Las fitohormonas son pequeñas moléculas orgánicas que son requeridas por las plantas en bajas concentraciones y que regulan el crecimiento, el desarrollo, la reproducción y las respuestas inmunitarias. Las variaciones en las señales ambientales se traducen en cambios en el contenido y composición de fitohormonas que inducen respuestas locales y sistémicas en la planta, que conducen a la regulación de la expresión génica y la producción de proteínas de defensa y metabolitos secundarios con propiedades antixenóticas o antibióticas. El **ácido salicílico** (SA), el ácido jasmónico (JA) con sus derivados, llamados colectivamente **jasmonatos** (JA), y el **etileno** (ET) se reconocen tradicionalmente como las principales hormonas de defensa. SA está generalmente involucrado en la activación de las respuestas de defensa contra patógenos biotróficos y hemi-biotróficos, mientras que la señalización por JA está involucrada principalmente en la defensa contra insectos herbívoros y, junto con la ET, contra patógenos necrotróficos (Berens *et al.*, 2017; Huot *et al.*, 2014; Morkunas *et al.*, 2011; Pieterse *et al.*, 2012; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

Sin embargo, las respuestas de las plantas a los insectos herbívoros son complejas y están fuertemente correlacionadas con el modo de alimentación del

insecto y el grado del daño causado (Walling, 2000). Debido a que los pulgones penetran el tejido vegetal con sus estiletes siguiendo una ruta apoplástica (ver apartado 2.3), el daño tisular que producen es limitado. Esto junto con las prolongadas interacciones del estilete con las células vegetales explica que las respuestas de las plantas a los pulgones sean distintas a las inducidas por los insectos masticadores, provocando respuestas en cierto modo más similares a las inducidas por patógenos. De hecho, los primeros estudios sugirieron que los pulgones inducían principalmente la vía de señalización por SA, la cual controla en gran medida las defensas de las plantas contra patógenos (Fidantsef *et al.*, 1999; Moran y Thompson, 2001; Walling, 2000). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado la participación de ambas rutas de señalización, SA y JA, en las respuestas de defensa contra pulgones, lo que sugiere que la relevancia de cada una puede variar de acuerdo con interacciones específicas planta-pulgón. (Coppola *et al.*, 2013; Kuśnierczyk *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2010; Studham y Macintosh, 2013; Zhu-Salzman *et al.*, 2004). No obstante, también ha sido sugerido que los pulgones son capaces de manipular las rutas de señalización de la planta y evitar las defensas efectivas derivadas de la activación de la ruta del JA a través de la inducción de otras rutas de señalización (ver apartado 4).

Las rutas de SA y JA actúan principalmente de manera antagónica entre sí, aunque su interacción depende tanto de la concentración de ambos como del genotipo de la planta, y juntas constituyen el eje principal de la regulación hormonal de la inmunidad de las plantas. Sin embargo, en la última década, diversos estudios han demostrado que las auxinas, el ácido abscísico (ABA), las giberelinas, las citoquininas y los brasinoesteroides, que generalmente se asocian con el estrés abiótico o los procesos de desarrollo, también son fundamentales componentes de la respuesta inmune de las plantas (Fig 10). Todas estas fitohormonas tienden a actuar de manera interdependiente a través de interacciones antagónicas (competitivas) o sinérgicas (cooperativas). Además, cambios leves en las concentraciones de fitohormonas, en combinación con las diferentes sensibilidades tisulares, pueden causar una gran variedad de efectos simultáneos, ya que cada fitohormona puede tener diversos efectos (Berens *et al.*, 2017; Huot *et al.*, 2014;

Morkunas *et al.*, 2011; Pieterse *et al.*, 2012; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011; Verma *et al.*; 2016). Además, recientes investigaciones han resaltado el papel de las rutas de señalización de fitohormonas en el control del balance o compensación entre crecimiento y la defensa que es necesario para optimizar la aptitud de la planta en respuesta a diferentes formas de estrés abiótico y biótico. La ruta del JA desempeña un papel clave en la mediación de dicho balance mediante la interacción con otras rutas hormonales (Guo *et al.*, 2018; Havko *et al.*, 2016; Howe *et al.*, 2018; Züst y Agrawal, 2017).

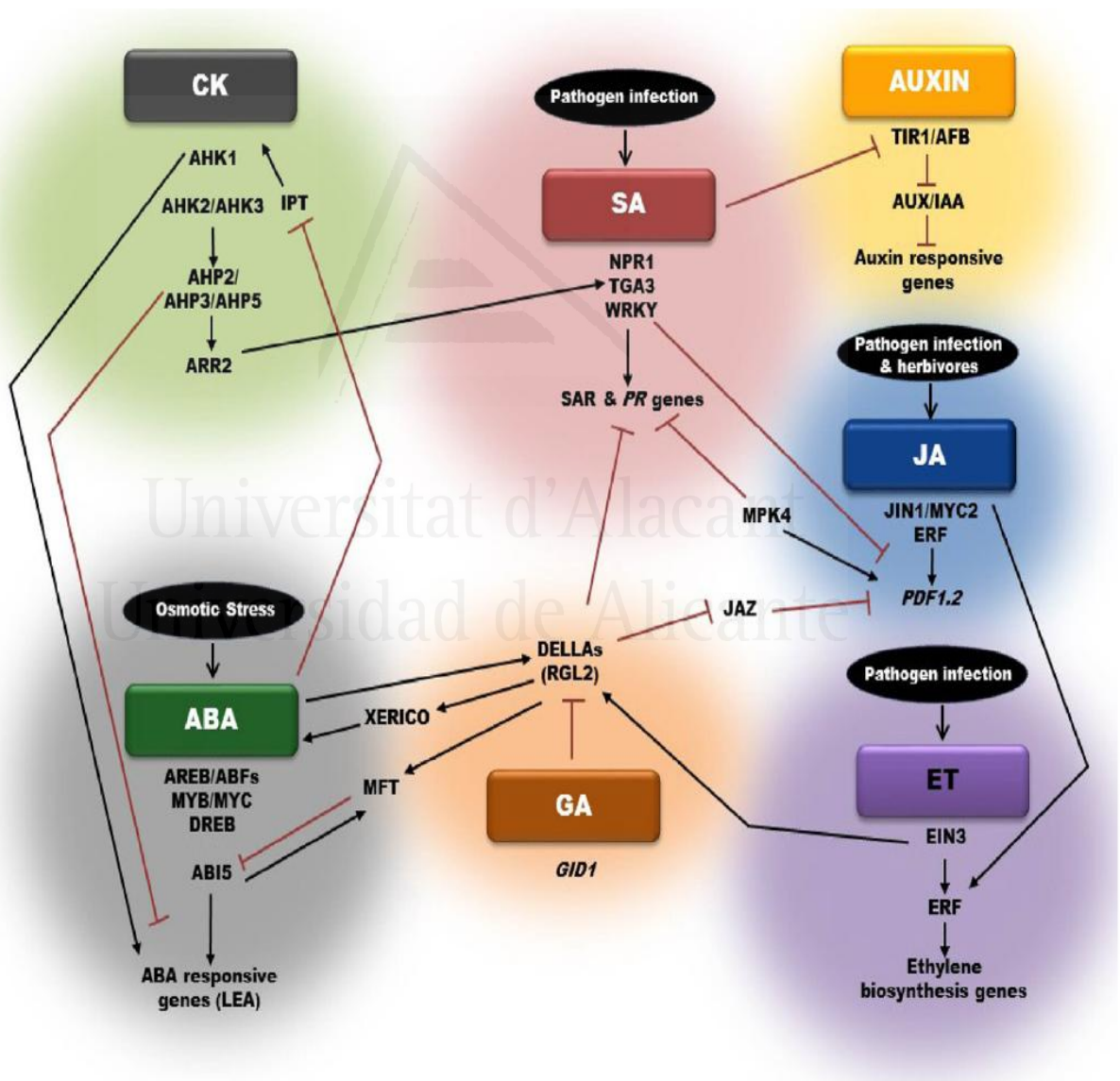


Fig 10. Visión general de las redes de señalización de fitohormonas y sus interacciones en las respuestas a estrés. Imagen extraída de Verma *et al.*, 2016.

3.4. Biosíntesis de metabolitos de defensa

Los metabolitos secundarios de las plantas juegan un importante papel en sus respuestas defensivas y es probable que todas las plantas exhiban una acumulación de tales metabolitos en respuesta a la herbivoría. Estudios con numerosas especies de plantas han revelado una gran variedad de compuestos que actúan como repelentes, inhibidores de la alimentación y/o toxinas en insectos. En general, el modo de acción de estos compuestos incluye la disrupción de membranas, la inhibición del transporte de nutrientes e iones, la inhibición de procesos de transducción de señales, la inhibición del metabolismo o la interrupción del control hormonal de los procesos fisiológicos de los insectos (Gatehouse, 2002; Howe y Jander, 2008; Mello y Silva-Filho, 2002; Mithöfer y Boland, 2012).

Entre los metabolitos de defensa se incluyen numerosos metabolitos secundarios de naturaleza química diversa. Los **terpenoides** son la clase más diversa metabólicamente de metabolitos secundarios con funciones defensivas, con más de 40.000 estructuras conocidas. Otras clases de metabolitos secundarios con propiedades defensivas conocidas son: glucosinolatos, glucósidos cianogénicos, alcaloides, fenoles, quinonas, poliaminas, furanocumarinas, cardenólidos, taninos y ligninas, saponinas y macromoléculas como el látex. Algunos de estos compuestos, como los terpenoides y los fenoles, son ubicuos en plantas, mientras que otros son típicos de ciertas familias taxonómicas, como los alcaloides en solanáceas, los glucosinolatos en brassicáceas y los glucósidos cianogénicos en leguminosas y en rosáceas. Además, para minimizar el riesgo de autointoxicación muchos compuestos de defensa, como los alcaloides y fenoles, son generalmente almacenados en compartimentos de limitada actividad metabólica, como la vacuola o el apoplasto. Finalmente, compuestos inorgánicos también pueden tener una función en defensa, por ejemplo, los cristales de oxalato de calcio, el selenio o el sílice (Howe y Jander, 2008; Mello y Silva-Filho, 2002; Mithöfer y Boland, 2012; War *et al.*; 2012; Wu y Baldwin, 2010).

Otro gran grupo de compuestos lo constituyen las proteínas con funciones defensivas, entre las cuales encontramos proteínas con propiedades

antinutricionales, como las arginasas, ascorbato oxidasas, lipoxigenasas, polifenol oxidasas y peroxidas, y otras que pueden ser tóxicas, como quitinasas, cisteína proteasas, lectinas y leucina aminopeptidasas. Por ejemplo, las enzimas oxidativas lipoxigenasas y polifenol oxidasas modifican covalentemente la proteína de la dieta del insecto mediante la producción de peróxidos lipídicos y o-quinonas reactivas, respectivamente. Por otro lado, las enzimas de la familia cisteína proteasa alteran la membrana peritrófica rica en quitina que protege el epitelio intestinal del insecto. Las lectinas y las quitinasas también dañan el intestino del insecto actuando sobre los componentes que contienen carbohidratos (Howe y Jander, 2008; Kehr, 2006; Mello y Silva-Filho, 2002; Mithöfer y Boland, 2012; War *et al.*; 2012; Zhu-Salzman *et al.*, 2008).

Así pues, muchas de estas proteínas son capaces de resistir las condiciones alcalinas y están activas en el intestino del insecto. Sin embargo, su actividad insecticida resulta fácilmente disminuida por la proteólisis, por lo que estas proteínas son liberadas simultáneamente junto con inhibidores de proteasas (PIs, *Protease Inhibitors*). De esta manera, se forma un complejo estable en el que la proteólisis es limitada y extremadamente lenta, evitando la degradación de las proteínas antinutricionales o tóxicas y permitiéndoles ejercer su función. Además, los PIs de la planta también inhiben las proteasas intestinales del insecto y generan deficiencias de aminoácidos que afectan negativamente al crecimiento y desarrollo del herbívoro, causándole eventualmente la muerte. Los niveles de PIs en plantas son normalmente bajos pero su biosíntesis es inducida a niveles elevados, tanto de manera local como sistémica, tras el ataque de insectos, el daño mecánico o la exposición a fitohormonas exógenas (Howe y Jander, 2008; Kehr, 2006; Mello y Silva-Filho, 2002; Mithöfer y Boland, 2012; War *et al.*, 2012; Zhu-Salzman *et al.*; 2008).

Finalmente, los HIPVs, que pueden actuar tanto como defensa directa como indirecta, median las interacciones entre plantas y fitófagos, microorganismos, plantas vecinas intactas e incluso entre partes de la misma planta advirtiéndole sobre el daño ocasionado. La composición específica de la mezcla depende del herbívoro atacante y también del tipo de concreto de daño generado en la planta (como herida, alimentación u oviposición) y puede variar según el estado de desarrollo y

las condiciones ambientales. Dentro de los HIPVs se incluyen terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos y homoterpenos), volátiles de hojas verdes (GLVs, *Green Leaf Volatiles*), etileno, metilsalicilato y otros VOCs. Dentro de los HIPVs los GLVs son el grupo mejor caracterizado. Se producen por la ruta de la hidroperóxido liasa y se liberan inmediatamente tras el daño, incluyendo compuestos de 6 carbonos isómeros de hexeno, hexenal y hexenylacetato (Arimura *et al.*, 2005; Dudareva *et al.*, 2011; Hare, 2011; War *et al.*; 2012).

3.5. Reconfiguración del metabolismo primario

Además de la biosíntesis de compuestos defensivos, se ha observado una activación y reconfiguración de las rutas del metabolismo primario en plantas tras el ataque insectos, tal y como también ocurre frente a la infección por patógenos. El metabolismo primario participa en los procesos de crecimiento, almacenamiento de recursos y reproducción de la planta, pudiendo además cumplir diferentes funciones en la resistencia a insectos fitófagos (Fig 11A) (Bolton, 2009; Schwachtje y Baldwin 2008; Zhou *et al.*, 2015). En primer lugar, los cambios observados en el metabolismo primario pueden deberse a la reasignación de recursos que ocurre tras la herbivoría, ya que con frecuencia se produce una reducción en el crecimiento, reproducción o almacenamiento y/o un incremento en la asimilación, para satisfacer las demandas metabólicas de las defensas. Se ha propuesto que la reconfiguración del metabolismo primario es necesaria para proveer los esqueletos de carbono y energía requeridos para la síntesis de metabolitos secundarios. Por otro lado, en lugar de sostener las respuestas de defensa, la reconfiguración del metabolismo primario podría apoyar los ajustes fisiológicos que las plantas deben realizar para tolerar la herbivoría y minimizar los impactos negativos en su aptitud (Fig 11B). Además, los metabolitos primarios pueden funcionar como moléculas señalizadoras en las vías de defensa y, también, algunos cambios inducidos en el metabolismo primario pueden ser en sí mismos un modo de defensa directa contra el herbívoro. Finalmente, la movilización de metabolitos primarios entre tejidos infestados y sistémicos de la planta que puede cumplir diferentes funciones defensivas. Por un lado, su transporte hacia el tejido atacado puede proporcionar sustratos para el

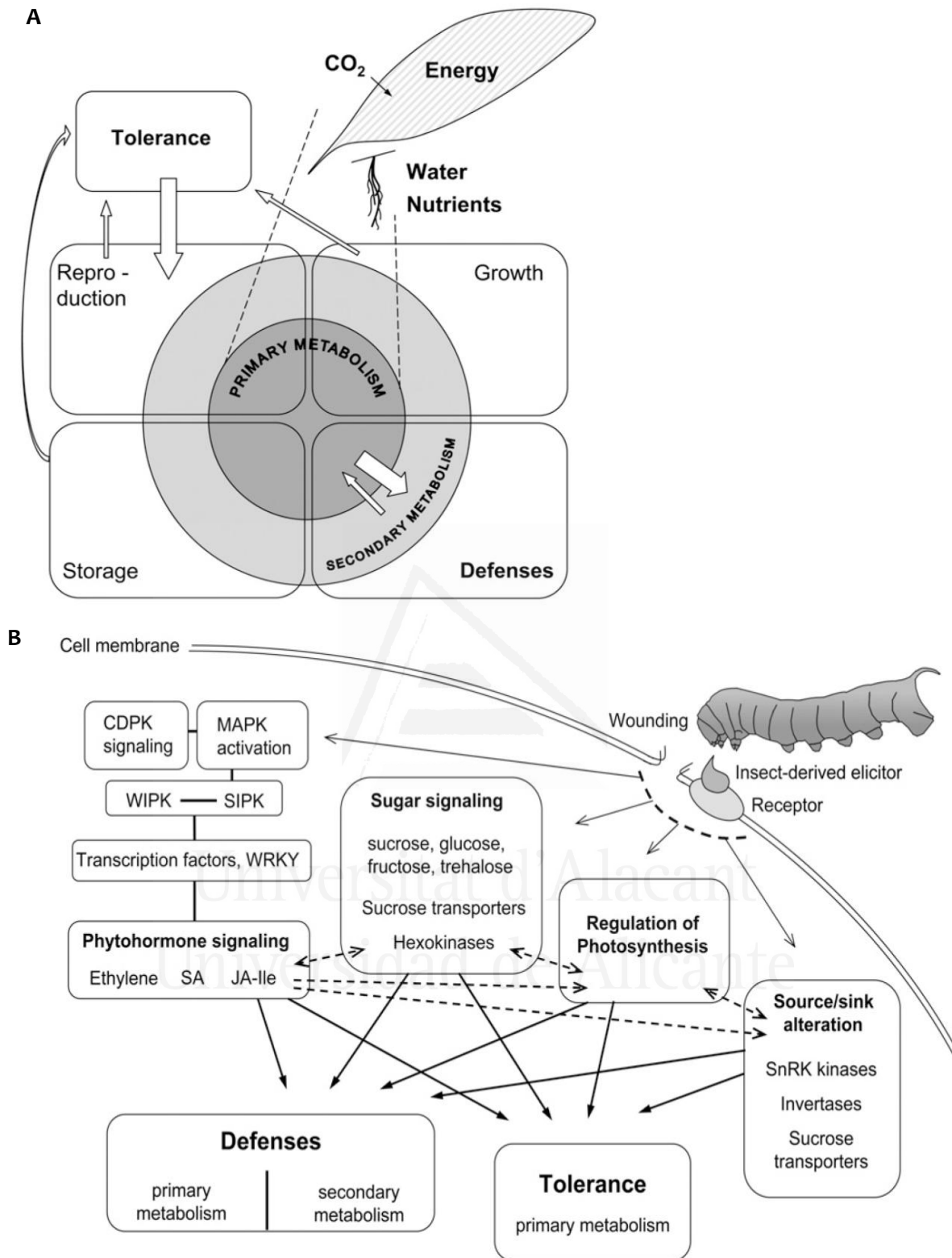


Fig 11. Dependencia entre los rasgos de resistencia (defensas y tolerancia) a la herbivoría y el metabolismo primario. La herbivoría induce una gran reorganización del metabolismo primario, incluida la fotosíntesis y las relaciones entre los tejidos fuente y sumidero (A); Estos cambios están coordinados por una red de señalización que solo se entiende parcialmente y en la que también participan metabolitos primarios (B). Imagen extraída de Schwachtje y Baldwin, 2008.

refuerzo de las defensas locales. Por otro lado, su transporte fuera de los lugares de alimentación del insecto puede directamente privarle de nutrientes, promover la tolerancia a herbivoría de la planta al salvaguardar estos metabolitos para su crecimiento posterior, o servir como defensa indirecta al ser exudados por las raíces y reclutar microorganismos beneficiosos del suelo (Kerchev *et al.*, 2012b; Schwachtje y Baldwin, 2008; Zhou *et al.*, 2015).

4. Manipulación de las defensas de la planta por parte del pulgón

La supervivencia de los pulgones depende de su capacidad de acceder al floema y succionar la savia mientras mantienen vivas las células del floema. Esto supone que deben superar una serie de respuestas de las plantas, que incluyen la oclusión de los tubos cribosos, la activación de las vías de señalización de fitohormonas y la expresión de moléculas con actividad insecticida. Es por ello, que los pulgones han desarrollado diferentes estrategias adaptativas para evitar o manipular las respuestas de defensa de las plantas (Giordanengo *et al.*, 2010; Jaouannet *et al.*, 2014; Nalam *et al.*, 2018; Walling, 2008).

La primera estrategia utilizada por los pulgones para evadir las respuestas de defensa de la planta consiste en **minimizar el daño tisular** mediante la penetración del tejido vegetal siguiendo la ruta apopástica (ver apartado 2.3). Además, los pulgones secretan desde el inicio de la penetración y de manera continua dos tipos de saliva que tienen diferente composición y cumplen diversas funciones (ver apartado 2.3). La saliva de los pulgones, además de componentes que actúan como elicitores o HAMPs induciendo las defensas de la planta (Ver apartado 3.1), también contiene otras moléculas llamadas **efectores** (Fig 12) que interactúan con la defensa basal de las plantas o PTI (Ver apartado 3.1) suprimiéndola. Recientemente, Yates y Michel (2018) han revisados los efectores conocidos en hemípteros (Yates y Michel, 2018). En el caso de pulgones, la proteína salivar mejor caracterizada es Coo2 la cual es específica de la familia *Aphididae* (Mutti *et al.*, 2008). Su silenciamiento génico transcripcional reduce la aptitud física de los pulgones (Mutti *et al.*, 2006; Pitino *et al.*, 2011), mientras que su sobreexpresión aumenta la reproducción de estos (Bos *et*

al. 2010), siendo este último efecto especie-específico. Así pues, la expresión de la proteína Coo2 de *M. persicae* (MpCoo2) en plantas transgénicas de *A. thaliana* promueve la colonización del pulgón, sin embargo, la expresión de su homóloga en *A. pisum* (ApCoo2) no aumenta la fecundidad (Pitino y Hogenhout, 2013). Como en el caso de ApCoo2, los homólogos de *A. pisum* de PlntO1 y PlntO2 no aumentan la producción de progenie de *M. persicae*, consolidando la idea de que las proteínas efectoras de pulgones actúan de manera especie-específica (Elzinga y Jander, 2013; Hogenhout y Bos, 2011).

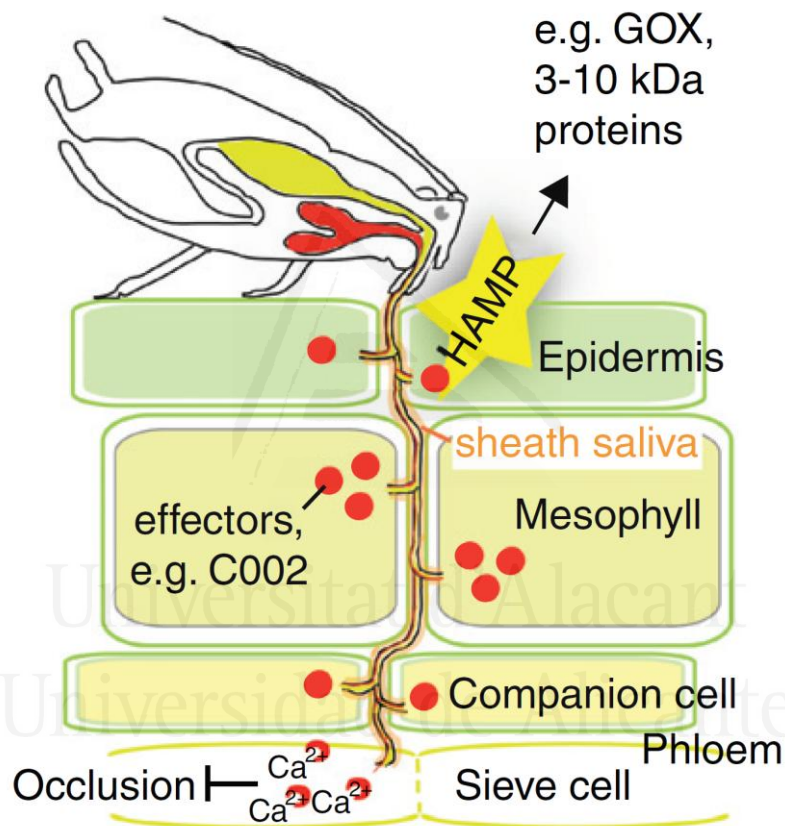


Fig 12. Secreción de efectores en la saliva del pulgón a lo largo del trayecto del estilete hacia los tubos cribosos del floema. Imagen extraída de Hogenhout y Bos, 2011.

Sin embargo, en la lucha coevolutiva entre los pulgones y las plantas, algunas plantas han adquirido una segunda línea de defensa basada en **proteínas de resistencia (R)** capaces de reconocer efectores específicos del pulgón e inducir la inmunidad activada por efectores (ETI, *Effector-Triggered Immunity*). Curiosamente, los genes R que codifican proteínas de resistencia a pulgones son similares a los genes de resistencia a patógenos, presentando dos dominios característicos: sitios

de unión a nucleótidos (NBS, *Nucleotide-Binding Site*) y repeticiones ricas en leucina (LRR, *Leucine-Rich Repeat*). Hasta el momento han sido clonados dos genes R que codifican proteínas de la familia NBS–LRR que confieren resistencia a pulgones. El gen del tomate Mi-1.2 (resistencia a *Meloidogyne incognita* (Kofold & White) Chitwood) ha mostrado conferir resistencia a ciertos clones del pulgón de la patata *Macrosiphum euphorbiae* (pero no a *M. persicae*), dos biotipos de mosca blanca, y un psílido pero, además, a tres especies de nematodos patógenos. Por otro lado, el gen del melón Vat confiere resistencia a un biotipo del pulgón del algodón *Aphis gossypii* (Glover) así como a la transmisión de virus por este. Por tanto, la resistencia mediada por genes R se limita a menudo a un clon de una especie lo que sugiere que los pulgones pueden evadir y/o suprimir las defensas de las plantas, tal y como sucede en el modelo “gen por gen” de las interacciones planta-patógeno (Bonaventure, 2012; Hogenhout y Bos, 2011; Howe y Jander, 2008; Wu y Baldwin, 2010; Yates y Michel, 2018).

A pesar de que los pulgones tratan de minimizar el daño mecánico ocasionado en la planta, las pruebas que realizan hasta alcanzar el floema resultan a menudo en la alteración de la pared celular y membranas plasmáticas y la penetración de células epidérmicas, del mesófilo y del parénquima. En respuesta al daño, las plantas inmediatamente ocluyen los tubos cribosos para evitar la pérdida de savia, mediante la deposición de calosa y proteínas específicas del floema. Ambos mecanismos de oclusión son activados por el influjo de Ca^{+2} desde los compartimentos de almacenamiento de los elementos cribosos (como el retículo endoplasmático y la pared celular) o por cambios en el estado redox de la savia de los tubos cribosos. Sin embargo, la penetración del estilete no afecta al flujo de savia, sugiriendo que la saliva acuosa secretada antes y durante la alimentación del pulgón evita la oclusión del tubo criboso para que el flujo de savia se produzca de manera continua. Así pues, se han detectado en la saliva de pulgones proteínas de unión a Ca^{+2} (Fig 12) y peroxidasas que pueden prevenir la oclusión de los tubos cribosos mediante la agregación de proteínas en respuesta a Ca^{+2} y cambios en las condiciones redox, respectivamente. Además, el sellado de las lesiones mediante saliva gelificante también ayuda a prevenir el influjo de Ca^{+2} apoplástico y la

coagulación de proteínas (Fig 12) (Giordanengo *et al.*, 2010; Nalam *et al.*, 2018; van Bel y Will, 2016; Walling, 2008; Will *et al.*, 2009; 2013).

En la saliva acuosa de los pulgones también se han descrito enzimas pectinasas, pectinmetilesterasas, poligalacturonasas y celulasas, las cuales pueden facilitar el progreso del estilete en el tejido vegetal mediante la degradación de las paredes celulares. Además, los pulgones producen en la planta una reprogramación transcripcional de diversos genes implicados en el metabolismo y remodelación de la pared celular, como proteínas quinasas asociadas a pared celular, pectinesterasas, pectinas acetilesterasas, expansinas y celulosa sintasas. La alteración del patrón de expresión de estas enzimas podría favorecer la alimentación de la progenie al facilitar la penetración del estilete a través de las paredes celulares, en cooperación con las enzimas salivares.

Por otro lado, estudios transcripcionales han mostrado que los pulgones inducen la sobreexpresión de distintos genes que codifican proteínas implicadas en la detoxificación de ROS (como ascorbato reductasas, L-ascorbato oxidasas, glutatión S-transferasas, transportadores de glutatión S-conjugados y precursores de peroxidasas) mientras que los genes que codifican para proteínas implicadas en la generación de ROS (como cobre amino oxidasa, NADPH oxidasa, superóxido dismutasa y ARN poligalacturonasa) son moderadamente inducidos o bajoexpresados. Además, el hecho de que rara vez se observan respuestas hipersensibles en plantas infestadas por pulgones, sugiere un papel de las secreciones salivales en la prevención de la producción de ROS, probablemente a través de enzimas como NADH-deshidrogenasas (Giordanengo *et al.*, 2010, Harmel *et al.*, 2008; Smith y Boyko, 2007). También se ha observado que los pulgones inducen la sobreexpresión de genes que codifican para proteínas de unión a calcio (como proteínas de unión a calmodulina, canales iónicos regulados por calmodulina, proteínas quinasas dependientes de calcio, calreticulina de unión a calcio) y ATPasas transportadoras de calcio (Giordanengo *et al.*, 2010; Kuśnierczyk *et al.*, 2008). Por tanto, los pulgones modulan las señales relacionadas con el estrés oxidativo y calcio, enfatizando la importancia de una supresión temprana de las respuestas de la planta para favorecer su uso como hospedador (Giordanengo *et al.*, 2010).

En cuanto a las rutas de señalización, se ha sugerido que los pulgones son capaces de manipular las respuestas de defensa de las plantas, aprovechando la comunicación cruzada entre hormonas, mediante la amplificación de la ruta de señalización de SA para reprimir así la ruta del JA, potencialmente más efectiva contra estos insectos (Giordanengo *et al.* 2010; Morkunas *et al.*, 2011; Thompson y Goggin, 2006; Walling, 2008). Más recientemente, se ha sugerido también que la inducción de la ruta del ABA también forma parte de la estrategia de manipulación de las defensas de la planta por parte del pulgón (Hillwig *et al.*, 2016; Studham and Macintosh, 2013). En la saliva del pulgón se ha detectado la presencia de glucosa oxidasa (GOX, Fig 12) la cual, por un lado, oxida la D-glucosa liberando H_2O_2 que estimula la acumulación de SA y, por otro lado, es un potente inhibidor de la actividad de la lipoxigenasa que participa en la ruta de síntesis del JA. Así pues, la presencia de esta enzima en la saliva puede permitir a los pulgones redirigir la señalización de la planta, conduciendo a la activación de la respuesta dependiente de SA y una débil inducción de la respuesta dependiente de JA (Giordanengo *et al.* 2010; Walling, 2008; Zhu-Salzman *et al.*, 2004). Recientemente, se ha demostrado que los pulgones reprimen las respuestas inmunitarias de las plantas a través de la secreción de una citocina en la saliva durante la alimentación (Naessens *et al.*, 2015). Además de la saliva, la melaza de los pulgones también contiene factores que suprimen las defensas de la planta. Schwartzberg y Tumlinson (2014) demostraron que la melaza induce la acumulación de SA y suprime la de JA. Algunas evidencias resaltan, además, el papel de los endosimbiontes del pulgón como mediadores en la interacción planta-pulgón, dado que tanto la saliva (Chaudhary *et al.*, 2014) como la melaza (Sabri *et al.*, 2013) del pulgón contienen proteínas bacterianas.

Las polifenoloxidasas y peroxidasas constituyen otra clase de las enzimas identificadas en las secreciones salivales de varias especies de pulgón. Puesto que la toxicidad de los compuestos fenólicos depende de su estado redox, la mayoría de los fenoles y sus derivados liberados por los tejidos dañados de la planta pueden ser absorbidos por la vaina salival del pulgón, donde son convertidos en sustancias menos tóxicas por estas enzimas. Además, estudios transcriptómicos sugieren que los insectos floépagos modulan la expresión de enzimas requeridas para la síntesis

de metabolitos secundarios implicados en las defensas de las plantas, como los fenilpropanoides y los glucosinolatos (Giordanengo *et al.* 2010; Thompson y Goggin, 2006).

También se ha detectado en la saliva de los pulgones la presencia de enzimas detoxificadoras como polifenoloxidasas y peroxidasas que les permitirían neutralizar y tolerar compuestos de defensa de la planta como los fenoles. Además, estudios transcriptómicos sugieren que pulgones modulan la expresión de enzimas requeridas para la síntesis de metabolitos secundarios implicados en las defensas de las plantas, como los fenilpropanoides y los glucosinolatos (Giordanengo *et al.* 2010; Thompson y Goggin, 2006; van Bel y Will, 2016). En cuanto a las defensas volátiles, en contraposición a los insectos masticadores, la cantidad de compuestos volátiles emitidos por las plantas en respuesta a pulgones es muy baja e incluso a veces indetectable (Du *et al.*, 1998; Turlings *et al.*, 1998). Esto podría deberse al mínimo daño mecánico que estos infligen, pero también podría ser que los efectores salivares introducidos en la planta pudieran inhibir la síntesis de compuestos volátiles (Walling, 2008). Así, se ha observado que *A. pisum* no solo es capaz de alimentarse en *V. faba* sin inducir en la planta emisiones detectables de HIPVs, sino que además inhibe activamente la emisión de los HIPVs inducidos por el insecto masticador *S. exigua* cuando se infestan las plantas simultáneamente con ambos fitófagos (Schwartzberg *et al.*, 2011). Además, también se ha observado que el pulgón de la mostaza *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach) y *M. persicae* inhiben la emisión de compuestos volátiles de las flores de la mostaza blanca (*Sinapis alba* L.), siendo este efecto de mayor intensidad en el caso del pulgón especialista *L. erysimi* (Pareja *et al.*, 2012). Eludir la emisión de compuestos volátiles puede ser beneficioso para el pulgón ya que puede resultar en menores defensas directas e indirectas por parte de la planta (Walling, 2008).

Los pulgones también modifican el metabolismo primario de la planta, alterando notablemente el metabolismo del nitrógeno, lo cual podría ser una estrategia para adaptar la composición del floema a sus propios requisitos nutricionales. Así pues, se ha observado en diversas interacciones planta-pulgón que la infestación con pulgón produce un incremento del contenido en aminoácidos

esenciales en la planta. Además, los pulgones manipulan la distribución de recursos en la planta aumentando la importación de recursos desde otros sitios de la planta a su lugar de alimentación e incrementando por tanto su calidad nutricional. Diversos estudios transcripcionales han mostrado una inducción de genes involucrados en la asimilación y movilización de nitrato y azúcares en plantas en respuesta a la infestación con pulgón. Asimismo, estudios enzimáticos e inmunohistoquímicos han mostrado un incremento en la actividad de enzimas requeridas para la síntesis de aminoácidos, como la glutamina sintasa y glutamato dehidrogenasa (Giordanengo et al., 2010; Goggin, 2007; Sandström et al., 2000; Thompson y Goggin, 2006). En la saliva acuosa de los pulgones también se han detectado diversas proteasas, las cuales pueden estar implicadas en la descomposición de proteínas de los tubos cribosos para suprimir las defensas de la planta y/o para incrementar la disponibilidad de compuestos orgánicos nitrogenados (Giordanengo et al., 2010; Goggin, 2007; Thompson y Goggin, 2006; van Bell y Will, 2016).

Así pues, debido a que los pulgones pueden manipular las defensas de la planta en su propio beneficio, resulta ciertamente difícil distinguir en las interacciones planta-pulgón los efectos ascendentes (respuestas de los pulgones a las características de la planta) de los efectos descendentes (respuestas de la planta al ataque del pulgón) así como determinar cuáles de los cambios observados poseen un valor adaptativo para las plantas (Guerrieri y Digilio, 2008; Thompson y Goggin, 2006).

5. El cultivo de pimiento (*Capsicum annuum* L.)

5.1. Clasificación taxonómica y descripción botánica

El género *Capsicum*, originario de Sudamérica, pertenece a la familia *Solanaceae* la cual tiene alrededor de 90 géneros y 2000 especies. *C. annuum* L. (conocida comúnmente como cayena, chili o pimiento dulce) es la especie cultivada dominante a nivel mundial. Otras especies cultivadas de *Capsicum* son *C. baccatum* L. (ají, ají amarillo, locoto), *C. chinense* Jacq. (ají dulce, habanero) y *C. pubescens* Ruiz and Pavón (rocoto, manzano) (Barceloux, 2008; Sarath Babu et al., 2011).

C. annuum es una planta herbácea anual con tallos densamente ramificados que alcanzan hasta 1,5 m de largo. Sus flores son simples, blancas y de pequeño tamaño. Sus frutos varían desde dulces, grandes y gruesos hasta variedades delgadas y picantes. El color del fruto es variable (verde, amarillo, naranja o rojo), correspondiéndose con las diferentes etapas de maduración así como con la capacidad de sintetizar carotenoides y clorofilas. En cuanto al sabor, se encuentran desde variedades dulces (no picantes) hasta variedades picantes como los chiles o la cayena (Baenas *et al.*, 2019; Barceloux, 2008).

5.2. Importancia económica en la agricultura

C. annuum se cultiva en regiones de clima cálido en todo el mundo, como Asia, norte de América, sur y centro de Europa y África tropical y subtropical. La producción mundial de pimiento se incrementó en un 25% en la década de 2006 a 2016 siendo actualmente uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia económica (Baenas *et al.*, 2019). En 2017 (últimos datos reportados por FAOSTAT) la superficie de cultivo dedicada al pimiento en España fue de 20498 ha, alcanzándose una producción de 1,28 millones de toneladas (MT) de pimiento. Estas cifras sitúan a España en el cuarto país productor de pimiento a nivel mundial, por detrás de China (17,8 MT), México (3,29 MT) e Indonesia (2,35 MT) (FAOSTAT, 2017). A nivel estatal, la zona del Levante (Alicante, Murcia y Almería) alberga el 71% de la superficie total de cultivo de pimiento donde se genera el 60.4% de la producción total (Datos estadísticos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2017).

El fruto del pimiento puede consumirse sin procesar, crudo o cocinado, además de en polvo como especia (ají) o colorante (paprika o pimentón). Además de sus características sensoriales, como el picante, el aroma y el color, el pimiento es también una importante fuente de compuestos bioactivos beneficiosos para la salud, incluyendo las vitaminas C y E, la provitamina A, carotenoides y compuestos fenólicos. Así pues, se trata de una planta de gran interés para las industrias agroalimentaria, cosmética y farmacéutica (Baenas *et al.*, 2019).

REFERENCIAS

- Alborn HT, Turlings TCJ, Jones TH, Stenhagen G, Loughrin JH, Tumlinson JH. 1997. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science*, 276: 945-949.
- Argandoña VH, Chaman M, Cardemil L, Muñoz O, Zúñiga E., Corcuera LJ. 2001. Ethylene production and peroxidase activity in aphid-infested barley. *J Chem Ecol*, 27: 53-68.
- Arimura G-I, Ozawa R, Shimoda T, Nishioka T, Boland W, Takabayashi J. 2000. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature*, 406: 512-515.
- Arimura G-I, Ozawa R, Nishioka T, Boland W, Koch T, Kühnemann F, Takabayashi J. 2002. Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants. *Plant J*, 29: 87-98.
- Arimura G-I, Kost C, Boland W, Baldwin IT. 2005. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochim Biophys Acta*, 34: 91- 111.
- Baenas N, Belovic M, Ilic N, Moreno DA, García-Vigera C. 2019. Industrial use of pepper (*Capsicum annuum* L.) derived products: Technological benefits and biological advantages. *Food Chem*, 274: 872-885.
- Barceloux DG. Medical toxicology of natural substances: foods, fungi, medicinal herbs, Toxic plants, and venomous animals. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2008. pp. 71-76.
- Bass C, Puinean AM, Zimmer CT, Denholm I, Field LM, Foster SP, Gutbrod O, Nauen R, Slater R, Williamson MS. 2014. The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochem Mol Biol*, 51: 41-51.
- Berens ML, Berry HM, Mine A, Argueso CT, Tsuda K. 2017. Evolution of hormone signaling networks in plant defense. *Annu Rev Phytopathol*, 55: 401-25.
- Bolton MD. 2009. Primary metabolism and plant defense—Fuel for the fire. *MPMI*, 22: 487-497.
- Bos JIB, Prince D, Pitino M, Maffei ME, Win J, Hogenhout SA. 2010. A functional genomics approach identifies candidate effectors from the aphid species *Myzus persicae* green peach aphid). *PLoS Genet*, 6(11): e1001216. doi:10.1371/journal.pgen.1001216
- Bonaventure G, VanDoorn A, Baldwin IT. 2011. Herbivore-associated elicitors: FAC signaling and metabolism. *Trends Plant Sci*, 16: 294-299.
- Bonaventure G, 2012. Perception of insect feeding by plants. *Plant Biol*, 14: 872-880.
- Bonaventure G. 2014. Plants recognize herbivorous insects by complex signalling networks, en: Voegelé, C., Jander, G. Insect-plant interactions. Willey Blackwell, UK. pp. 1-35.

Introducción General

- Brault V, Uzest M, Monsion B, Jacquot E, Blanc S. 2010. Aphids as transport devices for plant viruses. *C. R. Biologies*, 333: 524–538.
- Carolan JC, Fitzroy CI, Ashton PD, Douglas AE, Wilkinson TL. 2009. The secreted salivary proteome of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* characterised by mass spectrometry. *Proteomics*. 9: 2457–67.
- Chaudhary R, Atamian HS, Shen Z, Brigg SP, Kaloshian I. 2014. GroEL from the endosymbiont *Buchnera aphidicola* betrays the aphid by triggering plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111: 8919–8924.
- Cooper WR, Dillwith JW, Puterka GJ. 2011. Comparisons of salivary proteins from five aphid (Hemiptera: Aphididae) species. *Environ Entomol*, 40: 151–6.
- Coppola V, Coppola M, Rocco M, Digilio MC, D'Ambrosio C, Renzone G, Martinelli R, Scalon A, Pennacchio F, Rao R, Corrado G. 2013. Transcriptomic and proteomic analysis of a compatible tomato-aphid interaction reveals a predominant salicylic acid-dependent plant response. *BMC Genomics*, 14, 515. doi: 10.1186/1471-2164-14-515.
- Czarnocka W, Karpiński S. 2018. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radic Biol Med*, 122: 4-20.
- De Vos M, Jander G. 2009. *Myzus persicae* (green peach aphid) salivary components induce defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, 32: 1548–1560.
- Dinant S, Bonnemain J-L, Girousse C, Kehr J. 2010. Phloem sap intricacy and interplay with aphid feeding. *C. R. Biologies*, 333: 504–515.
- Divol F, Vilaine F, Thibivilliers S, Amselem J, Palauqui J-C, Kusiak C, Dinant S. 2005. Systemic response to aphid infestation by *Myzus persicae* in the phloem of *Apium graveolens*? *Plant Mol Biol*, 57: 517-540.
- Dogimont C, Bendahmane A, Chovelon V, Boissot N. 2010. Host plant resistance to aphids in cultivated crops: Genetic and molecular bases, and interactions with aphid populations. *C. R. Biologies*. 333: 566–573.
- Douglas AE. 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annu Rev Entomol*, 43: 17–37.
- Douglas AE. 2006. Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. *J Exp Bot*, 57: 747–754.
- Du YJ, Poppy GM, Powell W, Pickett JA, Wadhams LJ, Woodcock CM. 1998. Identification of semiochemicals released during aphid feeding that attract parasitoid *Aphidius ervi*. *J Chem Ecol*, 24: 1355–1368.

- Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I. 2011. Plant Volatiles: recent advances and future perspectives. *Crit Rev Plant Sci*, 25: 417-440.
- Edel KH, Marchadier E, Brownlee C, Kudla J, Hetherington AM. 2017. The Evolution of Calcium-Based Signalling in Plants. *Curr Biol*, 27: R667–R679.
- Ehrlich PR, Raven PH. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution*, 18: 586-608.
- Elzinga DA, Jander G. 2013. The role of protein effectors in plant–aphid interactions. *Curr Opin Plant Biol*, 16: 451–456.
- Elzinga DA, De Vos M, Jander G. 2014. Suppression of plant defenses by a *Myzus persicae* (green peach aphid) salivary effector protein. *Mol Plant–Microbe Interact*. 27: 747-756
- Erb M. 2018. Plant defenses against herbivory: closing the fitness gap. *Trends Plant Sci*, 23: 187-194.
- Fidantsef AL, Stout MJ, Thaler JS, Duffey SS, Bostock RM. 1999. Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 54: 97–114.
- Flint ML. 2013. Aphids. *Pest Notes*. Publication 7404.
- Foster SP, Denholm I, Devonshire AL. 2000. The ups and downs of insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*) in the UK. *Crop Prot*, 19: 873-879.
- Gatehouse JA. 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytol*, 156: 145–169.
- Gergerich RC, Dolja VV. 2006. Introduction to plant viruses, the invisible foe. *The Plant Health Instructor*. doi: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01
- Giordanengo P, Brunissen L, Rusterucci C, Vincent C, van Bel A, Dinant S, Girousse C, Faucher M, Bonnemain J-L. 2010. Compatible plant-aphid interactions: How aphids manipulate plant responses. *C. R. Biol*, 333: 516–523.
- Goggin FL. 2007. Plant-aphid interactions: molecular and ecological perspectives. *Curr Opin Plant Biol*, 10: 399–408.
- Guerrieri E, Digilio MC. 2008. Aphid-plant interactions: a review. *J Plant Interact*, 3: 223-232.
- Guo J, Hatt S, He K, Chen J, Francis F, Wang Z. 2017. Nine facultative endosymbionts in aphids. A review. *J Asia Pac Entomol*, 20: 794–801.
- Guo Q, Major IT, Howe GA. 2018. Resolution of growth–defense conflict: mechanistic insights from jasmonate signalling. *Curr Opin Plant Biol*, 44: 72–81.

- Halitschke R, Schittko U, Pohnert G, Boland W, Baldwin IT. 2001. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty acid-amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore-specific plant responses. *Plant Physiol.* 125: 711–17.
- Hare JD. 2011. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous Insects. *Annu Rev Entomol*, 56: 161–80.
- Harmel N, Létocart E, Cherqui A, Giordanengo P, Mazzucchelli G, Guillonneau F, et al. Identification of aphid salivary proteins: a proteomic investigation of *Myzus persicae*. *Insect Mol Biol*, 17:1 65–74.
- Havko NE, Major IT, Jewell JB, Attaran E, Browse J, Howe GA. 2016. Control of carbon assimilation and partitioning by jasmonate: an accounting of growth-defense tradeoffs. *Plants*, 15, doi: 10.3390/plants5010007.
- Hettenhausen C, Baldwin IT, Wu J. 2013. *Nicotiana attenuata* MPK4 suppresses a novel JA signaling-independent defense pathway against the specialist insect *Manduca sexta* but is not required for the resistance to the generalist *Spodoptera littoralis*. *New Phytol*, 199: 787–799.
- Hettenhausen C, Schuman MC, Wu J. 2015. MAPK signaling – a key element in plant defense response to insects. *Insect Sci*, 22: 157–164.
- Hettenhausen C, Sun G, He Y, Zhuang H, Sun T, Oi J, Wu J. 2016. Genome-wide identification of calcium-dependent protein kinases in soybean and analyses of their transcriptional responses to insect herbivory and drought stress. *Sci Rep*, 6, doi: 10.1038/srep18973.
- Hillwig MS, Chiozza M, Casteel CL, Lau ST, Hohenstein J, Hernández E, Jander G, Macintosh GC. 2016. Abscisic acid deficiency increases defence responses against *Myzus persicae* in *Arabidopsis*. *Mol Plant Pathol*, 17: 225–235.
- Hogenhout SA, Bos JIB. 2011. Effector proteins that modulate plant–insect interactions. *Curr Opin Plant Biol*, 14: 422–428.
- Howe GA, Jander G. 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 41–66.
- Huot B, Yao J, Montgomery BL, He SY. 2014. Growth–Defense Tradeoffs in Plants: A Balancing Act to Optimize Fitness. *Mol Plant*. 7: 1267–1287.
- Jaouannet, M.; Rodriguez, P. A.; Thorpe, P.; Lenoir, C. J. G.; MacLeod, R.; Escudero-Martinez, C.; Bos, J. I. B. 2014. Plant immunity in plant–aphid interactions. *Front Plant Sci*, 5, doi: 10.3389/fpls.2014.00663.

- Kaloshian I, Walling LL. 2005. Hemipterans as plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 43: 491–521.
- Kandoth PK, Ranf S, Pancholi SS, Jayanty S, Walla MD, Miller W, Howe GA, Lincoln DE, Stratmann JW. 2007. Tomato MAPKs LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 function in the systemin-mediated defense response against herbivorous insects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 12205–12210.
- Kehr J. 2006. Phloem sap proteins: their identities and potential roles in the interaction between plants and phloem-feeding insects. *J Exp Bot*, 57: 767–774.
- Kerchev PI, Fenton B, Foyer CH, Hancock RD. 2012a. Infestation of potato (*Solanum tuberosum* L.) by the peach-potato aphid (*Myzus persicae* Sulzer) alters cellular redox status and is influenced by ascorbate. *Plant Cell Environ*, 35: 430–440.
- Kerchev PI, Fenton B, Foyer CH, Hancock RD. 2012b. Plant responses to insect herbivory: interactions between photosynthesis, reactive oxygen species and hormonal signalling pathways. *Plant Cell Environ*, 35: 441–453.
- Kessler A, Baldwin IT. 2002. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 299–328.
- Kuśnierczyk A, Winge P, Jørstad TS, Troczyńska J, Rossiter JT, Bones AM. 2008. Towards global understanding of plant defence against aphids – timing and dynamics of early Arabidopsis defence responses to cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) attack. *Plant Cell Environ*, 31: 1097–1115.
- Lecourieux D, Ranjeva R, Pugin A. 2006. Calcium in plant defence-signalling Pathways. *New Phytol*, 171: 249–269.
- Levy M, Wang Q, Kaspi R, Parrella MP, Abel S. 2005. Arabidopsis IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense. *Plant J*, 43: 79–96.
- Li Q, Xie Q-G, Smith-Becker J, Navarre DA, Kaloshian I. 2006. Mi-1-mediated aphid resistance involves salicylic acid and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *MPMI*. 19: 655–664.
- Liu Y, He C. 2017. A review of redox signaling and the control of MAP kinase pathway in plants. *Redox Biol*, 11: 192–204.
- Liu Y, Wang WL, Guo GX, Ji XL. 2009. Volatile emission in wheat and parasitism by *Aphidius avenae* after exogenous application of salivary enzymes of *Sitobion avenae*. *Entomol Exp Appl*, 130: 215–221.

Introducción General

- Louis J, Shah J. 2013. *Arabidopsis thaliana*—*Myzus persicae* interaction: shaping the understanding of plant defense against phloem-feeding aphids. *Front Plant Sci*, 4, doi: 10.3389/fpls.2013.00213.
- Mai VC, Bednarski W, Borowiak-Sobkowiak B, Wilkaniec B, Samardakiewicz S, Morkunas I. 2013. Oxidative stress in pea seedling leaves in response to *Acyrtosiphon pisum* infestation. *Phytochemistry*. 93: 49–62.
- Maffei ME, Mithöfer A, Boland W. 2007a. Before gene expression: early events in plant–insect interaction. *Trends Plant Sci*, 12: 310–316.
- Maffei ME, Mithöfer A, Boland W. 2007b. Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*. 68: 2946–2959.
- Maffei ME, Arimura G-I, Mithöfer A. 2012. Natural elicitors, effectors and modulators of plant responses. *Nat Prod Rep*, 29: 1288–303.
- Mello MO, Silva-Filho MC. 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Braz J Plant Physiol*, 14: 71–81.
- Mithöfer A, Boland W. 2008. Recognition of herbivory-associated molecular patterns. *Plant Physiol*, 146: 825–831.
- Mithöfer A, Boland W. 2012. Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu Rev Plant Biol*, 63: 431–450.
- Moloi MJ, van der Westhuizen AJ. 2006. The reactive oxygen species are involved in resistance responses of wheat to the russian wheat aphid. *J Plant Physiol*, 163: 1118–1125.
- Moran PJ, Thompson GA. 2001. Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways. *Plant Physiol*, 125: 1074–1085.
- Moran PJ, Cheng Y, Cassell JL, Thompson GA. 2002. Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* in compatible plant-aphid interactions. *Arch Insect Biochem Physiol*, 51: 182–203.
- Moreno A, Garzo E, Fernandez-Mata G, Kassem M, Aranda MA, Fereres A. 2011. Aphids secrete watery saliva into plant tissues from the onset of stylet penetration. *Entomol Exp Appl*, 139: 145–153.
- Morkunas, I.; Mai, V. C.; Gabrys, B. 2011. Phytohormonal signaling in plant responses to aphid feeding. *Acta Physiol Plant*, 33: 2057–2073.
- Mutti NS, Park Y, Reese JC, Reeck GR. 2006. RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Sci*, 6, doi: 10.1673/031.006.3801.:38.

- Mutti NS, Louis J, Pappan LK, Pappan K, Begum K, Chen M-S, Park Y, Dittmer N, Marshall J, Reese JC, Reeck GR. 2008. A protein from the salivary glands of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, is essential in feeding on a host plant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 9965-9969.
- Nalam V, Louis J., Shah J. 2018. Plant defense against aphids, the pest extraordinaire. *Plant Sci*. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.04.027>.
- Naessens E, Dubreuil G, Giordanengo P, Baron OL, Minet-Kebdani N, Keller H, Coustau C. 2015. A secreted MIF cytokine enables aphid feeding and represses plant immune responses. *Curr Biol*, 25: 1898-1903.
- Nicholson SJ, Hartson SD, Puterka GJ. 2012. Proteomic analysis of secreted saliva from russian wheat aphid (*Diuraphis noxia* Kurd.) biotypes that differ in virulence to wheat. *J Proteom*, 75: 2252-2268.
- Pareja M, Qvarfordt E, Webster B, Mayon P, Pickett J, Birkett M, Glinwood R. 2012. Herbivory by a phloem-feeding insect inhibits floral volatile production. *PLoS ONE*, 7, doi:10.1371/journal.pone.0031971
- Perring TM, Battaglia, D, Walling LL, Toma I, Fanti P. 2018. Aphids: Biology, Ecology, and Management, en: Wakil W, Brust GE, Perring TM. Sustainable management of arthropod pests of tomato. Elsevier, San Diego, United States, pp. 15-48
- Peterson RKD, Varella AC, Higley LG. 2017. Tolerance: the forgotten child of plant resistance. *Peer J*, 16, doi: 10.7717/peerj.3934.
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 28:489–521.
- Pitino M, Coleman AD, Maffei ME, Ridout CJ, Hogenhout SA. 2011. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. *PLoS ONE*, 6, doi: 10.1371/journal.pone.0025709.
- Pitino M, Hogenhout SA. 2013. Aphid protein effectors promote aphid colonization in a plant species-specific manner. *Mol Plant Microbe Interact*, 26: 130-139.
- Pitzschke A, Schikora A, Hirt H. 2009. MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol*, 12: 421–426.
- Rao SAK, Carolan JC, Wilkinson TL. 2013. Proteomic profiling of cereal aphid saliva reveals both ubiquitous and adaptive secreted proteins. *PLoS ONE*, 8, doi:10.1371/journal.pone.0057413.
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 12: 707–719.

Introducción General

- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JDG. 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu Rev Phytopathol*, 49: 317–343.
- Rodriguez PA, Stam R, Warbroek T, Bos JIB. 2014. Mp10 and Mp42 from the aphid species *Myzus persicae* trigger plant defences in *Nicotiana benthamiana* through different activities. *Mol Plant Microbe Interact*, 27: 30-39.
- Romeis T, Herde M. 2014. From local to global: CDPKs in systemic defense signalling upon microbial and herbivore attack. *Curr Opin Plant Biol*, 20: 1–10.
- Sabri A, Vandermoten S, Leroy PD, Haubruge E, Hance T, Thonart P, De Pauw E, Francis F. 2013. Proteomic investigation of aphid honeydew reveals an unexpected diversity of proteins. *PLoS One* 8, doi:10.1371/journal.pone.0074656.
- Saguez J, Giordanengo P, Vicent C. 2013. Aphids as major potato pest, en: Giordanengo P, Vicent C, Alyokhin A. *Insect pests of potato*. Elsevier, Oxford, UK. 31-63.
- Sandström J, Telang A, Moran NA. 2000. Nutritional enhancement of host plants by aphids—a comparison of three aphid species on grasses. *J Insect Physiol*, 46: 33-40.
- Santamaria ME, Martínez M, Cambra I, Grbic V, Diaz I. 2013. Understanding plant defence responses against herbivore attacks: an essential first step towards the development of sustainable resistance against pests. *Transgenic Res*, 22: 697–708.
- Santamaria ME, Arnaiz A, Gonzalez-Melendi ID, Martinez M, Diaz I. 2018. Plant perception and short-term responses to phytophagous insects and mites. *Int J Mol Sci*, 19, doi:10.3390/ijms19051356.
- Sarath Babu S, Pandravada SR, Prasada Rao RDVJ, Anitha K, Chakrabarty SK, Varaprasad KS. 2011. Global sources of pepper genetic resources against arthropods, nematodes and pathogens. *Crop Prot*. 30: 389-400.
- Schmelz EA. 2015. Impacts of insect oral secretions on defoliation-induced plant defense. *Curr Opin Plant Biol*, 9: 7–15.
- Schwachtje J, Baldwin IT. 2008. Why does herbivore attack reconfigure primary metabolism? *Plant Physiol*, 146: 845–851.
- Schwartzberg EG, Böröczky K, Tumlinson JH. 2011. Pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, suppress induced plant volatiles in broad bean, *Vicia Faba*. *J Chem Ecol*. 37: 1055–1062.
- Schwartzberg, E.G., Tumlinson, J.-H., 2014. Aphid honeydew alters plant defence responses. *Funct Ecol*, 28, 386–394.

- Silva AX, Jander G, Samaniego H, Ramsey JS, Figueroa CC. 2012. Insecticide resistance mechanisms in the green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) I: A Transcriptomic Survey. *PLoS ONE*, 7, doi:10.1371/journal.pone.003636.
- Simon J-C, Peccoud J. 2018. Rapid evolution of aphid pests in agricultural environments. *Curr Opin Insect Sci*. 26: 17–24.
- Smith CM, Boyko EV. 2007. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomol Exp Appl*, 122: 1-16.
- Smith, C.M., Liu, X., Wang, L.J., Liu, X., Chen, M.-S., Starkey, S., Bai, J., 2010. Aphid feeding activates expression of a transcriptome of oxylipin-based defense signals in wheat involved in resistance to herbivory. *J. Chem. Ecol*, 36, 260–276.
- Sorensen JT. 2009. Aphids, en: Resh VH, Cardé RT. *Encyclopedia of Insects*. Elsevier, Oxford, UK. pp. 27–31
- Stowe KA, Marquis RJ, Hochwender CG, Simms EL. 2000. The evolutionary ecology of tolerance to consumer damage. *Annu Rev Ecol Syst*, 31: 565–595.
- Strauss SY, Agrawal AA. 1999. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends Ecol Evol*, 14: 179-185.
- Studham, M.E., Macintosh, G.C., 2013. Multiple phytohormone signals control the transcriptional response to soybean aphid infestation in susceptible and resistant soybean plants. *Mol Plant Microbe Interact*, 26: 116 –129.
- Tjallingii WF. 2006. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *J Exp Bot*, 57: 739–745
- Tiffin P. 2000. Mechanisms of tolerance to herbivore damage: what do we know? *Evol Ecol*, 14: 523-536.
- Thompson GA, Goggin FL. 2006. Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects. *J Exp Bot*, 57: 755–766.
- Turlings TCJ, Bernasconi M, Bertossa R, Bigler F, Caloz G, Dorn S. 1998. The induction of volatile emissions in maize by three herbivore species with different feeding habits: possible consequences for their natural enemies. *Biol Control*, 11: 122–129.
- van Bel AJE, Will T. 2016. Functional evaluation of proteins in watery and gel saliva of aphids. *Front Plant Sci*, 7, doi: 10.3389/fpls.2016.01840.
- Verma V, Ravindran P, Kumar PP. 2016. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*, 16, doi: 10.1186/s12870-016-0771-y86.
- Walling LL. 2000. The myriad plant responses to herbivores. *J Plant Growth Regul*, 19: 195-216.

Introducción General

- Walling LL. 2008. Avoiding effective defenses: strategies employed by phloem-feeding insects. *Plant Physiol*, 146: 859–866.
- Walters DR. 2015. The interaction between a plant and its attacker, en: *Physiological responses of plants to attack*. Willey Blackwell, UK. pp. 1-23.
- War AR., Paulraj MG., Ahmad T., Buhroo AA., Hussain B., Ignacimuthu S., Sharma HC. 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal Behav*, 7: 1306–1320.
- Will T, Tjallingii WF, Thönnessen A, van Bel AJE. 2007. Molecular sabotage of plant defense by aphid saliva. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 10536–10541.
- Will T, Kornemann SR, Furch ACU, Tjallingii WF, van Bel AJE. 2009. Aphid watery saliva counteracts sieve-tube occlusion: a universal phenomenon? *J Exp Biol*, 212: 3305–3312.
- Will T, Furch ACU, Zimmermann MR. 2013. How phloem-feeding insects face the challenge of phloem-located defences. *Front Plant Sci*, 4, doi: 10.3389/fpls.2013.00336.
- Williams IS, Dixon AFG. 2007. Life cycles and polymorphism, en: van Emden H, Harrington R, *Aphids as crop pests*, CAB International, Wallingford, UK, pp. 69–86.
- Wu J, Hettenhausen C, Meldau S, Baldwin IT. 2007. Herbivory rapidly activates MAPK signaling in attacked and unattacked leaf regions but not between leaves of *Nicotiana attenuate*. *Plant Cell*, 19: 1096–1122.
- Wu J, Baldwin IT. 2009. Herbivory-induced signalling in plants: perception and action. *Plant Cell Environ*, 32: 1161–1174.
- Wu J, Baldwin IT. 2010. New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annu Rev Genet*, 44: 1–24.
- Xu J, Zhang S. 2015. Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends Plant Sci*, 20: 56-64.
- Yates AD, Michel A. 2018. Mechanisms of aphid adaptation to host plant resistance. *Curr Opin Insect Sci*, 26: 41–49.
- You MK, Oh S-I, Ok SH, Cho SK, Shin HY, Jeung JU, Shin JS. 2007. Identification of putative MAPK Kinases in *Oryza minuta* and *O. sativa* responsive to biotic stresses. *Mol Cells*. 23: 108-114.
- Zhu-Salzman K, Salzman RA, Ahn J-E, Koiwa H. 2004. Transcriptional regulation of sorghum defense determinants against a phloem-feeding aphid. *Plant Physiol*, 134, 420–431.
- Zhu-Salzman K, Luthe DS, Felton GW. 2008. Arthropod-Inducible Proteins: Broad Spectrum Defenses against Multiple Herbivores. *Plant Physiol*, 146: 852–858.

Zhou S, Lou YR, Tzin V, Jander G. 2015. Alteration of plant primary metabolism in response to insect herbivory. *Plant Physiol*, 169: 1488-1498.

Züst and Agrawal. 2017. Trade-offs between plant growth and defense against insect herbivory: an emerging mechanistic synthesis. *Annu Rev Plant Biol*, 68: 513-34.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

SECCIÓN II:
TRABAJOS PUBLICADOS

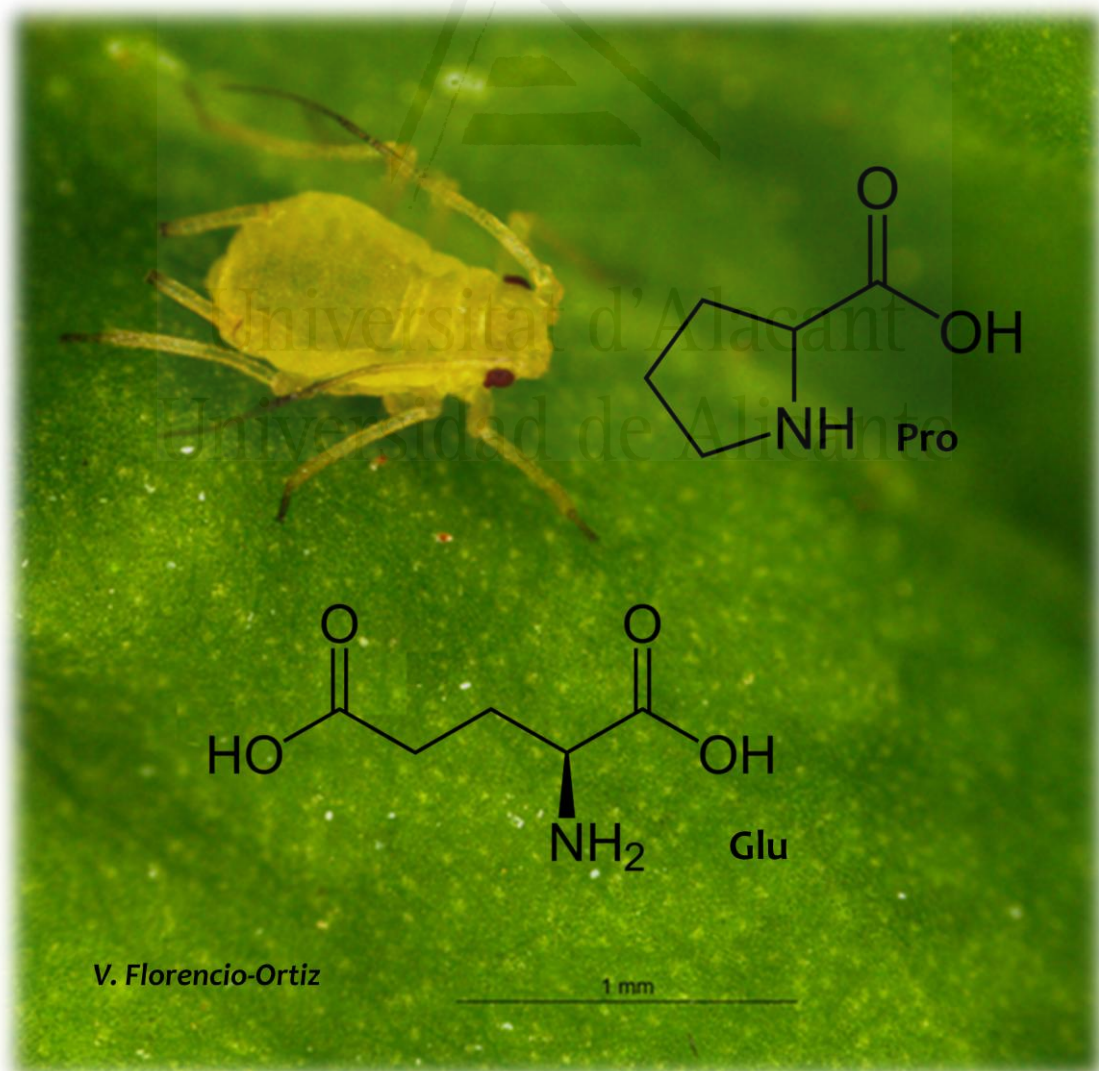


Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

CAPÍTULO 1

Changes in the free amino acid composition of *Capsicum annuum* (pepper) leaves in response to *Myzus persicae* (green peach aphid) infestation.

A comparison with water stress.



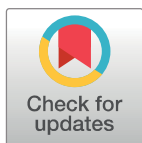
RESEARCH ARTICLE

Changes in the free amino acid composition of *Capsicum annuum* (pepper) leaves in response to *Myzus persicae* (green peach aphid) infestation. A comparison with water stress

Victoria Florencio-Ortiz¹, Susana Sellés-Marchart², José Zubcoff-Vallejo³, Georg Jander⁴, José L. Casas^{1*}

1 Instituto Universitario de Investigación CIBIO (Centro Iberoamericano de la Biodiversidad), University of Alicante, Carretera de San Vicente del Raspeig, s/n, San Vicente del Raspeig, Alicante, Spain, **2** Genomics and Proteomics Unit, Servicios Técnicos de Investigación, University of Alicante, Carretera de San Vicente del Raspeig, s/n, San Vicente del Raspeig, Alicante, Spain, **3** Departamento de Ciencias del Mar y Biología Aplicada, University of Alicante, Carretera de San Vicente del Raspeig, s/n, San Vicente del Raspeig, Alicante, Spain, **4** Boyce Thompson Institute for Plant Research, Ithaca, NY, United States of America

* jl.casas@ua.es



OPEN ACCESS

Citation: Florencio-Ortiz V, Sellés-Marchart S, Zubcoff-Vallejo J, Jander G, Casas JL (2018) Changes in the free amino acid composition of *Capsicum annuum* (pepper) leaves in response to *Myzus persicae* (green peach aphid) infestation. A comparison with water stress. PLoS ONE 13(6): e0198093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198093>

Editor: Daniel Doucet, Natural Resources Canada, CANADA

Received: November 29, 2017

Accepted: May 14, 2018

Published: June 1, 2018

Copyright: © 2018 Florencio-Ortiz et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work has been supported by: Ministerio de Economía y Competitividad, 518 Project CGL2016-79054-R; University of Alicante fellowship UAFPU2013-5793 519 to VFO, and the United States Department of Agriculture—National Institute of 520 Food and Agriculture award 2016-

Abstract

Amino acids play a central role in aphid-plant interactions. They are essential components of plant primary metabolism, function as precursors for the synthesis of defense-related specialized metabolites, and are major growth-limiting nutrients for aphids. To quantify changes in the free amino acid content of pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves in response to green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) feeding, plants were infested with a low (20 aphids/plant) or a high (200 aphids/plant) aphid density in time-course experiments ranging from 3 hours to 7 days. A parallel experiment was conducted with pepper plants that had been subjected to water stress. Factor Analysis of Mixed Data revealed a significant interaction of time x density in the free amino acid response of aphid-infested leaves. At low aphid density, *M. persicae* did not trigger a strong response in pepper leaves. Conversely, at high density, a large increase in total free amino acid content was observed and specific amino acids peaked at different times post-infestation. Comparing aphid-infested with water-stressed plants, most of the observed differences were quantitative. In particular, proline and hydroxyproline accumulated dramatically in response to water stress, but not in response to aphid infestation. Some additional differences and commonalities between the two stress treatments are discussed.

1. Introduction

Although they are best known as constituents of proteins, amino acids also play a central role in a wide variety of other plant physiological processes [1]. They act as osmolytes,

Abstract

Amino acids play a central role in aphid-plant interactions. They are essential components of plant primary metabolism, function as precursors for the synthesis of defense-related specialized metabolites, and are major growth-limiting nutrients for aphids. To quantify changes in the free amino acid content of pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves in response to green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) feeding, plants were infested with a low (20 aphids/plant) or a high (200 aphids/plant) aphid density in time-course experiments ranging from 3 hours to 7 days. A parallel experiment was conducted with pepper plants that had been subjected to water stress. Factor Analysis of Mixed Data revealed a significant interaction of time x density in the free amino acid response of aphid-infested leaves. At low aphid density, *M. persicae* did not trigger a strong response in pepper leaves. Conversely, at high density, a large increase in total free amino acid content was observed and specific amino acids peaked at different times post-infestation. Comparing aphid-infested with water-stressed plants, most of the observed differences were quantitative. In particular, proline and hydroxyproline accumulated dramatically in response to water stress, but not in response to aphid infestation. Some additional differences and commonalities between the two stress treatments are discussed.

Keywords

Aphid-plant interaction; *Capsicum annuum*; Plant defense; Primary metabolism; Water stress; *Myzus persicae*.

Abbreviations

Ala, alanine; Arg, arginine; Asn, asparagine; Asp, aspartate; BCAA, branched-chain amino acids; Cys, cysteine; dpi, days post-infestation; GABA, γ -aminobutyric acid; Gln, glutamine; Glu, glutamate; Gly, glycine; HFBA, heptafluorobutyric acid; His, histidine; hpi, hours post-infestation; Hyp, hydroxyproline; Ile, isoleucine; Leu, leucine; Lys, lysine; MeJA, methyl jasmonate; Met, methionine; MRM, multiple reaction monitoring; Phe, phenylalanine; Pro, proline; SA, salicylic acid; Ser, serine; TCA, tricarboxylic acid; Thr, threonine; Trp, tryptophan; Tyr, tyrosine; Val, valine.

1. Introduction

Although they are best known as constituents of proteins, amino acids also play a central role in a wide variety of other plant physiological processes (Pratelli and Pilot, 2014). They act as osmolytes, regulate ion transport, modulate stomatal opening, participate in detoxification of heavy metals, contribute to redox-homeostasis, influence gene expression, and affect the synthesis and activity of some enzymes (Rai, 2002). Moreover, amino acids serve as precursors for numerous plant secondary metabolites that fulfill critical functions such as signaling, defense, interactions with other organisms, and photoprotection (Pratelli and Pilot, 2014; Zeier, 2013). Many plant studies have demonstrated accumulation of free amino acids (FAA), especially proline, in response to both abiotic and biotic stresses (reviewed in Pratelli and Pilot, 2014), including the two explored in the present study: water stress and aphid herbivory.

Aphids are among the most economically important pests in world agriculture. The negative impact of aphids is related in part to their huge reproductive capacity, which leads to high population densities and significant nutrient withdrawal from the plants in the form of phloem sap (Giordanengo *et al.*, 2010; Guerrieri and Digilio, 2008). Phloem sap is an unbalanced food for aphids, being composed primarily of sucrose and other carbohydrates, as well as nitrogen in the form of FAA (Douglas, 2003; Guerrieri and Digilio, 2008). Although amino acids are also present in cells as protein-bound forms with defensive functions (Dardeau *et al.*, 2015), aphids are considered to rely primarily on FAA for their nutritional requirements (Rahbé *et al.*, 1995). As phloem-feeders, aphids cannot utilize FAA contained in other leaf cells. Nevertheless, a high correlation in the amino acid composition of whole leaves and phloem exudates has been shown (Weibull *et al.*, 1990), and there is evidence that aphids gain fitness benefits from the total amino acid content of the plant tissue from which they are feeding on (Suzuki *et al.*, 2010). Moreover, phloem changes induced by aphids appear to be systemic, affecting at least the whole attacked leaf (Sandström *et al.*, 2000).

The abundance of essential amino acids (EAA) of phloem sap is too low for animal dietary requirements (Douglas, 2003; Guerrieri and Digilio, 2008). To circumvent this problem, aphids contain endosymbiotic bacteria from the genus *Buchnera* that provide them with EAA (Douglas, 2003). Nevertheless, some aphids have been suggested to manipulate plant metabolism to favor their own nutritional requirements, increasing the phloem amino acid content in particular EAA. This phenomenon of “nutritional enhancement” (Sandström *et al.*, 2000) has been observed in the phloem or bulk leaf tissue of plants after infestation with aphids that cause macroscopic changes in their hosts, including *Schizaphis graminum* (Rondani) (Sandström *et al.*, 2000), *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Sandström *et al.*, 2000; Telang *et al.*, 1999) and *Aulacorthum solani* (Kaltenbach) (Sato *et al.*, 2013), which produce chlorotic lesions, as well as *Tetraneura* spp. (Suzuki *et al.*, 2009) and *Phloemyzus passernii* (Signoret) (Dardeau *et al.*, 2015) which produce galls and pseudogalls, respectively. In the case of “asymptomatic” aphids, which do not cause macroscopic changes in their host plants, results have been more variable. Whereas *Aphis glycines* (Matsumura) (Chiozza *et al.*, 2010) and *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Leroy *et al.*, 2011) altered FAA composition of their host plants, *Megoura viciae* (Buckton) (Leroy *et al.*, 2011) or *Sitobion avenae* (Fabricius) (Eleftherianos *et al.*, 2006) did not. Additionally, *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) feeding did not affect the phloem amino acid content (Sandström *et al.*, 2000), but increased the total FAA content in whole leaves (Eleftherianos *et al.*, 2006).

Due to the dual function of amino acids in plant-aphid interactions, as precursors for the production of many plant defense compounds and as major growth-limiting nutrients for aphids, aphid-infested plants are hypothesized to upregulate FAA biosynthesis, but at the same time limit herbivore access to these nutrients (Zhou *et al.*, 2015). The large volumes of sap that aphids ingest to acquire sufficient nitrogen can reduce the water potential and induce drought-stress symptoms in plants (Riedell *et al.*, 1989). The abscisic acid signaling pathway, which is important for drought stress responses in plants, is also induced by aphid feeding (Hillwig *et al.*, 2016). Therefore, it has been suggested that some of the phenotypic changes associated with aphid infestation may be induced by water stress rather

than directly by the aphids themselves (Corcuera, 1993). The aim of the present work was therefore to investigate changes in the FAA composition of pepper (*Capsicum annuum*) leaves caused by the asymptomatic aphid *Myzus persicae* (Sulzer) and determine whether these changes are similar to those occurring during water stress.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Capsicum annuum var. California Wonder seeds (Ramiro Arnedo S.A, Murcia, Spain) were germinated in plastic pots with a 1:1 mixture of peat (Prohumin potting soil, Projar S.A., Valencia, Spain) and vermiculite. Plants were watered three times each week and maintained in a growth chamber under a 16:8 hr photoperiod (day/night), 24°C, and 70% relative humidity.

2.2. Aphid culture and plant infestation

A culture of the green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) was derived from a population on greenhouse-grown sweet pepper close to Pilar de la Horadada (Alicante), Spain. This stock culture was maintained on pepper plants in a growth chamber under a 16:8 hr photoperiod (day/night), 24°C, and 70% relative humidity. Pepper plants (five weeks after sowing) were infested sequentially with wingless adult aphids to obtain plants at 3 hours post-infestation (hpi), 8 hpi, 1 day post-infestation (dpi), 2 dpi, 4 dpi and 7 dpi. In order to compare high and low aphid density, plants were infested with 200 or 20 adult aphids, respectively, in two independent assays. In both cases, fifteen plants were assayed at each time point of infestation, and the same number of uninfested plants was used as a control. In each experiment, all leaves were collected at the same time (6 weeks after planting), insects were brushed off and the plant leaves from each treatment were pooled together. Leaves were initially frozen in liquid nitrogen during collection, frozen at -80°C for further freeze-drying, and finally ground and stored at 4°C until analysis.

2.3. Water stress

To induce water stress pepper plants were subjected to water constraint. For this, two groups of fifteen plants were maintained under the conditions described above, but without watering for 7 or 14 days, respectively. An additional group of fifteen plants remained watered regularly (3 times/week) and served as controls. The onset of the water constraint treatment was planned sequentially in order to collect all leaves at the same time (6 weeks after planting), and the plant leaves from each treatment were pooled together. As above, leaves were freeze-dried, ground, and stored at 4°C until analysis.

2.4. Samples and standards preparation

FAA extraction was performed in quadruplicate from 5 mg of dried leaf tissue in 1 ml of water, with 2 mg/L cystine as the internal standard. After homogenization by vortexing, samples were incubated for 10 min at room temperature, centrifuged at 10,000 g for 10 min, and supernatants filtered through a 0.45 µm pore membrane filter (Teknokroma S.A, Spain). Calibration standards were prepared in water by spiking the 21 amino acids analyzed at concentrations from 0.25 to 10 mg/L. Amino acid standards were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), with exception of *L*-arginine, which was from Duchefa Biochemie (Haarlem, The Netherlands).

2.5. Quantitation of FAA by multiple reaction monitoring

The FAA analysis was carried out by UHPLC-MS/MS using an Agilent 1290 Infinity UHPLC System coupled to an Agilent 6490 triple quadrupole mass spectrometer with an Agilent Jet Stream ion source in positive ionization mode, according to previously published methods (Harder *et al.*, 2011; Parra *et al.*, 2013). Separation of analytes was performed on an Agilent Zorbax Extend-C18 column (2.1 × 50 mm, 1.8 µm), which was maintained at 25°C during the analysis. In optimized conditions, the mobile phase consisted of solvent A (0.05% formic acid and 0.03% heptafluorobutyric acid (HFBA) in water) and solvent B (0.05% formic acid and 0.03%

HFBA in acetonitrile) using the following gradient: 0 min 0% B, 2.5 min 0% B, 5.5 min 40% B, 5.60 min 90% B, 6 min 90% B; at a constant flow rate of 0.4 mL/min. In order to improve glutamate quantification, a specific chromatographic method was created, consisting of: solvent A (0.5% formic acid and 0.3% HFBA in water) and solvent B (0.5% formic acid and 0.3% HFBA in acetonitrile) using the gradient 0 min 0% B, 2.5 min 0% B, 3 min 40% B, 3.5 min 90% B, 4 min 90% B; at a constant flow rate of 0.4 mL/min. For all the samples, the injection volume was 1 μ L.

The multiple reaction monitoring (MRM) analysis mode was used to monitor the transitions from precursor ions to dominant product ions. The optimized source parameters were: gas curtain temperature 275°C, gas flow 11 L/min, cell acceleration voltage 2 V, nebulizer pressure 50 psi, capillary voltage 3000 V and dwell time 10 ms. Several specific transitions were used to determine each compound and, for each transition, the collision energy applied was optimized to detect the greatest possible intensity.

A total of 21 amino acids was analyzed: alanine (Ala), arginine (Arg), asparagine (Asn), aspartate (Asp), cysteine (Cys), glutamine (Gln), glutamate (Glu), glycine (Gly), histidine (His), hydroxyproline (Hyp), isoleucine (Ile), leucine (Leu), lysine (Lys), methionine (Met), phenylalanine (Phe), proline (Pro), serine (Ser), threonine (Thr), tryptophan (Trp), tyrosine (Tyr) and valine (Val). The specific MRM transitions used for quantitation of each amino acid and the optimized MRM parameters, such as fragmentor voltage and collision energy, are summarized in S1 Table.

A MassHunter Workstation (version B.07.01) was used for data acquisition. MassHunter Qualitative Analysis (version B.07.00) and Quantitative Analysis Software (version B.07.00) were used for data processing. The two most abundant MRM transitions were selected for each analyte as quantifier and qualifier ions. Quantification was made according to the internal standard cystine.

2.6. Data analysis

Data analysis was conducted with the statistical software R 3.4.0 (Core Team, R, 2017). The effects of high aphid density, low aphid density and water stress on FAA composition were assessed with Multivariate Analysis of Variance (MANOVA), followed by a post hoc analysis to detect significant differences between times of treatment. Post-hoc tests were conducted with Tukey's HSD or Games-Howell, depending on whether or not Levene's test showed homogeneous variance.

In order to compare the changes in FAA under the different treatments, the fold change for each amino acid in the treated relative to the control leaves was calculated by: $(b_i - \bar{a}) / \bar{a}$, with “ b_i ” being the different replicates of treated plants and “ \bar{a} ” the mean of the corresponding control leaves. In accordance to Dadd (1985) we have considered Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp and Val as EAA.

To explore whether the global FAA response was different among treatments, we conducted a Factor Analysis of Mixed Data (FAMD). FAMD performs Principal Component Analyses on continuous variables and Multiple Correlation Analyses on categorical variables, enabling the simultaneous analysis of both kinds of factors (Arias *et al.*, 2016). The comparison between the treatments was conducted only after 7 days of stress, which was a common duration for all three treatments. Another FAMD analysis between high and low aphid density treatments was conducted to study the possible interactions between aphid density and time of infestation.

3. Results

FAA analysis of leaves was performed on pepper plants under high aphid density, low aphid density, or water stress, as well as on the corresponding control plants. In all cases, 19 amino acids, but not Cys and Gly, were detected. Fig 1 shows the concentration of each amino acid, as well as EAA and non-essential amino acids (NEAA) content, found in control leaves.

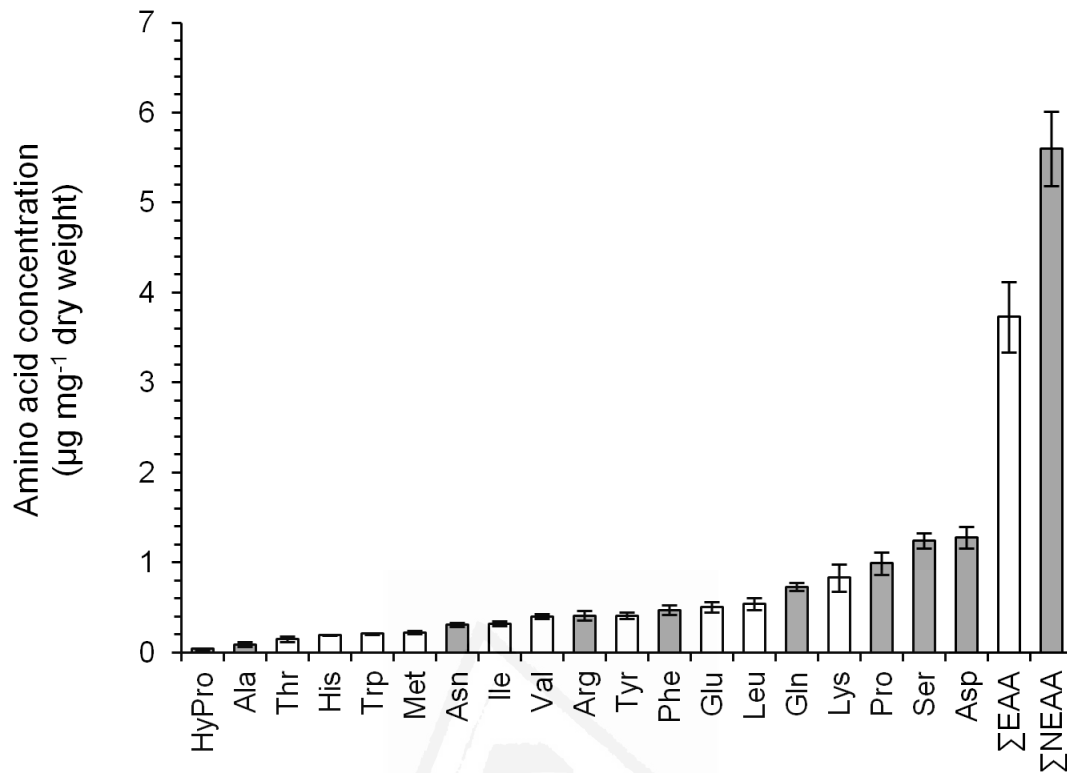


Fig 1. FAA content of control pepper leaves. Mean \pm s.e. of $n = 12$. White and gray bars correspond to EAA and NEAA, respectively.

3.1. Effect of aphid infestation on plant FAA composition

Aphid infestation induced significant changes in the total FAA content of pepper leaves at high aphid density, whereas changes of lower magnitude were observed at low aphid density (Fig 2). When plants were subjected to high aphid density, the total FAA fold change was already significant at 3 hpi, increased to maximum levels between 1 dpi and 4 dpi, and decreased thereafter. This increase in the total FAA content was mainly due to an increase in EAA rather than in NEAA. Conversely, at low aphid density the total FAA fold-change was not significant until 7 dpi, when a slight decrease was registered, and the fold changes detected in EAA were very similar to those of the NEAA (Fig 2).

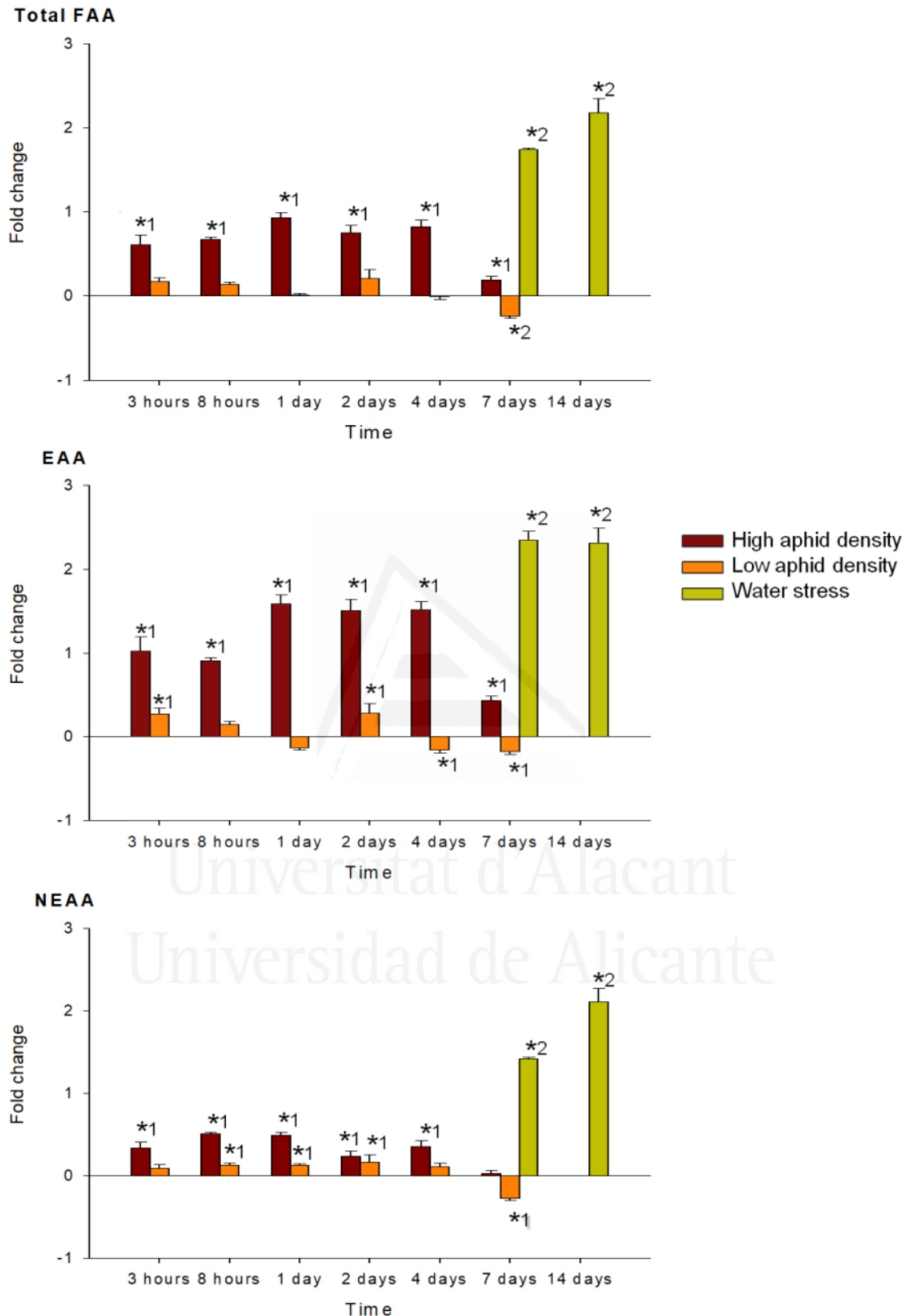


Fig 2. Fold change in total FAA, EAA and NEAA of pepper leaves after different treatments (high aphid density, low aphid density, and water stress). Mean \pm s.d. of $n = 4$. Positive or negative values indicate increases or decreases, respectively. Asterisks indicate significant changes (P -value < 0.05) in Tukey¹ or Games-Howell² post hoc analysis relative to their respective control leaves.

FAMD revealed groups markedly differentiated in their FAA composition, depending on both the density of aphid infestation and the time of infestation (Fig 3). The two first dimensions explained 73.8% of the total variability. Dimension 1 is composed, in order of descending contribution (S2 Table), by the quantitative variables Val, Thr, Phe, Arg, Lys, Ile, Tyr, Leu, Ala, Met, Asn, Trp, and His, and the qualitative variable “density”. On the other hand, dimension 2 is composed, in order of descending contribution (S2 Table), by the qualitative variable “time” and the quantitative variables Glu, Pro, Ser, Gln, and Asp. Variability between high- and low density aphid treatments is mostly explained by the variables belonging to dimension 1. On the other hand, variability between the different times of infestation is explained similarly by dimensions 1 and 2. Comparing the different times of infestation, 7 dpi is most clearly differentiated from the other time points. Moreover, density x time interactions are pointed out, given that groups based on the time of infestation were not chronologically ordered on dimension 2.

MANOVA performed on all amino acids analyzed (individual FAA, EAA, NEAA and total FAA) indicated a significant effect of the time of infestation ($P < 0.001$), for both high and low aphid density treatments. MANOVA performed on the fold-change of each FAA in response to high and low aphid density also revealed a significant effect of the interaction time x density ($P < 0.001$). Under high aphid density, all amino acids concentrations increased in response to infestation, with exception of Glu, which mostly decreased during the entire study period (Figs 4-9).

Most of the 18 amino acids with increased concentrations reached their maximum levels between 1 and 4 dpi. Exceptions to this pattern were Asp, Gln, Hyp, Pro, Ser and Thr, which showed an earlier response with a local maximum before 1 dpi. In quantitative terms, amino acids that more than doubled in concentration in response to high aphid density were, in descending order: Ala, Leu, Lys, Thr, Arg, Tyr, Phe, Val, Ile, Met, Asn and Pro (Figs 4-9). Under low aphid density, most amino acids increased until 2 dpi, followed by a general decrease at 4 dpi that continued until 7 dpi. Amino acids with higher magnitude of variation (increases or decreases greater than 0.3 fold change) were, in descending order: Glu, Asn, Gln, Pro, Ala, Leu, His, Phe, Thr, Tyr and Ser.

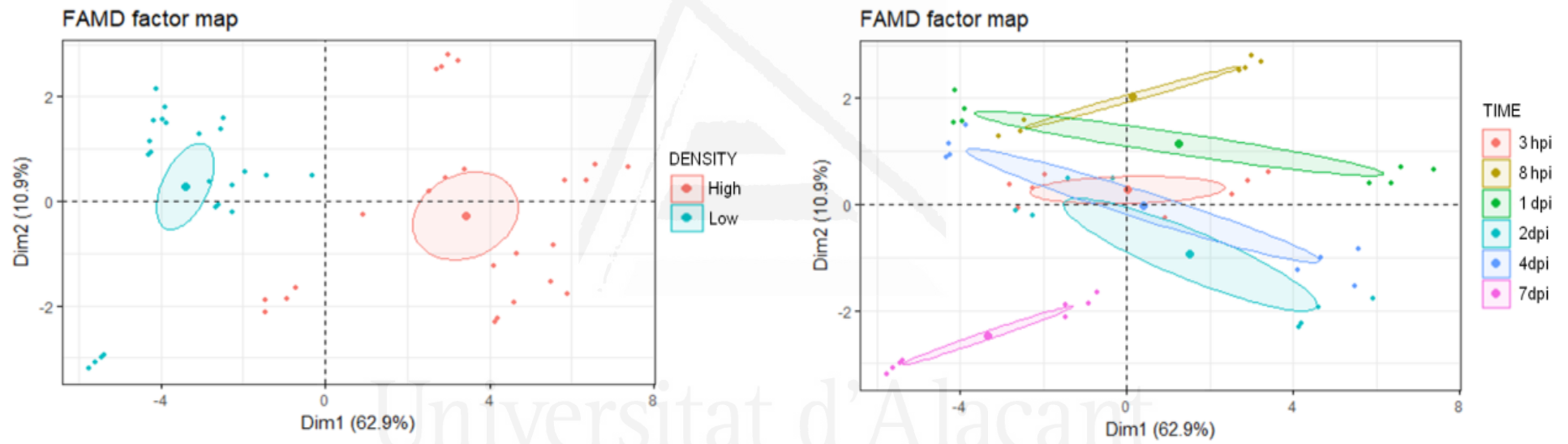


Fig 3. FAMD factor map of FAA in pepper leaves subjected to high- and low-density aphid infestation for different times.

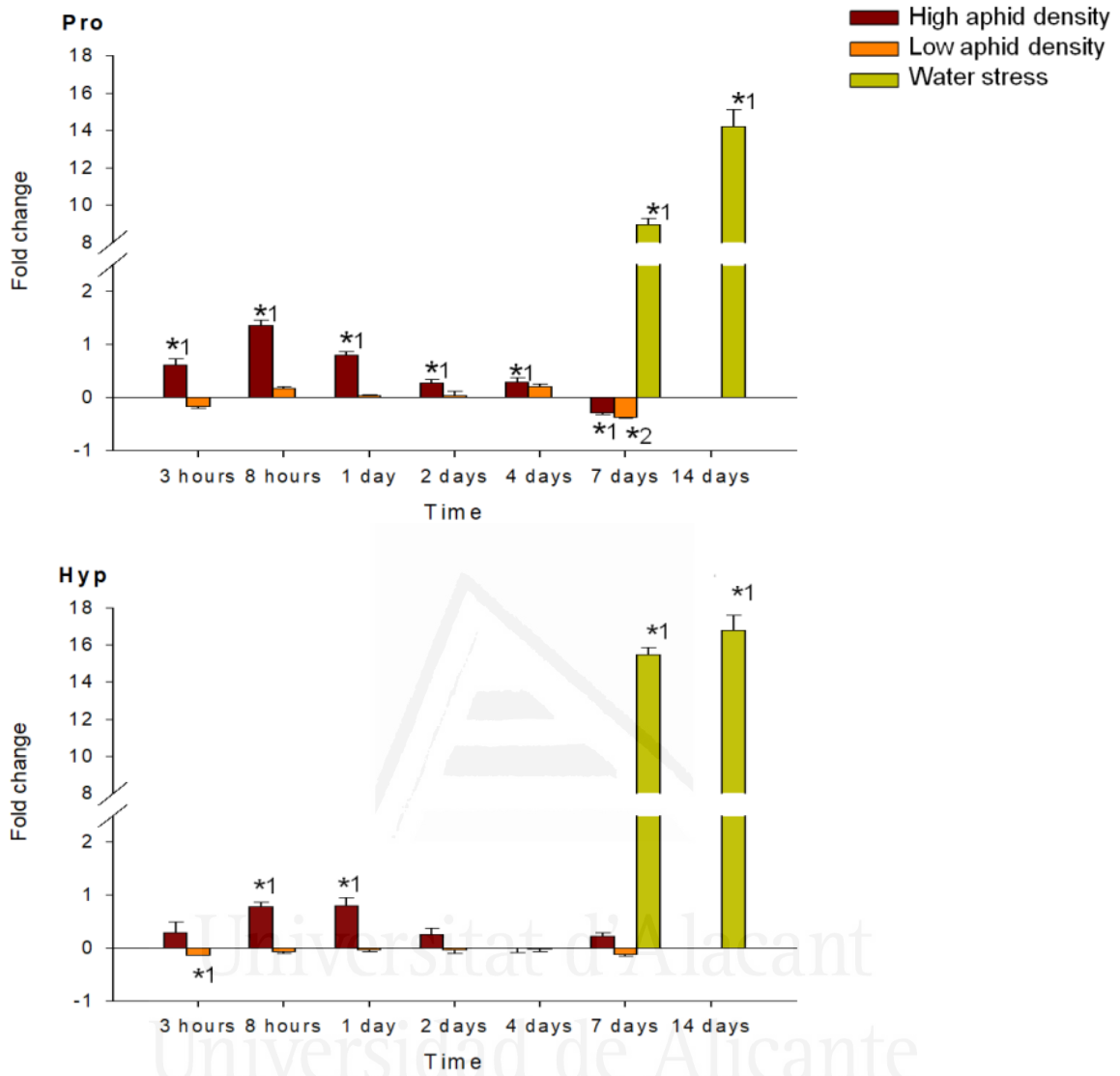


Fig 4. Fold change in Pro and Hyp of pepper leaves after different treatments (high aphid density, low aphid density, and water stress). Mean \pm s.d. of $n = 4$. Positive or negative values indicate increases or decreases, respectively. Asterisks indicate significant changes (P -value < 0.05) in Tukey¹ or Games-Howell² post hoc analysis relative to their respective control leaves.

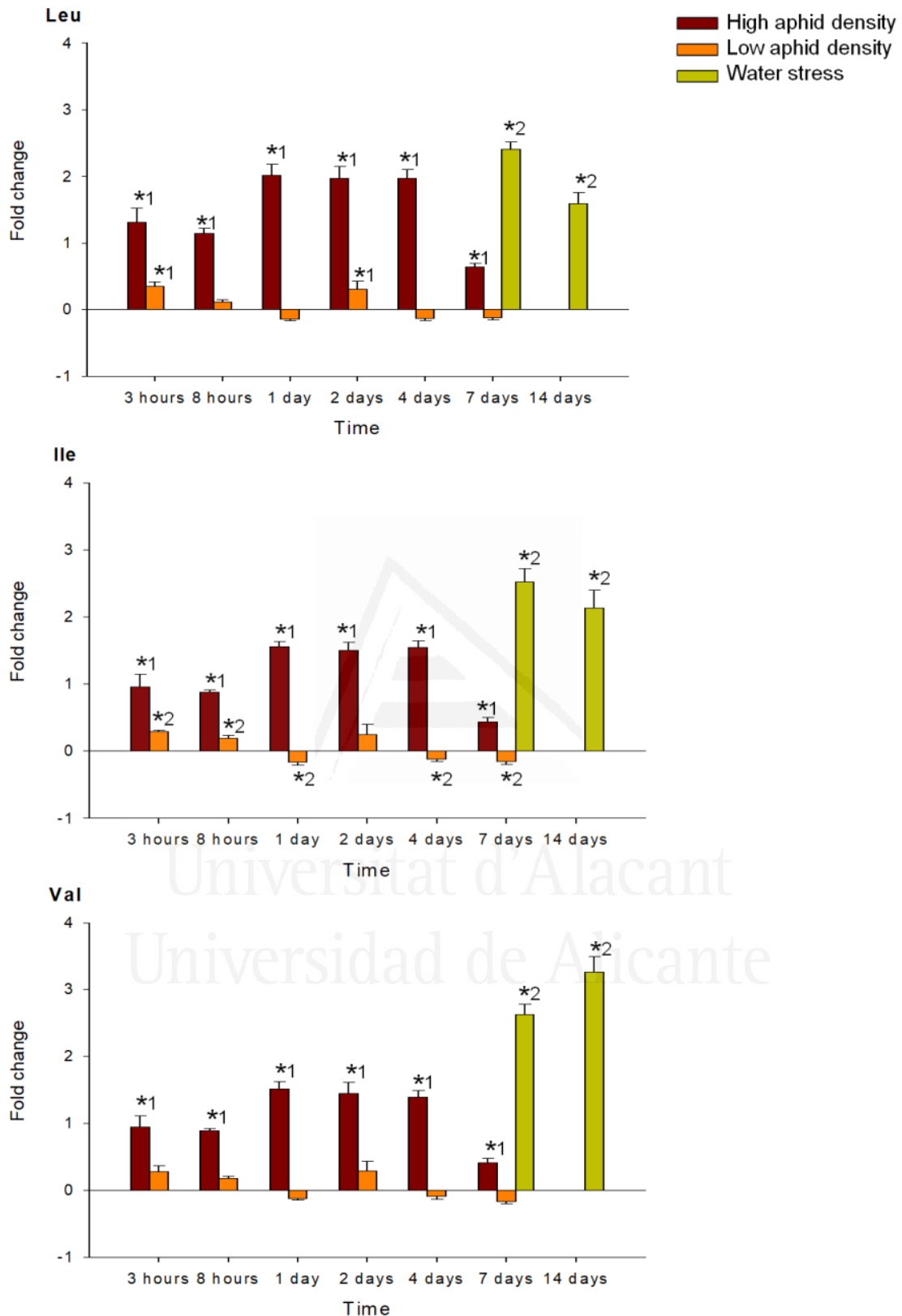


Fig 5. Fold change in Leu, Val and Ile of pepper leaves after different treatments (high aphid density, low aphid density, and water stress). Mean \pm s.d. of $n = 4$. Positive or negative values indicate increases or decreases, respectively. Asterisks indicate significant changes (P -value < 0.05) in Tukey¹ or Games-Howell² post hoc analysis relative to their respective control leaves.

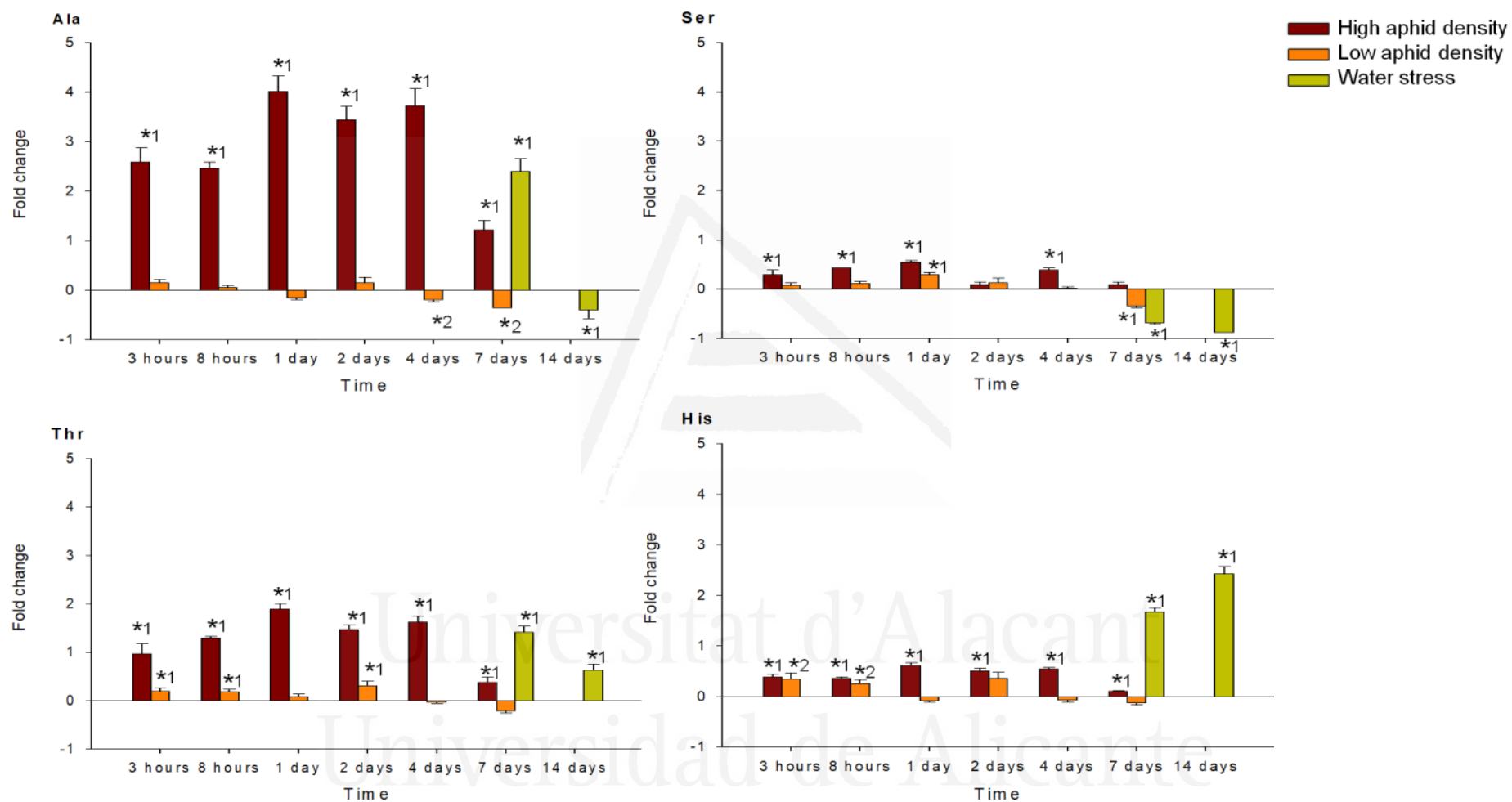


Fig 6. Fold change in Ala, Ser, Thr and His of pepper leaves after different treatments (high aphid density, low aphid density, and water stress). Mean \pm s.d. of $n = 4$. Positive or negative values indicate increases or decreases, respectively. Asterisks indicate significant changes (P -value < 0.05) in Tukey¹ or Games-Howell² post hoc analysis relative to their respective control leaves.

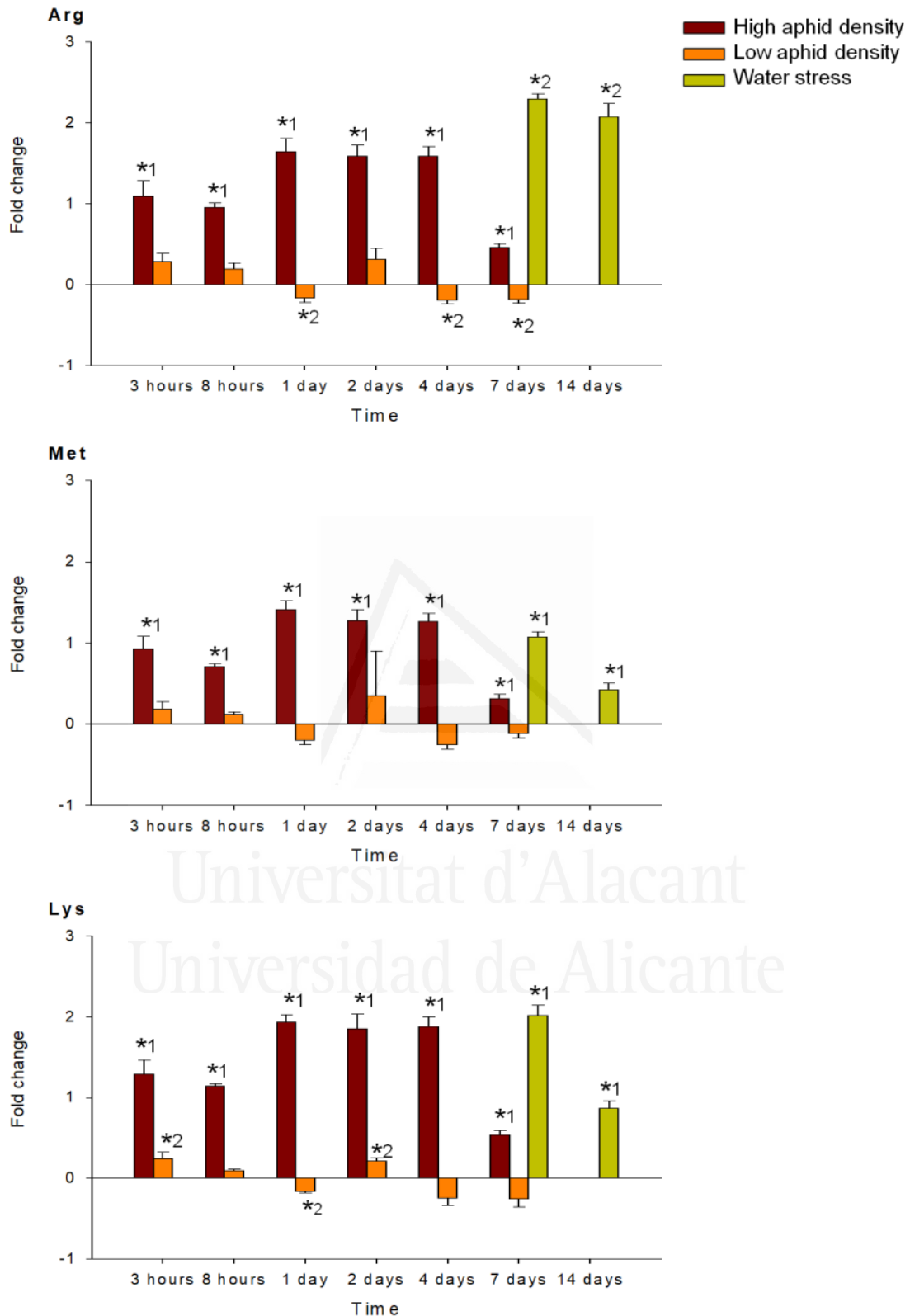


Fig 7. Fold change in Arg, Met and Lys of pepper leaves after different treatments (high aphid density, low aphid density, and water stress). Mean +/- s.d. of n = 4. Positive or negative values indicate increases or decreases, respectively. Asterisks indicate significant changes (P-value < 0.05) in Tukey¹ or Games-Howell² post hoc analysis relative to their respective control leaves.

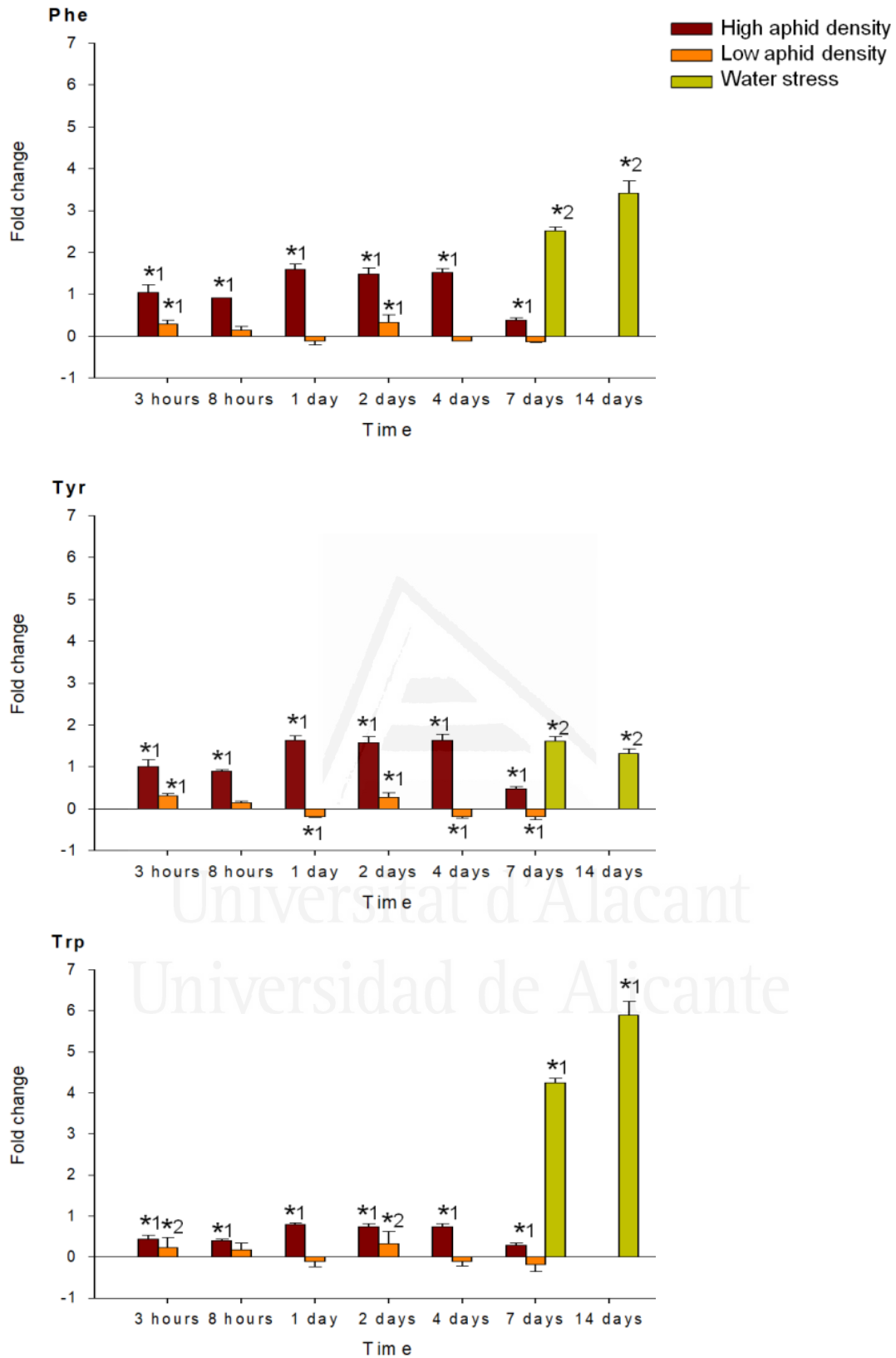


Fig 8. Fold change in Phe, Tyr and Trp of pepper leaves after different treatments (high aphid density, low aphid density, and water stress). Mean +/- s.d. of n = 4. Positive or negative values indicate increases or decreases, respectively. Asterisks indicate significant changes (P-value < 0.05) in Tukey¹ or Games-Howell² post hoc analysis relative to their respective control leaves.

3.2. Effect of water stress on plant FAA composition. Comparison with aphid infestation

Plants under water constraint showed symptoms of water stress (epinasty and leaf rolling) which were moderate after 7 days but became much more severe after 14 days, when the symptoms were observed in all of the leaves. Water stress resulted in significant changes in the total FAA content (Fig 2), which increased with time. EAA responded earlier than NEAA, with a greater increase after 7 days, although after 14 days the increases in both groups of amino acids were of similar magnitude.

FAMD of high aphid density, low aphid density and water stress after 7 days of treatment revealed three groups markedly differentiated in their FAA composition (Fig 10). The two first dimensions explained 99.5% of the total variability. Dimension 1 was composed, in order of descending contribution (S3 Table) by Phe Val, “treatment”, Ile, Arg, His, Leu, Trp, Lys, Met, Hyp, Thr, Pro, and Ala. On the other hand, dimension 2 was composed, in order of descending contribution (S3 Table), by the qualitative variable “treatment” and the quantitative variables Asn, Gln, Ser, Asp, and Glu. Variability between aphid infestation (high- and low density) and water stress is mainly explained by the variables belonging to the dimension 1, whereas the variability between high aphid density and low aphid density treatments is mostly explained by the variables belonging to the dimension 2.

MANOVA performed on all amino acids analyzed (individual FAA, EAA, NEAA and total FAA) indicated a significant effect of the time of water stress ($P < 0.001$). Significance between leaves subjected to 7 or 14 days of water stress, and their corresponding controls in the post hoc analysis, is indicated by asterisks (Figs 4-9). Most amino acids showed an increased concentration in response to water stress, with exception of Asn, Asp, Glu, and Ser, which showed a decrease at 7 days, and also Ala and Glu, which decreased at 14 days. It is worth noting that, although there was an increase in the total FAA content from 7 days to 14 days of water stress (Fig 2), mainly due to the huge increase in Pro and Hyp content (Fig 4), most amino acids

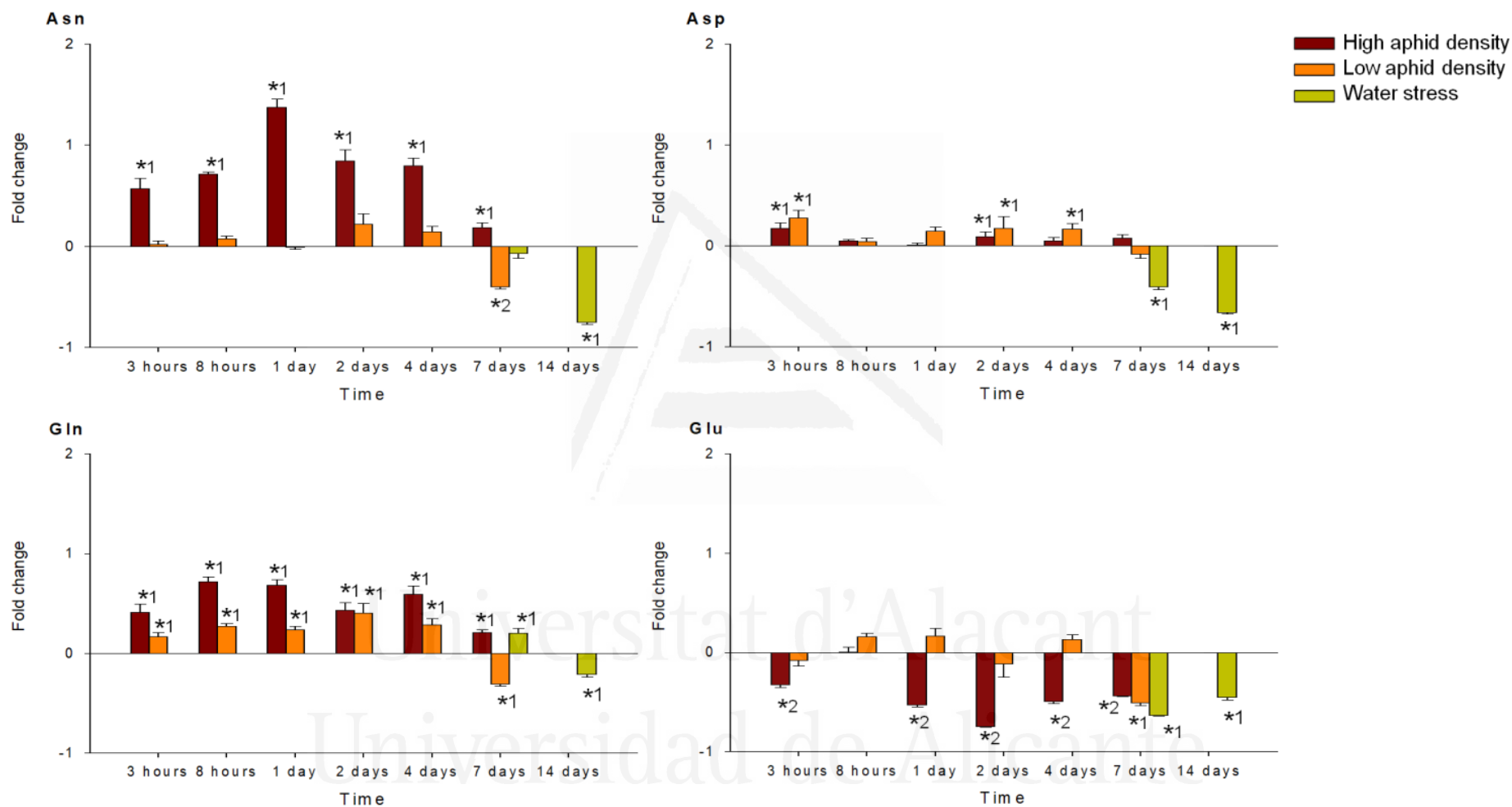


Fig 9. Fold change in Asn, Asp, Gln and Glu of pepper leaves after different treatments (high aphid density, low aphid density, and water stress). Mean \pm s.d. of $n = 4$. Positive or negative values indicate increases or decreases, respectively. Asterisks indicate significant changes (P -value < 0.05) in Tukey¹ or Games-Howell² post hoc analysis relative to their respective control leaves.

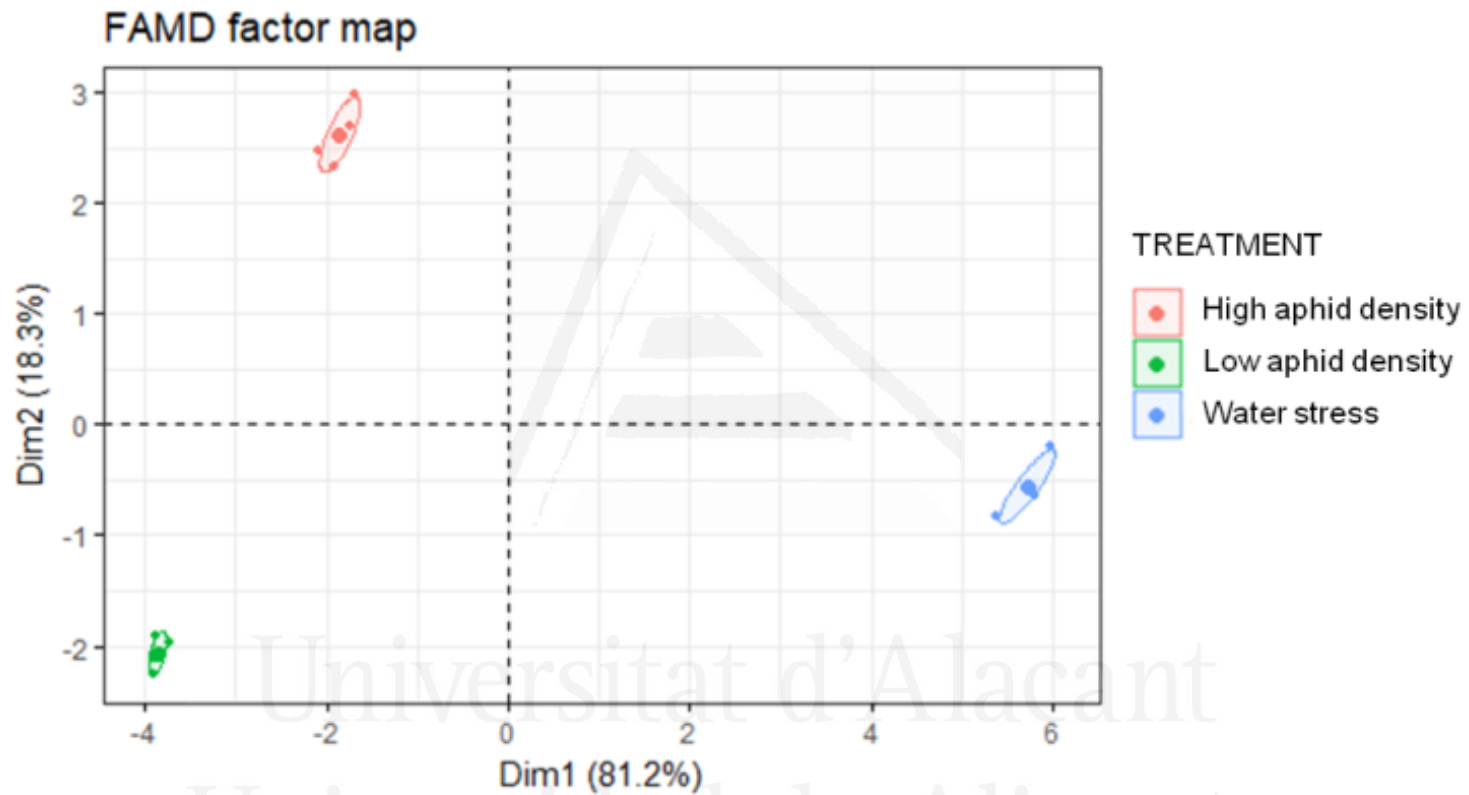


Fig 10. FAMD factor map of FAA in pepper leaves after 7 days of different treatments (high aphid density, low aphid density and water stress).

became less abundant after 14 days (Figs 5-9). In addition to Pro and Hyp, other amino acids with increased concentrations after 14 days of water stress were Glu, His, Phe, Trp, and Val. Amino acids with greater than two-fold concentration increase in response to water stress, in descending order: Hyp, Pro, Trp, Phe, Ile, His, Leu, Ala, Val, Arg, and Lys.

4. Discussion

The two densities of infestation assayed gave very different results in our study. Low aphid density provoked minor variations in the FAA composition of pepper leaves, but there was a significant decrease in total FAA content at the end of the study period (7 dpi). These results are in line with previous studies with different asymptomatic aphids, which showed little or no effect on the FAA content of their host plants (Eleftherianos *et al.*, 2006; Leroy *et al.*; 2011; Sandström *et al.*, 2000), especially when compared to symptomatic aphid species causing chlorotic lesions or galls in their plant hosts (Dardeau *et al.*, 2015; Sandström *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2009; Telang *et al.*, 1999). Thus, it seems that at low aphid density *M. persicae* either remain undetected or do not trigger a strong response in pepper plants. Conversely, high aphid density triggered a large increase in total FAA content. Specific amino acids, including the aromatics Phe, Tyr, Trp; the branched-chain amino acids (BCAA), Val, Ile, and Leu; and a miscellaneous group with Arg, Lys, Met, Thr, Ala, Asn, and His, accumulated and peaked at different times post-infestation. This again coincides with previously published works describing strong effects of asymptomatic aphids in plant FAA content, when using aphid densities similar (Leroy *et al.*, 2011) or even higher (Chiozza *et al.*, 2010) to our high aphid density. Nevertheless, we have observed a significant interaction of time x density. Therefore, not only the density of infestation is important to define plant amino acid responses, but also the time of exposure.

Generally speaking, most differences between aphid infestation and water stress were quantitative. The most relevant difference was found in the total FAA fold change, which was much higher under water stress than in response to aphid

infestation, mainly due to a huge accumulation of Pro and Hyp. Accordingly, previous publications described a large increase in FAA in response to drought and osmotic stress (Del Amor *et al.*, 2010; Kovács *et al.*, 2012; Ximénez-Embún *et al.*, 2017). In addition, water stress induced a higher accumulation of the BCAA group, Phe, Trp, Arg, Lys, Met, His, Thr, and Ala compared to aphid infestation, but a lower accumulation of Ser and the glutamate group (Glu, Gln, Asp, Asn). The existence of shared traits among both stresses is not unexpected given that they involve overlap and interactions between hormone, redox, nitric oxide, kinase, and calcium signaling pathways (Foyer *et al.*, 2016).

In some cases, aphid infestation has been described to specifically increase the content of EAA, which have relatively low abundance in the phloem sap under unstressed conditions (Douglas, 2003; Guerrieri and Digilio, 2008). This finding has driven the intriguing hypothesis that aphids may manipulate the composition of phloem sap for their own benefit (Sandström *et al.*, 2000; Telang *et al.*, 1999). However, in our study the increase in total FAA content of pepper leaves was mainly due to a rise in EAA, not only in the case of *M. persicae* infestation but also in response to water stress, as also has been described in tomato leaves in response to drought (Ximénez-Embún *et al.*, 2017). Although EAA accumulation may be a consequence of an adaptive manipulation by the aphids, the possibility that it is a general plant response to stress must also be considered. EAA for aphids include amino acids that are precursors for a large array of secondary metabolites with defensive or signalling functions in plants (Häusler *et al.*, 2014; Pratelli and Pilot, 2014; Zeier, 2013).

With regard to individual amino acids that respond to plant stress, Pro has been studied the most extensively. Its accumulation primarily occurs in response to stresses that cause dehydration of the plant tissue and it is commonly used as a biochemical marker of water stress (see Verslues and Sharma (2010) and references therein). The present results show a drastic increase in Pro and its hydroxylated derivative, Hyp, in pepper leaves in response to water stress, as was previously described by Del Amor *et al.* (2010). Hyp also was shown to accumulate along with Pro in oak leaves in response to water stress (Oufir *et al.*, 2009). Interestingly, under

high aphid density, Hyp levels remained unaltered and Pro content showed a significant decrease at 7 dpi. Furthermore, both amino acids peaked at 8 hpi and decreased thereafter. Apart from its role in osmotic adjustment, several functions in stress resistance have been also reported for Pro, including protection of cellular structure during dehydration, redox buffering, storage and transfer of reductants, signaling, and reactive oxygen scavenging (reviewed in Verslues and Sharma, 2010). Moreover, Pro content in plants has been negatively correlated with aphid development in the case of *Aphis gossypii* (Glover) (Mostefaoui *et al.*, 2014) and *M. persicae* (Van Emden and Bashford, 1969). Hyp can be used for the synthesis of Hyp-rich glycoproteins, which are also enriched in other amino acids that accumulated in our study, including Ala, Val, Thr, Lys and Tyr (Mazau *et al.*, 1988). The Hyp-rich glycopeptides systemin has been shown to confer resistance against *Helicoverpa armigera* larvae (Ren and Lu, 2006), and Dardeau *et al.* (2015) suggested the accumulation of Hyp-rich peptides in aphid-infested tissues. The absence of a substantial accumulation of Pro and Hyp under high aphid density at longer times of infestation (from 2 dpi) may be related to a metabolic manipulation of aphids, thus preventing the release of defense signaling pathways. However, this possibility has not been investigated. It is worth mentioning that Ala was the amino acid that increased the most in response to aphid feeding. Although the high fold change observed for this amino acid may be partly due to its low basal level in unstressed conditions, as for Hyp, we cannot rule out an active role in the plant response to aphid infestation. Ala may accumulate as a by-product of the γ -aminobutyric acid shunt, which has been associated with various physiological responses, including defense against insects (Bouché and Fromm, 2004).

Amino acids other than Pro that accumulate upon water or osmotic stress include the BCAA group, the aromatics, and Thr, Lys, Arg, and Met (Bowne *et al.*, 2012; Huang and Jander, 2017; Joshi *et al.*, 2010; Kovács *et al.*, 2012; Witt *et al.*, 2012). Of these, the BCAA showed greater fold changes than the others in response to stress (Huang and Jander, 2017). Their biosynthesis consumes NADPH in the plastids and their catabolism releases reducing agents within the mitochondria, thereby participating in similar redox buffering and energy transfer mechanisms as Pro

(Verslues and Sharma, 2010). However, research with *Arabidopsis* has shown that BCAA accumulate in response to osmotic stress, including water stress, primarily due to protein degradation rather than *de novo* biosynthesis (Huang and Jander, 2017). Other studies have demonstrated accumulation of both BCAA and aromatic amino acids after MeJA treatment (Noge and Tamogami, 2013) and insect feeding (Chiozza *et al.*, 2010; Noge and Tamogami, 2013). Accordingly, in the present study, BCAA and aromatic amino acids are among the most increased amino acids in response to high aphid density and water stress.

Arg accumulation was also induced by water stress and, to a lesser extent, under high aphid density. Arg was described as a compatible solute in yeast under hyperosmotic stress (Xu *et al.*, 2011) and was also shown to accumulate in wheat under osmotic stress (Kovács *et al.*, 2012). Moreover, Arg accumulation may be related to its role as the main precursor of the polyamines putrescine, spermidine, and spermine. Other amino acids that greatly accumulated under stress conditions, especially in the case of high aphid density, were Met and Lys. Met, through its intermediate S-adenosylmethionine, is a precursor for polyamines and ethylene and Lys is the precursor of the diamine cadaverine. Polyamines have been shown to play important roles in plant responses to different abiotic stresses (reviewed in Alcázar *et al.*, 2010). More recently, the participation of plant amines and their biosynthetic enzymes in the response of plants to aphid infestation has also been described (Sempruch *et al.*, 2012).

In contrast to other amino acids, Glu decreased in response to both water stress and aphid infestation. These results are in line with previous publications showing an increase in several amino acids, but not Glu, as a consequence of osmotic stress or phytophagous attack (Chiozza *et al.*, 2010; Kovács *et al.*, 2012; Ximénez-Embún, 2017). Glu metabolism participates in numerous plant processes, including nitrogen assimilation, metabolism and transport, carbon/nitrogen partitioning, and stress-associated metabolism. Under stress conditions, Glu metabolism is used for rapid production of stress-associated metabolites (Galili *et al.*, 2008). Thus, the decrease in Glu content in our study may be explained by its extensive use for the synthesis of the other strongly induced amino acids; mainly

BCAA, aromatic amino acids, and Arg, but also Pro and Hyp in the case of water stress. It is known that, in response to a large variety of abiotic stresses or biotic attacks, plants induce nitrogen remobilization processes in order to translocate and safeguard nutrients in their non-infected tissues (Zhou *et al.*, 2015). In the present study, Gln and Asn increased after aphid feeding, and Gln also increased under water stress. Diverse studies have pointed out the relevance of these two amino acids in plant defense responses. Gln synthase activity was strongly increased in potato plants after aphid infestation (Giordanengo *et al.*, 2010), Gln was shown to play a crucial role in *Arabidopsis* disease resistance (Liu *et al.*, 2010), and Asn synthetase was required for plant nitrogen assimilation and defense against microbial pathogens in pepper plants (Hwang *et al.*, 2011). Moreover, Gln and Asn are major nitrogen- transport compounds in plants (Lam *et al.*, 1996). Interestingly, Gln was the only amino acid showing a significant change at low aphid density throughout the complete period under study. Its accumulation may suggest mobilization of amino acids away from aphids, leading to the significant decrease in total FAA observed at 7 dpi under low aphid density.

In summary, we have shown that the asymptomatic *M. persicae* induces significant changes in the FAA composition of pepper leaves, depending on aphid density and time post-infection. These changes were of a lower magnitude than those observed in response to water stress.

Acknowledgements

This work was supported by Ministerio de Economía y Competitividad, Project CGL2016-79054-R, University of Alicante grant UAFPU2013-5793 to VFO, and United States Department of Agriculture – National Institute of Food and Agriculture award 2016-67013-24756 to GJ. This work is part of the VFO PhD.

References

- Alcázar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, et al. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*. 2010; 231: 1237±1249. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1130-0> PMID: 20221631.
- Arias M, Meichanetzoglou A, Elias M, Rosser N, Lisa de-Silva D, Nay B, et al. Variation in cyanogenic compounds concentration within a *Heliconius* butterfly community: does mimicry explain everything? *BMC Evol Biol*. 2016; 16:272. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0843-5> PMID: 27978820
- Bouché N, Fromm H. GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci*. 2004; 9: 1360-1385.
- Bowne JB, Erwin TA, Juttner J, Schnurbusch T, Langridge P, Bacica A, et al. Drought responses of leaf tissues from wheat cultivars of differing drought tolerance at the metabolite level. *Mol Plant*. 2012; 5: 418-429. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp114> PMID: 22207720.
- Chiozza MV, O'Neal ME, Macintosh GC. Constitutive and induced differential accumulation of amino acid in leaves of susceptible and resistant soybean plants in response to the soybean aphid (Hemiptera: Aphididae). *Environ Entomol*. 2010; 39: 856-864 <https://doi.org/10.1603/EN09338> PMID: 20550799.
- Corcuera LJ. Biochemical basis for the resistance of barley to aphids. *Phytochemistry*. 1993; 33: 741-747.
- Core Team, R. (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Dadd RH. Nutrition: Organisms. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Vol. 4, Regulation: Digestion, Nutrition, Excretion. Pergamon Press, Oxford, 1985; pp. 313-390.
- Dardeau F, Body M, Berthier A, Miard F, Christidès J-P, Feinard-Duranceau M, et al. Effects of fertilisation on amino acid mobilisation by a plant-manipulating insect. *Ecol Entomol*. 2015; 40: 814-822.
- Del Amor FM, Cuadra-Crespo P, Walker DJ, CaÂmara JM, Madrid R. Effect of foliar application of antitranspirant on photosynthesis and water relations of pepper plants under different levels of CO₂ and water stress. *J Plant Physiol*. 2010. 167: 1232-1238. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.04.010> PMID: 20542351
- Douglas AE. The nutritional physiology of aphids. *Adv In Insect Phys*. 2003; 31:73-140.

Capítulo 1

- Eleftherianos I., Vamvatsikos P., Ward D., Gravanis F. Changes in the levels of plant total phenols and free amino acids induced by two cereal aphids and effects on aphid fecundity. *J. Appl. Entomol.* 2006; 130(1), 15-19.
- Foyer CH, Rasool B, Davey JW, Hancock RD. Cross-tolerance to biotic and abiotic stresses in plants: a focus on resistance to aphid infestation. *J Exp Bot.* 2016; 67: 2025-2037. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw079> PMID: 26936830
- Galili S, Amir R, Galili G. Genetic engineering of amino acid metabolism in plants. In: Bohnert H, Nguyen H, Lewis N, editors. *Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology* Vol. 1: Bioengineering and Molecular Biology of Plant Pathways. Elsevier Ltd; 2008, pp. 49-80.
- Giordanengo P, Brunissen L, Rusterucci C, Vincent C, van Bel A, Dinant S, et al. Compatible plant-aphid interactions: How aphids manipulate plant responses. *CR Biol.* 2010; 333: 516-523.
- Guerrieri E, Digilio MC. Aphid-plant interactions: a review. *J Plant Interact.* 2008; 3: 223-232.
- Harder U, Koletzko B, Peissner W. Quantification of 22 plasma amino acids combining derivatization and ion-pair LC±MS/MS. *J Chromatogr B.* 2011; 879: 495-504.
- Häusler RE, Ludewig F, Krueger S. Amino acids±A life between metabolism and signalling. *Plant Sci.* 2014; 229: 225-237. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.09.011> PMID: 25443849.
- Hillwig MS, Chiozza M, Casteel CL, Lau ST, Hohenstein J, Hernaández E, et al. Abscisic acid deficiency increases defence responses against *Myzus persicae* in *Arabidopsis*. *Mol Plant Path.* 2016; 17:225-235.
- Huang T, Jander G. Abscisic acid-regulated protein degradation causes osmotic stress-induced accumulation of branched-chain amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 2017; 246: 737-747. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2727-3> PMID: 28668976.
- Hwang IS, An SH, Hwang BK. Pepper asparagine synthetase 1 (CaAS1) is required for plant nitrogen assimilation and defense responses to microbial pathogens. *Plant J.* 2011; 67: 749-762. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2011.04622.x> PMID: 21535260.
- Joshi J, Joung J-G, Fei Z, Jander G. Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. *Amino Acids.* 2010; 39: 933-947. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0505-7> PMID: 20186554.
- Kovács Z, Simon-Sarkadi L, Ildiko V, Kocsy G. Different accumulation of free amino acids during short and long-term osmotic stress in wheat. *The Scientific World J.* vol, 2012. Article ID 216521, 10 pages. 2012, <https://doi.org/10.1100/2012/216521> PMID: 22919298.

- Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM. The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1996; 47:569-593. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.569> PMID: 15012301.
- Leroy PD, Wathelet B, Sabri A, Francis F, Verheggen FJ, Capella Q, et al. Aphid-host plant interactions: does aphid honeydew exactly reflect the host plant amino acid composition? *Arthropod Plant Interact.* 2011; 5:193-199.
- Liu G, Ji Y, Bhuiyan N H, Pilot G, Selvaraj G, Zou J, Wei Y. Amino acid homeostasis modulates salicylic acid-associated redox status and defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2010; 22: 3845-3863. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.079392> PMID: 210977127.
- Mazau D., Rumeau D., Esquerre-Tugaye M-T. Two different families of hydroxyproline-rich glycoproteins in melon callus. *Plant Physiol.* 1988; 86: 540-546. PMID: 16665943
- Mostefaoui H, Allal-Benfekih L, Djazouli ZE, Petit D, Saladin G. Why the aphid *Aphis spiraecola* is more abundant on clementine tree than *Aphis gossypii*? *CR Biol.* 2014; 337: 123-133.
- Noge K, Tamogami S. Herbivore-induced phenylacetonitrile is biosynthesized from de novo-synthesized L-phenylalanine in the giant knotweed, *Fallopia sachalinensis*. *FEBS Lett.* 2013; 587: 1811-1817. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.04.038> PMID: 23673319.
- Oufir M, Schulz N, Vallikhan PSS, Wilhelm E, Burg K, Hausman JF, et al. Simultaneous measurement of proline and related compounds in oak leaves by high-performance ligand-exchange chromatography and electrospray ionization mass spectrometry for environmental stress studies. *J Chromatogr A.* 2009; 1216: 1094-1099 <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.12.030> PMID: 19135675.
- Parra NP, Yang Y, Zang L. Quantitative analysis of underivatized glutamine, glutamic acid, asparagine, and aspartic acid in cell media using Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS. Agilent application note publication 5991-0904EN. 2013.
- Pratelli R, Pilot G. Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *J Exp Bot.* 2014; 65: 5535-5556. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru320> PMID: 25114014.
- Rahbé Y, Sauvion N, Febvay G, Peumans WJ, Gatehouse AMR. Toxicity of lectins and processing of ingested proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Entomol Exp Appl.* 1995; 76: 143-155.
- Rai VK. Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biol. Plant.* 2002. 45:481-487.
- Ren F, Lu YT. Overexpression of tobacco hydroxyproline-rich glycopeptides systemin precursor A gene in transgenic tobacco enhances resistance against *Helicoverpa armigera* larvae. *Plant Sci.* 2006; 171: 286-292.

Capítulo 1

- Riedell WE. Effects of Russian wheat aphid infestation on barley plant response to drought stress. *Physiol Plant*. 1989; 77: 87-92.
- Sandström J, Telang A, Moran NA. Nutritional enhancement of host plants by aphids. A comparison of three aphid species on grasses. *J Insect Physiol*. 2000; 46: 33-40. PMID: 12770256.
- Sato D, Akashi H, Sugimoto M, Tomita M, Soga T. Metabolomic profiling of the response of susceptible and resistant soybean strains to foxglove aphid, *Aulacorthum solani* Kaltentbach. *J Chromatogr B*. 2013; 925: 95-103.
- Sempruch C, Horbowicz M, Kosson R, Leszczynski B. Biochemical interactions between triticale (*Triticosecale*; Poaceae) amines and bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi*; Aphididae). *Biochem Syst Ecol*. 2012; 40: 162-168.
- Suzuki DK, Fukushi Y, Akimoto S. Do aphid galls provide good nutrients for the aphids?: Comparisons of amino acid concentrations in galls among *Tetraneura* species (Aphididae: Eriosomatinae). *Arthropod Plant Interact*. 2009; 3: 241-247.
- Telang A, Sandström J, Dyreson E, Moran NA. Feeding damage by *Diuraphis noxia* results in a nutritionally enhanced phloem diet. *Entomol Exp Appl*. 1999; 91: 403-412.
- Van Emden HF, Bashford MA. A comparison of the reproduction of *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae* in relation to soluble nitrogen concentration and leaf age (leaf position) in the Brussels sprout plant. *Entomol Exp Appl*. 1969; 12, 351-364.
- Verslues PE, Sharma S. Proline metabolism and its implications for plant environment interaction. *The Arabidopsis Book*. 2010; 8, e0140. <https://doi.org/10.1199/tab.0140> PMID: 22303265.
- Weibull J, Ronquist F, Brishammar S. Free amino acid composition of leaf exudates and phloem sap: a comparative study in oats and barley. 1990. *Plant Physiol*. 92: 222-226. PMID: 16667250.
- Witt S, Galicia L, Lisek J, Cairns J, Tiessen A, Araus JL, et al. Metabolic and phenotypic responses of greenhouse-grown maize hybrids to experimentally controlled drought stress. *Mol Plant*. 2012; 5: 401-417. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr102> PMID: 22180467.
- Ximénez-Embún MG, Castañera P, Ortego F. Drought stress in tomato increases the performance of adapted and non-adapted strains of *Tetranychus urticae*. *J Insect Physiol*. 2017; 96: 73-81 <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.10.015> PMID: 27789296
- Xu S, Zhou J, Liu L, Chen J. Arginine: A novel compatible solute to protect *Candida glabrata* against hyperosmotic stress. *Process Biochem*. 2011; 46: 1230-1235.

Zeier J. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant Cell Environ.* 2013. 36: 2085-2103 <https://doi.org/10.1111/pce.12122> PMID: 23611692.

Zhou S, Lou YR, Tzin V, Jander G. Alteration of plant primary metabolism in response to insect herbivory. *Plant Physiol.* 2015; 169: 1488-1498. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01405> PMID: 26378101



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

S1 Table. Triple quadrupole MRM acquisition method parameters.

Compound name	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragmentor (V)	CE (V)
Alanine	0.521	90.09	44.05	380	10
			42	380	10
Arginine	1.538	175.2	70	380	16
			60.06	380	25
Asparagine	0.424	133.1	87.1	380	4
			74.1	380	10
Aspartate	0.442	134.1	88	380	5
			74	380	10
Cysteine	0.509	122	76	380	25
			59	380	25
Cystine	0.484	241	151.9	380	4
			195	380	4
Glycine	0.447	76.07	51.7	380	4
			29.9	380	30
Glutamate	0.8	148.1	130.1	380	4
			84.1	380	15
Glutamine	0.450	147.1	130.1	380	15
			84.1	380	5
Hydroxyproline	0.434	132	85.9	380	4
			68	380	4
Histidine	0.822	156.1	109.9	380	25
			93.04	380	25
Isoleucine	4.224	132.2	69.1	380	4
			56.9	380	20
Leucine	4.289	132.2	86.1	380	4
			54.9	380	20
Lysine	0.9	146.9	130.08	380	25
			83.9	380	25
Methionine	2.5	150.2	104.05	380	25
			56.05	380	25
Phenylalanine	4.5	166.2	119.9	380	25
			103.06	380	25
Proline	0.641	116.1	70	380	25
			68.05	380	25
Serine	0.436	106.1	88.04	380	15
			60.05	380	25
Threonine	0.491	120.1	74.01	380	20
			56.01	380	20
Tryptophan	4.843	205.2	188	380	4
			146	380	16
Tyrosine	4.089	182	136	380	10
			91	380	20
Valine	2.110	118.1	72	380	25
			55.06	380	25

Quantifier transitions are marked in bold.

S2 Table. Contribution (%) by dimension of each amino acid in FAMD by time and density of aphid infestation.

	Dim.1	Dim.2	Dim.3	Dim.4	Dim.5
Alanine	6.131	0.400	0.289	0.309	0.031
Arginine	6.195	0.560	0.106	0.07	0.002
Asparagine	5.873	0.767	0.107	0.843	0.465
Aspartate	0.061	4.832	35.390	0.999	1.595
Glutamate	2.178	22.200	0.038	0.544	0.129
Glutamine	4.206	9.252	0.096	0.246	2.574
Hydroxyproline	3.289	3.199	8.876	0.130	7.265
Histidine	4.953	0.139	4.063	2.611	0.348
Isoleucine	6.164	0.696	0.076	0.030	0.077
Leucine	6.142	0.988	0.037	0.010	0.014
Lysine	6.186	0.600	0.008	0.006	0.001
Methionine	5.939	0.692	0.344	0.043	0.123
Phenylalanine	6.215	0.487	0.158	0.001	0.008
Proline	2.889	12.904	2.965	2.135	0.229
Serine	3.387	11.832	0.023	6.011	0.011
Threonine	6.244	0.017	0.275	0.096	0.229
Tryptophan	5.823	0.320	1.146	0.618	0.012
Tyrosine	6.144	0.829	0.138	0.002	0.033
Valine	6.246	0.398	0.098	0.038	0.002
Density	4.707	1.053	2.150	0.012	1.718
Time	1.028	27.874	43.617	85.245	85.133

{Density Levels = High and low aphid densities;
Time levels = 3 hpi, 8 hpi, 1 dpi, 2 dpi, 4 dpi and 7 dpi}

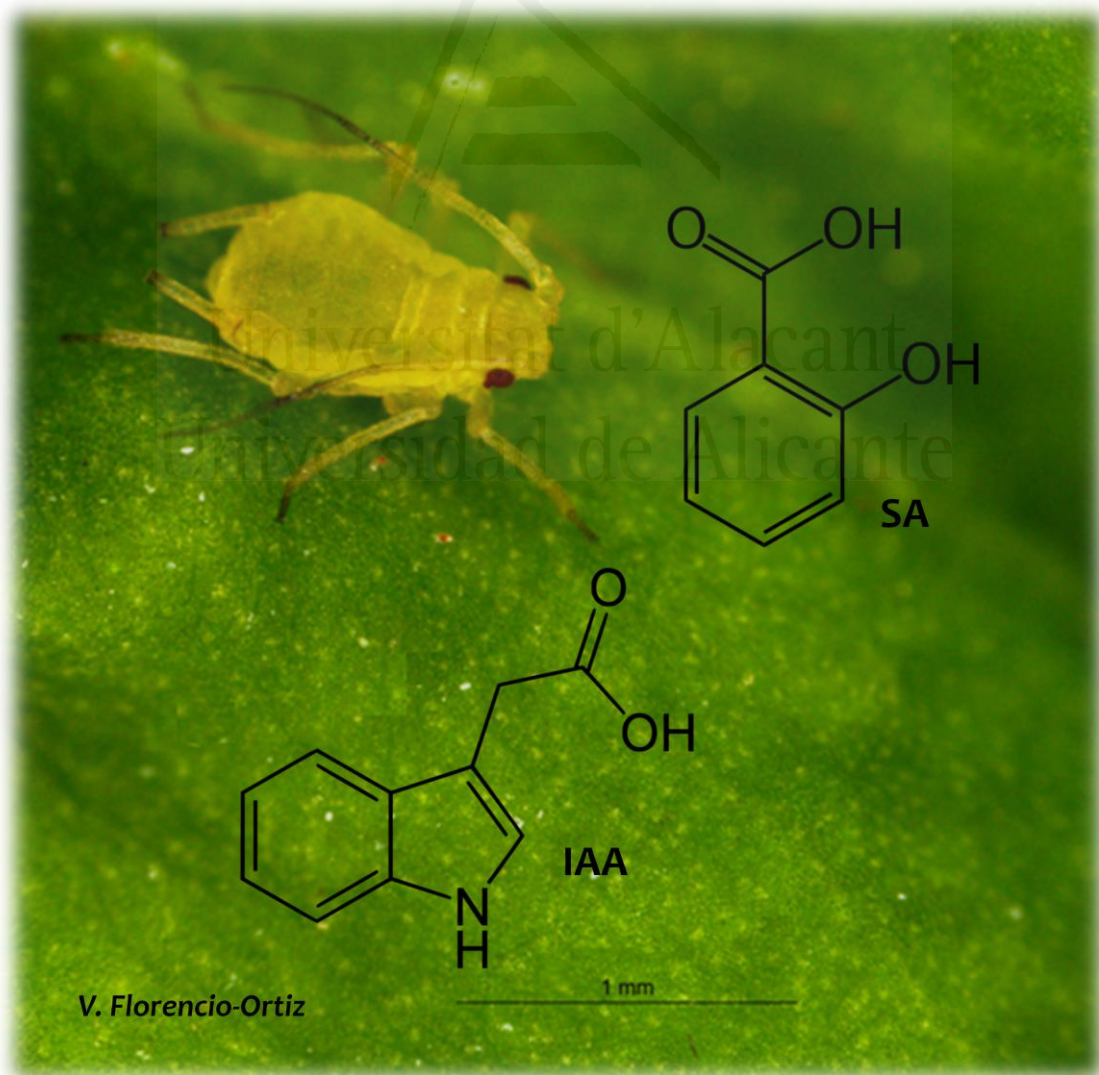
S3 Table. Contribution (%) by dimension of each amino acid in FAMD by treatment.

	Dim.1	Dim.2	Dim.3	Dim.4	Dim.5
Alanine	4.906	4.109	0.444	1.141	28.944
Arginine	5.848	0.0625	0.045	0.178	3.120
Asparagine	0.455	23.923	0.213	1.147	1.172
Aspartate	4.243	6.741	19.228	2.278	0.226
Glutamate	4.180	6.598	68.296	4.035	1.918
Glutamine	2.530	14.561	5.542	9.173	13.346
Hydroxyproline	5.676	0.843	0.272	0.096	0.344
Histidine	5.821	0.173	0.378	1.354	0.324
Isoleucine	5.855	0.007	0.239	1.470	4.949
Leucine	5.811	0.245	0.010	0.354	0.051
Lysine	5.711	0.592	3.764	1.202	3.852
Methionine	5.690	0.699	0.015	1.947	4.911
Phenylalanine	5.863	0.005	0.318	0.144	2.403
Proline	5.634	0.971	0.168	1.334	9.059
Serine	2.897	13.041	0.151	5.476	10.593
Threonine	5.664	0.756	0.075	10.061	5.890
Tryptophan	5.801	0.288	0.022	0.00002	0.754
Tyrosine	5.692	7.152	0.247	2.091	0.507
Valine	5.863	5.332	0.002	1.363	0.916
Treatment	5.859	2.567	0.570	3.410	6.721

{Treatment levels = High aphid density, low aphid density, and water constraint}

CAPÍTULO 2

Local and systemic hormonal responses in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves under green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) infestation



Florencio-Ortiz V, Novák O, Casas JL. 2018. Local and systemic hormonal responses in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves under green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) infestation. *Journal of Plant Physiology* 231: 356–363.

doi: 10.1016/j.jplph.2018.10.015.

Abstract

This study examined the temporal changes in the leaf content of defence-involved phytohormones in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants responding to the green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) infestation, at both local and systemic level. Aphid infestation did not alter the content of cis-12-oxo-phytodienoic acid, the jasmonic acid (JA) precursor, even though endogenous levels of JA and its bioactive isoleucine-conjugated form (JA-Ile) significantly increased from 8 to 96 hours in local infested leaves. Systemic effects in jasmonates were only showed at 48 hours for JA, and 8 and 48 hours in the case of JA-Ile. SA accumulated only in local infested leaves after 96 hours of infestation, when the level of JA-Ile decreased in these leaves. This suggests a possible antagonistic interaction between JA and SA pathways, although other pathways may be also involved. Endogenous level of indole-3-acetic acid was higher in systemic relative to local infested leaves at 3 and 24 hours, although no significant changes in its content were found compared to control leaves. Abscisic acid content was lower in local infested relative to control leaves at 24 hours, but was higher at 48 hours when it also increased systemically. The possible roles of the studied phytohormones in plant defence responses against aphids are discussed.

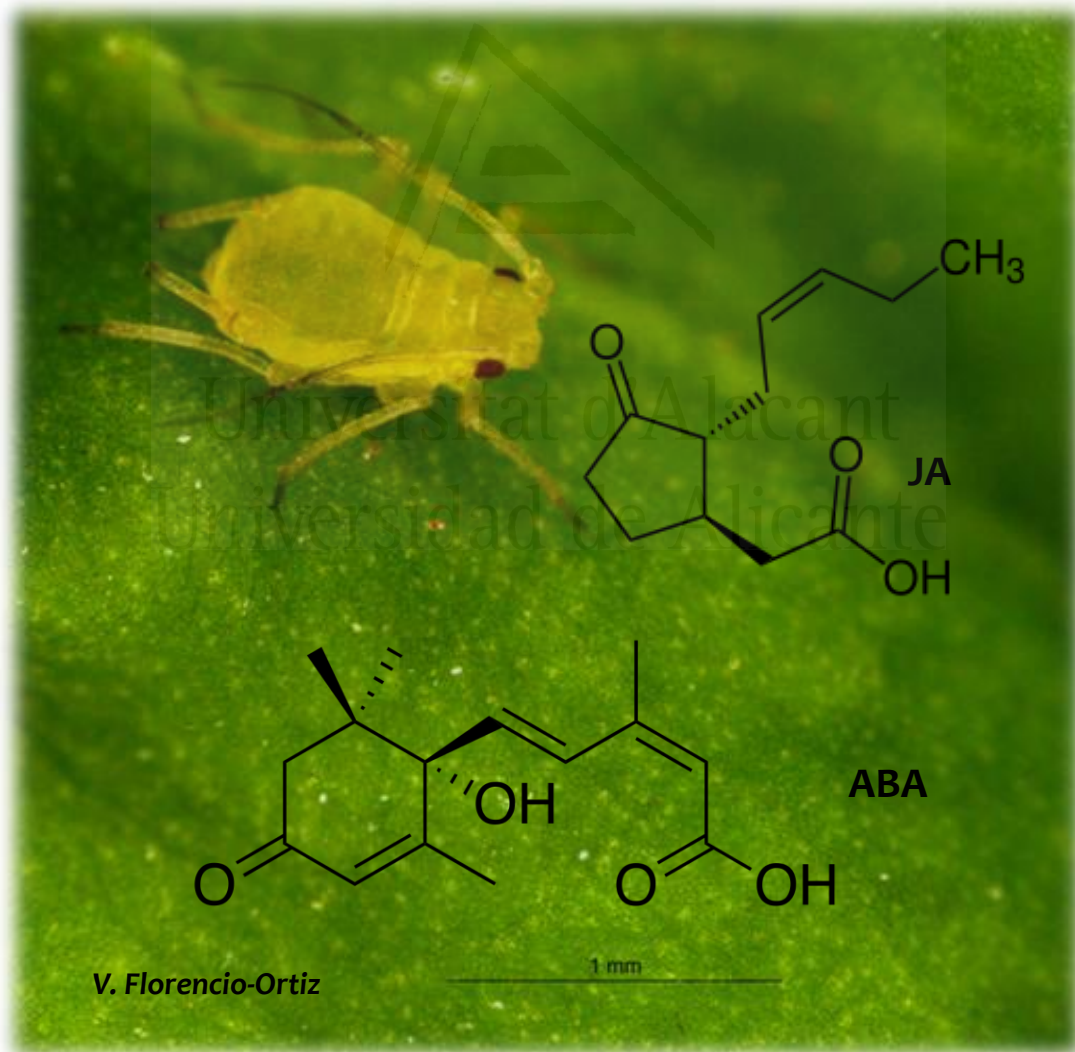
SECCIÓN III:
TRABAJOS NO PUBLICADOS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

CAPÍTULO 3

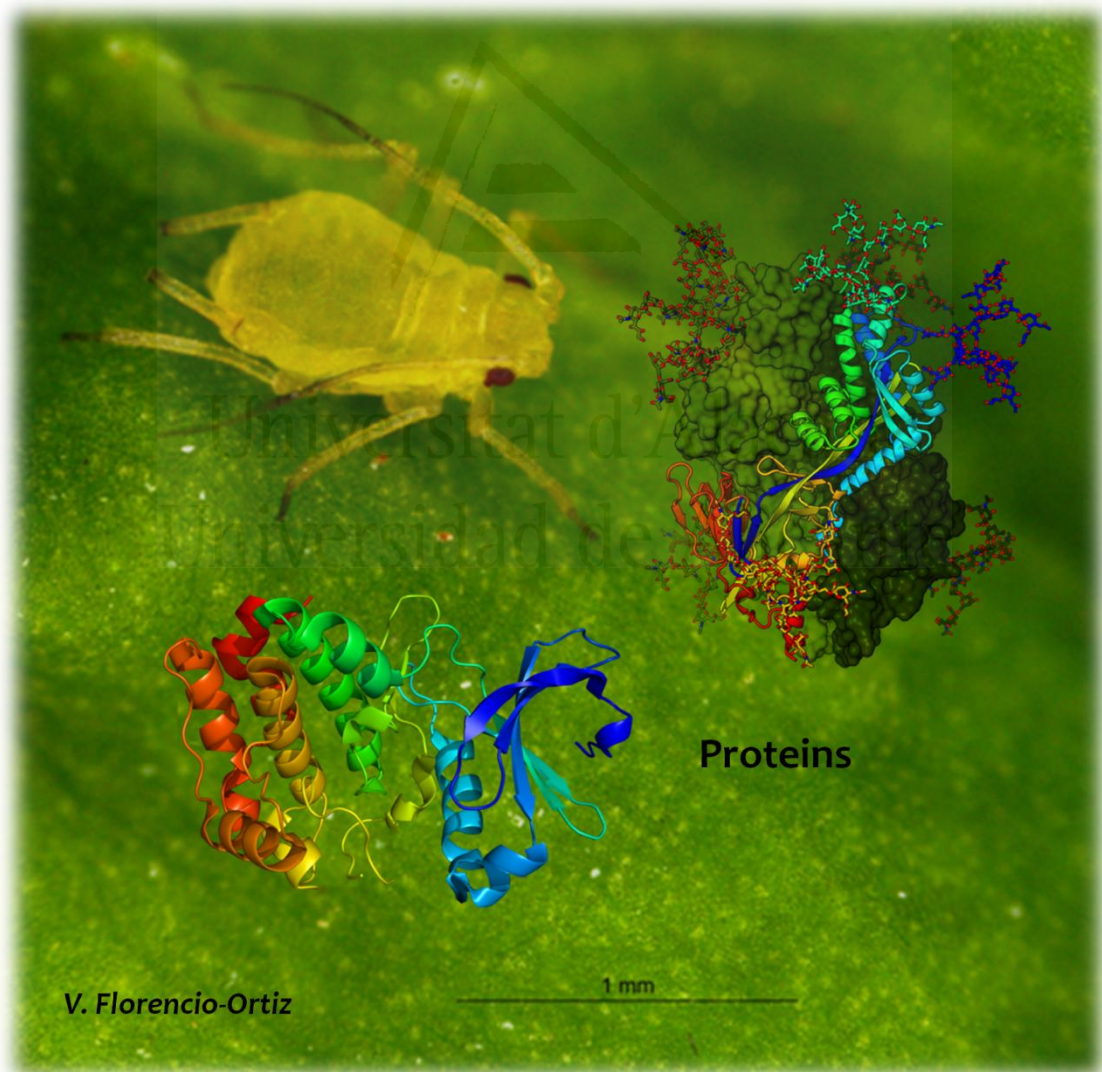
Phytohormone responses in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves under a high density of aphid infestation



Manuscript in preparation

CAPÍTULO 4

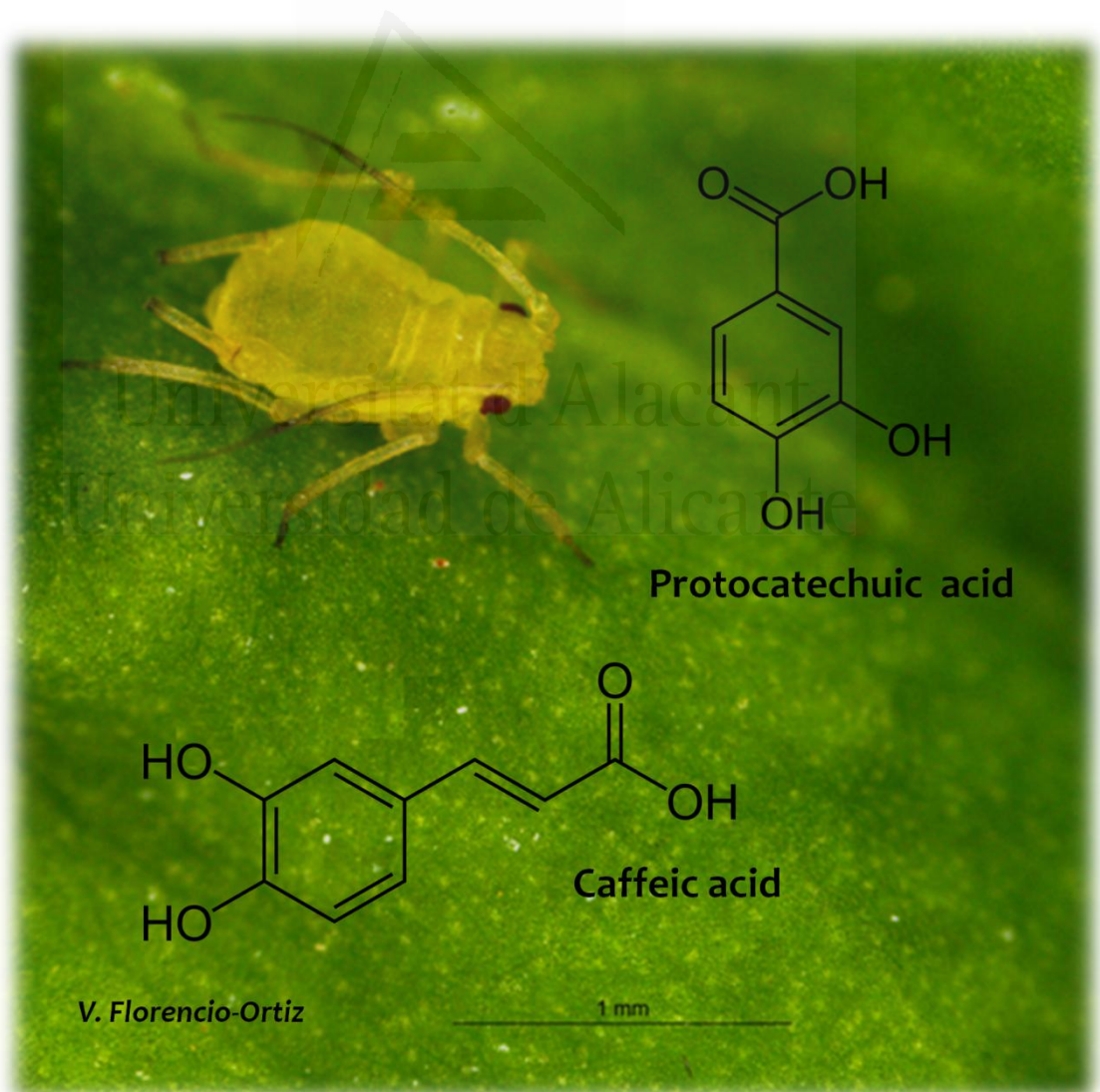
Proteome changes in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves induced by the green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer)



Manuscript sent to *Journal of Proteome Research*

CAPÍTULO 5

Changes in the free phenolic acid
composition of pepper (*Capsicum annuum* L.)
leaves in response to green peach aphid
(*Myzus persicae* Sulzer) infestation



Manuscript in preparation

SECCIÓ IV



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

CONCLUSIONES

Esta Tesis Doctoral constituye un avance en la comprensión de las respuestas de las plantas frente a pulgones en un cultivo agrícola de gran importancia como es el pimiento.

Las **conclusiones derivadas de esta Tesis Doctoral** son las siguientes:

1. Diferentes análisis fitoquímicos, incluyendo hormonas involucradas en las rutas de señalización que controlan el crecimiento y las respuestas de defensa de las plantas, el estudio proteómico a gran escala, y el análisis de metabolitos primarios (aminoácidos) y secundarios (ácidos fenólicos), han demostrado que el pulgón verde del melocotonero *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) a una baja densidad de infestación permanece sin ser detectado o no desencadena una respuesta de gran magnitud en las plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). (Conclusión general).

2. *M. persicae* induce cambios significativos en la composición de aminoácidos libres de las hojas de pimiento, dependiendo tanto de la densidad de infestación como del tiempo post-infestación. (Capítulo 1).

3. Mientras que a alta densidad *M. persicae* produce un gran incremento en el contenido total de aminoácidos libres, a baja densidad el contenido de

aminoácidos libres disminuye considerablemente a los 7 días post-infestación. (Capítulo 1).

4. El aumento en el contenido total de aminoácidos libres se debe principalmente a un incremento en los aminoácidos esenciales. En términos cuantitativos, los aminoácidos con mayor incremento en su contenido son los aromáticos fenilalanina y tirosina, los aminoácidos de cadena ramificada, valina, leucina e isoleucina, y un grupo formado por alanina, arginina, lisina, metionina y treonina. (Capítulo 1).

5. El análisis de fitohormonas ha demostrado que la mayor parte de las respuestas ocurren a nivel local. (Capítulo 2).

6. Las vías de señalización del ácido jasmónico y el ácido salicílico están ambas involucradas en las respuestas moleculares del pimiento a *M. persicae*. (Capítulo 2 y 3).

7. La ruta de señalización del ácido jasmónico responde más rápidamente y con una mayor magnitud que la del ácido salicílico, la cual se induce sólo en las últimas etapas de la infestación. (Capítulo 2 y 3).

8. Los niveles endógenos del ácido indolacético no se alteran significativamente en las plantas de pimiento en respuesta al pulgón, incluso bajo una elevada densidad de infestación. (Capítulo 3).

9. Las plantas de pimiento infestadas con una alta densidad de pulgón muestran una reducción en la longitud del tallo, el número de hojas y el ancho de la hoja a los 7 días post-infestación. (Capítulo 3).

10. El análisis proteómico ha revelado un patrón general en las respuestas de las proteínas de las hojas de pimiento al ataque del pulgón, según el cual la expresión de la mayor parte de las proteínas aumenta a tiempos cortos pero disminuye con el progreso de la infestación. (Capítulo 4).

11. El pobre solapamiento observado entre las proteínas con expresión diferencial a diferentes tiempos de infestación indica que la mayoría de las proteínas se regulan solo de forma transitoria. (Capítulo 4).

12. Un elevado número (46,8%) de las proteínas con expresión diferencial son cloroplásticas, lo que subraya la relevancia de este orgánulo en la respuesta de la planta a los pulgones. (Capítulo 4).

13. La mayoría de los cambios se producen en proteínas que son necesarias para el funcionamiento de la planta en condiciones normales, incluyendo proteínas involucradas en fotosíntesis y fotorrespiración, metabolismo de aminoácidos y carbohidratos, traducción, y plegamiento y degradación de proteínas. Sin embargo, el número de proteínas directamente involucradas en la defensa de la planta es bajo y su expresión está mayoritariamente reprimida en respuesta al ataque del pulgón. (Capítulo 4).

14. El análisis de los ácidos fenólicos libres ha revelado que una alta densidad de infestación por pulgón induce la alteración en el contenido de todos los ácidos fenólicos libres analizados en algún momento de la infestación, con excepción del ácido clorogénico. (Capítulo 5).

15. Los ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, cafeico, p-cumárico y sinápico aumentan su contenido en las hojas de pimiento a tiempos cortos de infestación (1 día) pero disminuyen por debajo del control (excepto el ácido sinápico) a tiempos más largos. (Capítulo 5).

16. Los ácidos protocatéquico y salicílico muestran un patrón de variación opuesto en las hojas de pimiento en respuesta al pulgón. (Capítulo 5).



CONCLUSIONS

This PhD Thesis provides insights in the understanding of the plant responses to aphids using a very valuable Mediterranean crop as pepper.

The **conclusions derived from this PhD Thesis** are the following:

1. Different phytochemical analysis, including hormones involved in signaling pathways that control plant growth and defence responses, a large-scale proteomic study and the analysis of primary (amino acids) and secondary (phenolic acids) metabolites have revealed that the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) at low aphid density either remain undetected or do not trigger a strong response in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. (General conclusion).

2. *M. persicae* induces significant changes in the free amino acid composition of pepper leaves, depending on both aphid density and time post-infestation (Chapter 1).

Conclusiones

3. Whereas at high density *M. persicae* produces a large increase in total free amino acid content, at low density the free amino acid content significantly decreases at 7 days post-infestation. (Chapter 1).

4. The increase in the total free amino acid content is mainly due to an increase in essential rather than in non-essential amino acids. In quantitative terms, major responses are found in the aromatic amino acids phenylalanine and tyrosine, the branched-chain amino acids, valine, leucine and isoleucine, and a miscellaneous group with alanine, lysine, methionine and threonine. (Chapter 1).

5. Phytohormone analysis has shown that most responses occur at local level (Chapter 2).

6. Both jasmonic and salicylic acid signaling pathways are involved in the molecular responses of pepper to *M. persicae*. (Chapter 2 and 3).

7. The jasmonic acid signaling pathway responds faster and strongly whereas the salicylic acid signaling pathway is induced only at late stages of infestation. (Chapter 2 and 3).

8. Endogenous levels of indoleacetic acid are not significantly changed in pepper plants in response to aphids even under high density of infestation. (Chapter 3).

9. Pepper plants infested with a high density of aphids show reduction in stem length, number of leaves and leaf width at 7 days post-infestation. (Chapter 3).

10. Proteomic analysis has revealed a general pattern of pepper proteomic responses to *M. persicae* with most proteins being upregulated at short times but downregulated as infestation progress. (Chapter 4).

11. The poor overlapping observed between the differentially expressed proteins at each time point of infestation indicates that most of these proteins are only transiently regulated. (Chapter 4).

12. A large amount (46.8%) of the regulated proteins are chloroplastic, which highlights the relevance of this organelle in the plant response to aphids. (Chapter 4).

13. Most changes are produced in proteins that are critical for functioning under normal conditions, including proteins involved in photosynthesis and photorespiration, amino acid and carbohydrate metabolism, translation and protein folding and degradation. However, proteins directly involved in defense are scarce and are mostly downregulated in response to aphids. (Chapter 4).

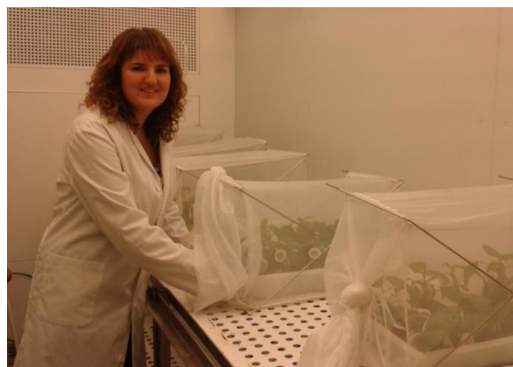
14. Analysis of free phenolic acids has revealed that a high density of aphid infestation induce the alteration of all free phenolic acids, but not chlorogenic acid, at some time of the infestation. (Chapter 5).

15. Gallic, p-hydroxybenzoic, caffeic, p-coumaric and sinapic acids increase their content in pepper leaves at short times (1 day) post-infestation but decrease below controls (with the exception of sinapic acid) at longer times. (Chapter 5).

16. An opposite pattern of variation has been shown between protocatechuic and salicylic acid in response to aphids. (Chapter 5).

Curriculum Vitae

Victoria Florencio-Ortiz was born on May 4th 1988 in Alicante (Spain). She started her degree in Biology at the *University of Alicante* in 2006. In 2009 she moved to the second degree in Biotechnology at the *University Rovira i Virgili* (Tarragona, Spain). She did her Bachelor's Degree Final Project at the *Mechanisms of Abiotic Stress Tolerance in Plants* Group in the



Institute for Plant Molecular and Cell Biology (IBMCP, UPV-CSIC) in Valencia (Spain), from March to June 2011, under the supervision of Dr. Óscar Vicente Meana. In July 2011 she graduated obtaining the *Bsc. in Biotechnology*. In September 2011, she started a Master's Degree in Biodiversity and Conservation at the *University of Alicante*. In July 2012 she graduated obtaining the *Msc. in Biodiversity and Conservation* with an Extraordinary Master Award.

In July 2012 she got a 6-months research fellowship of the Generalitat Valenciana Programme Gerónimo Forteza at the *Molecular Neurogenetics* Group of the *Institute of Neuroscience* (UMH-CSIC, Alicante), under the supervision of Dr. Francisco J. Tejedor Rescalvo. After that, she was granted with a 1-year research fellowship by the *University Miguel Hernández* (UMH, Alicante) at the aforementioned research group.

In September 2013 she was granted with a 3-years predoctoral fellowship by the *University of Alicante* and she started her PhD in the *University Centre CIBIO* (*Centro Iberoamericano de la Biodiversidad*), under the supervision of Dr. José Luis Casas Martínez. Starting in April 2015, she did a research stay for 3 months at the *Biotic Interactions* Group in the *Boyce Thompson Institute for Plant Research* (Ithaca, New York, USA), under the supervision of Dr. Georg Jander. Also, starting in April 2016 she did a 3-months research stay at the *Laboratory of Growth Regulators* in the *Palaky University Olomouc & Institute of Experimental Botany AS CR* (Olomouc, Czech Republic), under the supervision of Dr. Ondřej Novák. All her research work during these stays is included in this PhD Thesis.

Starting in April 2017 she worked in the collaborative project “Evaluation of the insecticide activity of different botanical extracts on insect pests of agricultural relevance” between CIBIO and the company *Atlántica Agrícola* (Villena, Alicante). From February 2018 to present, she has been working at CIBIO as a technician in the project “Global analysis of multitrophic interactions in greenhouse horticultural systems. Application to integrated pest control”.

List of Publications

- Soppa U, Schumacher J, **Florencio-Ortiz V**, Pasqualon T, Tejedor FJ, Becker W. 2014. The Down syndrome-related protein kinase DYRK1A phosphorylates p27Kip1 and Cyclin D1 and induces cell cycle exit and neuronal differentiation. *Cell Cycle*. 13 (13) 2084–2100.
- **Florencio-Ortiz V**, Sellés-Marchart S, Zubcoff-Vallejo J, Jander G, Casas JL. 2018. Changes in the free amino acid composition of *Capsicum annuum* (pepper) leaves in response to *Myzus persicae* (green peach aphid) infestation. A comparison with water stress. *PLoS ONE* 13(6): e0198093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198093>.
- **Florencio-Ortiz V**, Novák O, Casas JL. 2018. Local and systemic hormonal responses in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves under green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) infestation. *Journal of Plant Physiology* 231: 356–363.

Congress Presentations

1. Title: HPLC-MS-based proteomics: a promising approach to study the responses of pepper (*Capsicum annuum* L.) to the aphid pest *Myzus persicae* (Sulzer, 1776)
Authors: **V Florencio Ortiz**, MA Marcos-García, JL Casas
Name of the conference: XVI Congreso Ibérico de Entomología
Type of event: Poster presentation Field of the conference: International
City of the publishing body: Badajoz (España) Date of the event: 02-04/10/2014
2. Title: Jasmonate and salicylate accumulation in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves induced by aphid (*Myzus persicae* Sulzer) infestation. A local or systemic response?
Authors: **V Florencio-Ortiz**, O Novák, JL Casas
Name of the conference: 34th Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology (ISCE)
Type of event: Poster presentation Field of the conference: International
City of the publishing body: Budapest (Hungary) Date of the event: 12-18/08/2018.
3. Title: Volatilome of salivary glands of the hoverfly *Sphaerophoria rueppellii* larvae (Diptera: Syrphidae)
Authors: **V Florencio-Ortiz**, MA Marcos-García, R Amorós-Jiménez, JL Casas
Name of the conference: 14th meeting of the IOBC-WPRS Working Group
Type of event: Oral presentation Field of the conference: International
City of the publishing body: Lisboa (Portugal) Date of the event: 04-07/09/2018.