



Identificación de posibles factores de *Myzus persicae* implicados en la transmisión del virus del grabado del tabaco (TEV) y estrategias para interferir su expresión

María Urizarna España

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

CENTRE DE RECERCA EN AGRIGENÒMICA (CRAG)
DEPARTAMENTO GENÉTICA MOLECULAR

IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES FACTORES DE MYZUS PERSICAE
IMPLICADOS EN LA TRANSMISIÓN DEL VIRUS DEL GRABADO DEL
TABACO (TEV) Y ESTRATEGIAS PARA INTERFERIR SU EXPRESIÓN

MARÍA URIZARNA ESPAÑA
2012

RESULTADOS

RESULTADOS

1. INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA ENTRE EL FACTOR DE TRANSMISIÓN DE TEV Y UN POSIBLE RECEPTOR DEL PULGÓN

El potyvirus TEV ha sido ampliamente utilizado como virus modelo para el estudio de la transmisión por pulgones, y en concreto disponemos en el laboratorio de una variante transmisible denominada TEV-HCH10 (Blanc *et al.*, 1999). La proteína HCPro de esta variante se puede purificar de forma sencilla gracias a que se ha modificado con la adición de seis residuos histidina en el extremo amino terminal, a pesar de lo cual sigue siendo funcionalmente activa: los niveles de transmisión de planta a planta obtenidos en el laboratorio con la variante TEV-HCH10 son del 30% aproximadamente, en el mismo rango que otros aislados no modificados de TEV.

Comenzando con el potencial candidato a receptor en el pulgón identificado y clonado en el laboratorio (Fernandez-Calvino *et al.*, 2010), se planteó estudiar en profundidad y mediante distintas aproximaciones la interacción de este factor derivado del pulgón con HCPro de TEV, al mismo tiempo que la interacción esperable entre la CP de TEV y su HCPro, tal y como se predice en la hipótesis del puente (Govier and Kassanis, 1974a). Para ello se sobreexpresaron mediante sistemas diferentes las tres proteínas implicadas: CP de TEV, MpRPS2 (posible receptor candidato) y HCPro de TEV, para posteriores ensayos de interacción proteína- proteína.

1.1.- SOBREEXPRESIÓN DE CP DE TEV Y PRODUCCIÓN DE ANTISUERO CONTRA LA MISMA.

1.1.1.- Obtención de la CP de TEV por sobreexpresión en bacteria.

Los sistemas que emplean proteínas de fusión son una alternativa para expresar proteínas con alto rendimiento, siendo apropiados además por permitir aplicar esquemas de purificación simples. En estos sistemas, la purificación, detección y seguimiento durante el proceso productivo son relativamente sencillos debido a la expresión de péptidos, polipéptidos o proteínas fusionados a la proteína recombinante

de interés en el extremo N o C terminal. Las proteínas de fusión usadas en este trabajo fueron: la glutatión-S-transferasa (GST) y la proteína de unión a la maltosa (MBP).

Los vectores pGEX expresan la proteína glutatión S- transferasa fusionada a la proteína de interés por la parte N- terminal, facilitando su purificación y estabilizando a la vez el plegamiento adecuado de las proteínas, además, con el uso alternativo de la proteasa trombina se puede lograr la separación de ambas proteínas.

Los vectores pMAL proporcionan un método para expresar fusiones en el extremo N-terminal del gen malE, que codifica para la proteína de unión a maltosa . El método produce una alta expresión y permite la purificación usando la afinidad de la MBP por la maltosa, además de tener un sitio de corte para el factor Xa que separa la unión entre la proteína de fusión y la de interés.

Los resultados obtenidos con las proteína CP de TEV clonada en el vector plasmídico pGEX-4T-1 son los que se muestran a continuación, además del paso posterior que tiene como objetivo separar la proteína de interés de la GST aprovechando el sitio para digestión con trombina.

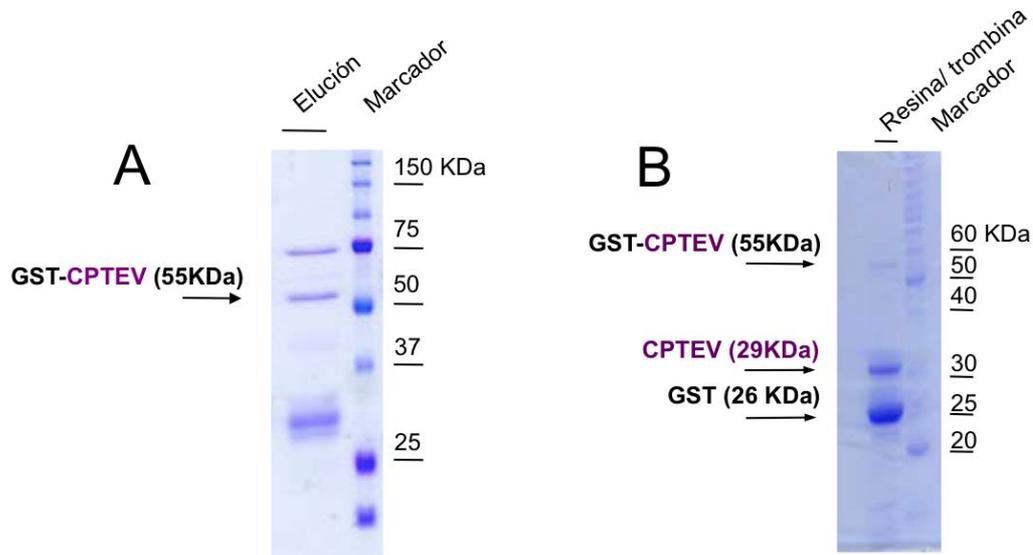


Figura 13. En el panel A se muestra el análisis SDS-PAGE con tinción de Coomassie de una muestra de fracción de elución de la proteína de fusión GST-CPTEV; la flecha señala la banda correspondientes al producto de fusión. Encima de ésta se aprecia la presencia de otras bandas proteicas no relacionadas. En el panel B se muestra la digestión con trombina de la proteína retenida en la resina, mostrándose mayoritariamente en la muestra de la resina a la altura esperada la GST libre, así como la proteína de interés aislada y restos de la proteína de fusión no digerida

Los resultados obtenidos para la proteína de fusión MBP-CPTEV con las construcciones disponibles se muestran a continuación:

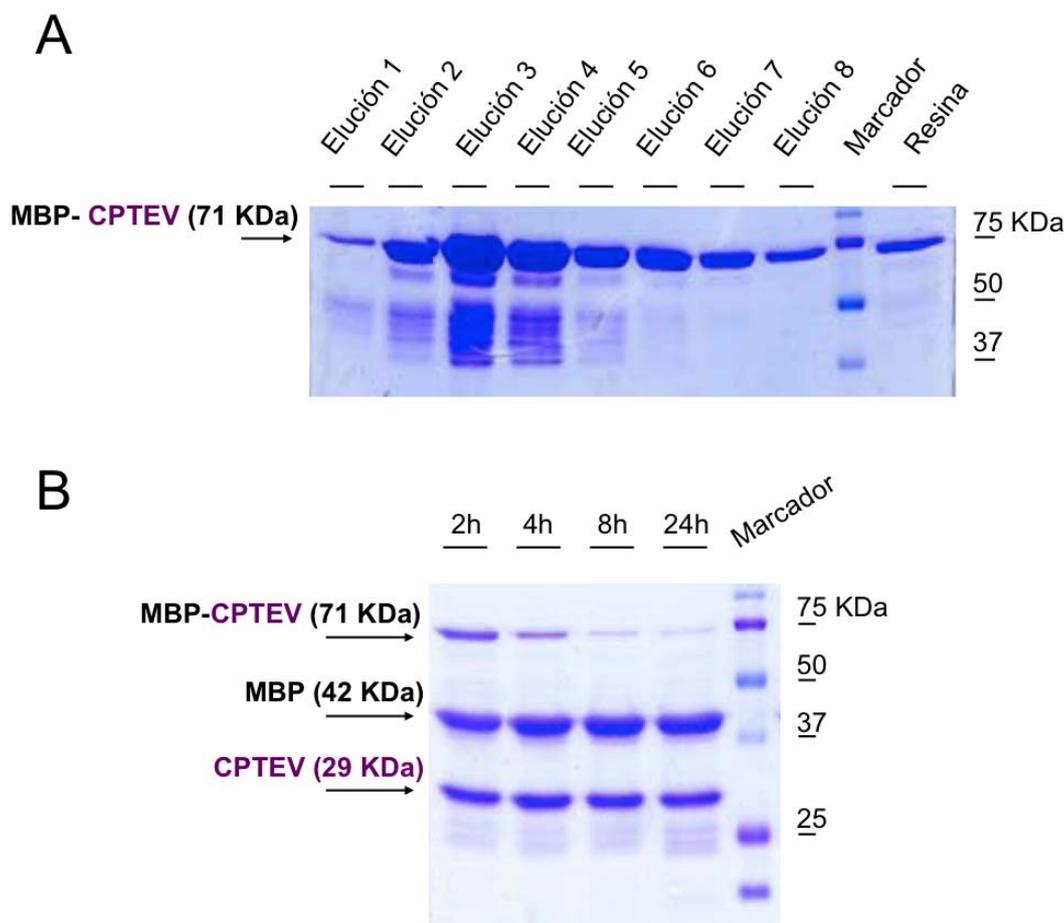


Figura 14. En la imagen superior (A) se muestra el **análisis mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie de las fracciones de eluciones de las proteínas de fusión MBP-CPTEV** a la altura esperada correspondiente a 71 KDa (42KDa de la MBP más 29 KDa de la CP de TEV). En el panel B se muestra el análisis de la digestión con el factor Xa a diferentes tiempos de incubación con el fin de comprobar la eficiencia de la actividad de esta enzima. Con flechas se señalan las dos proteínas libres y la proteína de fusión restante después del proceso de digestión.

Tal y como se ve en las figuras anteriores, fue posible obtener con un buen rendimiento (12,36 μg de proteína de fusión por 500 ml de cultivo) tanto las proteínas de fusión como los productos digeridos en los que se había separado de forma mayoritaria la proteína de interés. Sin embargo, se decidió no llevar a cabo el paso final de obtener la proteína aislada y separada de la GST o de la MBP, ya que el rendimiento final disminuía después de someter las muestras a un nuevo ciclo de cromatografía de afinidad para poder eliminar las proteínas GST o MBP liberadas (no

mostrado). Por ello se utilizaron directamente las proteínas de fusión en el resto del trabajo.

Aprovechando la ventaja de tener dos sistemas distintos de expresión, se obtuvo un antisuero contra la fusión de MBP-CPTEV con objeto de usarlo posteriormente en experimentos de interacción proteína-proteína, reteniendo la posibilidad de usar en ocasiones las construcciones de la misma proteína pero fusionadas a GST para evitar posibles reacciones cruzadas por reconocimiento de epítomos en la MBP.

1.1.2.- Obtención y titulación de un antisuero específico de la proteína CP de TEV

A partir de la purificación de la proteína de fusión MBP-CPTEV, se obtuvieron anticuerpos policlonales producido en conejo. La obtención fue realizada en la plataforma de producción de antisueros CAbs del CSIC en el Instituto de Química Avanzada de Catalunya y del Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), contando con la colaboración de la doctora Núria Pascual, proporcionándoles las dosis de antígenos necesarias para la inmunización de los animales.

Una vez recibidas las alícuotas de los sueros de animales inmunizados, se procedió a una titulación de los antisueros presentes en el suero utilizando diferentes muestras y diferentes diluciones, buscando optimizar la detección de las proteínas deseadas mediante Western Blot.

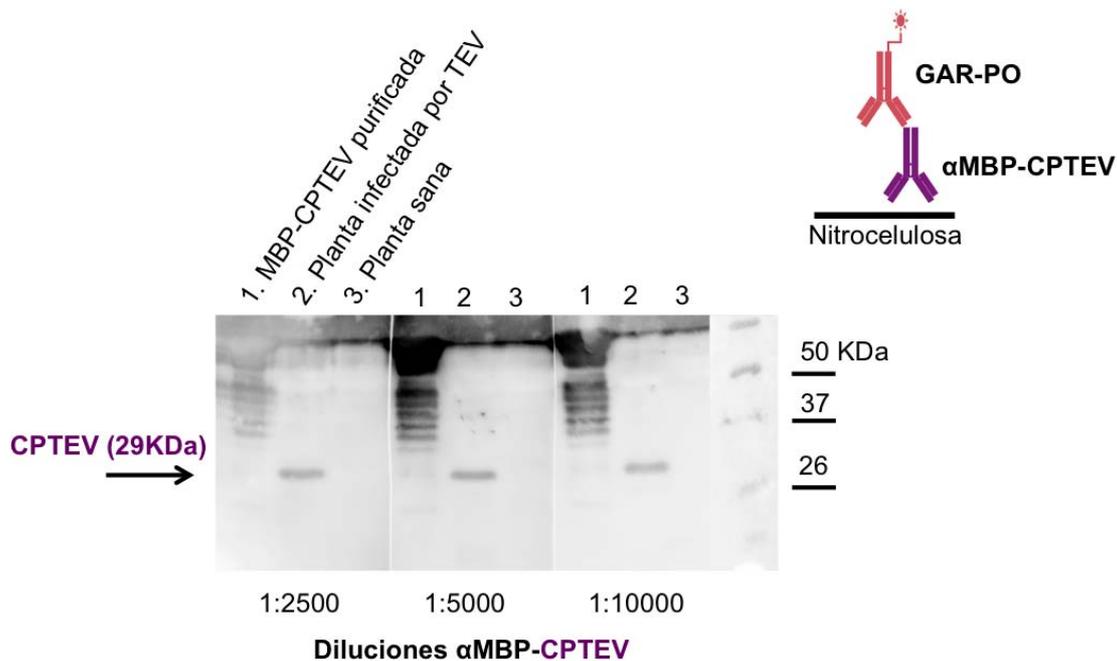


Figura 15. Análisis tipo **Western blot** según el esquema de la derecha superior, de las diferentes diluciones de antisuero utilizadas para titularlo. En la figura se muestra la **titulación de α MBP- CPTEV**, usando como control la fusión MBP- CPTEV y un homogeneizado de una planta infectada con TEV, conteniendo por tanto la CP del virus. Además, se añadió un homogeneizado de planta sana a modo de control negativo del experimento. Los carriles marcados con 1, 2 y 3 representan muestras idénticas ensayadas con las tres diluciones que se indican debajo.

Para mejorar la especificidad de los sueros en la detección de las proteínas se inmuoadsorbieron los antisueros con polvo cetónico de cultivos bacterianos. Los antisueros inmuoadsorbidos fueron titulados nuevamente, y mostraron un aumento de especificidad tal y como se muestra en la figura 16.

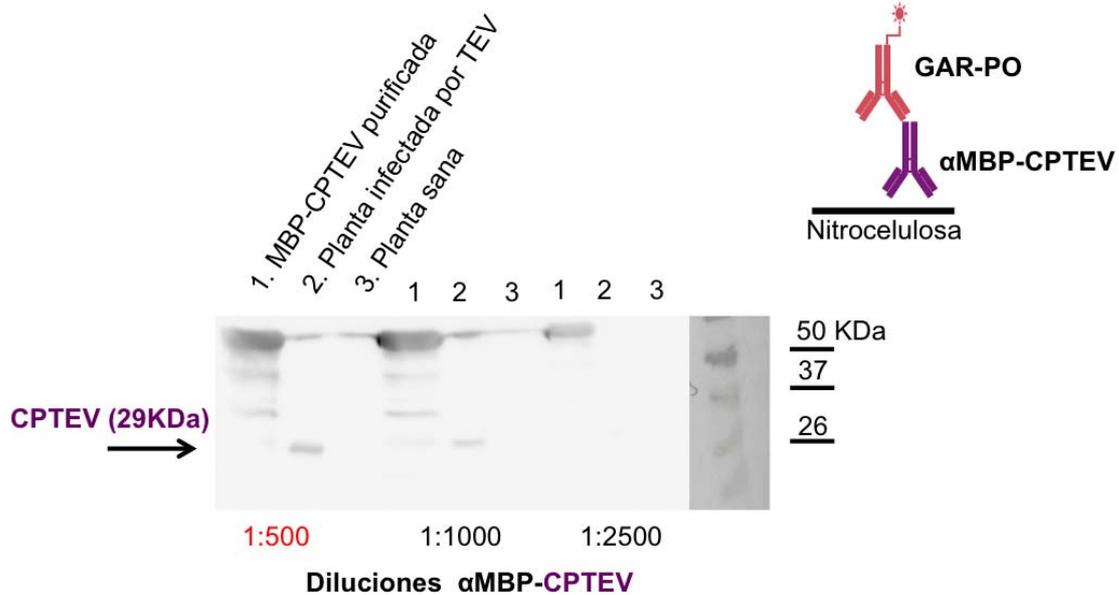


Figura 16. Análisis tipo **Western blot** según el esquema que se muestra en el extremo superior derecho, de las diferentes diluciones de **antisuero inmunoabsorbido**. En la figura se muestra la **titulación de α MBP- CPTEV**, usando como control la fusión MBP- CPTEV y un homogeneizado de una planta infectada con TEV, conteniendo por tanto la CP del virus. Además, se añadió un homogeneizado de planta sana a modo de control negativo del experimento. Los carriles marcados con 1, 2 y 3 representan muestras idénticas ensayadas con las tres diluciones que se indican debajo.

Después de la titulación del antisuero, se verificó en un ensayo tipo Western Blot que permitía la detección de la proteína CP en las fusiones, tanto de GST como de MBP, eluidas previamente en un gel de acrilamida, posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa y por último, incubadas con el antisuero contra la fusión MBP- CPTEV.

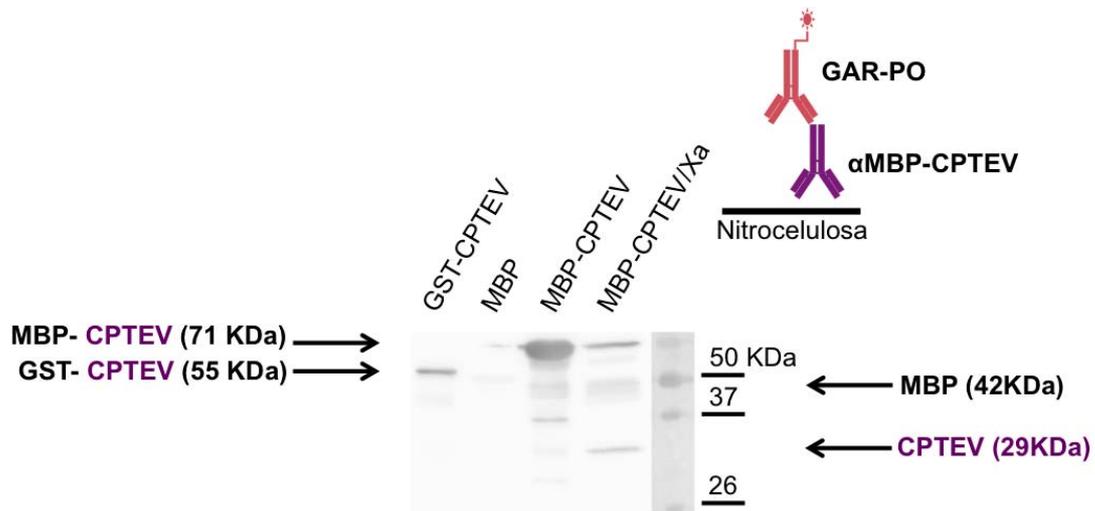


Figura 17. Análisis tipo **Western blot**, tal y como se muestra en el esquema de la parte superior derecha. Las muestras analizadas fueron, en este orden, las siguientes proteínas purificadas: GST- CPTEV, MBP libre de la fusión, MBP- CPTEV y la fusión MBP- CPTEV digerida con el factor Xa, dejando la MprPS2 libre de la fusión. La dilución de uso del antisuero es 1:500.

1.2.- SOBREEXPRESIÓN DE MprPS2 Y PRODUCCIÓN DE ANTISUERO CONTRA LA MISMA.

1.2.1.- Obtención de la MprPS2 por sobreexpresión en bacteria.

Al igual que con la CP de TEV, con objetivo de disponer de un medio para sobreexpresar MprPS2, posible receptor candidato derivado de pulgón, se clonó el gen en los dos sistemas que hemos visto hasta ahora, fusionando así MprPS2 a GST y a MBP.

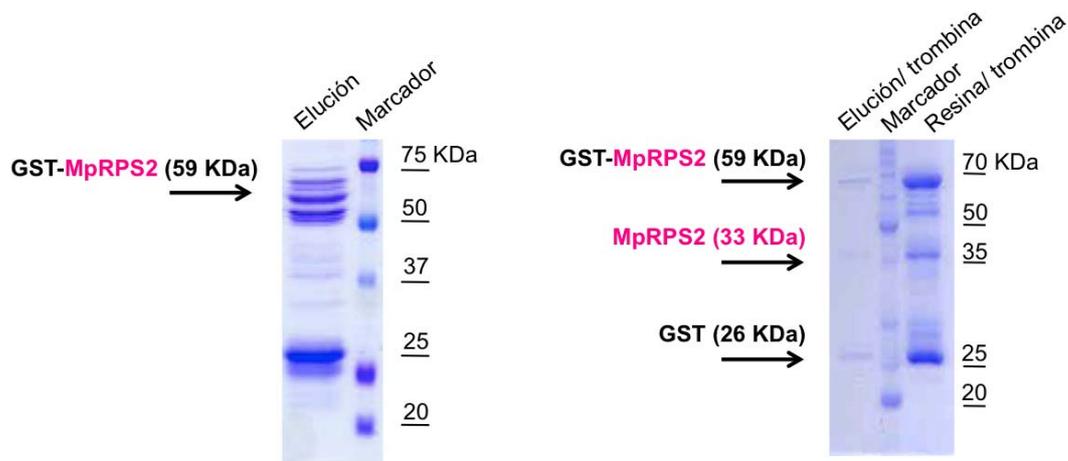


Figura 18. En el panel de la izquierda se muestra el análisis es **SDS-PAGE con tinción de Coomassie de dos muestras de fracciones de eluciones de la proteína de fusión GST-MpRPS2**; la flecha señalan la banda correspondientes a la fusión con un peso de 59KDa, debido a la suma de la GST (26 KDa) y MpRPS2 (33 KDa). En el panel de la derecha se muestran las mismas eluciones procesadas con trombina, mostrándose mayoritariamente en la muestra de la resina a la altura esperada la GST libre, así como la proteína de interés aislada y restos de la proteína de fusión no digerida.

A continuación, MpRPS2 fue clonada en vectores tipo pMAL, obteniendo la proteína de fusión MBP-MpRPS2, que fue purificada tal y como se describe en el protocolo de material y métodos del apartado 5.1 gracias a una resina de afinidad con la maltosa. En este caso, el rendimiento fue más bajo, comparado con la producción de MBP-CPTEV, obteniendo aún y así una cantidad de 5,28 µg de proteína de fusión por 500 ml de cultivo. Aprovechando el sitio de corte de la proteína de fusión, que en este caso era el factor Xa, se hicieron pruebas para aislar la proteína de interés, obteniendo también de nuevo un rendimiento sensiblemente más bajo, no óptimo para usar en posteriores ensayos de interacción proteína proteína.

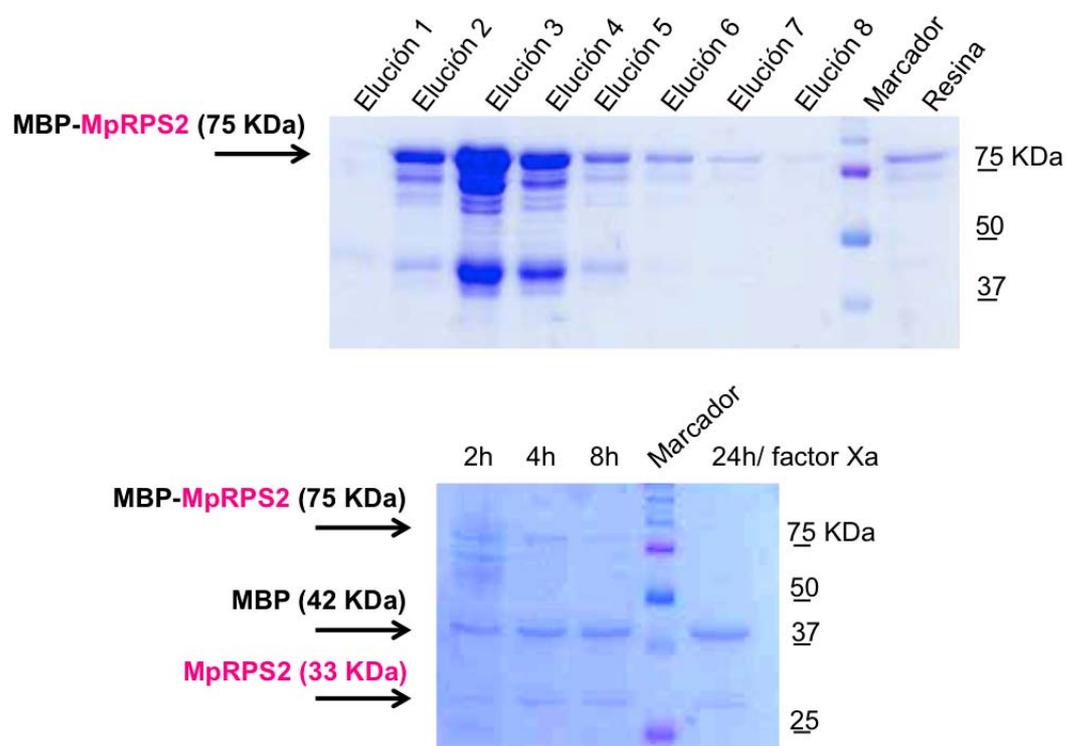


Figura 19. En la imagen superior se muestra el análisis mediante **SDS-PAGE y tinción con Coomassie de las fracciones de eluciones de las proteínas de fusión MBP-MpRPS2** a la altura esperada correspondiente a 75 KDa, resultado de la unión de MBP (42KDa) y MpRPS2 (33 KDa). En el panel inferior se muestra el análisis de la digestión con el factor Xa a diferentes tiempos de incubación con el fin de comprobar la eficiencia de la actividad de esta enzima. Con flechas se señalan las dos proteínas libres y la proteína de fusión restante después del proceso de digestión.

Tal y como se ha mostrado en las figuras anteriores, las fusiones de MpRPS2 con GST o MBP se obtienen con mayor rendimiento comparado con MpRPS2 libre obtenida a partir de los respectivos sitios de corte trombina o el factor Xa. Estas fusiones serán utilizadas para los próximos ensayos de interacción, además de para la producción de un antisuero específico capaz de reconocer a MpRPS2.

1.2.2.- Obtención y titulación de un antisuero contra la proteína MpRPS2 de pulgón

El antisuero α MBP- MpRPS2 se obtuvo bajo las mismas condiciones que para α MBP- CPTEV, gracias a la colaboración de la Dra. Núria Pascual. Las diluciones 1/2500, 1/5000 y 1/10000 fueron probadas en el ensayo previo para encontrar la dilución adecuada de uso:

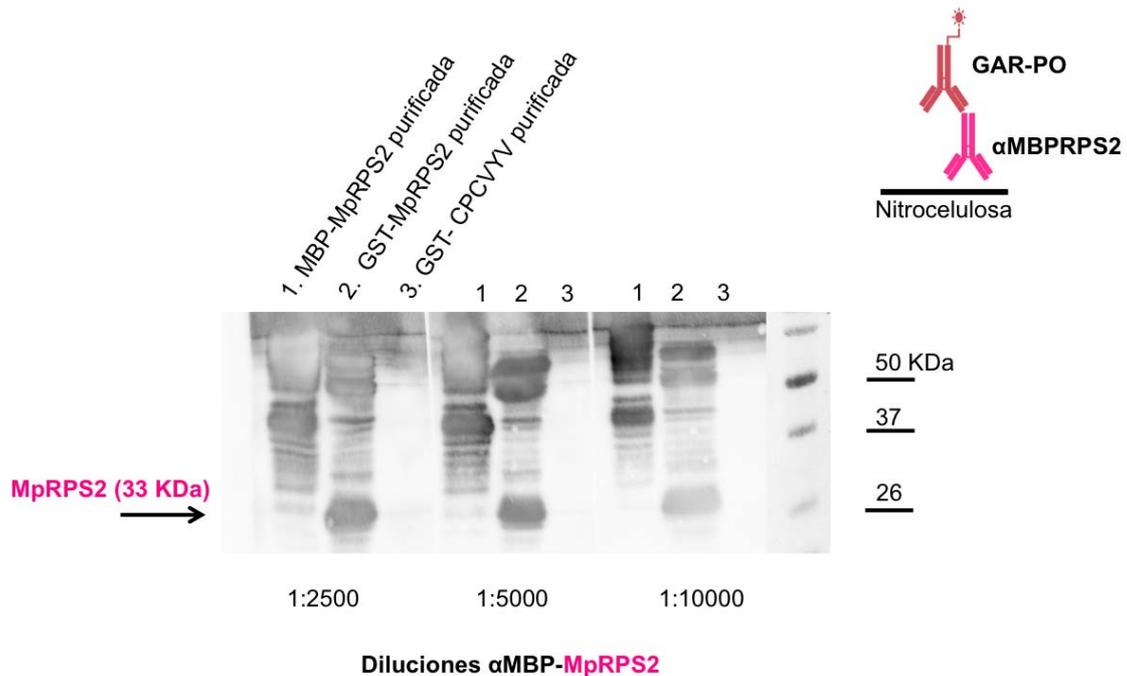


Figura 20. Análisis tipo **Western blot** según el esquema de la derecha superior, de las diferentes diluciones de antisuero α MBP- MpRPS2 utilizadas para titularlo. Se analizaron muestras utilizadas para la correcta **titulación de α MBP- MpRPS2**: las dos fusiones de la proteína con GST y MBP, y a modo de control negativo, una purificación de la CP de un virus no relacionado, el ipomovirus CVYV. Los carriles marcados con 1, 2 y 3 representan muestras idénticas ensayadas con las tres diluciones que se indican debajo.

Con objetivo de mejorar la detección de MpRPS2, se decidió inmuoadsorber el antisuero mediante polvo cetónico, del mismo modo que se procedió para el antisuero α MBP- CPTEV, obteniendo así menos señal inespecífica (ruido de fondo) en los ensayos tipo Western blot.

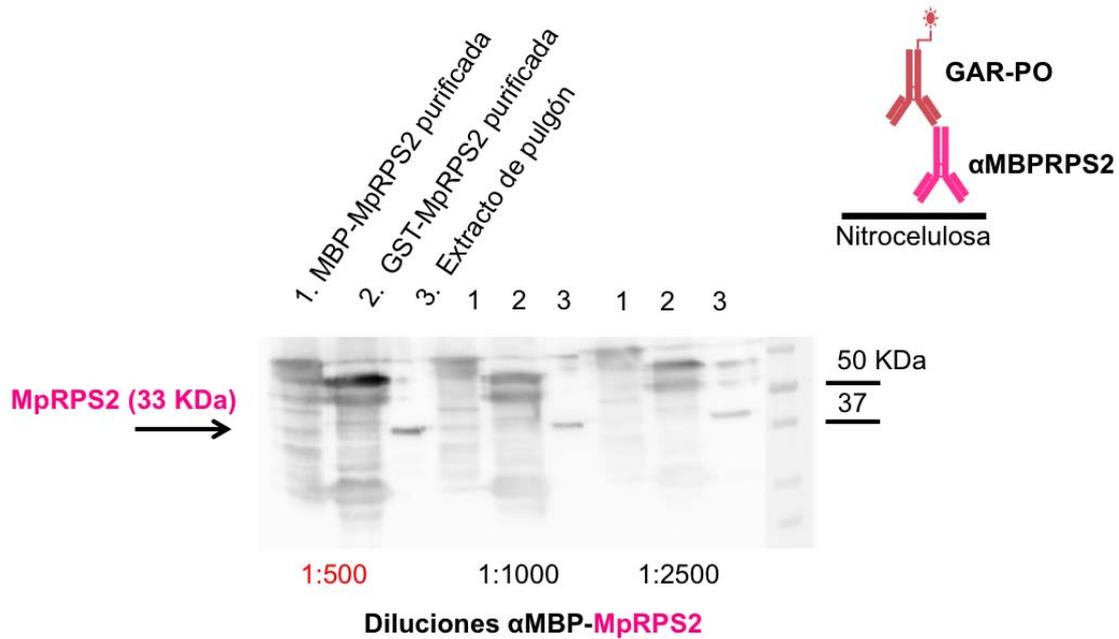


Figura 21. Análisis tipo **Western blot** según el esquema de la derecha superior, de las diferentes diluciones de antisuero αMBP- MpRPS2 utilizadas para titularlo después de un proceso de inmunoadsorción. En este caso, se analizaron las mismas muestras utilizadas en la primera titulación, añadiendo como control positivo un extracto crudo de pulgón. Los carriles marcados con 1, 2 y 3 representan muestras idénticas ensayadas con las tres diluciones que se indican debajo.

La figura anterior difiere en las muestras analizadas respecto a la primera titulación: se mantuvieron las dos proteínas fusión y se añadió un extracto de pulgón. Este nuevo control mostró la especificidad del antisuero al detectar MpRPS2, aportando una herramienta de uso para su detección en pulgón.

1.2.3.- Análisis de la correcta inmunodetección de MpRPS2

Un último ensayo Western blot fue realizado después de la elección de la dilución de uso (1:500) con el antisuero αMBP- MpRPS2. En éste, se incluyeron como muestras a analizar las dos fusiones GST/MBP-RPS2, MBP libre de la fusión y MBP-RPS2 procesada con factor Xa dejando RPS2 fuera de la fusión:

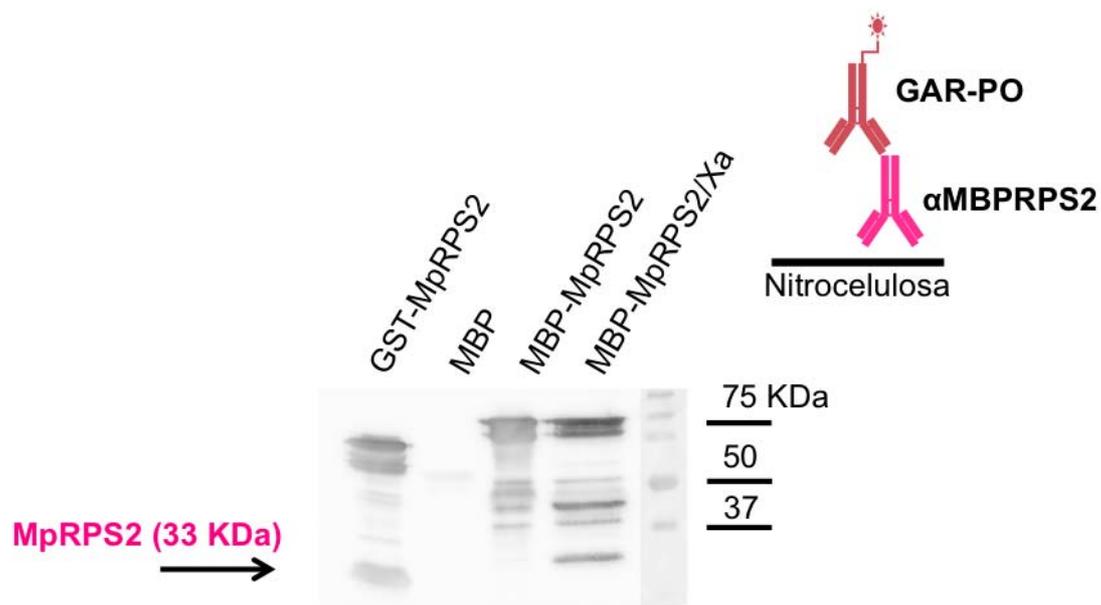


Figura 22. Análisis tipo **Western blot**, tal y como se muestra en el esquema de la parte superior derecha. En la figura se encuentran cuatro carriles donde se eluyeron, en este orden, las siguientes proteínas purificadas: GST- MpRPS2, MBP libre de la fusión, MBP- MpRPS2 y la fusión MBP- MpRPS2 digerida con el factor Xa, dejando la MpRPS2 libre de la fusión. La dilución de uso del antisuero es 1:500.

Este ensayo muestra cómo el antisuero α MBP- MpRPS2, después de la inmunoadsorción y a una dilución de uso de 1:500, es capaz de detectar al mismo antígeno usado en la inmunización (como era esperable y se observa en el tercer carril) así como a los dos componentes de la fusión, MBP (segundo carril) y MpRPS2 (cuarto carril, separada de la fusión gracias al corte con factor Xa).

1.3.- OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA HCPRO DE TEV Y SUS MUTANTES EITC Y PAK.

Con el fin de correlacionar las diferentes interacciones entre CP-HCPro-MpRPS2, se realizaron ensayos de interacción proteicos en el que las partículas virales de TEV y la MpRPS2 eran fijadas a la membrana, incubando a continuación con la proteína HCPro purificada. Como se ha mencionado, esta proteína se puede obtener directamente de tejido infectado con TEV HCH10 gracias a la presencia de una cola de histidinas que permite su purificación por cromatografía de afinidad. Para facilitar la expresión de variantes de la misma proteína HCPro también es posible purificarla a partir de tejido agroinfiltrado con una construcción adecuada. Para ello

fueron previamente clonadas y expresadas la proteína HCPro y sus mutantes mediante expresión transitoria por agroinfiltración, usando como vector de expresión el plásmido pTRANS5'TEV, que derivaba del vector comercial pCAMBIA2300, producido previamente en el laboratorio (Goytia *et al.*, 2006).

1.3.1.- Mutagénesis dirigida en los dominios implicados en transmisión de la HCPro

Para poder verificar los dominios de interacción entre CP y HCPro, y entre MpRPS2 y HCPro que predice la hipótesis del puente, se decidió modificar en la proteína HCPro de TEV residuos en dominios conservados y presuntamente implicados en los procesos de interacción, de acuerdo a trabajos previos realizados con otros potyvirus:

- Región amino terminal, dominio KITC: se ha demostrado (Atreya *et al.*, 1992; Atreya and Pirone, 1993; Huet *et al.*, 1994; Blanc *et al.*, 1998) que cambios en el primer residuo del dominio provocan la pérdida de transmisión de diversos potyvirus. Así que la mutación se realizó cambiando la lisina (K) por glutámico (E).

- Zona central, dominio PTK: el cambio aminoacídico de la treonina (T) por la alanina (A) produce una drástica reducción en la tasa de transmisión en el ZYMV (virus del mosaico amarillo del calabacín), perteneciente al género potyvirus (Peng *et al.*, 1998; Granier *et al.*, 1993).

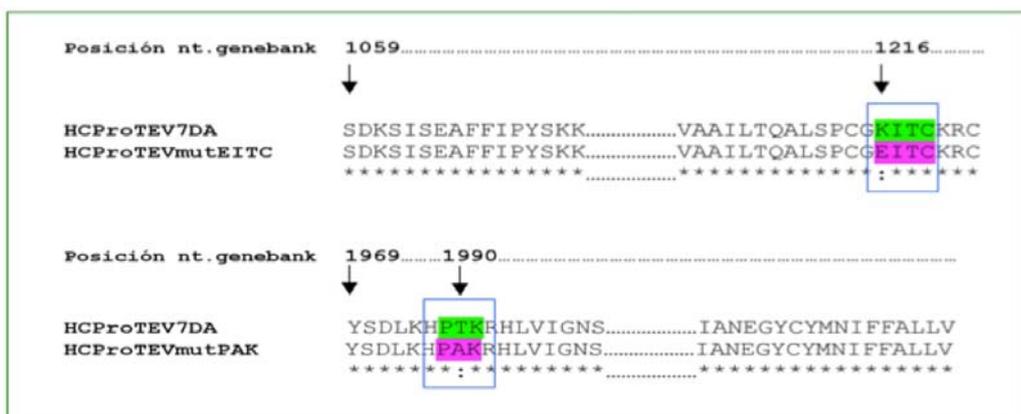


Figura 23. Alineamiento de las secuencias mutadas con la secuencia de HCProTEV7DA publicada en GeneBank. Están señalados con una flecha las posiciones de cambio, correspondiendo los aminoácidos sombreados en verde a los dominios no mutados y los sombreados en rosa los mutados mediante el kit de mutagénesis dirigida.

La reacción de mutagénesis fue comprobada por secuenciación en los clones finales obtenidos, corroborando el correcto funcionamiento del proceso que da lugar a los clones EITC-TOPO y PAK- TOPO.

1.3.2.- Expresión transitoria de HCPro y sus mutantes

Para poder obtener gran cantidad tanto de HCPro sin modificar, como de sus mutantes, un paso crucial para realizar estudios de implicación de dicha proteína en el proceso de transmisión, se utilizaron clones de la proteína y de sus mutantes en pTRANS5'TEV para la sobreexpresión el producto en tejido de planta (*N. benthamiana*). Para ello se usó el sistema de agroinfiltración, basado en la infiltración de cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* transformados con las construcciones adecuadas en los espacios intercelulares de hojas (Goytia *et al.*, 2006).

Para comprobar la estabilidad de la expresión de la proteína HCPro de TEV, se realizó una cinética de expresión a diferentes días post- agroinfiltración (dpa). Se infiltraron plantas de *N. benthamiana* y se recolectaron muestras de la hoja agroinfiltrada a diferentes dpa (0, 3, 6 y 9 días). Con dichas muestras se realizaron extractos de proteína para detectar mediante Western blot la expresión de HCPro y sus mutantes (figura 24).

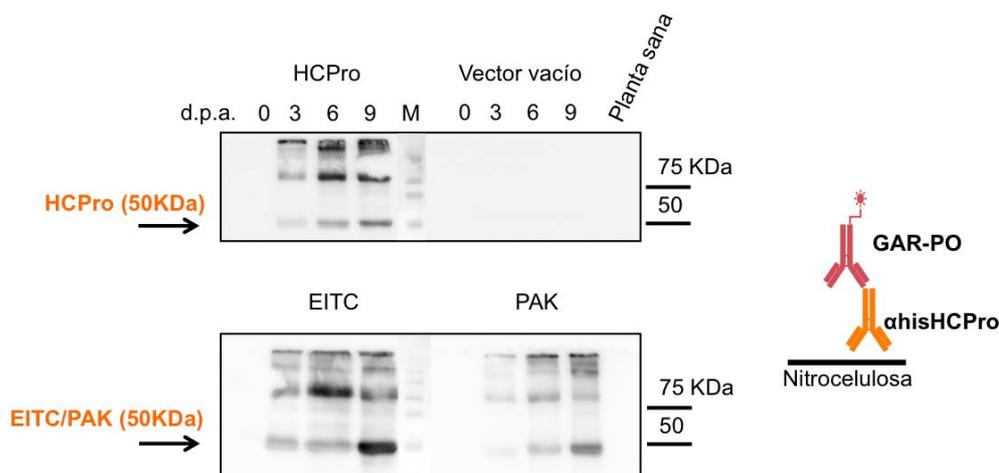


Figura 24. **Análisis Western blot para detectar la expresión de la proteína HCPro de TEV y sus mutantes en hoja agroinfiltrada (*N. benthamiana*).** Las muestras se recogieron a los 0, 3, 6 y 9 días tras la agroinfiltración. Se cargaron cantidades equivalentes de extractos proteicos de hoja agroinfiltrada con la construcción pCAMBIA 35S 5'TEVHCH10, los mutantes EITC y PAK, con el vector vacío y extracto de una planta sana. La detección de la proteína HCPro se realizó con un antisuero policlonal αhisHCPro disponible en el laboratorio.

Como se puede apreciar en la figura, la expresión aumenta a medida que aumenta el tiempo post agroinfiltración, acumulándose la proteína hasta los 9 dpa (no se continuó con el análisis a tiempos más tardíos ya que el tejido se comenzaba a degradar y presentaba síntomas de senescencia); así para las extracciones proteicas posteriores, se eligieron las hojas a los 7 dpa.

Gracias a este sistema hemos sido capaces de purificar la proteína HCPro y variantes de la misma para poder utilizarlas en diversos ensayos.

1.4.- ESTUDIO DE INTERACCIÓN DE HCPRO DE TEV CON LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE Y CON UN POSIBLE RECEPTOR DEL VECTOR DE TRANSMISIÓN MEDIANTE ENSAYOS DE FAR WESTERN BLOT.

Para comprobar la interacción de HCPro con CP de TEV y con el receptor putativo MpRPS2 se llevaron a cabo experimentos de interacción de tipo Far Western blot. En este ensayo se separaron por electroforesis extractos de planta sana e infectada con TEV, la proteína HC-Pro purificada, las inducciones de las construcciones GST-MpRPS2 y GST-CPTEV, muestras de las resinas utilizadas en las purificaciones de las proteínas aisladas de CP-TEV y MpRPS2 y las partículas virales purificadas de TEV. Se transfirieron todas las muestras de proteínas mencionadas a una membrana de nitrocelulosa que se incubó primeramente con proteína purificada hisHCPro de TEV, y después con un antisuero policlonal anti-hisHCPro, que de esa forma permite detectar la posible unión de la proteína hisHCPro a las diferentes proteínas presentes en el gel.

En el caso del Western blot (ensayo control) se omitió el paso de la incubación con la proteína hisHC-Pro, y se siguieron el resto de pasos tal y como se ha explicado en el apartado 5.5/5.6 de material y métodos.

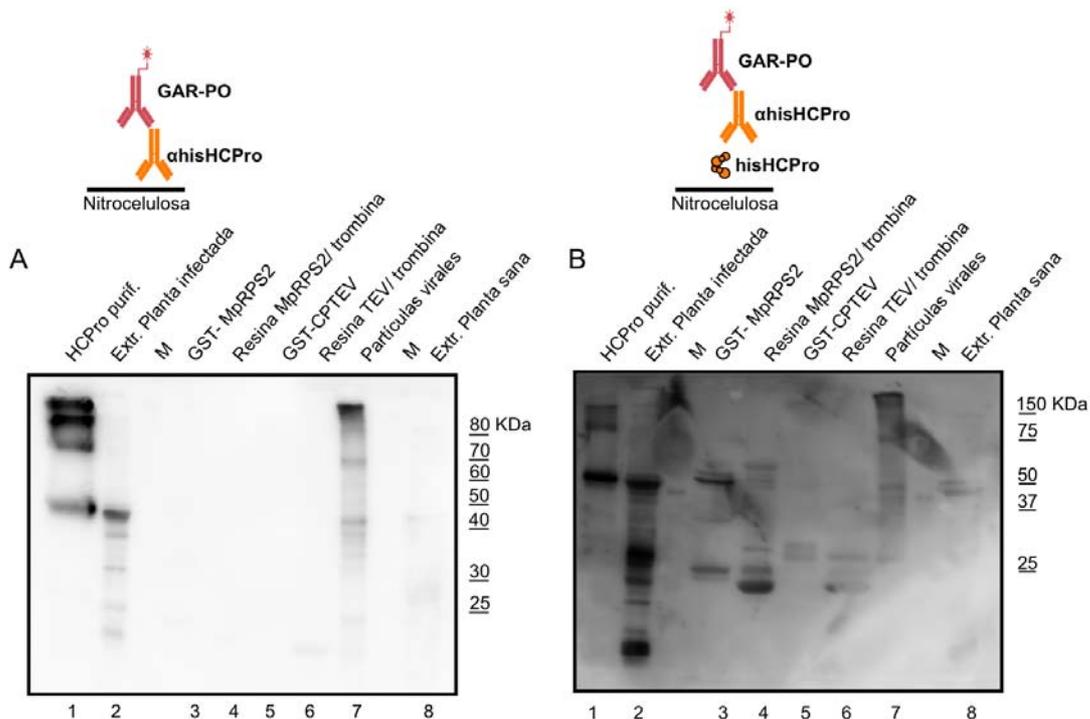


Figura 25. **Ensayos de interacción (Far) Western blot de la proteína HC-Pro de TEV con extractos vegetales y diferentes proteínas separadas por SDS-PAGE.** A) En el ensayo Western blot se ha incubado la membrana con el antisuero ahisHCPro TEV mostrando la presencia de la correspondiente proteína (53KDa) en los carriles 1 y 2, donde además las bandas superiores muestran la ya conocida capacidad de esta proteína de formar multímeros (Ruiz-Ferrer *et al.*, 2005). Las señales detectadas en el carril 7 parecen ser la misma HCPro que podría estar presente en la purificación de las partículas virales de TEV (Sasaya *et al.*, 2000) B) En el Far-Western Blot se ha incubado primeramente con la proteína HC-Pro y seguidamente con el antisuero primario. En los carriles 1 y 2 se observa la interacción de HCPro consigo misma. En los carriles 3 y 5 se muestran las bandas correspondientes a las fusiones con GST-CPTEV y GST-MpRPS2 a la altura esperada de 55KDa y 59KDa respectivamente. En los carriles 4 y 6 donde se encuentra la resina cortada con trombina, se observan las señales de interacción con las proteínas aisladas y las fusiones con GST además de una banda a la altura de 26KDa que podría corresponder a un producto de degradación de la proteína de fusión con un tamaño similar a la GST libre, aunque tampoco se puede descartar una interacción inespecífica de ésta con el antisuero primario. En el carril 7 vuelven a aparecer las interacciones inespecíficas ya mencionadas en el caso del ensayo Western blot. En ambos paneles el control de extracto de planta sana (carril 8) no muestra interacción.

Una vez comprobada la especificidad del ensayo en el experimento anterior, se llevó a cabo un ensayo Far Western donde se separaron por electroforesis partículas virales de TEV, la proteína HC-Pro purificada y las inducciones correspondientes a las construcciones de fusión GST-MpRPS2 y MBP-MpRPS2. Dos membranas con

réplicas en paralelo de estas muestras fueron incubadas con proteína purificada hisHC-Pro de TEV, o con una variante no funcional en transmisión, en concreto con el mutante EITC, revelando las posibles interacciones con el anticuerpo policlonal dhisHCPro.

Mediante estos ensayos de interacción de tipo Far Western, se confirma la existencia de la interacción de este receptor putativo con la proteína HCPro, tal y como predice la hipótesis del puente. Cuando el mismo tipo de experimento se realizó con el mutante de HCPro (EITC) que presumiblemente no se une al receptor, efectivamente no se detectaba la interacción. En ambos casos el antisuero detectaba correctamente a la propia proteína (columna hisHCPro) y la interacción con la CP (columna marcada "partículas virales"), pero únicamente la proteína funcional interaccionaba con las construcciones de fusión que incluían el hipotético receptor MpRPS2. Estos resultados dan paso a futuros experimentos encaminados a profundizar en la caracterización de este posible receptor.

El mismo ensayo se repitió con el mutante de HCPro, PAK, que tiene modificado uno de los dominios que supuestamente interviene en la unión entre las partículas virales y HCPro. Tal y como se muestra en la figura 26, la interacción proteína- proteína se mantenía en el ensayo con este mutante tanto con el supuesto receptor MpRPS2 como con las partículas virales de TEV. Es posible que sean necesarias más modificaciones para interrumpir la interacción CP-HCPro. En efecto, resultados en otros sistemas virales así lo sugieren (Seo *et al.*, 2010).

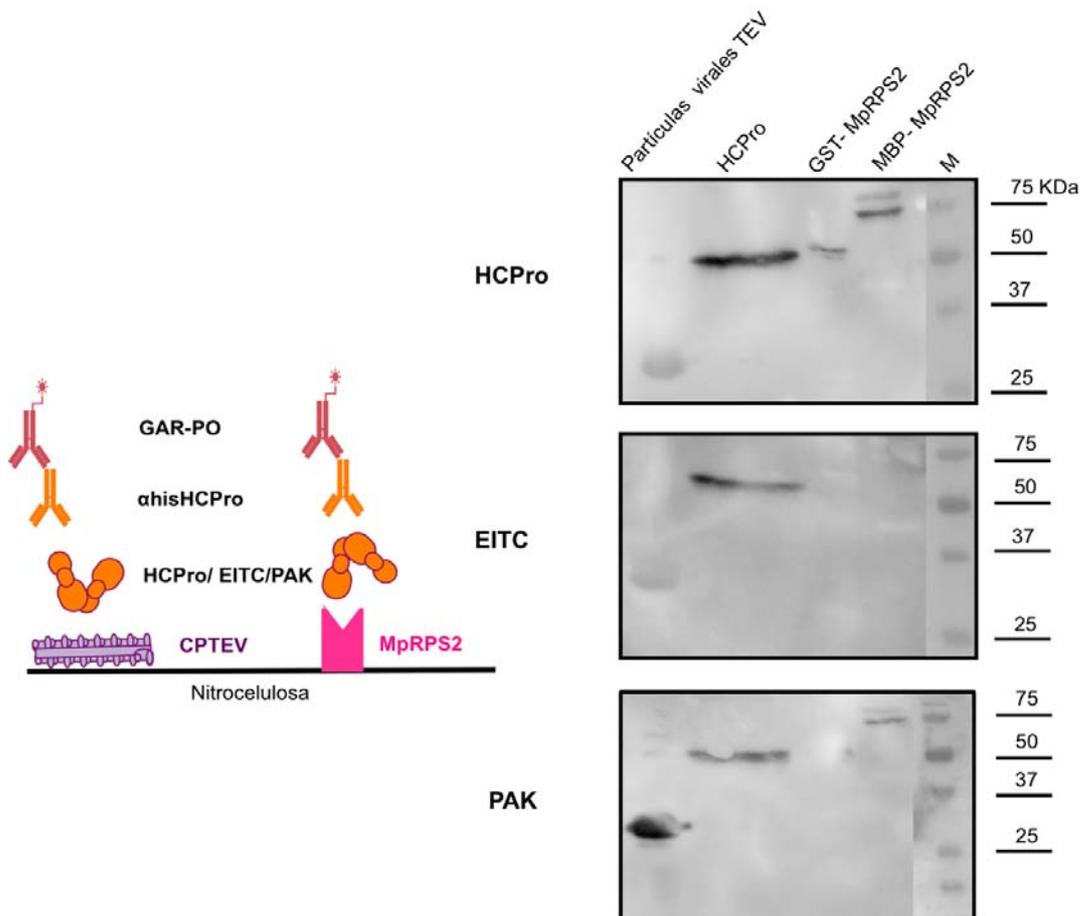


Figura 26. Ensayo Far Western blot utilizando como proteínas cebo HCPPro y los mutantes de transmisión EITC y PAK. En el panel superior se observan las interacciones esperadas por la hipótesis del puente como en el primer carril las partículas de TEV, el control positivo de HCPPro, y por último, la demostración de la posible interacción entre las proteínas de fusión con MpRPS2 y HCPPro. En el panel intermedio, donde se utilizó como cebo el mutante de HCPPro, EITC, las interacciones entre la CP de TEV y el mutante se mantienen, mientras que desaparecen en el caso de las fusiones de MpRPS2. En el panel inferior se utilizó como cebo el mutante de HCPPro, PAK, las interacciones entre la CP de TEV y el mutante se mantienen, igual que en caso de MpRPS2.

1.5.- ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL FACTOR HCPRO DE TEV CON CP DE TEV Y MPRPS2 MEDIANTE EL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURA.

Con el fin de demostrar mediante otro ensayo si las proteínas CP de TEV y MpRPS2 eran capaces de interactuar con HCPPro, se llevó a cabo un estudio basado en el sistema de doble híbrido dirigido (YTH).

El sistema del doble híbrido en levadura se basa en la capacidad de modular la actividad algunos activadores transcripcionales de eucariotas (ver sección 2.2.6 del capítulo de materiales y métodos). Si las proteínas analizadas interactúan entre sí, se produce la activación de diversos promotores transcripcionales que permiten detectar la interacción. Este estudio requiere el uso de proteínas de fusión en las que se fusionan fragmentos de un activador transcripcional a las proteínas cuya capacidad de interacción se quiere analizar. Como se ha descrito hasta ahora, la interacción entre HCPPro y CP de TEV ha sido estudiada en un amplio número de potyvirus transmitidos por pulgón. Así, estos ensayos de YTH se llevaron a cabo con objetivo de verificar mediante una aproximación experimental complementaria las interacciones CP-HCPPro-MpRPS2 realizadas mediante ensayos tipo Far Western blot como se indica en el apartado anterior.

En este tipo de ensayo, es conveniente realizar una primera aproximación para descartar resultados que pueden conducir a errores de interpretación posteriormente, probando todos los vectores híbridos contra el vector contrario vacío. Así, si en el medio de crecimiento más restrictivo donde se demuestra la interacción (que en este caso de experimentos de control debería ser siempre negativa), se observa que hay crecimiento, hay que concluir que puede existir autoactivación: algunos de los factores clonados tienen la capacidad de autoactivar el promotor y expresar el producto para el que la cepa es auxotrófica, que en este caso es la histidina.

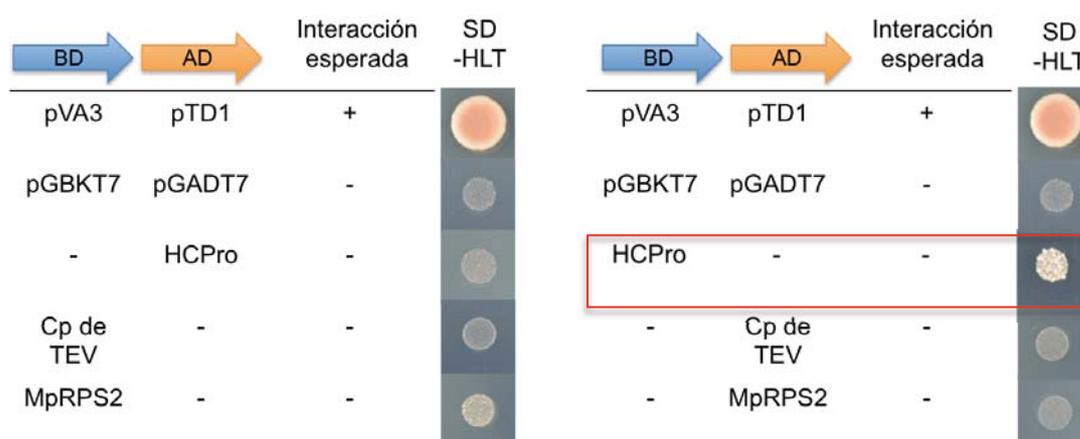


Figura 27. **Ensayo previo de detección de autoactivación en el experimento YTH.** En la tabla izquierda, se muestran los clones de CP de TEV y MpRPS2 en el vector BD mientras que HCPPro (que supuestamente interactúa con los dos) clonado en el vector opuesto, AD. En la tabla de la derecha se muestra la interacción con los factores clonados en vectores opuestos a la tabla anterior.

A partir de los resultados mostrados en la figura 27, se puede considerar que la proteína HCPPro de TEV fusionada al dominio de unión a DNA (BD) presentaba autoactivación en ausencia de una proteína interactora, por lo que se decidió llevar a cabo el experimento de interacción de doble híbrido con CP de TEV y MpRPS2 están clonados en el vector BD, y HCPPro se encuentra en el dominio de activación (AD). Para ello se transformaron las diferentes cepas de levadura PJ694 α y YM4271a con los vectores híbridos BD y AD respectivamente y se crecieron en medio selectivo SD-LT, dónde sólo hay crecimiento de las colonias que han sido transformadas. Posteriormente, las colonias crecidas fueron transferidas a otro medio de selección SD-HLT en el que la ausencia de histidina actúa como agente de selección de la interacción. Únicamente se supera la carencia de este metabolito en el medio si se activan determinados genes en la levadura, dependientes de la activación transcripcional reconstituida al darse la interacción de los productos fusionados. Al interaccionar las dos proteínas de fusión, el sistema permite la activación del factor de transcripción fragmentado en ambos plásmidos, y resulta en la transcripción de los genes delatores, observándose crecimiento en el medio.

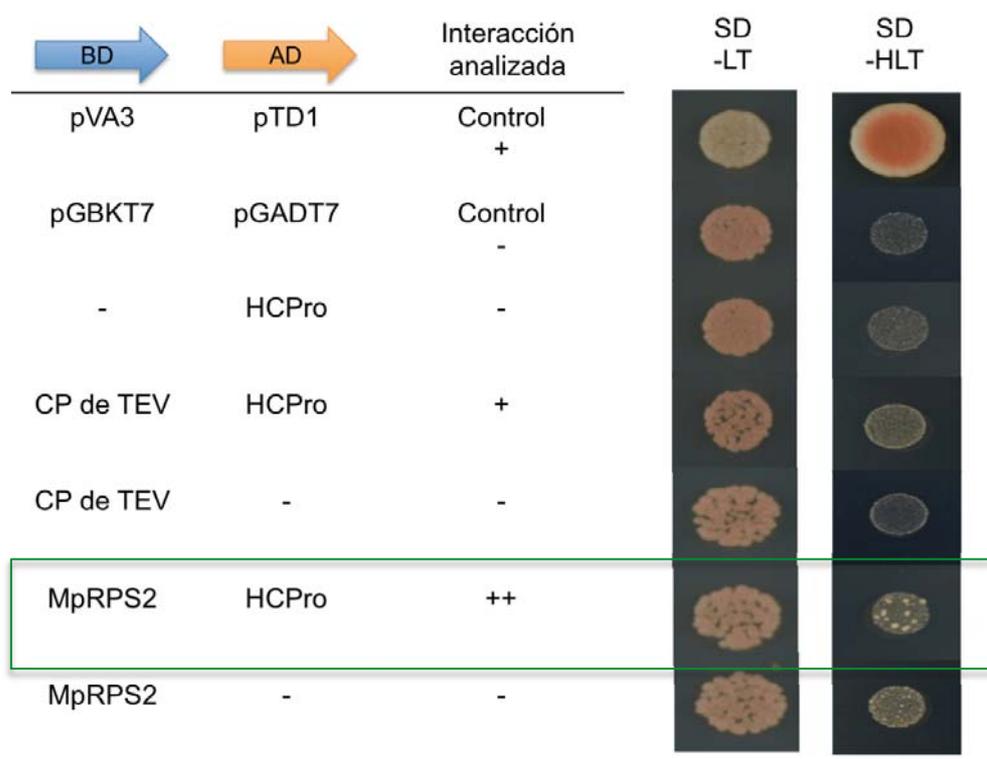


Figura 28. **Ensayo de doble híbrido (YTH)**. En la figura se muestra a la izquierda una tabla con las construcciones generadas con las proteínas virales HCPPro y CP de TEV, además de MPRPS2 de pulgón. En la parte derecha, se observa el crecimiento de la levadura en medio restrictivo SD-LT, donde se comprueba la transformación y en medio SD- HLT donde si hay crecimiento, es porque hay interacción.

En los resultados obtenidos mediante el ensayo tipo Far Western, MpRPS2 y HCPPro fueron capaces de interactuar, así como se demuestra en este ensayo de doble híbrido. Sin embargo, mediante YTH la conocida interacción entre HCPPro y CP de TEV se observa pero con menos claridad, lo que coincide con lo observado en los ensayos far western. (figura 28).

2. BÚSQUEDA DEL CANDIDATO A RECEPTOR MPRPS2 MEDIANTE INMUNOLocalIZACIÓN ESPECÍFICA EN EL ESTILETE DEL PULGÓN.

Nuestro interés por el estudio de proteínas del vector posiblemente implicadas en la transmisión viral, nos llevó a establecer una colaboración con el laboratorio del Dr. Stéphan Blanc (Montpellier) con el objetivo de adquirir los conocimientos necesarios para la correcta disección del estilete del pulgón, y así intentar localizar la presencia de los posibles factores que intervienen en la transmisión.

La retención de TEV se había demostrado anteriormente que tenía lugar en los estiletes maxilares, mediante la detección directa de partículas virales marcadas con radioactividad (Wang *et al.*, 1996). Además, recientemente se demostró una acumulación de proteína cuticular en el lugar de retención (Uzest *et al.*, 2010). Así, como primera aproximación, se decidió localizar MpRPS2 en tejido cuticular de pulgón, mediante ensayo Western blot. Para obtener cutículas aisladas y fácilmente accesibles se recogieron mudas, y se extrajeron proteínas totales de muestras de pulgón entero y de mudas aisladas. Como se observa en la figura, fue posible detectar una banda del tamaño esperado en la muestra procedente de mudas aisladas, lo que sugiere que en efecto MpRPS2 se encuentra presente en el tejido cuticular.

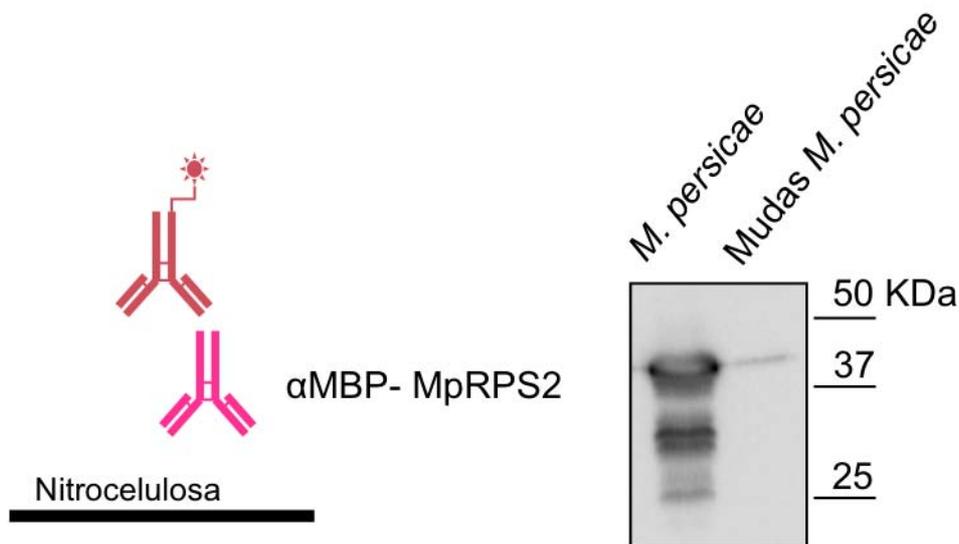


Fig 29. **Inmunodetección de MpRPS2 por Western Blot.** En esta figura se muestra la detección de MpRPS2 mediante el antisuero α MBP-MpRPS2 en muestras de pulgón entero y mudas de pulgón.

La presencia de MpRPS2 en tejido cuticular de muda no da información sobre su posible distribución, y en especial nos interesaba confirmar en lo posible si se localizaba en el estilete, por lo que se procedió a intentar la inmunodetección directa en el estilete de este candidato a receptor.

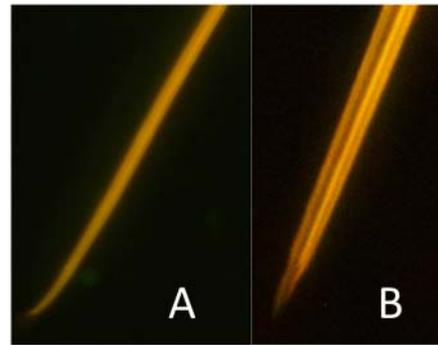
Este tipo de experimentos tiene como objetivo encontrar las localizaciones dónde se encuentran los candidatos a receptores que pueden actuar reteniendo las partículas virales en regiones específicas del aparato bucal del vector (como por ejemplo el acrostilo), a partir de ensayos de inmunodetección directamente sobre el estilete diseccionado.

Una primera necesidad experimental para llevar a cabo el análisis consiste en diferenciar los estiletes mandibulares de los maxilares. Es en estos últimos donde se presume deben retenerse las partículas virales. Para ello, mediante observación en el microscopio confocal, se establecieron unas claves de morfología anatómica para determinar el tipo de estilete. Las características diferenciadoras elegidas se describen a continuación, y se ilustran en la figura adjunta:

- Estilete mandibular: extremo distal curvado.
- Estilete maxilar: extremo distal en forma de onda.

Fig 30. **Disección de estiletes de *Myzus persicae*.**

A) Estilete mandibular. B) Estilete maxilar.



Para poner a punto un control del ensayo se utilizó el anticuerpo α PepL que detecta un dominio conservado de las proteínas cuticulares, (secuencia de aminoácidos GSYSLLEADGSTRVE) (Uzest *et al.*, 2010). En disecciones de estiletes mandibulares y maxilares, sólo en estos últimos se observó señal de fluorescencia debida a la acumulación de proteína cuticular.

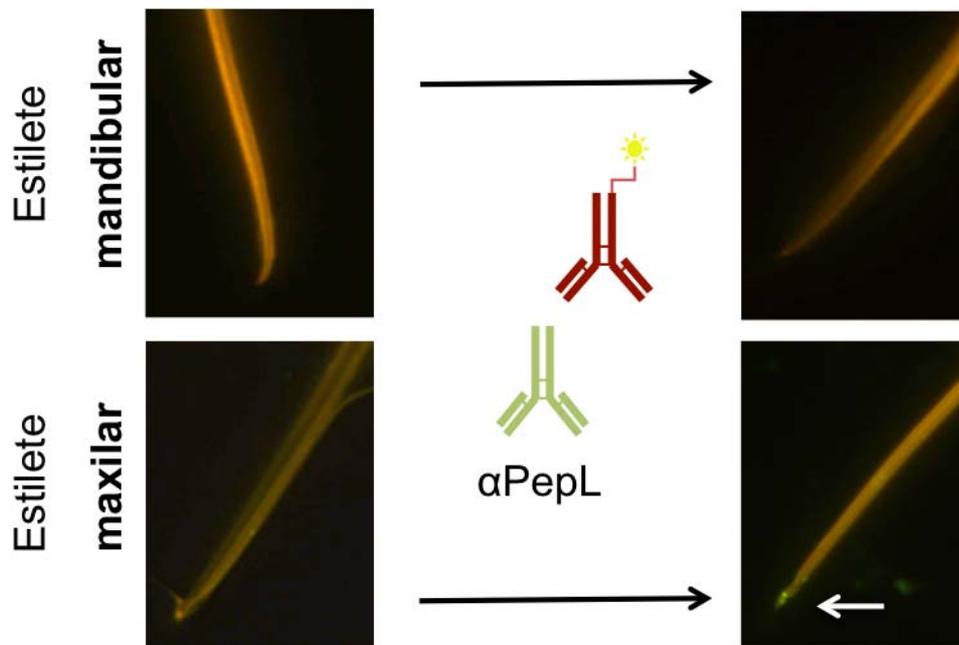


Figura 31. **Detección de proteínas cuticulares mediante su inmunolocalización con el anticuerpo α PepL.** En la parte izquierda superior, se ve como el estilete mandibular no presenta señal al ser incubado con el anticuerpo que detecta tejido cuticular. Sin embargo, en la parte inferior derecha, se observa la señal (flecha blanca) de acumulación de proteínas cuticulares en el estilete maxilar.

Para el experimento de inmunodetección de MpRPS2 con su antisuero específico, de nuevo se diseccionaron los estiletes diferenciándolos en mandibulares y maxilares. El anticuerpo contra proteínas cuticulares se usó como control positivo.

Cuando se ensayó el antisuero específico contra MpRPS2, no se obtuvo marcaje. Intentos posteriores incluyendo un tratamiento con quitinasa, que en teoría puede ayudar a dejar más expuestas las proteínas presentes en esta estructura, continuaron sin producir una señal detectable asociada a la presencia de MpRPS2 en el estilete, mientras que la señal en el control positivo no se vio alterada.

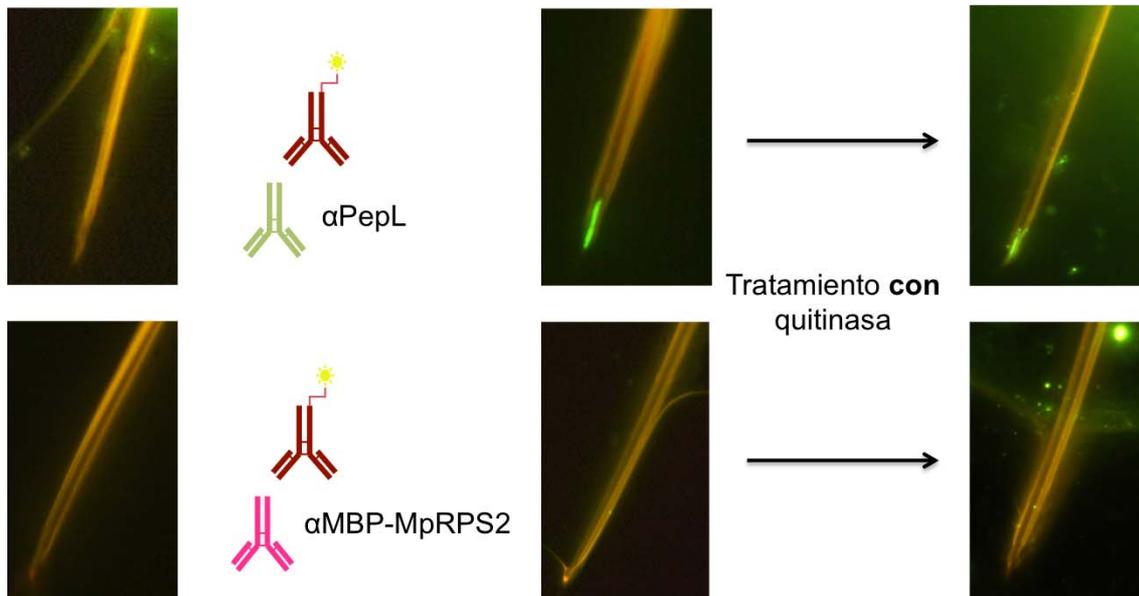
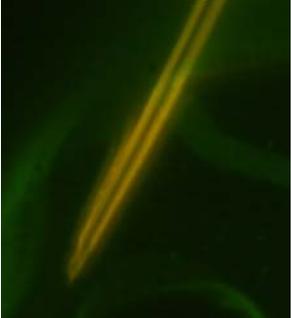
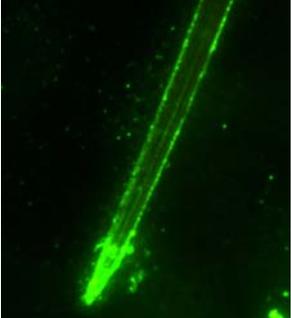


Fig 32. **Inmunolocalización de MpRPS2 en el estilete.** En la parte superior se muestra la detección de proteína cuticular mediante el anticuerpo PepL, mostrando señal positiva con o sin tratamiento con quitinasa. En la parte inferior, se utilizó el antisuero para detectar el candidato a receptor MpRPS2, su localización fue imposible aún tratando con quitinasa.

Intentos adicionales de localización de proteínas en el estilete se llevaron a cabo imitando *in vitro* las condiciones químicas propias de la saliva. Se buscaba si MpRPS2 podría mediar en la interacción con el estilete en unas condiciones diferentes a las de los ensayos anteriores. Para ello se probaron variaciones en el pH, el tampón de elución, y se ensayó también una variante de la proteína HCPPro unida a GFP. La siguiente figura resume los ensayos hechos variando estos parámetros:

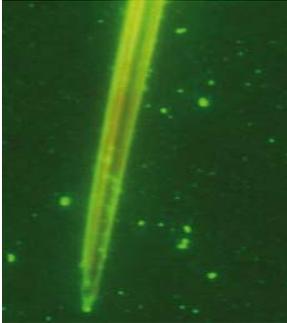
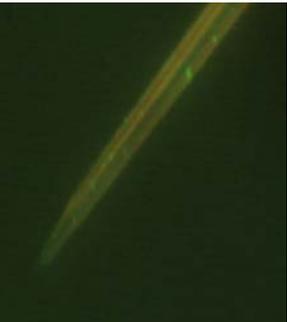
Localización de MpRPS2 a través de la interacción con HcPro- GFP y EGTA

Muestras analizadas	Imagen
Muestra incubada durante 1 hora con HcPro- GFP 300mM EGTA	
Muestra incubada durante 4 horas con HcPro- GFP 300mM EGTA y 1 hora con GST- MpRPS2 purificada	
Muestra incubada durante 1 hora con HcPro- GFP 200mM EGTA	

Localización de MpRPS2 a través de la incubación de la proteína purificada GST-
MpRPS2 en los estiletes

Muestras analizadas	Imagen
Incubación de 45 minutos de la muestra con GST- MpRPS2 purificada	
Incubación de 30 minutos de la muestra con GST- MpRPS2 purificada y a continuación con HCPPro- GFP purificada durante 2 horas.	

Localización de MpRPS2 cambiando condiciones de pH.

Muestras analizadas	Imagen
Muestra incubada con GST- MpRPS2 purificada dializada en TrisHCl 1M pH 8.	
Muestra incubada con GST- MpRPS2 purificada dializada en MES 1M pH 5,6	

Muestras analizadas	Imagen
Muestra incubada con GST- MpRPS2 y HCPro- GFP purificadas y dializadas en MES 1M pH 5,6	
Muestra incubada con GST- MpRPS2 y HCPro purificadas y dializadas en MES 1M pH 5,6	

Tal y como se muestra en las imágenes, no fue posible obtener una detección clara de MpRPS2 en el estilete aún variando ciertos parámetros que podían acercarnos más a las condiciones *in vivo*.

3. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE NUEVOS CANDIDATOS A RECEPTOR A PARTIR DEL INTERACTOMA DE HCPro CON PROTEÍNAS DE PULGÓN VECTOR.

Con objetivo de identificar el/los hipotéticos receptor/es en *Myzus persicae*, responsable del proceso de transmisión no persistente de TEV, se realizó una búsqueda de proteínas con capacidad de interacción *in vitro* con la proteína HCPro en muestras procedentes de una extracción enriquecida en proteínas cuticulares de pulgón. Se denominó interactoma al conjunto de proteínas así seleccionadas. Para

aumentar el poder discriminatorio de los ensayos, se llevaron a cabo comparaciones entre los resultados de extractos incubados con HCPro (interactoma +) y los mismos con la variante denominada EITC, mutante de HCPro que pierde la capacidad de transmisión (interactoma -).

3.1.- ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS DE PULGÓN E INTERACTOMA DE ÉSTOS CON LA PROTEÍNA HCPro.

Se realizaron extracciones de proteínas de pulgón con el protocolo mencionado en el apartado 6.1.1 enriquecidas de proteínas cuticulares. Estos extractos se analizaron en geles unidimensionales desnaturalizantes de acrilamida-bisacrilamida (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para realizar un ensayo de interacción *in vitro* con las proteínas HCPro y EITC. Estas proteínas se detectaron gracias al antisuero disponible en el laboratorio *chisHCPro*. Como control de la extracción, se tiñó un gel sin transferir con nitrato de plata.

Esta vez se incluyó extracto de otro pulgón, *Acyrtosiphon pisum*, insecto del que también disponíamos de una colonia en el laboratorio (procedente de individuos proporcionados por el Dr. Stephan Blanc, BGPI, Montpellier, Francia). *A. pisum* es también vector de algunos virus de transmisión no persistente y gracias a la reciente secuenciación de su genoma (Consortium, 2010), resulta una herramienta útil para identificar los factores que interaccionan con HCPro.

Como se muestra en la tinción de plata de las proteínas extraídas y separadas por electroforesis unidimensional (figura 33) se obtuvieron proteínas que abarcaron el rango de pesos moleculares entre 15 y 250 KDa.

Para realizar los ensayos de interacción, las proteínas extraídas a partir de 0,5g de cuerpos completos de individuos de *M. persicae* y *A. Pisum* separadas por electroforesis unidimensional, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, incubadas con HCPro y reveladas con su antisuero específico. Estos ensayos se repitieron 2 veces (por especie de pulgón) mostrando, en las repeticiones, diferencias mínimas en cuanto a la intensidad de interacción y al número de proteínas que interaccionaron, indicando que la proteína HCPro puede unirse predominantemente a proteínas de pulgón de pesos moleculares estimados de 15, 20, 27, 30 y 40 KDa (figura 33)

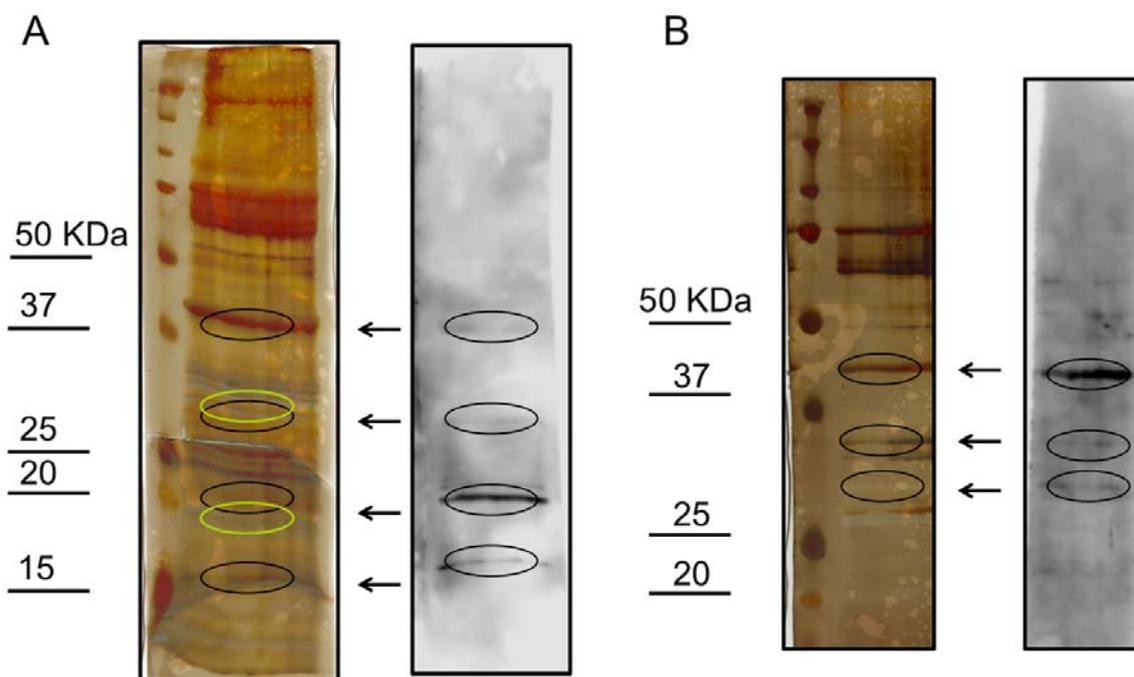


Figura 33. **Separaciones unidimensionales de una extracción de proteínas de diferentes pulgones y su correspondientes Far Western Blot usando HCPPro purificada.** El panel A se refiere a la extracción de proteínas del pulgón *A. pisum* mientras que el panel B, muestra la extracción de *M. persicae*. En la parte derecha de ambos paneles, se sitúan los Far Western blots realizados mediante la incubación con HCPPro, que muestran las interacciones de esta proteína con diversas proteínas de pulgón. Los círculos señalan las bandas interactoras que se mandaron a secuenciar para ser analizadas posteriormente en función de su posible papel como receptor de transmisión viral.

3.2.- ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS DE PULGÓN E INTERACTOMA DE ÉSTOS CON LA PROTEÍNA HCPRO Y LA VARIANTE MUTANTE EITC.

Para poder aumentar la resolución y realizar una mejor caracterización de la naturaleza de las proteínas extraídas de pulgón que interaccionaron con la proteína HCPPro en el ensayo anteriormente descrito, se realizó el mismo análisis utilizando como herramienta de separación de las proteínas geles unidimensionales. Los extractos de pulgón se analizaron en geles bidimensionales discontinuos desnaturizantes de acrilamida-bisacrilamida (SDS-PAGE) y se trataron igual que se ha mencionado anteriormente con los genes unidimensionales. Una muestra representativa del tipo de resultados obtenidos se muestra en la figura 34. El número de proteínas presentes en el gel se estimó entre 45 y 60.

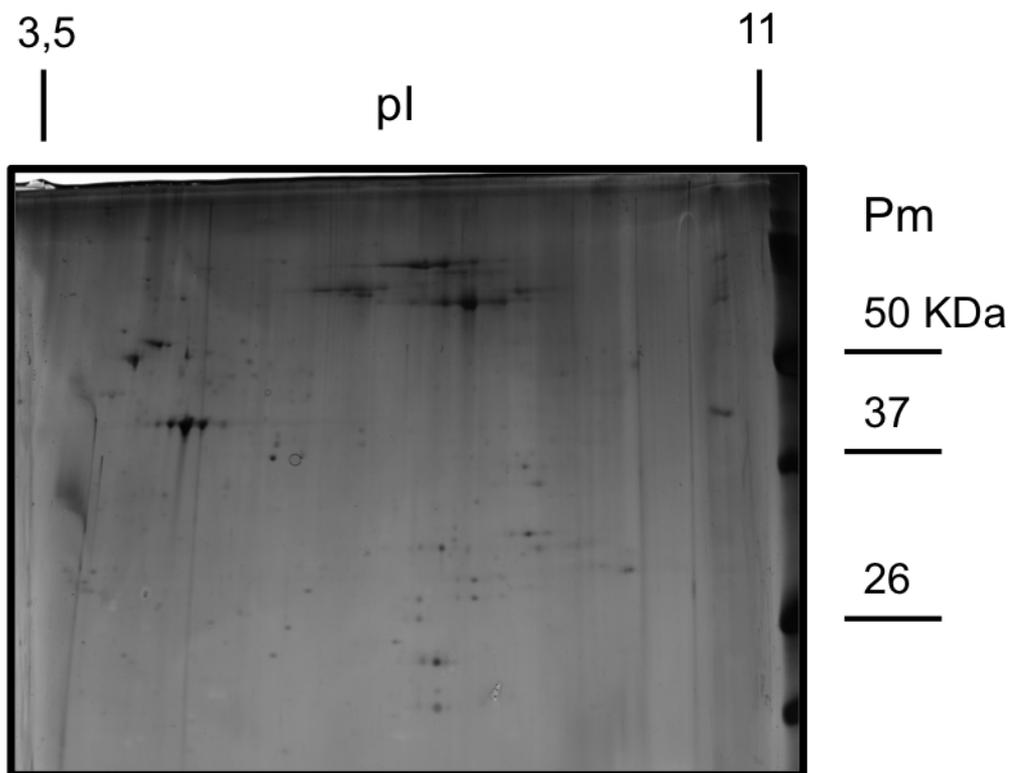


Fig 34. **Electroforesis bidimensional (2D) de una extracción proteica enriquecida de proteínas cuticulares de *Myzus persicae*.** Tinción de plata de las proteínas extraídas de pulgón y separadas en geles 2D.

Una vez realizados los ensayos far-western, se observó la presencia de señales correspondientes a proteínas que indicaban diferentes interacciones entre HCPPro y factores en el pulgón, lo que pone de manifiesto que con este tipo de experimentos sería teóricamente posible determinar los receptores que intervienen en el proceso de transmisión, si estuvieran suficientemente representados en la muestra analizada y la interacción se mantuviera en las condiciones del ensayo. Como controles se realizaron incubaciones sin proteína interpuesta y con la proteína mutante EITC purificada. En este último control se obtuvieron menos señales de interacción, lo que nos podría estar indicando la pérdida de interacción con algunos factores, tal vez asociada a la funcionalidad en transmisión. Este mismo diseño experimental fue el empleado con anterioridad para detectar proteínas de cabezas de *Myzus persicae* diseccionadas con capacidad de interactuar específicamente con HCPPro de TEV (Fernandez-Calvino *et al.*, 2010). La diferencia fundamental en este caso es que se utilizó un procedimiento de aislamiento de proteínas cuticulares, enfocado a enriquecer el extracto en dichas proteínas. Aunque se planteó la posibilidad de realizar extractos

de proteínas procedentes de estiletes de pulgones aislados, al realizar la disección de los pulgones se observó que la manipulación requerida para obtener el aislamiento del estilete posiblemente dañase la estructura del mismo y se podría estar perdiendo parte de la estructura responsable del fenómeno de transmisión viral en virus no persistentes. Este efecto se debe a que una vez seccionados los estiletes, la separación de los mismos exigen aplicar una fuerza relativamente importante en la zona distal, donde se localiza el acrostilo y se fusionan los canales alimenticio y salival. Se prefirió, por tanto, continuar realizando extractos de pulgón completo que incluían al estilete del pulgón intacto.

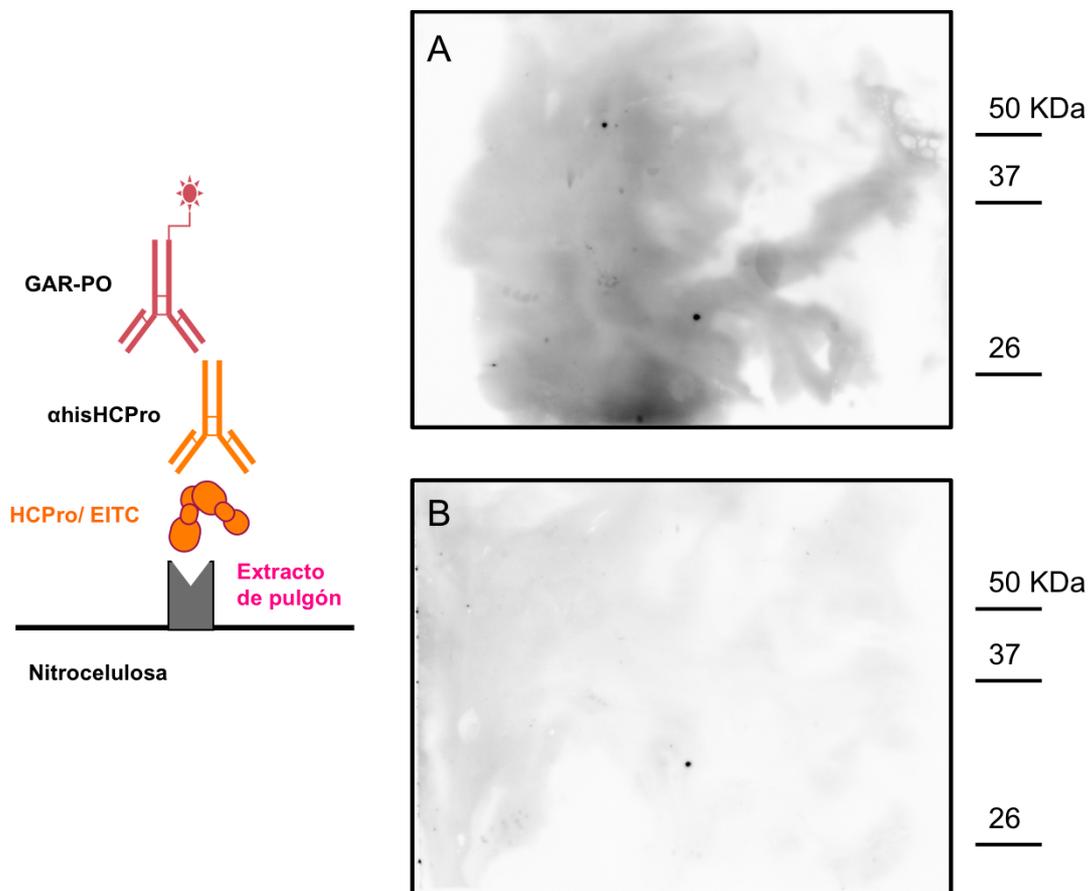


Figura 35. **Ensayos de interacción Far Western Blot usando HCPPro o EITC como proteínas de incubación.** En la parte superior (A) se muestra la incubación de la membrana con HCPPro, mientras que en la parte inferior (B) se muestra la incubación con EITC (mutante de HCPPro).

Como se ve en la figura 35, este ensayo demostró la existencia de interacción entre algunas de las proteínas extraídas de pulgón y la proteína HCPPro. Cuando la incubación de las membranas se realizó en presencia del mutante de HCPPro, EITC, se observaron variaciones en el patrón de interacción, aunque la comparación entre los conjuntos de señales (interactomas) no era lo suficientemente clara como para localizar específicamente las mismas señales diferenciales en sucesivas repeticiones del experimento (no mostrado). Por esta razón, se decidió continuar con ensayos usando geles unidimensionales para elegir los candidatos a analizar. La principal ventaja de estos geles es que el volumen de extracción de proteínas que se puede someter a electroforesis es mayor con lo que se podría aumentar la cantidad total de proteína analizada, y además permite realizar un mayor número de repeticiones que los ensayos bidimensionales.

3.3.- IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE PULGÓN QUE INTERACCIONAN CON EL FACTOR VIRAL HCPRO.

Las bandas correspondientes a proteínas que presentaron interacción con la proteína HCPPro en los análisis anteriores fueron aisladas y analizadas por espectrometría de masas (LC- MS/MS) en un espectrómetro de masas Q-TOF. Aunque las bandas aparecían como discretas en las imágenes, se aislaron unos fragmentos de gel correspondientes a la misma movilidad electroforética con una anchura superior a la de la banda propiamente dicha, tratando de minimizar en lo posible un error en la selección de los productos. Al tratarse además de extractos que contenían un gran número de proteínas (como se puede observar en las tinciones con plata), el número de proteínas individuales por cada fragmento de gel se podría estimar entre 15 y 40 KDa. La información de la secuencia de los fragmentos peptídicos fue obtenida gracias al Servei Científic-Tècnic del Parc Científic de Barcelona. Así se identificaron hasta un total de 167 posibles proteínas diferentes en el proceso de secuenciación, que abarcaron un rango de pesos moleculares entre 75 KDa y 20 KDa. De estas, sólo predicciones con cobertura (“coverage”) mayor al 40% con el genoma de referencia (*A. pisum*) fueron elegidas para proseguir el análisis, obteniendo un total de 48, atendiendo a criterios adicionales. La selección de esta lista restringida se hizo considerando la coincidencia entre tamaño de la banda analizada y el peso molecular esperable de los productos identificados, el número de veces que la proteína se identificaba en repeticiones del experimento en bandas equivalentes, y

también atendiendo a la presencia de productos homólogos en muestras de *M. persicae* y de *A. pisum* (ver apartado 3.4).

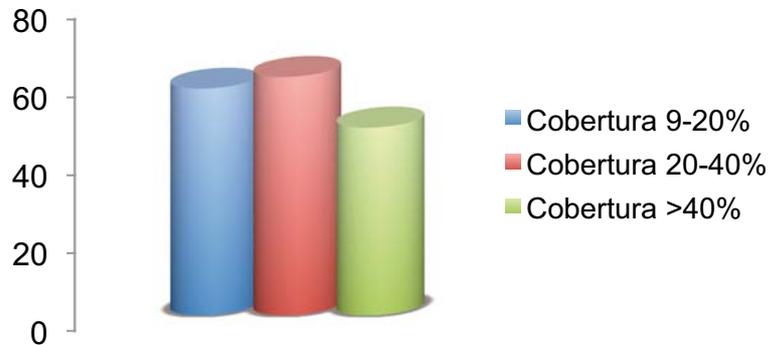


Figura 36. **Representación en gráfico de columnas de las proteínas identificadas en un interactoma entre HCPPro y proteínas de pulgón, en base a la cobertura con el genoma de referencia.** Este diagrama se hizo en función de la cobertura con el genoma de referencia de *A. Pisum* de las secuencias proporcionadas después de su paso por el espectrómetro de masas.

Gracias a la base de datos NCBI, las 48 proteínas fueron clasificadas en base a dominios reconocidos en proteínas de tipo cuticular, ribosomal u otras, obteniendo un 19% de proteínas cuticulares, un 23% de proteínas ribosomales y el resto proteínas sin funciones o dominios específicos asignados. Entre las proteínas ribosomales se encontró RPS2, previamente identificada en el screening de proteínas de cabeza de pulgón (Fernández-Calvino et al., 2010).

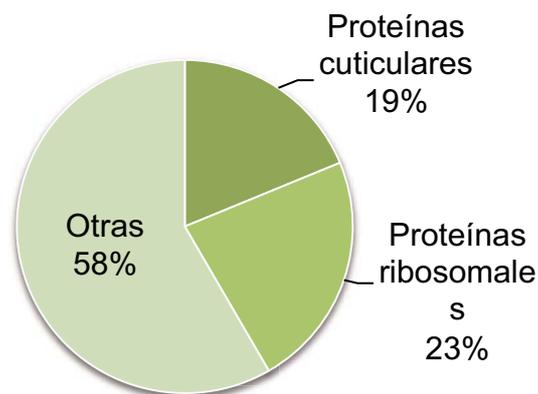


Figura 37. **Gráfico en porciones de los tipos proteínas secuenciadas que presentaron una cobertura mayor del 40% con el genoma de referencia.** Estas proteínas están clasificadas en proteínas “ribosomales” y “cuticulares”, presentando éstas dominios típicos y en el resto como “otras” ya que no presentaron dominios o funciones específicas importantes.

3.4.- IDENTIFICACIÓN Y ELECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE PULGÓN UTILIZANDO LAS SECUENCIAS DE LOS PÉPTIDOS OBTENIDOS EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

A partir de las secuencias facilitadas por el Servei Científic-Tècnic del Parc Científic de Barcelona, se realizó una búsqueda específica en la base de datos que contiene el genoma del *A. pisum* (<http://www.aphidbase.com/aphidbase>). Se consideraron las categorías funcionales de los candidatos de acuerdo con la anotación disponible de dicho genoma

Además, se utilizaron los datos de una genoteca realizada con *Myzus persicae* (Sulzer), que proviene de extractos realizados de pulgón entero, pudiendo comparar así los genes obtenidos de la base de datos de *A. pisum* con los contigs disponibles de *M. persicae*. El acceso a la información de secuencias no publicadas de *M. persicae* se pudo realizar directamente en el servidor de la U. Cornell, USA, en el marco de una estancia de colaboración con el grupo del Dr. G. Jander.

Para identificar posibles candidatos a receptores que intervengan en la transmisión viral, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios para la elección:

- Proteínas de tipo cuticular, debido a que el lugar donde son retenidas las partículas virales de potyvirus es en la parte distal del estilete maxilar (Wang *et al.*, 1996) que es donde se encuentra el acrostilo, estructura descrita recientemente donde se acumula gran cantidad de proteínas de tipo cuticular (Uzest *et al.*, 2010).
- Proteínas de tipo ribosomal, como ya se ha explicado, MpRPS2 fue identificado previamente como candidato a receptor (Fernandez-Calvino *et al.*, 2010) lo que permite extender la multifuncionalidad de otras proteínas ribosomales como posibles factores que intervengan en la transmisión viral.

Así, un primer candidato seleccionado para estudios posteriores fue la proteína cuticular denominada RR1Cp2 de la que se muestran sus principales características en la tabla siguiente.

Tabla XV. **Características de la proteína cuticular** seleccionada a partir de la secuenciación de extractos de pulgón que supuestamente interactuaban con HCPPro.

Proteína	Pm teórico (KDa)	Acceso AphidBase	Acceso NCBI	Identidad	Descripción
Cuticular RR1Cp2	27	ACYPI001775	gi 288558737	58	Los dominios RR son regiones conservadas en artrópodos que putativamente unen quitina.

También se decidió utilizar MpRPS2, proteína ribosomal previamente seleccionada.

Un alineamiento de la hipotética proteína RR1Cp2 de *M. persicae* con su homóloga en *A. pisum* denominada RR1Cp8 (figura 38), nos permitió averiguar la conservación de este candidato en otros pulgones, presentando un 94% de similitud mediante el programa T- Coffe integrado en el software de E- BioX.

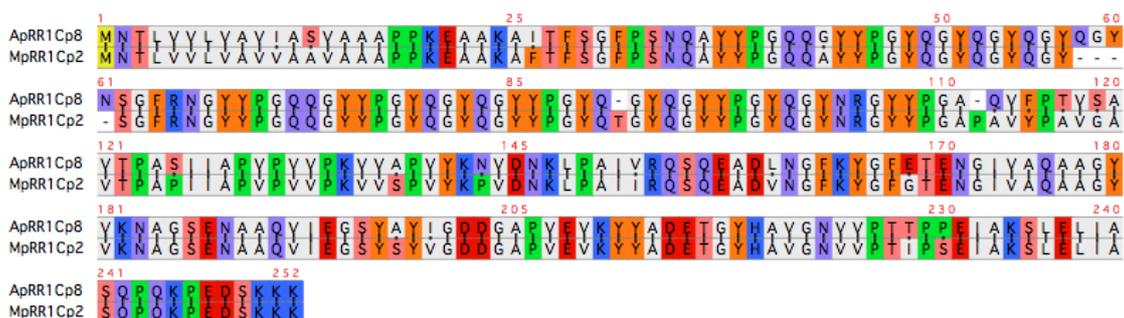


Figura 38. **Alineamiento de la secuencia de la proteína identificada RR1Cp2 en el interactoma con la proteína RR1Cp8 de *A. pisum*.** Los aminoácidos sombreados con el mismo color están conservados en las secuencias alineadas.

3.5.- IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE PULGÓN QUE DEJAN DE INTERACCIONAR CON EL MUTANTE DE HCPRO, EITC.

Del mismo modo que se procedió para averiguar el interactoma de HCPPro con la extracción enriquecida de proteínas cuticulares de pulgón, se realizó un ensayo Far Western blot utilizando esta vez como cebo en la fase de incubación, el mutante de HCPPro, EITC, que resulta ser el descrito como dominio mutado que hace perder la capacidad de transmisión en HCPPro.

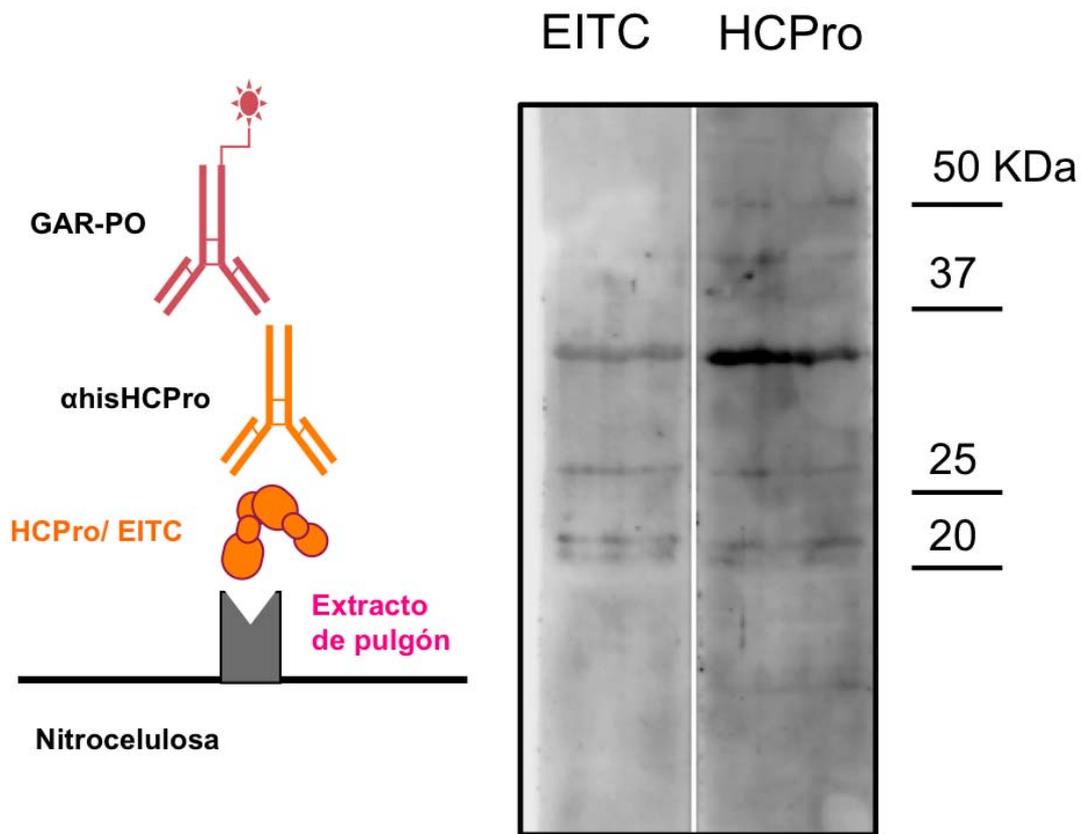


Figura 39. Far Western blot usando como cebo EITC/HCPPro de una extracción enriquecida en proteínas cuticulares de pulgón. En la parte izquierda de la figura se muestra el esquema del ensayo. A la derecha se encuentran las dos membranas de izquierda a derecha incubadas con EITC y HCPPro respectivamente.

En la figura 39 se observa una disminución de intensidad en las bandas en la membrana incubada con EITC, en concreto, bandas con una movilidad aproximada de 50, 42 y 38 KDa (en la zona superior) y de 18 KDa (en la zona inferior) no se detectaban en la incubación con el mutante EITC, mientras que las de 34, 27 22 y 21 KDa aparecían con una intensidad similar a la mostrada en la incubación con el factor HCPPro no modificado.

3.6.- IDENTIFICACIÓN DE MpRPS2 EN EL EXTRACTO ENRIQUECIDO DE PROTEÍNAS CUTICULARES DE PULGÓN.

Además de realizar un nuevo interactoma en busca de nuevos candidatos, se decidió buscar si el candidato previamente estudiado MpRPS2 se encontraba presente entre las proteínas aisladas en esta nuevo método de extracción, mediante un ensayo Western blot usando el antisuero específico disponible y titulado en este trabajo, α MBP- MpRPS2.

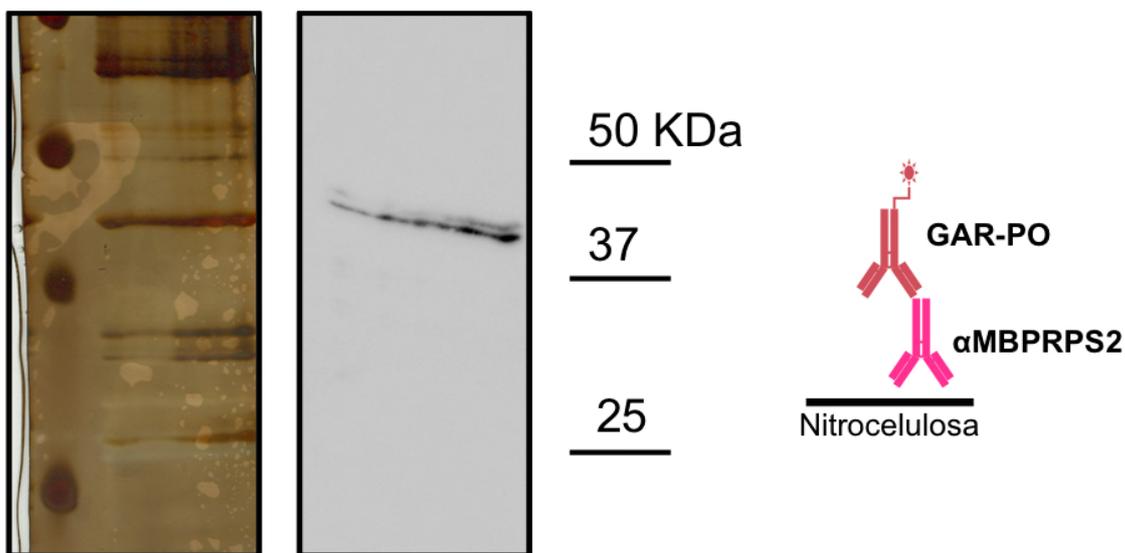


Figura 40. **Western Blot de extracto de pulgón usando el antisuero específico α MBP-MpRPS2.** En el panel izquierdo se muestra la electroforesis de la extracción teñida con plata, mientras que en el panel derecho se muestra el Western Blot usando el antisuero específico contra la proteína MpRPS2.

En la figura se muestra una clara detección de la proteína MpRPS2 en el extracto proteico de pulgón. Además, posteriormente, en la identificación de proteínas mediante el interactoma anteriormente explicado, MpRPS2 vuelve a ser identificado como posible interactor.

4. ESTUDIO DE DIFERENTES PARÁMETROS DEL CICLO VITAL DE UNA POBLACIÓN *M. PERSICAE* EN TABACO BAJO CONDICIONES ESPECÍFICAS.

4.1.- ESTUDIO DEL CICLO VITAL

Debido a los diversos cambios que sufren estos insectos a lo largo de su ciclo vital (metamorfosis), se consideró necesario establecer la duración de las etapas del ciclo de vida en las condiciones de cría de la población en el laboratorio. Tal y como se ha mencionado en el apartado de material y métodos, la colonia de *M. persicae* se encontraba sobre plantas de tabaco en cajas situadas en una cámara visitable, a una temperatura entre 18 y 22°C y con un fotoperiodo de tipo día largo. Con estos parámetros establecidos, se observó a través de mediciones sobre fotografías hechas con la lupa Olympus DP71, que los individuos de nuestra colonia de insectos pasaban por cuatro fases ninfales en los 5 primeros días de su vida mediante procesos de muda necesarios para pasar a la fase siguiente. Del sexto al séptimo día entraban en una fase que se denomina pre-adulto donde aún son inmaduros en términos de reproducción, pero ya no mudan. A partir del octavo día, los pulgones pasaban a ser maduros reproductivamente, siendo capaces de tener mediante partenogénesis de 4 a 5 ninfas al día. Cabe destacar, que en las condiciones descritas anteriormente, los pulgones no pasan por ciclo sexual, obteniendo así una población clonal continua de insectos hembras ápteras, aunque se encontraban en ocasiones algunos individuos alados.

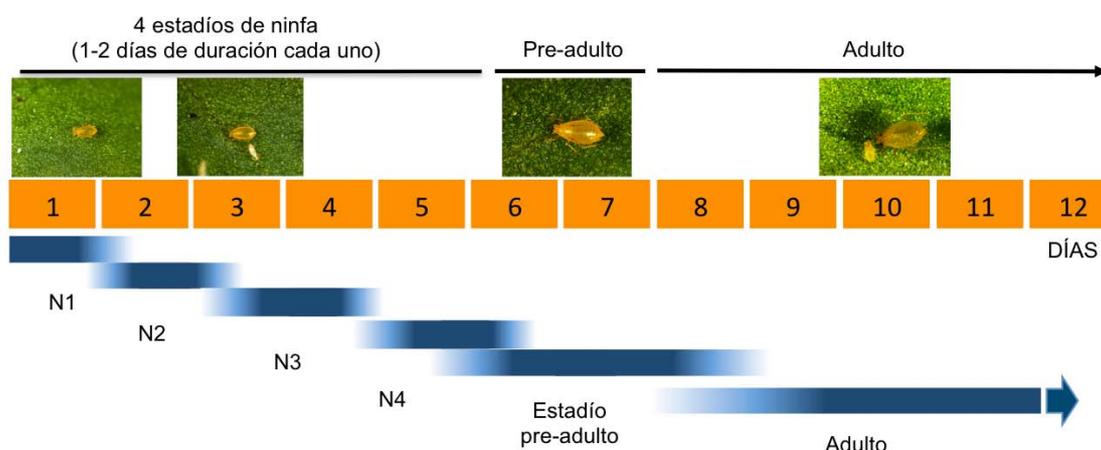


Figura 41. Esquema del ciclo vital de *M. persicae* en las condiciones del laboratorio: 18-22°C y día largo como fotoperiodo.

4.2.- MEDIDA DE LA CÁPSULA CEFÁLICA EN LOS DIFERENTES ESTADÍOS DEL CICLO VITAL DEL PULGÓN.

Al tratarse de una población clonal y por tanto formada por individuos genéticamente idénticos, y por seguir una metamorfosis con ninfas similares morfológicamente a los adultos, es difícil conocer en qué estadio de desarrollo se encuentra cada individuo. Para obtener información de la edad de cada pulgón, se propuso medir la variación de tamaño de la cápsula cefálica diariamente en cada fase del ciclo, obteniendo de esta forma unos valores que pueden servir de ayuda para saber el estadio aproximado en que se encontraba un pulgón determinado. Esta medida se basa en la distancia que hay entre los ojos del pulgón, y se obtuvo gracias al Software al que está conectada la lupa Olympus DP71, Cell, que a partir del aumento y otros parámetros, es capaz de dar la medida en micrómetros entre dos puntos de la imagen. Este parámetro morfométrico se determinó mediante medidas diarias efectuadas sobre 10 individuos, y los resultados se muestran en la figura 42.

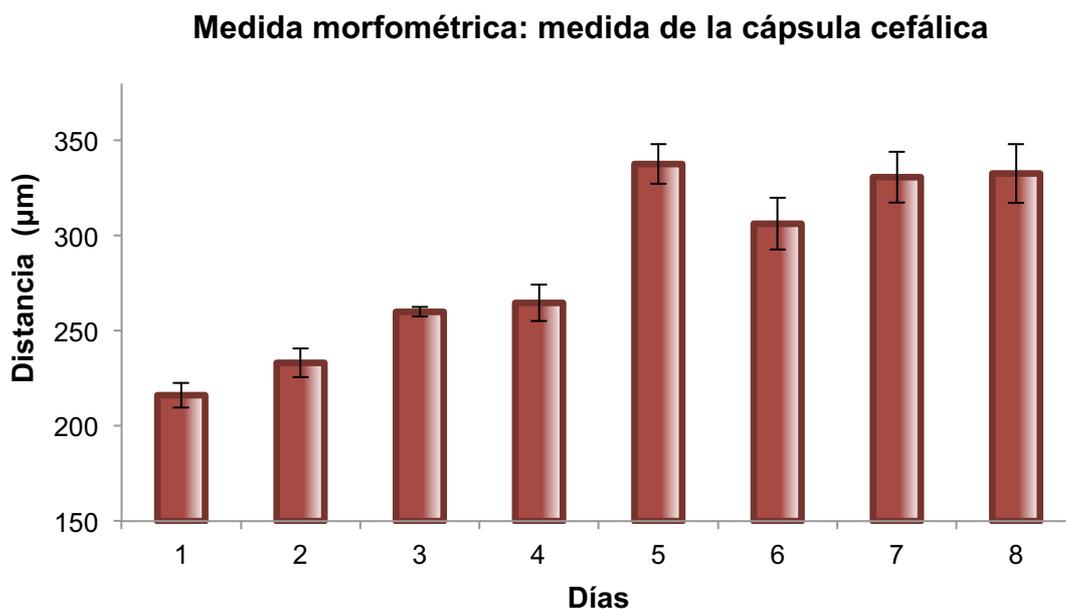


Figura 42. Diagrama de barras con las medidas morfométricas de la cápsula cefálica de *M. persicae* a lo largo de su ciclo vital.

Como se observa, la cápsula cefálica aumentaba de tamaño diariamente hasta el día 5, estabilizándose entonces. En nuestras condiciones los pulgones en fases ninfales mudaban aproximadamente cada día hasta alcanzar las fases de pre-adulto y adulto.

4.3.- EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS CANDIDATOS A RECEPTOR MPRPS2 Y MPRR1CP2 A LO LARGO DEL CICLO VITAL DEL PULGÓN.

Una vez seleccionados los dos candidatos a receptor en la transmisión viral, MpRPS2 y MpRR1Cp2 se estudiaron sus patrones de expresión a lo largo del ciclo vital del insecto. Para ello se escogieron pulgones individualizados diariamente (y que como hemos visto corresponden mayoritariamente a los diferentes estadios del desarrollo) y se analizaron los niveles de transcritos de cada gen mediante RT-qPCR y normalizando después con los niveles de MpRPL7, gen ribosomal constitutivo elegido para estos ensayos.

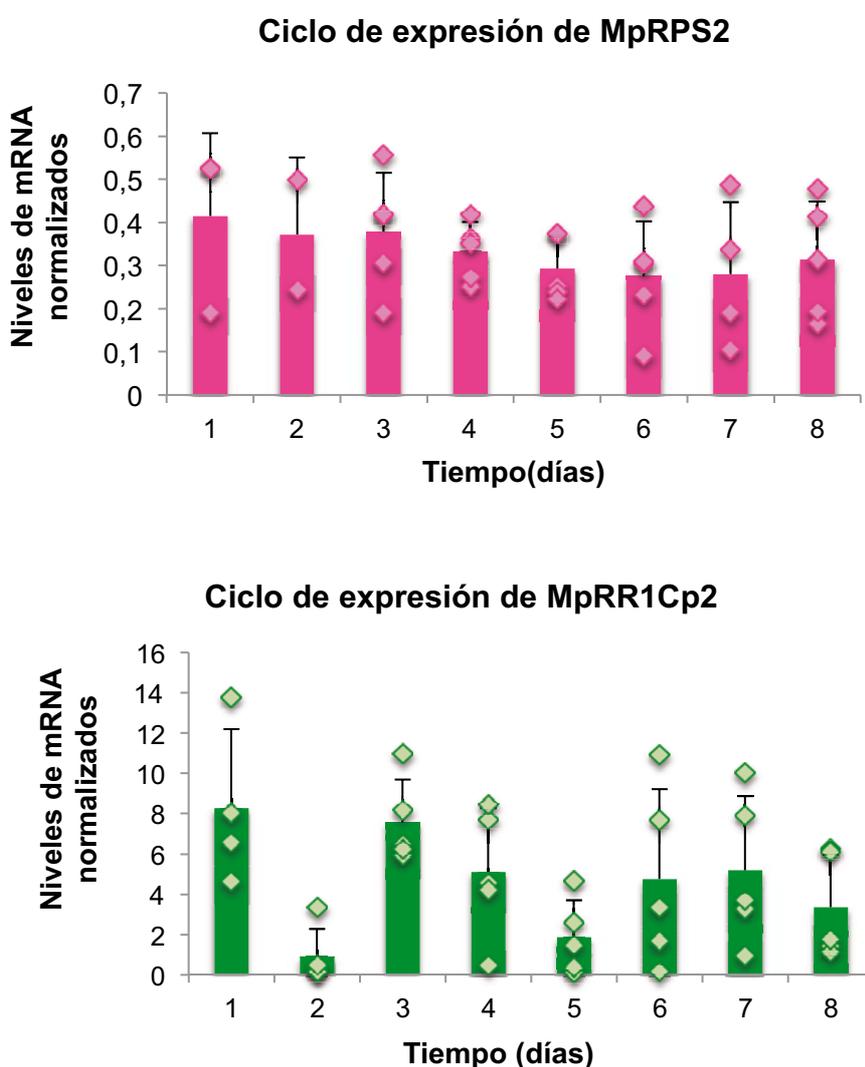


Figura 43. **Patrones de expresión de los genes de pulgón MpRPS2 y MpRR1Cp2 a lo largo de los diferentes estadios del ciclo vital.** Estas gráficas representan las variaciones de la expresión de dos genes MpRPS2 (superior) y MpRR1Cp2 (inferior) a lo largo del ciclo medido por RT- qPCR y normalizados gracias a la medición conjunta del gen constitutivo MpRPL7.

Los gráficos de la figura 43 indican que MpRPS2 es un gen que a lo largo del ciclo mantiene una expresión más baja que la del gen de referencia MpRPL7, y que su expresión es relativamente estable. Contrariamente a éste, MpRR1Cp2 presenta una expresión muy superior a la del gen de referencia, y sufre variaciones más marcadas, aunque siempre más alta comparada con el constitutivo. Este gen podría estar relacionado con los procesos de muda, ya que presenta un patrón más cercano al esperable de genes implicados en crecimiento y desarrollo del insecto.

5. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS DE SILENCIAMIENTO DE GENES DE PULGÓN A TRAVÉS DE DISTINTAS TÉCNICAS BASADAS EN LA ALIMENTACIÓN.

Disponer de un sistema capaz de silenciar la expresión de genes concretos del insecto vector puede servir para validar la presumible actividad en transmisión de virus de los genes candidatos seleccionados. Con este objetivo, se planteó el desarrollo de dos metodologías de silenciamiento de la expresión en genes de insecto a través del uso de dietas artificiales o del uso de vectores virales VIGS en plantas.

5.1.- EVALUACIÓN DE LA DIETA ARTIFICIAL COMO MÉTODO DE SILENCIAMIENTO DE GENES DE PULGÓN

Las dietas artificiales para la cría de insectos han sido ampliamente estudiadas y mejoradas a lo largo de los últimos años (Turner *et al.*, 2006; Baum *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010) permitiendo suplir la alimentación natural del pulgón. Para que un insecto consuma un alimento este debe cumplir varios requisitos: ser reconocible por el insecto, estar en condiciones de ser ingerido y digerido y aportar los nutrientes necesarios que permitan la supervivencia y reproducción del insecto (Artigas, 1994). Con este sistema se alimentaron los pulgones con una dieta que incorporaba dsRNA, previamente sintetizado artificialmente, con un fragmento de secuencia homóloga a los genes identificados que se deseaba interferir, que en este caso fueron los candidatos MpRPS2 y MpRR1Cp2. Los pulgones alimentados en dietas conteniendo dsRNA, fueron analizados individualmente por RT-qPCR tras 3, 5 y 8 días de ingesta. Se utilizaron ninfas de un día al comenzar los experimentos, a fin de reducir la variabilidad asociada al desarrollo entre los tratamientos.

Los resultados de las medias obtenidas a partir del análisis de 5 pulgones individuales están recogidos en la tabla XVI.

Tabla XVI. **Niveles medios normalizados de mRNA y sus desviaciones estandar (sd) correspondientes a dos genes de pulgones individuales alimentados en dieta artificial**, dieta artificial suplementada con un control de dsRNA no específico y dieta artificial suplementada con dsRNA específico contra los genes diana (MpRPS2 y MpRR1Cp2).

Tratamiento	Genes analizados	Día 3		Día 5		Día 8	
		Media	Sd	Media	Sd	Media	Sd
Dieta	MpRPS2	0,22	0,05	0,28	0,04	0,29	0,07
	MpRR1Cp2	9,07	5,81	1,61	1,90	2,19	1,24
RNAi	MpRPS2	0,30	0,03	0,21	0,06	0,34	0,07
	MpRR1Cp2	6,96	2,59	2,91	1,65	1,75	0,81
dsMpRPS2	MpRPS2	0,23	0,04	0,25	0,04	0,29	0,07
dsRR1Cp2	MpRR1Cp2	4,93	3,52	2,67	3,78	3,04	1,14

A partir de estos datos se realizó un análisis de significación estadística mediante la prueba t de Student. Así se compararon los diferentes tratamientos: dieta/dsRNA control, dieta/dsRNA del gen analizado y dsRNA control/dsRNA del gen. La significación se marcará en este caso a partir de datos menores o iguales a 0,05 (valor p). (tabla XVII)

Tabla XVII: **Valor p** de la comparación entre niveles medios de expresión normalizados (prueba T-student) en pulgones alimentados con dieta artificial.

Gen	Comparación	Valor p		
		Día 3	Día 5	Día 8
MpRPS2	Dieta/dsRNAi	0,01	0,10	0,43
	Dieta/dsMpRPS2	0,6	0,38	0,59
	dsRNAi/dsMpRPS2	0,01	0,27	0,24
MpRR1CP2	Dieta/dsRNAi	0,48	0,28	0,52
	Dieta/dsMpRR1Cp2	0,21	0,59	0,30
	dsRNAi/dsMpRR1Cp2	0,33	0,90	0,07

Ensayo de interferencia de MpRPS2 mediante dieta artificial

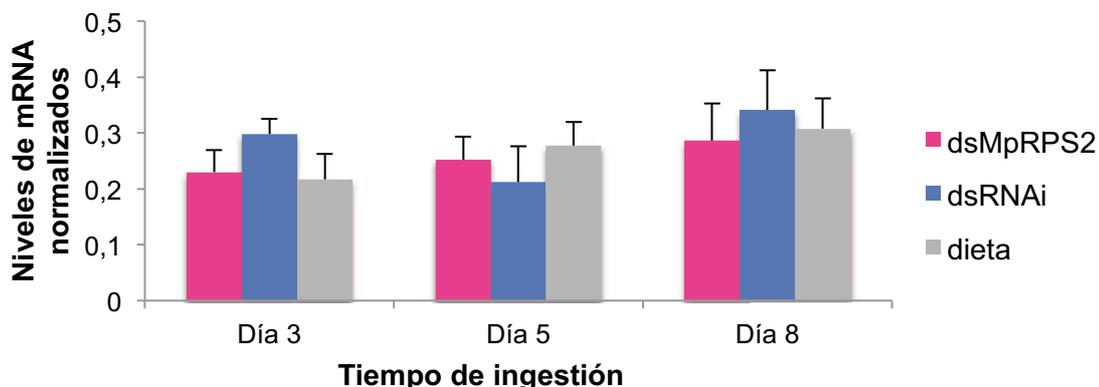


Figura 44. **Ensayo de interferencia de MpRPS2 mediante dieta artificial.** En este gráfico de barras se muestran los niveles de MpRPS2 (rosa) después de la ingesta por los pulgones de dieta artificial suplementada con una cantidad de 1,3 μg de dsRNA con la secuencia correspondiente al fragmento 328-478 del candidato a receptor. Las barras azul y gris muestran dos tipos de control, el primero referente a la dieta suplementada con un dsRNA sin relación alguna con genes de pulgón y el segundo, la dieta sin dsRNA.

Ensayo de interferencia de MpRR1Cp2 mediante dieta artificial

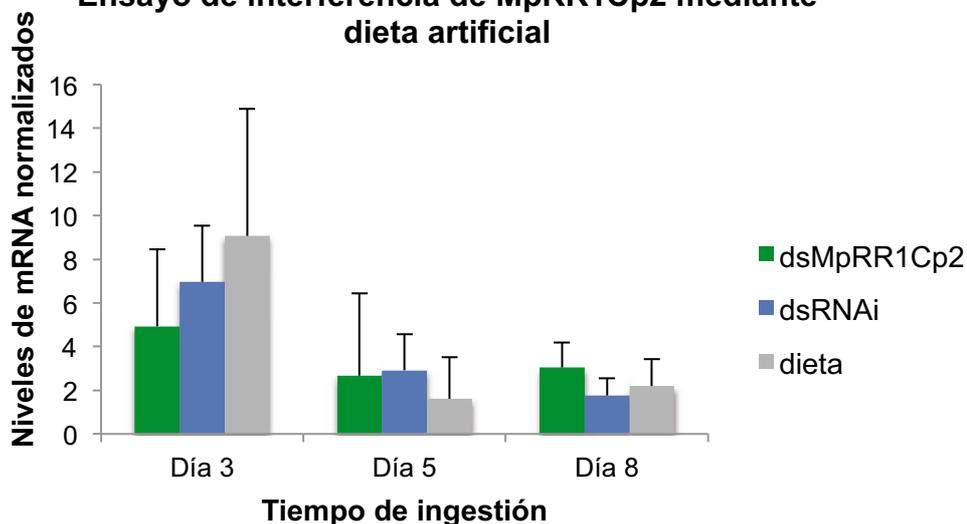


Figura 45. **Ensayo de interferencia de MpRR1Cp2 mediante dieta artificial.** En este gráfico de barras se muestran los niveles de MpRR1Cp8 (verde) después de la ingesta por los pulgones de dieta artificial suplementada con dsRNA cuya secuencia contiene un fragmento de la región codificante del candidato a receptor. Las barras azul y gris muestran dos tipos de control, el primero referente a la dieta suplementada con un dsRNA sin relación alguna con los genes de pulgón. y el segundo, la dieta sin dsRNA

Los resultados no mostraron una disminución significativa del nivel de expresión respecto a los controles en ninguno de los dos genes considerados. Esta falta de efecto sobre el valor medio no se aprecia en ninguno de los tres tiempos analizados. Es interesante resaltar que los promedios de expresión de MpRPS2 de nuevo se mantenían por debajo del valor correspondiente al gen de referencia MpRPL7, mientras que MpRR1Cp2 mostró niveles superiores, con diferencias entre los tres tiempos analizados (días 3, 5 y 8) que reproducían las diferencias observadas en la expresión a lo largo del desarrollo (ver apartado 4.3 y figura 32), con una mayor expresión a 3 días comparada con 5 y 8 días.

5.2.- USO DE VECTORES VIRALES VIGS EN PLANTAS PARA ALIMENTACIÓN DEL INSECTO SOBRE EL TEJIDO INFECTADO.

En estos ensayos se intentaron silenciar genes de pulgón a través de su alimentación en tejido vegetal previamente infectado con vectores virales VIGS. En el tejido infectado se acumulan intermediarios replicativos y siRNAs derivados del vector viral, incluyendo los fragmentos de genes de pulgón clonados en él. De esta forma, al alimentarse el insecto sobre el tejido adquiere las dobles cadenas y los siRNAs que potencialmente podrán interferir con la expresión del gen homólogo. En el caso de pulgones se ha publicado que una dieta vegetal que aporta dsRNAs derivados de agroinfiltración puede silenciar genes del insecto (Pitino et al., 2011), y el sistema basado en vectores virales también se ha demostrado recientemente que funciona en el caso de insectos masticadores como *Manduca sexta* (Kumar et al., 2012).

Existen en la actualidad varios vectores para desencadenar VIGS en plantas con diferentes características. En este proyecto se eligió el vector basado en el virus del cascabeleo del tabaco, Tobacco rattle virus (TRV), virus de ARN bipartito que es capaz de infectar múltiples huéspedes. El objetivo del ensayo fue clonar los candidatos a receptor en este vector, agroinfiltrar plantas con el vector viral (agroinoculación) y posteriormente alimentar al pulgón sobre éstas, buscando afectar de esta forma la expresión génica en el insecto.

Previamente a la puesta a punto de estos experimentos, se hizo un seguimiento mediante RT-PCR de la estabilidad del transcrito producido a partir de la infección con el vector TRV a lo largo del tiempo, obteniendo señal positiva hasta 20 días post- agroinfiltración (resultados no mostrados).

5.2.1- Tasa de supervivencia en una población de *M. persicae* en dos especies diferentes del género *Nicotiana*.

Los ensayos para interferir genes de pulgón mediante VIGS, explicados en el apartado anterior, inicialmente se plantearon para usar *N. benthamiana* como planta para la agroinoculación del vector viral, dado que es una planta altamente permisiva para numerosos virus, y es la planta modelo de elección en muchos trabajos de silenciamiento génico inducido por virus. Una característica adicional interesante en el caso de TRV es la ausencia de síntomas. Sin embargo, la colonia de *Myzus persicae* con la que estábamos trabajando vivía en plantas de tabaco *N. tabacum* cv *Xanthy* nc, lo que implicaba un cambio de planta. Por esta razón, se decidió estudiar la tasa de supervivencia de individuos de la misma colonia en ambas plantas y ver qué consecuencias podrían suponer para este tipo de ensayos el cambio de huésped. Para ello, se eligieron pulgones en estadio adulto maduro para obtener una progenie ninfal en ambas plantas. A partir de estas ninfas, se contó el número de individuos diariamente para obtener una aproximación de la supervivencia en las dos plantas sin agroinocular, agroinoculadas con el vector vacío y con el vector que contenía un fragmento de uno de los candidatos, concretamente el gen MpRPS2.

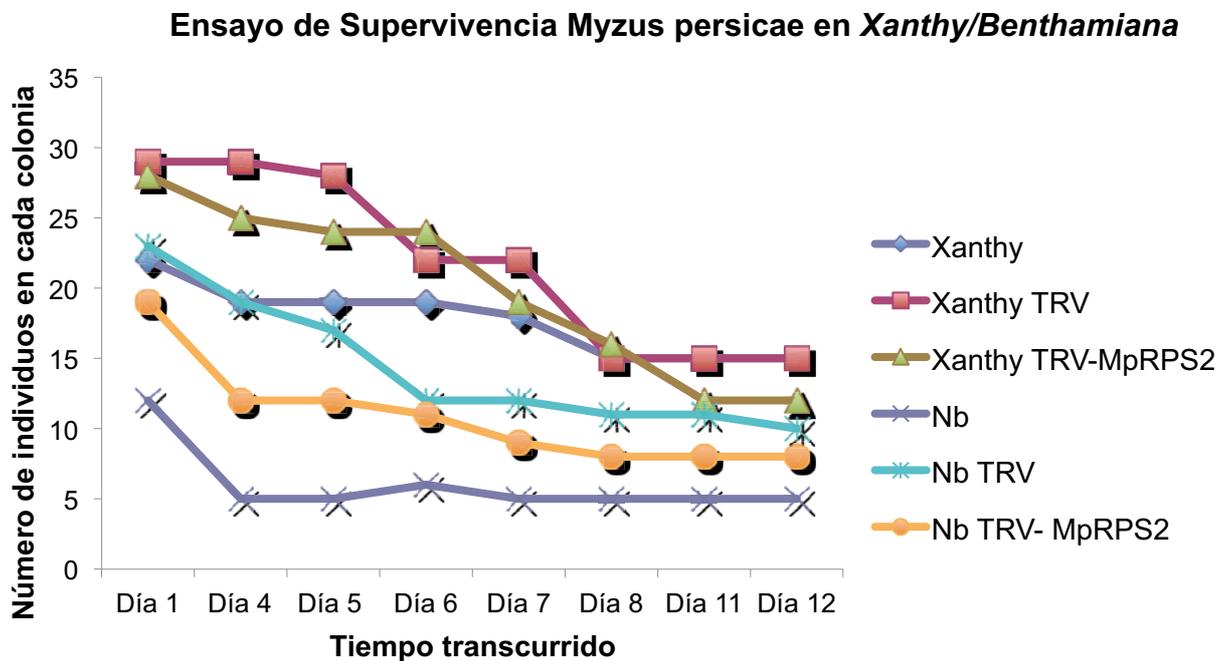


Figura 46. **Análisis poblacional de la progenie de una colonia de pulgones alimentándose de diferentes plantas.** Esta gráfica muestra la variación de una progenie ninfal de pulgones, derivados del mismo número de pulgones adultos (10) depositados en plantas de *N. tabacum* cv *Xanthy* nc o *N. benthamiana*. Además de introducir las variaciones de plantas agroinoculadas (de ambas especies) con TRV o TRV- MpRPS2.

Como se observa en la gráfica anterior, la colonia originada a partir de pulgones adultos trasladados a *N. tabacum* cv *Xanthy* nc, produjo más progenie (mayor número de descendientes) que los que se habían trasladado a *N. benthamiana*. En cuanto a la supervivencia, si bien en todos los casos se produjo una cierta mortandad a medida que transcurrían los días, al final del ensayo había más individuos en la población mantenida en tabaco respecto a los sobrevivientes en *N. benthamiana*. Además, la comparación entre el recuento de insectos entre plantas agroinoculadas o no, señala que las plantas infectadas con TRV logran una población más alta que las plantas sanas. A pesar de estas observaciones que indican importantes efectos asociados al cambio del huésped y a la presencia/ausencia de infección viral que se tendrán que considerar al analizar los resultados, se decidió llevar a cabo los experimentos de agroinoculación en ambas especies de plantas, dado que se ignoraba a priori cuál era más adecuada para inducir silenciamiento.

5.2.2- Interferencia con la expresión de MpRPS2 y MpRR1Cp2 en pulgones mantenidos sobre plantas de *N. benthamiana* agroinoculadas con el vector viral TRV.

En estos ensayos se realizaron seguimientos de la expresión de los genes diana a lo largo de diferentes días de alimentación, analizando pulgones individualizados a tiempos 4, 7, 10 y 30 días. Además se añadieron ninfas al análisis recogidas a los 10 días (primera generación) y a los 30 días (segunda o tercera generación) para comprobar si el esperado efecto de interferencia se mantenía a lo largo del tiempo y en la progenie (tabla XVIII)

Tabla XVIII. Niveles medios normalizados de mRNA correspondientes a dos genes de pulgones individuales alimentados en plantas de *Nicotiana benthamiana*.

Tratamientos	Gen analizado	Días transcurridos desde el inicio del experimento													
		4		7		10		13		30(1)		progenie 1 (2)		progenie 2 (3)	
		Media	Sd	Media	Sd	Media	Sd	Media	Sd	Media	Sd	Media	Sd	Media	Sd
Nb	MpRPS2	0,37	0,10	0,36	0,12	0,32	0,09					0,33	(4)	0,26	0,04
	MpRR1Cp2			3,51	0,72	4,40	(4)					7,93	(4)		
Nb-TRV	MpRPS2	0,39	0,07	0,36	0,09	0,42	0,16	0,45	0,03	0,40	0,14	0,36	0,06	0,24	0,10
	MpRR1Cp2			2,74	2,00	2,13	0,58	2,55	1,12	1,99	1,30	6,35	3,07	5,96	3,26
Nb-TRV/RPS2	MpRPS2	0,38	0,06	0,37	0,10	0,43	0,08	0,40	0,03	0,31	0,05	0,41	0,16	0,28	0,09
Nb-TRV/RR1Cp2	MpRR1Cp2			3,00	1,87	2,00	0,98	1,32	0,71	2,08	1,87	6,74	2,79	7,47	3,35

(1) Adultos de colonias establecidas sobre plantas a los 30 días de iniciado el experimento

(2) Ninfas recogidas a los 10 días de iniciado el experimento.

(3) Ninfas recogidas a los 30 días de iniciado el experimento

(4) Únicamente se analizó un individuo

Los primeros resultados indican, después de un análisis de variación de transcrito de los genes MpRPS2 y MpRR1Cp8 mediante RT-qPCR, que en los pulgones alimentados en *N. benthamiana* infectada con TRV que llevan un fragmento de dichos genes, puede llegar a haber un silenciamiento del gen diana respecto a los

niveles correspondientes a un gen control normalizado, en este caso el gen (RPL7). Cabe destacar la ausencia de datos en ciertos tratamientos debido a la alta mortalidad en la colonia al estar alimentándose en una planta que no es su huésped.

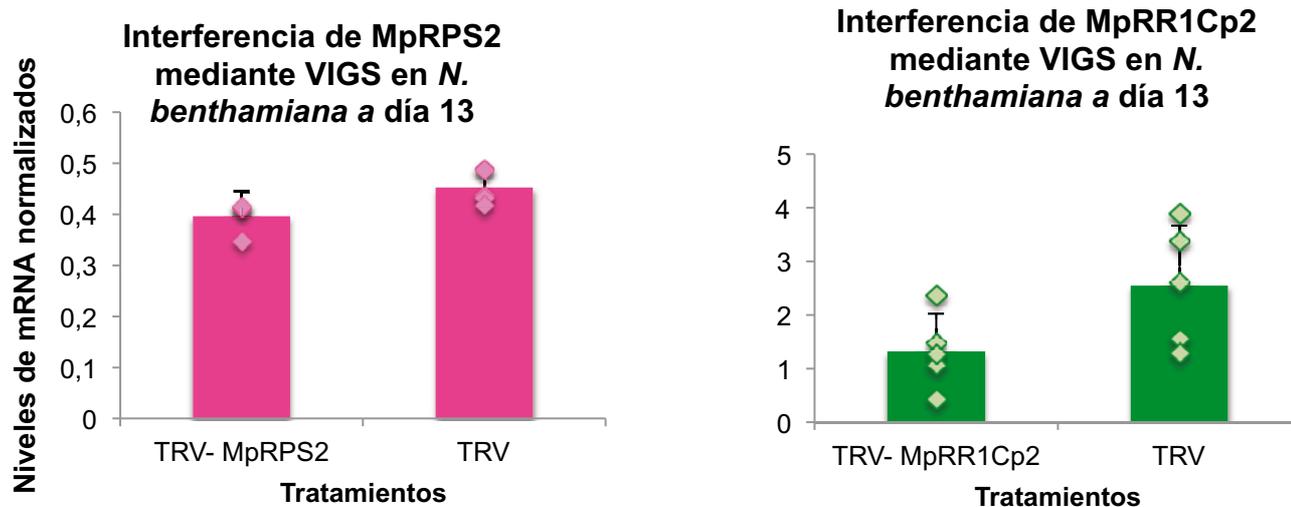
Igual que en el tratamiento de dieta, se realizó un análisis mediante la prueba t de Student (tabla XIX) obteniendo los valores p de las comparaciones entre diferentes tratamientos.

Tabla XIX. **Valor P** de la comparación entre niveles medios de expresión normalizados (prueba T-student)

Gen	Días	4	7	10	13	30(1)	progenie 1 (2)	progenie 2 (3)
MpRPS2	N.benthamiana/ TRV	0,83	0,94	0,43				0,77
	N.benthamiana/ TRV-MpRPS2	0,84	0,86	0,14				0,60
	TRV/TRV-MpRPS2	0,94	0,89	0,90	0,04	0,21	0,47	0,52
MpRR1CP2	N.benthamiana/ TRV		0,31					
	N.benthamiana/ TRV-MpRR1CP2		0,48					
	TRV/TRV-MpRR1CP2		0,74	0,76	0,07	0,92	0,81	0,49

(1) En fondo de color se indican las diferencias significativas ($p < 0.05$)

Tal y como se observa en la tabla, a día 13, los valores medios de expresión presentaron las mayores diferencias entre los pulgones controles alimentados sobre planta infectada con TRV y los ensayos de interferencia para los genes MpRPS2 y MpRR1Cp2. La diferencia fue significativa en el caso de MpRPS2. Este tiempo de duración del tratamiento (13 días) fue por tanto el escogido para realizar los experimentos de transmisión. El control de pulgones alimentados sobre plantas no infectadas de *N. benthamiana* no se consideró por la baja supervivencia en la planta sin agroinocular.



igura

Figura 47. **Ensayo de interferencia de MpRPS2 y MpRR1Cp8 mediante VIGS agroinoculados en *N. Benthamiana* a día 13.** En este gráfico de barras se muestran los niveles de MpRPS2 (rosa, panel izquierdo), MpRR1Cp2 (verde, panel derecho) después de la ingesta por los pulgones de dieta vegetal agroinoculada con TRV. Las barras azules son el control del experimento, plantas agroinoculadas con vector TRV vacío.

Los resultados de este experimento indicaron que se lograba una disminución de hasta el 50% en la expresión normalizada de MpRR1Cp2 en varios de los tiempos analizados, en cambio, aparentemente MpRPS2 no se veía alterado de una forma tan marcada. A 4 y 7 días no se observan apenas diferencias de expresión en ninguno de los genes, pero a partir de 109 días se aprecia una disminución en los promedios de expresión. A 13 días de iniciado el experimento, los pulgones adultos alimentados sobre planta infectada con TRV-MpRPS2 presentaban una expresión del gen MpRPS2 un 11% más baja en promedio que el control con TRV, mientras que en el caso de MPRR1Cp2 la reducción fue del 51%, aunque con una mayor variabilidad entre repeticiones por lo que no se alcanzaba valores significativos. Estos datos sugieren que la susceptibilidad a la reducción de la expresión por RNAi depende de la naturaleza de cada gen analizado y posiblemente de sus niveles de expresión.

5.2.3- Interferencia con la expresión de MpRPS2 y MpRR1Cp2 en pulgones mantenidos sobre plantas de *N. tabacum* var *Xanthy* agroinoculadas con el vector viral TRV.

Del mismo modo que con *N. benthamiana*, se procedió para las plantas *N. tabacum* cv *Xanthy* nc, agroinoculando el tejido con TRV y analizando individualmente cada pulgón. Cabe destacar que en esta variedad de tabaco TRV mostró síntomas de infección viral que con *N. benthamiana* no fueron observados.



Figura 48. Síntomas mostrados por *N. tabacum* var *Xanthy* agroinoculadas con TRV.

La supervivencia de la colonia de pulgones en *N. tabacum* cv *Xanthy* nc fue más alta, como cabe esperar después del análisis mencionado en el apartado 5.2.1. En este ensayo sólo se incluyeron análisis a 7, 13 y 30 días de alimentación en planta, debido a los resultados negativos en cuanto a interferencia en el ensayo de *N. benthamiana* (tabla XX).

Tabla XX. Niveles medios normalizados de mRNA correspondientes a dos genes de pulgones individuales alimentados en plantas de *Nicotiana tabacum* cv *Xanthy*.

Tratamientos	Genes analizados	Días transcurridos desde el inicio del experimento					
		7		13		30(1)	
		Media	Sd	Media	Sd	Media	Sd
Xanthy	MpRPS2	0,28	0,11	0,20	0,12	0,24	0,10
	MpRR1Cp2	5,14	1,13	2,48	1,42	0,65	0,63
Xanthy-TRV	MpRPS2	0,24	0,17	0,31	0,03	0,22	0,13
	MpRR1Cp2	5,55	2,58	1,55	0,35	2,85	2,73
Xanthy-TRVRPS2	MpRPS2	0,32	0,11	0,39	0,13	0,24	0,10
Xanthy-TRVRR1Cp2	MpRR1Cp2	1,26	1,20	2,48	1,42	1,50	1,40

(1) Adultos de colonias establecidas sobre plantas a los 30 días de iniciado el experimento

Los datos de la tabla anterior fueron analizados estadísticamente con la prueba t de Student como en los casos anteriores (tabla XXI).

Tabla XXI. Valor p de la comparación entre niveles medios de expresión normalizados (prueba T-student)

Gen analizado	Días		7	13	30(1)
	Comparación				
MpRPS2	Xanthy/TRV		0,58	0,07	0,81
	Xanthy/TRV-MpRPS2		0,44	0,04	0,78
	TRV/TRV-MpRPS2		0,27	0,20	0,95
MpRR1CP2	Xanthy/TRV		0,76	0,19	0,16
	Xanthy/TRV-MpRR1CP2		0,001	0,16	0,31
	TRV/TRV-MpRR1CP2		0,02	0,68	0,40

(1) En fondo de color se indican las diferencias significativas ($p < 0.05$)

Mediante estos resultados se establecerá el día 7 como tiempo idóneo para realizar experimentos de transmisión en *N. Tabacum* cv Xanthy.

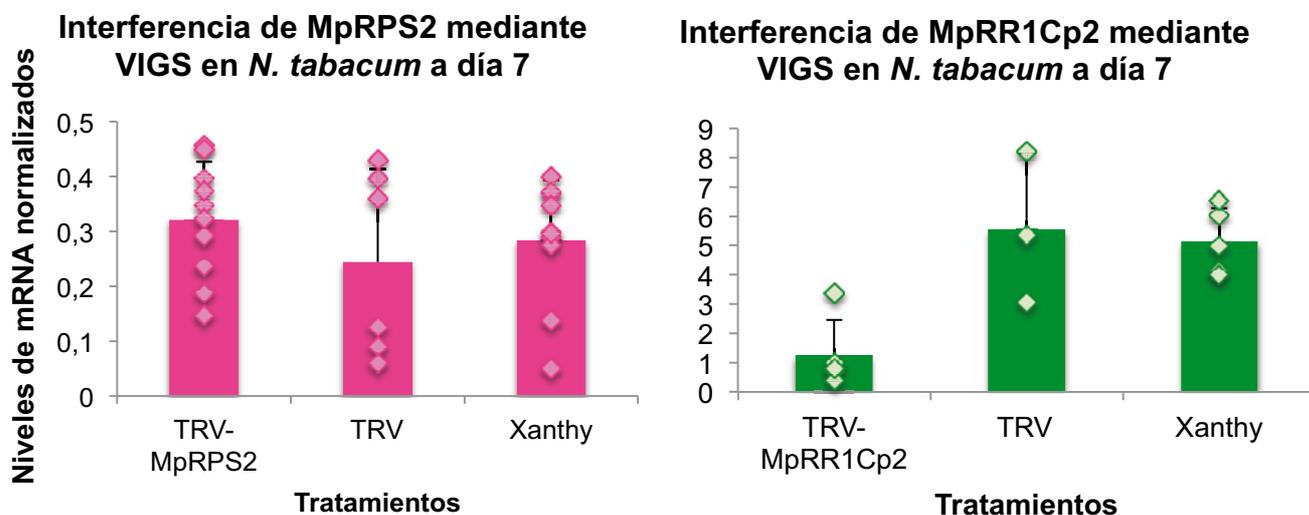


Figura 49. Ensayo de interferencia de MpRPS2 y MpRR1Cp2 mediante VIGS agroinoculados en *N. tabacum* cv Xanthy nc a día 7. En este gráfico de barras se muestran los niveles de MpRPS2 (rosa, panel izquierdo), MpRR1Cp8 (verde, panel derecho) después de la ingesta por los pulgones de dieta vegetal agroinoculada con TRV. Las barras azules son el control del experimento, plantas agroinoculadas con vector TRV vacío y las grises de los insectos analizados alimentándose de xanthy sin agroinocular.

En este caso, sólo MpRR1Cp2 presenta diferencias significativas de reducción de transcrito frente a los dos controles (*N. tabacum* Xanthy y TRV) a los 7 días de alimentación en las plantas *N. tabacum* cv Xanthy nc. El gen MpRPS2 no mostró diferencias significativas de expresión frente a los dos controles: aunque a 13 días se observa una reducción de expresión comparada con el control alimentado sobre planta no agroinoculada, no se mantenía esta diferencia al comparar con el control de TRV. Atendiendo a estos resultados, la duración de 7 días fue la seleccionada para realizar ensayos de transmisión.

6. ENSAYOS DE TRANSMISIÓN CON PULGONES ALIMENTADOS SOBRE PLANTAS AGROINOCULADAS CON VECTORES VIRALES DISEÑADOS PARA INTERFERIR LA EXPRESIÓN DE GENES ESPECÍFICOS.

Considerando los resultados de interferencia con la expresión génica obtenidos en los ensayos anteriores, se procedió a analizar el posible efecto de dicha interferencia en la capacidad vectorial de los pulgones tratados. Para ello se diseñaron y realizaron los experimentos como se muestra en el siguiente esquema:

1.- Plantas (*N. benthamiana* o *N. tabacum*) agroinoculadas t=0 con vector viral TRV. Cuatro tratamientos en paralelo:

- *N. benthamiana* (o *N. tabacum*) no agroinoculada
- *N. b./N. t.* + TRV
- *N. b./N. t.* + TRV-MpRPS2
- *N. b./N. t.* + TRV-MpRR1Cp2

2.- Colocar sobre las plantas pulgones adultos (*M. persicae*) t=6 d.p.i.

3.- Retirar adultos, mantener ninfas de un día de vida t=7 d.p.i

4.- Mantener durante 7 días (en el caso de *N. tabacum*) ó 13 días (en el caso de *N. benthamiana*) en cámara de crecimiento, aisladas en cajas individuales.

5.- Aislar pulgones, someter a ayuno durante 2 h

6.- Permitir adquisición de 10' sobre hoja de *N. tabacum* infectada con TEV-1179

7.- Transferir pulgones en grupos (1, 2 ó 5 pulgones, de acuerdo a supervivencia y disponibilidad) a plantas de ensayo de *N. tabacum* (plántulas en estado de 2-3 hojas verdaderas). Permitir inoculación durante 24 h, con las plantas aisladas individualmente.

8.- Eliminar pulgones con tratamiento insecticida, y trasladar a cámara de crecimiento para observación de síntomas de infección por TEV, hasta 15 días después para contabilizar resultados.

En la tabla se resumen los resultados obtenidos, indicando la tasa de transmisión total (porcentaje de plantas infectadas con TEV-1179 sobre el total de plantas ensayadas) y la tasa corregida considerando el número de pulgones de cada ensayo.

Tabla XXII. Experimentos de transmisión realizados en *N.benthamiana*, se señala el número de vectores utilizados así como la tasa corregida en función de éstos.

Experimentos (número de vectores)												
Planta	Tratamiento	Número repeticiones	1	2	3	4	5	6	Total Infectadas	Total Ensayadas	Transmisión	Tasa corregida
<i>N. benthamiana</i>	No inculada	4	0/15 (1)	0/12 (1)	0/4 (2)	0/5 (2)			0	36	0,00%	0,00%
	TRV	5	0/10 (1)	1/12 (1)	0/12 (2)	1/6 (3)	5/9 (5)		7	49	14,29%	4,76%
	TRV- MpRPS2	6	0/10 (1)	2/12 (1)	0/3 (2)	5/9 (5)	1/4 (2)	2/8 (5)	10	46	21,74%	8,48%
	TRV- MpRR1CP2	5	1/10 (1)	0/12 (1)	5/14 (5)	2/6 (2)	2/6 (4)		10	48	20,83%	7,29%
Totales									27	179	15,08%	

Tabla XXIII. Experimentos de transmisión realizados en *N. tabacum*, se señala el número de vectores utilizados así como la tasa corregida en función de éstos.

		Experimentos (número de vectores)										
Planta	Tratamiento	Número repeticiones	1	2	3	4	5	6	Total Infectadas	Total Ensayadas	Transmisión	Tasa corregida
N. tabacum	No inoculara	5	1/11 (5)	3/12 (5)	0/6 (5)	0/6 (2)	6/23 (5)		18	70	25,71%	3,45%
	TRV	3	3/12 (5)	4/12 (5)	0/12 (5)				7	36	19,44%	3,89%
	TRV-MpRRPS2	5	0/11 (5)	0/12 (5)	2/6 (5)	1/6 (2)		1/12 (5)	4	47	8,51%	2,34%
	TRV-MpRR1CP2	3	7/12 (5)	1/12 (5)	1/13 (5)				9	37	24,32%	4,86%
Totales									38	190	20,00%	

Los resultados corresponden a los totales acumulados de al menos 4 experimentos independientes en cada tratamiento. La significación de las diferencias se calculó a partir de un análisis ANOVA de acuerdo a la prueba de Tukey.