



# 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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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

# MATERIALES Y MÉTODOS



# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. MATERIAL BIOLÓGICO

### 1.1.- AISLADOS VIRALES

Este trabajo se ha llevado a cabo gracias al clon completo de un aislado HAT (High Aphid Transmissible) de TEV (*Tobacco etch virus*) denominado pTEVHCH10 (Blanc *et al.*, 1999), transmisible por pulgón, cedido por el Dr. S. Blanc (UMR- BGPI, Montpellier, Francia). Este plásmido procede del clon pTEV-7DA (Dolja *et al.*, 1992) y contiene una secuencia de seis Histidinas adicional insertada en la región amino terminal del gen que codifica para la proteína HCPro. Esta variante TEV fue inoculada en plantas de la especie *N. tabacum* cv *Xanthi* nc. Los síntomas presentados fueron los esperados tal y como se han descrito para TEV (Allison *et al.*, 1985). Se muestra un ejemplo de los típicos síntomas de TEV en plantas de tabaco (figura 8)



Figura 8. **Síntomas típicos de infección por TEV en plantas de tabaco.**

Los ensayos de transmisión se han realizado con un aislado de campo de TEV, proporcionado por el Dr. Benoit Moury (INRA-Avignon, Francia) denominado 1179.1, y que fue originalmente encontrado en plantas de tabaco.

Para inactivar determinados genes en insectos que se alimentan sobre plantas se pensó en aprovechar los mecanismos defensivos de las plantas frente a los virus basados en el silenciamiento de ARN. Para ello se infectaron mediante agroinfiltración plantas con vectores virales modificados, en este caso el vector utilizado fue pTRV (Tobacco Rattle Virus), cedido por André C. Velásquez (BTI, Ithaca, EEUU). La infección con este vector viral modificado en células de la planta se ha descrito que causa el silenciamiento de genes homólogos en las plantas (Lu *et al.*, 2003), y se

espera que si se clonan genes de insectos, los elementos desencadenantes de la respuesta de silenciamiento puedan ser adquiridos en la alimentación y afectar a los pulgones, de una manera similar a lo que ocurre en otros insectos como *Manduca sexta* (Kumar et al., 2012). Además TRV es transmitido por nemátodos, lo cual se espera que su presencia no afectará al proceso de transmisión por pulgones.

## 1.2.- CEPAS BACTERIANAS

Para la multiplicación y purificación los plásmidos generados se usó la cepa comercial de *E. coli* Top10 (Invitrogen). Mientras que para la transformación de plásmidos a través de la tecnología Gateway, la cepa DB3.1 fue elegida porque contiene el gen tóxico *ccdB*, usado en este sistema para selección de transformantes.

En el caso de la sobreexpresión de proteínas, los plásmidos fueron transformados en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen), esta cepa se caracteriza por estar diseñada para obtener una expresión elevada de proteínas recombinantes gracias al promotor T7.

Los ensayos de agroinfiltración se llevaron a cabo por transformación de la cepa *A. tumefaciens* C58C1, que contiene el plásmido ayudante de virulencia pCH32 (Hamilton, 1996), seleccionada con 50 µg/ml de Rifampicina (Rif) y 5 µg/ml de Tetraciclina (Tet) (Hamilton, 1996; Bendahmane *et al.*, 1999). Los ensayos de agroinoculación, fueron hechos con la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* que se selecciona con 25 µg/ml de Rifampicina (Rif) y 25 µg/ml de Gentamicina (Gent).

Las cepas de *E. coli* (DB3.1, TOP 10 y BL21) y las de *A. tumefaciens* (C58C1 y GV3101) se cultivaron a 37° y 28°C respectivamente, en medio LB (triptona 10g/l, extracto de levadura 5g/l y NaCl 10 g/l), añadiendo 15 g/l de agar para los cultivos en medio sólido.

Los cultivos bacterianos transformados con los distintos plásmidos se mantuvieron a 4°C en placas de medio sólido con los correspondientes antibióticos para su uso en cortos períodos de tiempo. Para períodos largos, las bacterias se conservaron a -80°C en medio LB con glicerol al 85%.

### 1.3.- LEVADURAS

Los experimentos de doble híbrido de levadura llevados a cabo en el presente trabajo se realizaron sobre las cepas genéticamente modificadas de *S. cerevisiae* PJ694 $\alpha$  y YM4271a, siguiendo las instrucciones del proveedor comercial del sistema Matchmaker GAL4 Two-Hybrid Systems (Clontech).

Estas cepas carecen de las rutas biosintéticas de determinados nutrientes, permitiendo así la selección de crecimiento de la levadura en diferentes medios de cultivo. La cepa PJ694 $\alpha$  (Uetz *et al.*, 2000) es auxotrófica para triptófano (T) y la cepa YM4271a (Liu, 1993) es auxotrófica para leucina (L). Ambas cepas se usaron para llevar a cabo los ensayos de doble híbrido de tipo “Mating”.

## 2. MANIPULACIÓN DE VIRUS Y MICROORGANISMOS

### 2.1.- INOCULACIÓN MECÁNICA DEL VIRUS TEV PARA SU MANTENIMIENTO Y PROPAGACIÓN

La infección de plantas se realizó de modo mecánico, aplicando un extracto reciente de planta infectada sobre hojas previamente espolvoreadas con carborundo para provocar lesiones y facilitar la entrada del virus. El extracto se obtiene de la trituración en frío de hojas infectadas frescas (o congeladas) en un mortero con tampón de inoculación ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,02M pH 7,2) empleando aproximadamente 2 ml por gramo de hoja.

### 2.2.- MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

#### 2.2.1.- Obtención y transformación de células competentes de *Escherichia coli*

Las transformaciones se llevaron a cabo por choque térmico con células competentes de las cepas seleccionadas, todas ellas preparadas por el método de cloruro cálcico (Sambrook, 2001; Sambrook and Russell, 2001).

Para la transformación con los plásmidos correspondientes, unos 100 ng de DNA plasmídico purificado se añadieron a 100  $\mu\text{l}$  de células competentes, y se incubaron en hielo durante 30 min. Las células fueron sometidas entonces a un choque térmico a 42°C durante 1 minuto y 15 segundos, y transferidas a hielo 2 min.

Se añadieron 750 µl de medio LB por tubo, y las células se crecieron durante 1 h a 37°C en agitación a 250 rpm. Posteriormente, se extendieron volúmenes de 100 µl en una placa con LB-agar añadiendo el antibiótico de resistencia necesario, y el resto, tras concentrar mediante centrifugación, en otra. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h para el crecimiento de las colonias.

Cuatro o cinco colonias de cada transformación se mantuvieron en placa a 4°C para su verificación por reacción de PCR específica y/o mediante purificación del plásmido a partir de cultivo líquido. El aislamiento de plásmidos se realizó con diferentes sistemas basados en hidrólisis alcalina, incluyendo sistemas comerciales como GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) y análisis por digestión enzimática con los enzimas de restricción convenientes. Por último se procedió a la secuenciación de los clones seleccionados.

### **2.2.2.- Obtención y transformación de las células competentes de *A. tumefaciens* cepa C58C1**

Se prepararon células competentes para la transformación por choque térmico: se inoculó una colonia aislada de *A. tumefaciens* en 5 ml de medio LB con rifampicina a una concentración de 50 µg/ml y tetraciclina a una concentración 5 µg/ml. Este cultivo se mantuvo durante 48 horas en agitación a 28°C. Posteriormente se usó este preinóculo para inocular 200 ml de LB con rifampicina y tetraciclina a la misma concentración y se incubó en las mismas condiciones hasta observar una densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de entre 0,5 y 1 unidades, valores entre los que se considera que el cultivo se encuentra en crecimiento exponencial. A continuación se centrifugó el cultivo a 4000 rpm durante 5 minutos. Se resuspendió el sedimento en 100 ml de Tris HCl 100mM pH 8,0 estéril y frío. Se repitió la centrifugación en las mismas condiciones resuspendiendo las células en un volumen final de 2 ml de LB que se alicuotaron en fracciones de 200 µl. Estas células ya competentes se pueden conservar a -80°C por varios meses.

Para la transformación se usó la técnica de choque térmico. Se mezcló una alícuota de células competentes con el DNA plasmídico (0,1- 10 µg) preparado en un volumen final de 100 µl. La mezcla se sumergió en nitrógeno líquido durante 5 minutos. Posteriormente, el tubo se pasó a un baño a 37°C durante 30 minutos. Pasado este tiempo se añadió 1-2 ml de LB o YEB y se incubó a 28°C en agitación durante 1 hora. Se plaqueó la mezcla en fracciones de 300 µl en distintas placas de LB agar con los antibióticos de selección, en este caso, los plásmidos derivados de pCAMBIA se utilizó kanamicina a 25 µg/ml, rifamficina a 50µg/ml y tetraciclina a 5 µg/ml. Las placas se



incubaron durante 48 horas a 28°C. La transformación de las colonias que crecieron en el medio de selección se confirmaron por PCR y las colonias positivas se conservaron en un stock de glicerol a -80°C.

### **2.2.3.- Agroinfiltración para la expresión transitoria de proteínas en plantas de *N. benthamiana***

Para el proceso de agroinfiltración se preparó un cultivo fresco en placa de LB agar kanamicina 25 µg/ml, rifampicina 50µg/ml y tetraciclina 5 µg/ml (LB+ Kan/Rif/Tet). Con una colonia aislada se inoculó un volumen necesario (dependiendo del tamaño del ensayo) de medio LB+ Kan/Rif/Tet líquido y se incubó a 28°C durante 16 horas. Se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en tampón de inducción (MES 10mM pH 5,6, MgCl<sub>2</sub> 10mM y acetosiringona 0,15 mM) dejando el cultivo a una DO<sub>600</sub> final de 0,3 durante 3 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se agroinfiltraron las hojas de *N. tabacum* cv *Xanthy* y *N. benthamiana* con ayuda de una jeringuilla de 1 ml a través de la cara abaxial. Para agroinfiltrar se seleccionaron plantas de 3- 4 semanas y se agroinfiltraron las primeras hojas verdaderas que estuvieran completamente extendidas.

### **2.2.4.- Obtención y transformación de las células competentes de *A. tumefaciens* cepa GV3101**

La obtención de células de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 electrocompetentes se realizó de la misma manera que para la cepa C58C1, pero sustituyendo la tetraciclina por gentamicina 25 µg/ml, debido a que la cepa GV3101 porta el plásmido pMP90, que posee el gen de resistencia al mencionado antibiótico.

### **2.2.5.- Agroinoculación de pTRV para la expresión transitoria de proteínas procedentes de pulgón en plantas de tabaco.**

La inoculación de pTRV se realizó en plantas de tabaco de 2 semanas de edad. Se siguió el protocolo escrito en el artículo de Velasquez, (Velasquez *et al.*, 2009) basado en la inducción mediante acetosiringona 200 µM durante toda la noche

de los cultivos. Posteriormente se realizó la agroinoculación del mismo modo que se hizo con la agroinfiltración explicada anteriormente.

### 2.2.6.- Obtención y transformación de células competentes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* PJ694 $\alpha$ y YM4271a para ensayos de doble híbrido de tipo "mating".

Las células competentes de ambas cepas fueron obtenidas gracias al protocolo publicado por Dohmen (Dohmen *et al.*, 1991).

Para la transformación, se partió de células competentes de levadura congeladas a -80°C. En el mismo día se prepara una mezcla de 10  $\mu$ l de DNA de esperma de salmón ssDNA (10mg/ml) en 240  $\mu$ l 50% PEG, 36  $\mu$ l 10x LiAc(1M), y 69  $\mu$ l agua estéril (volumen total de 360  $\mu$ l para 1 transformación). Previamente el ssDNA congelado a -20°C, se desnaturaliza incubándolo 3 min a 95°C,. Agitar la mezcla con vórtex. A continuación se siguieron los siguientes pasos, siempre bajo campana:

1. Dejar descongelar las células competentes en hielo. Centrifugar el tubo 1 min a 14000 rpm. Retirar el sobrenadante con cuidado.
2. Agregar los 360  $\mu$ l de la mezcla. Añadir 5  $\mu$ l del plásmido de DNA (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l). Incubar a 28°C-30°C en agitación durante 30 min.
3. Añadir 36  $\mu$ l de DMSO. Incubar en un baño a 42°C durante 15 min.
4. Centrifugar a 14000 rpm durante 1 min. Aspirar el sobrenadante y resuspender las células en 200  $\mu$ l de agua estéril. Sembrar 50  $\mu$ l y 100  $\mu$ l en dos placas del medio adecuado de selección.
5. Incubar placas a 30°C durante 2-5 d.

La cepa pJ694 $\alpha$  con el plásmido con la proteína fusionada al BD se siembra en medio SD-T y la cepa YM4271a con el plásmido con la proteína fusionada al AD se siembra en medio SD-L. Esto es debido a que la primera cepa contiene el gen de selección nutricional del triptófano, y la segunda contiene el gen de la leucina. Si se siembran en medios que no contienen estos aminoácidos, sólo las células transformadas sobrevivirán.

Obtenidas las transformaciones, se procede a la cotransformación, proceso en que las levaduras haploides se aparearán y darán lugar a la célula diploide. Para ello se inocularon dos cultivos de 2 ml de medio YPAD con colonias frescas: uno que expresaba BD-X (tubo 1) y el otro AD-Y (tubo 2) (siendo X e Y las proteínas ensayadas). Se realizó este proceso por cada interacción que se quiso analizar. Los

cultivos fueron crecidos a 28°C durante 24 h con agitación. A continuación se realizó el “mating”, en las siguientes etapas:

1. Preparación de mating. Añadir en un tubo de 10 ml (tubo 3) 500 µl de cultivo del tubo 1 (BD-X) y 500 µl del cultivo del tubo 2 (AD-Y). Mezclar e incubar durante 48 h a 28°C sin agitación.
2. Preparación de enriquecimiento para las células diploides. Inocular 2 ml de SD-LT (tubo 4) con 200 µl del tubo 3 e incubar a 28°C con agitación (48 h).
3. Preparar 3 diluciones del cultivo del tubo 4: sin diluir,  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ .
4. Plaquear en forma de gota 5 ó 10 µl de las diluciones en medio de agar SD-LT (comprobación de mating) y SD-HLT (comprobación de la interacción de las proteínas).

Este último paso de siembra en medios SD-HLT es el que da lugar al resultado de la interacción. Así pues, el gen reportero incluido es el de la histidina, el cual es activado si las dos proteínas ensayadas interaccionan dando lugar a la transcripción del mismo. Al igual que en el caso de la transformación, las colonias crecidas en este medio –HLT serán el resultado positivo de la interacción mediante este tipo de ensayo.

Medio YPAD (500 mL): 10 g Peptona, 5 g Yeast extract, 10 g D-glucosa, 10 gr Agar\* (Difco o BD). Ajustar el pH a 5,8 en un volumen de 500 µL. Autoclavar el medio durante 15 minutos. Cuando se enfría a 55°C, añadir 7,5 ml de 0,2% (p/v) de la solución de Adenina hemisulfato.

Medio SD-: (450 mL): 3,35 gr de Yeast Nitrogen Base (Sigma), 10 gr D-glucosa, 10 gr Agar (Difco o BD). Ajustar el pH a 5,8 en un volumen de 450 mL. Autoclavar el medio durante 15 min. Cuando se enfría a 55 °C, añadir 50 mL de la solución 10xDO apropiada.

10x DO-LT (200 mL): 1,28 gr DO-LT en 200 mL de agua. Autoclavar 15 minutos.

10x DO-L (200 mL): 1,28 gr DO-LT + 40 mg de L-triptófano en 200 mL de agua. Autoclavar 15 min.

10x DO-T (200 mL): 1,28 gr DO-LT + 200 mg L-leucina en 200 mL de agua. Autoclavar 15 min.

10x DO-HLT (200 mL): 1,20 gr DO His-Leu-Met-Trp + 40 mgr L-adenina hemisulfato (Sigma- Aldrich) + 40 mg de L-metionina (Sigma- Aldrich) en 200 mL de agua. Autoclavar 15 min.

Todas las soluciones 10x DO son de la casa Clontech.

## 3. PLÁSMIDOS

### 3.1. PLÁSMIDOS GENERADOS Y CONSTRUCCIONES EMPLEADAS PARA LA SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN BACTERIA

#### 3.1.1.- Plásmidos empleados

Los siguientes vectores comerciales se han usado para el clonaje de productos de origen viral o de pulgón por PCR, siguiendo en cada caso las instrucciones de los fabricantes:

Tabla IV. **Vectores utilizados para el clonaje de productos de origen viral o de pulgón para sobreexpresión de proteínas en bacteria.**

Vector	Fabricante	Producto (origen viral)	Productos (origen pulgón)
pMAL- c2x	New England BioLabs	CP de TEV	MpRPS2, MpRR1Cp2
pGEX-4T-1	GE Healthcare	CP de TEV	MpRPS2, MpRR1Cp2

#### 3.1.2.- Construcciones conteniendo secuencias de virus y pulgón para sobreexpresión de proteínas en bacteria

Se disponía en el laboratorio de construcciones con capacidad de expresar las proteínas CP de TEV, así como de una proteína derivada del pulgón considerada como un posible receptor, denominada MpRPS2, y que se corresponde con una hipotética proteína ribosomal derivada de un anterior análisis proteómico (Fernandez-Calvino *et al.*, 2010). Estas construcciones previas habían sido derivadas del vector plasmídico pMAL- c2x. Este vector fue empleado para recuperar los insertos e

incluirlos en el clonaje de los productos CP de TEV y MpRPS2 entre las dianas EcoRI y Sall, usando como vector final pGEX-4T-1 que incluye la secuencia correspondiente a la proteína GST (Glutación S- transferasa). Se obtuvieron así dos sistemas de sobreexpresión de proteínas de fusión, con los productos a ensayar unidos a MBP y a GST.

### 3.2.- PLÁSMIDOS GENERADOS Y CONSTRUCCIONES EMPLEADAS PARA LA EXPRESIÓN TRANSITORIA EN PLANTA DE PRODUCTOS VIRALES (AGROINFILTRACIÓN)

#### 3.2.1.- Plásmidos empleados

Los siguientes vectores comerciales se han usado para el clonaje de productos de origen viral o de pulgón amplificados por RT-PCR, siguiendo en cada caso las instrucciones de los fabricantes:

Tabla V. **Vectores utilizados para el clonaje de productos de origen viral para expresión transitoria en planta.**

Vector	Origen	Producto (origen viral)
pCR-II TOPO	Invitrogen	HPro y mutantes
pCAMBIA 5'TEVHis	(Goytia <i>et al.</i> , 2006)	HPro y mutantes
pBIN-GFP	(Haseloff <i>et al.</i> , 1997)	

#### 3.2.2.- Construcciones virales y obtención de plásmidos derivados de virus y pulgón para agroinfiltración transitoria en *N. benthamiana*

El fragmento de cDNA conteniendo la secuencia codificante de HPro se obtuvo a partir de la extracción de RNA total de hojas de tabaco infectadas con TEV mediante el kit RNeasy Plant (Qiagen). La secuencia deseada se amplificó mediante transcripción inversa del RNA, con SuperScript III Reverse transcriptase (Invitrogen) y la enzima Takara ExTaq (Takara) para la reacción en cadena de la polimerasa, siguiendo protocolos de los fabricantes.

Los cebadores diseñados para este paso se muestran en la tabla VI. La secuencia codificante de la proteína fue clonada inicialmente en el vector pCRII-TOPO.

Tabla VI. **Cebadores específicos para la amplificación de la región correspondiente a HC-Pro en el genoma de TEV.**

Nombre	Secuencia 5'-3'	Modificaciones
HProTEVHis F	ttccatggaccatcaccatcaccatcacgc	Diana <b>Nco I</b> que incluye un codón de inicio (subrayado). El triplete <b>CAT</b> corresponde al inicio de una cola de seis residuos His.
HProTEVHis R	ccgacgctattccaacattgtaagtttcatttc	Codón <b>STOP</b> al final de la secuencia de HC-Pro.

Después de amplificar, subclonar en vectores plasmídicos y corroborar por secuenciación que el clonaje era correcto, se procedió a introducir mutaciones de los dominios KITC y PTK mediante el sistema comercial QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene), para ello fue necesario diseñar cebadores específicos (tabla VII) para convertir los dominios mencionados en EITC y PAK.

Tabla VII. **Cebadores específicos para la mutación dirigida de los dominios implicados en transmisión de HC-Pro de TEV.**

Nombre	Secuencia 5'-3'	Modificaciones
HProTEVMut EITC F	tcaccgtgtggtgagatcacatgcaaacgttgc	Cambio de K a E
HProTEVMut EITC R	gcaacgtttgcattgatctcaccacacgggtga	Cambio de K a E
HProTEVMut PAK F	tcagatctaaagcaccagcgaagagacatctggtc	Cambio de T a A
HProTEVMut PAK R	gaccagatgtctcttcgctgggtgctttagatctga	Cambio de T a A

Una vez disponibles las construcciones de HPro y sus mutantes EITC y PAK en el vector pCAMBIA 5'TEVHis, se procedió a un clonaje adicional, para obtener fusionados estos productos a la GFP en la parte C- terminal. Para ello, se procedió a amplificar GFP del plásmido pBIN-GFP mediante cebadores específicos (tabla VIII). Posteriormente a la amplificación, se utilizó la estrategia de digestión por restricción mediante las dianas EcoRI y PstI y ligación para obtener los clones pCAMBIA-HProGFP y sus mutantes.

Tabla VIII. Cebadores específicos para el clonaje GFP en el vector pCAMBIA 5'TEVHis en C- terminal de HCPro y sus mutantes EITC y PAK.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Comentarios
GFP 5' EcoRI F	ggcgaattc <u>atg</u> agtaaaggagaaga	Diana <b>EcoRI</b> . Codón de <u>inicio</u> (subrayado).
Pst 3' PFG R	cggctgcag <u>ttag</u> gatcctttgtatagttc	Diana <b>PstI</b> . Codón de <u>stop</u> (subrayado).

### 3.3.- PLÁSMIDOS GENERADOS Y CONSTRUCCIONES EMPLEADAS PARA LA EXPRESIÓN TRANSITORIA EN PLANTA DE PRODUCTOS DE PULGÓN A TRAVÉS DEL VECTOR VIRAL TRV.

#### 3.3.1.- Plásmidos empleados

Para este caso, la tecnología Gateway basado en clonaje por recombinación fue usada para proceder al clonaje de candidatos a receptor de pulgón (MpRPS2 y MpRR1Cp8) en el vector viral TRV:

Tabla IX. Vectores utilizados para el clonaje de productos de pulgón para la agroinoculación mediante TRV.

Vector	Origen
pDONOR207	Clontech
pENTRY	Clontech
pTRV	(Lu <i>et al.</i> , 2003)

#### 3.3.2.- Clonaje de genes de pulgón en TRV para agroinoculación en planta.

Estos clonajes fueron llevados a cabo gracias a la reacción Gateway, para ello fue necesario sintetizar cebadores que amplificaran los genes deseados unidos a las secuencias de recombinación.

Este sistema consta de diversos pasos que fueron seguidos gracias a instrucciones del proveedor (Clontech).

Tabla X. Cebadores específicos para el clonaje de candidatos de pulgón mediante el sistema Gateway en el vector viral TRV. En la secuencia de los cebadores se indica en mayúsculas las secuencias de recombinación y en minúsculas el gen que se quiere amplificar.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Comentarios
<b>GWMpRPS2 F</b>	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC <u>atg</u> tcg gga gga cta gat gta ttg	Codón de <u>inicio</u> (subrayado).
<b>GWMpRPS2 R</b>	GGGG ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT GGG TC <u>tta</u> ggt cga cca gtt agg tgc	Codón de <u>stop</u> (subrayado).
<b>GWRR1CP8F</b>	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC <u>atg</u> aac act ttg gta gtg tta gta gct	Codón de <u>inicio</u> (subrayado).
<b>GWRR1CP8R</b>	GGGG ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT GGG TC <u>tca</u> atc caa aag act tgg cga ttc	Codón de <u>stop</u> (subrayado).

### 3.4. PLÁSMIDOS GENERADOS Y CONSTRUCCIONES EMPLEADAS PARA ENSAYOS DE INTERACCIÓN DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS (MATING).

Para llevar a cabo este ensayo de interacción, se clonaron las proteínas CP de TEV, HCPro y MpRPS2 en ambos vectores, pGBKT7 y pGADT7 (Clontech) el que contiene el dominio BD (Binding Domain) y el que contiene el dominio AD (Activation Domain), respectivamente, con objetivo de probar la unión en ambos sentidos. Para ello se utilizaron las siguientes estrategias:

- Los clonajes de HCPro y sus mutantes (PAK y EITC) en el vector pGADT7, se realizaron a partir de enzimas de restricción (BamHI/XhoI), usando los vectores TOPO obtenidos en la mutagénesis dirigida (ver apartado 3.2.2).
- El resto de clonajes se llevaron a cabo utilizando la amplificación mediante cebadores específicos (tabla XI)



Tabla XI. Cebadores específicos para la amplificación de HC-Pro, CPTEV y MpRPS2 para clonar en vectores del sistema del doble híbrido.

Vector destino	Inserto	Nombre	Secuencia 5'-3'	Modificaciones
pGBKT7	HCPro	HProTEVHis F	ttccatggaccatcaccatcac catcacgc	Diana Nco I que incluye un codón de inicio.
		HProTEVSalIR	ccgtcgacttatccaacattgta agtttcatttc	Diana Sal I
pGADT7/ pGBKT7	CP de TEV	CPTEVMueF	agtggcactgtgggtgctggt	
		CPTEVMueR	ctggcggaccctaataatgtgt	
pGADT7/ pGBKT7	MpRPS2	MpRPS2NdeIMueF	catatgctgggaggactagatg tattg	Diana Nde I
		MpRPS2XmaIMueR	cccgggttaggtcgaccagtta ggtgc	Diana Xma I

Como controles negativos del ensayo, se emplearon el plásmido pGBKT7 (auxotrofia para Trp, resistencia a Kanamicina), pGADT7 (auxotrofia para Leu, resistencia a Ampicilina), como controles positivos, los proporcionados por Clontech pVA3 y pTD1 con las mismas auxotrofias para Trp y Leu, respectivamente, pero resistentes los dos a ampicilina.

### 3.5. PLÁSMIDOS GENERADOS Y CONSTRUCCIONES EMPLEADAS PARA ENSAYOS DE INTERFERENCIA DE GENES DE PULGÓN.

Para los ensayos de interferencia mediante dieta artificial, se obtuvo una doble cadena de RNA que sirviera de desencadenante del proceso de RNAi a partir de reacciones químicas. Pero para ello, fue necesario obtener plásmidos que tuvieran los promotores T7 y SP6 en dirección opuesta, para poder sintetizar por separado las hebras + y - del inserto correspondiente, que posteriormente se hibridaron para generar la doble cadena. Así, se clonaron dos genes candidatos a receptores de pulgón en el vector pCR-II TOPO (invitrogen) gracias a la amplificación de una extracción de RNA de pulgón bajo cebadores específicos.

Tabla XII. **Cebadores específicos para la amplificación de genes de pulgón necesarios para clonar en pCR-II TOPO**, que será para uso posterior en la síntesis de RNA de doble cadena.

Nombre	Secuencia 5'-3'
<b>MpRPS2 F1</b>	ttcaactgaacaagacatggga
<b>MpRPS2 R1</b>	cacgggccaagaaccaccac
<b>MpRR1Cp2 F1</b>	gtccgcatctgtccacatcc
<b>MpRR1Cp2 R1</b>	aagtgaaagccttggcagctt

## 4. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### 4.1. EXTRACCIONES DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTALES DE TEJIDO DE PLANTAS AGROINFILTRADAS O AGROINOCULADAS

Para efectuar el seguimiento de la expresión de construcciones agroinfiltradas o agroinoculadas se procedió a la extracción de ácidos nucleicos total a diferentes días dpa (post agroinfiltración) y dpi (post agroinoculación), mediante el protocolo siguiente:

- Se parte de un disco (aproximadamente 0,5 cm de diámetro) de tejido vegetal de la planta a analizar fresco o congelado.
- En presencia de 500 µl de tampón frío TMK (25mM Tris- HCl pH 7,5, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 25mM KCl) y 50 µl de SDS al 10% (p/v), se tritura el material vegetal (todo el proceso se realizará en frío).
- Inmediatamente se transfiere el homogeneizado a un eppendorf frío que contiene 500 µl de fenol. Se vortea a intervalos durante un minuto (15 segundos vortea, 15 segundo en hielo).
- Se centrifuga 2 minutos a 13200 rpm.
- Se recuperan 400 µl del sobrenadante de la fase acuosa, y se transfiere a otro eppendorf frío que contiene fenol:cloroformo (1:1). Se vortea y se centrifuga como en los dos pasos anteriores.
- Se recuperan 200 µl finales del sobrenadante y se mezclan con 20 µl de acetato de sodio 3 M pH 5,4 y 440 µl de etanol 95% (p/v), ambos fríos. Se mezcla por inversión y se deja precipitando toda la noche a -20°C (o una hora a -80°C).
- Centrifugación a 13200 rpm durante 20 minutos.
- El sedimento se limpia con etanol 70%, y se centrifuga 5 minutos a 13200 rpm.

- Finalmente se deja secar el pellet durante 3 minutos y se resuspende en 10  $\mu$ l de agua estéril.

La calidad y limpieza de la extracción se midió en el nanodrop y en gel de agarosa.

#### **4.2.- EXTRACCIONES DE RNA DE TEJIDO DE PLANTAS INFECTADAS Y PULGÓN.**

Las extracciones de RNA se llevaron a cabo utilizando el kit comercial PureLink® RNA Mini Kit (Ambion), asegurándonos de una extracción adecuada para experimentos de alta sensibilidad, como la RT- qPCR. Como en el proceso anterior, la calidad y limpieza de este método de extracción se midió en el nanodrop y en gel de agarosa.

#### **4.3.- AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE RNA POR RT- PCR.**

Para la reacción de retrotranscripción (RT) se utilizó 1  $\mu$ g de ácidos nucleicos totales o de ARN como molde de la síntesis de la cadena de ADN complementario. El primer paso fue un tratamiento enzimático con DNAsa (Promega), llevándose a cabo la reacción en un volumen de 10  $\mu$ l totales (donde 8  $\mu$ l eran de ácidos nucleicos, 1  $\mu$ l de DNAsa y 1  $\mu$ l de tampón 10x). La mezcla se incubó en baño a 37°C durante 1 hora, a continuación se añadió 1  $\mu$ l de solución STOP (Promega) para parar la reacción. Como enzima catalizadora de la reacción se utilizó la transcriptasa reversa SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen), pero previamente se siguieron los siguientes pasos:

- Preparación de mezcla (para cada muestra):
  - o 0,5  $\mu$ l de random Primers (Roche) o 1  $\mu$ l de un cebador Reverse 10  $\mu$ M.
  - o 2  $\mu$ l de dNTPs (2.5 mM cada dNTP) (Takara).
- Añadir mezcla a la reacción de DNAsa.
- Incubar 5 minutos a 65°C en baño seco.
- Incubar 5 minutos en hielo.
- Añadir 7  $\mu$ l de esta mezcla a cada muestra:
  - o 4  $\mu$ l de tampón RT 5x (Invitrogen)
  - o 2  $\mu$ l de DTT 1 mM (Invitrogen)
  - o 1  $\mu$ l de RNAsin (Promega)
- Incubar 7 minutos a temperatura ambiente.

- Añadir 1 µl de RT a la mezcla.
- Incubar 1 hora y 50 minutos a 50°C en baño.

La reacción se finaliza con la desactivación de la enzima 15 minutos a 70°C en baño seco.

#### 4.4.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron 1 µl de la mezcla obtenida en la RT y se llevó a un volumen final de 25 µl de la siguiente manera:

- 2,5 µl Tampón 10x (Takara)
- 2 µl de dNTPs (2.5 mM cada dNTP) (Takara)
- 1 µl de cebador Forward (10 µM)
- 1 µl de cebador Reverse (10 µM)
- 17,375 µl agua estéril
- 0,125 µl Taq Polimerasa (Takara)

El programa de amplificación utilizado en cada caso consta de un ciclo de desnaturalización inicial del ADN a 94°C durante 2 minutos, seguida de 30 ciclos con desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a la temperatura y tiempo optimizados según la pareja de oligos utilizada y elongación a 72°C durante 1 minuto y finalizando con una elongación a 72°C durante 7 minutos. Para el caso de los cebadores que añadían dianas de restricción a los productos generados, se incluía una etapa previa en las mismas condiciones, pero disminuyendo el número de ciclos y la temperatura de hibridación, asegurando así un correcto anillamiento.

El resultado de esta reacción de amplificación se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE, teñido con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium). Se utilizó como marcador de peso molecular el 1Kb Ladder (NEB).

#### 4.5.- PCR EN TIEMPO REAL (qPCR).

Con objetivo de analizar los ciclos y ensayos de interferencia en genes de pulgón, se usó la técnica de la PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR) que permite cuantificar la expresión de un gen de interés relativa a un gen control. Esta técnica se basa en la unión a la doble cadena del ácido nucleico del fluorocromo SYBRGreen (Roche) presente en la mezcla de la PCR y la monitorización del seguimiento a lo

largo del tiempo de la fluorescencia emitida por este compuesto. La fluorescencia detectada describe una curva sigmoïdal. En los ciclos iniciales de la qPCR la seña es indistinguible del ruido de fondo. A medida que el producto se acumula, la identificación de la seña crece exponencialmente hasta llegar a la fase de saturación. En la parte lineal de la fase exponencial, la fluorescencia es proporcional a la cantidad de DNA amplificado, y siendo éste a su vez proporcional al número de copias de ADN inicial en la muestra. Un detector realiza la medida de esta emisión de fluorescencia (Cp), que es proporcional a la cantidad de ADN presente, y la representa gráficamente. En el CRAG se disponía del equipo LightCycler 480 (Roche) para realizar este tipo de ensayo.

El número de copias representadas como valor Cp del gen de interés, se corrigió respecto al gen utilizado como referencia (gen constitutivo) y se obtiene  $\Delta Cp$ . La elección del gen de referencia en pulgón se hizo tras consultar al Dr. Denis Tagu (INRA-Rennes, Francia), siendo el gen MpRPL7.

Este tipo de PCRs se realizaron en placas de 96 y 384 pocillos, donde se incluían dos o tres réplicas técnicas de las curvas de calibración, un control negativo sin ADN, otro sin RT y las muestras a analizar. En cada pocillo se colocaron 3  $\mu$ l de muestra y la siguiente mezcla (optimizada por Lluïsa Vilaplana):

- 10  $\mu$ l Syber MasterMix (Roche)
- 0,7  $\mu$ l 10  $\mu$ M cebador Forward
- 0,7  $\mu$ l 10  $\mu$ M cebador Reverse
- 5,6  $\mu$ l de agua estéril

Para las placas de 384 pocillos se usó la mitad de volumen de todo lo anterior.

La reacción de qPCR fue la siguiente:

1. Activación de la Taq polimerasa (Roche): 1 ciclo a 95°C durante 10 minutos
2. PCR: 

95°C 10 segundos	}	45 ciclos
60°C 30 segundos		
72°C 30 segundos		
3. Curva de fusión: 1 ciclo a 95°C durante 2 segundos y 65°C durante 15 segundos
4. Enfriamiento

Los cebadores específicos para los genes de pulgón usados en la PCR cuantitativa fueron los siguientes:

Tabla XIII. **Cebadores específicos para la detección cuantitativa de genes de pulgón usados en la qPCR.**

Nombre	Secuencia 5'-3'
MpRPL7 F	gtttccatcccgttctgcaa
MpRPL7 R	cacggttctttacgttcctc
MpRPS2 F2	gctttactaatcagatacaagc
MpRPS2 R2	acaagtcaacaacaacatccc
MpRR1Cp2 F2	tacggcaattttctgatcacgg
MpRR1Cp2 R2	gcctggttgatgggaatc

Los datos fueron analizados gracias al software de Roche.

#### 4.6.- SÍNTESIS DE RNA DE DOBLE CADENA PARA LA DIETA ARTIFICIAL.

Los experimentos de interferencia en pulgón a través de una dieta artificial, se llevaron a cabo gracias a la incorporación en la alimentación RNA de doble cadena. Este procedimiento se basa en que la presencia en la dieta de una doble cadena de RNA (dsRNA) con una secuencia complementaria a un fragmento del mensajero que se pretende silenciar, puede desencadenar en el insecto una reacción de RNAi específica. Para ello es necesario que la molécula sea adquirida por el pulgón a través de la dieta artificial, y sea posteriormente procesada en las células del insecto en fragmentos de 21-23 nucleótidos que desencadenan la degradación del mensajero endógeno diana (Schutze, 2004; Plasterk, 2002).

La síntesis del dsRNA se divide en varios días de protocolo:

##### DIA 1: Linearización del ADN

Para sintetizar el dsRNA se necesitan dos fragmentos lineales de ADN. Uno que contenga el promotor T7 y otro el promotor SP6, para ello se utilizaron los clones de los genes de pulgón en pCRII- TOPO descritos en el apartado 3.5. Para obtener estas linearizaciones se cortaron los plásmidos con Bam HI para sintetizar la cadena con T7 y XhoI para sintetizar la cadena con SP6. Esta digestión se realizó por separado utilizando 40 µg de plásmido digeridos durante la noche en baño a 37°C.

### DIA 2: Reacción “Single Strand RNA”

Una vez terminada la digestión, se precipitó el ADN mediante el método fenol/cloroformo, resuspendiendo el sedimento final en 23 µl de agua estéril. Esta linearización sirvió de molde para la reacción de “Single strand RNA”, mostrada a continuación:

	<b>Bam HI (T7)</b>	<b>XhoI (SP6)</b>
Tampón 5x (Invitrogen)	10 µl	10 µl
DTT 100 mM (Invitrogen)	4 µl	4 µl
RNAsin (Promega)	1 µl	1 µl
rNTPs 10mM (cada uno) (Promega)	10 µl	10 µl
Molde ADN	23 µl	23 µl
SP6 polimerasa (Promega)	-	1,5 µl
T7 polimerasa (Promega)	1,5 µl	-

Esta mezcla se incubó durante 3 horas a 37°C en un baño. Se extrajo 1 µl para analizar en gel de agarosa y comprobar la eficiencia de la reacción. Las reacciones fueron guardadas a -80°C hasta el día siguiente.

### DÍA 3: SÍNTESIS DEL dsRNA

Para favorecer la correcta hibridación de los ssRNA obtenidos anteriormente en una hebra doble, es conveniente realizar el anillamiento lentamente, bajando de una temperatura muy elevada a la temperatura ambiente. Así, se unieron las dos reacciones y se incubaron a 95°C en un baño durante 10 minutos. Al transcurrir este tiempo, se dejaron los tubos en el mismo baño apagado durante 5 horas, tiempo en que llegó a la temperatura ambiente. A continuación se precipitó el dsRNA con el método fenol/cloroformo resuspendiendo el sedimento final en 39,5 µl de agua estéril. Para eliminar ADN plasmídico y ssRNA que ha podido no hibridar correctamente se realizó un tratamiento añadiendo 5 µl de DNAsa (Promega), 5 µl del tampón de la DNAsa y 5 µl de RNAsa, incubando la reacción durante 15 minutos en un baño a 37°C. Por último se procedió a una última precipitación mediante fenol/cloroformo, resuspendiendo el producto final en 40 µl.

La calidad y limpieza de proceso entero de síntesis de dsRNA se estimó en geles de agarosa y la concentración se midió en el equipo nanodrop.

## 5. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

### 5.1.- EXPRESIÓN EN BACTERIA DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN GST/MBP-CP-TEV Y GST/MBP-MPRPS2

Después de clonar los genes de interés en vectores de expresión, se llevó a cabo el siguiente protocolo de expresión y purificación de proteínas unidas a GST o MBP:

Se crecieron las bacterias en el medio de selección adecuado a una temperatura de 37°C, hasta alcanzar una  $DO_{595}$  entre los valores 0,5-0,6. A continuación se dio paso a la sobreexpresión mediante la adición del agente inductor IPTG a una concentración de 0,5mM. Tras 7h de incubación, se lisaron las bacterias y se separó la proteína mediante centrifugaciones diferenciales y una purificación por cromatografía de afinidad, siguiendo los protocolos descritos por el suministrador de los plásmidos comerciales. La separación de la proteína de interés de la proteína de fusión se llevó a cabo mediante la digestión con trombina en el caso de pGEX, y a través del factor Xa para el vector pMAL, tal y como se describe en la documentación comercial en ambos sistemas.

### 5.2.- EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA HCPRO A PARTIR DE PLANTAS INFECTADAS

El protocolo utilizado para la purificación se basa en el aprovechamiento de la afinidad por resinas de níquel de la cola de His fusionadas al extremo amino terminal en la variante TEVHCH10, y fue descrito por Blanc (Blanc *et al.*, 1999) con las modificaciones detalladas por Ruíz-Ferrer y col.(Ruiz-Ferrer *et al.*, 2005).

Se cortaron las hojas con síntomas de plantas infectadas de *N. tabacum* L. var *Xanthynca* a los 7 días de la inoculación mecánica. El tejido se trituró (4ml de tampón por gramo de tejido) en tampón de extracción (100mM Tris-HCl pH 8,0, 20mM  $MgSO_4$ , 500mM NaCl, 0,5mM EGTA) conteniendo 0,1 vol de PVP (p/v) y 0,2 vol de  $Na_2SO_3$  (p/v) en frío. El homogeneizado se filtró por 2 capas de gasa y una de "miracloth" (Calbiochem) y el filtrado se centrifugó en un rotor JLA 16.250 (Beckman) a 16.000 rpm durante 2 horas a 4°C. Al sobrenadante se le añadió un 20% de  $(NH_4)_2SO_4$  y se agitó durante 1 hora a 4°C. Posteriormente se centrifugó en el mismo rotor durante 15 minutos a 15.000 rpm, volviendo a añadir al sobrenadante resultante  $(NH_4)_2SO_4$ , esta vez hasta el 40%. Se volvió a agitar y centrifugar en las condiciones del primer



sobrenadante y el precipitado obtenido en esta última centrifugación se resuspendió en 10 ml de tampón de extracción descrito anteriormente. El resuspendido se mezcló con una resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen), previamente equilibrada con tampón de extracción (1ml de resina por cada 100g de tejido). Se llevó todo a un volumen final de 50 ml con tampón de extracción y se incubó durante 45 minutos a 4°C con una agitación de 100 rpm. Posteriormente se centrifugó a 1.200 rpm durante 10 minutos. La resina precipitada se lavó dos veces con tampón de extracción en las mismas condiciones anteriores con tiempos de lavado de 30 minutos cada vez. Tras los lavados, la resina se cargó en una columna de polipropileno de 5 ml (Qiagen) previamente equilibrada con tampón de extracción. Tras cargar la resina, se eluyó la proteína hisHCPPro mediante el tampón de elución (100mM Tris-HCl pH 8,0, 20mM MgSO<sub>4</sub>, 500mM NaCl y 400mM EGTA). Las eluciones se obtuvieron a partir de incubaciones de 1 hora entre la resina y 1 ml de tampón de elución. Las diferentes alícuotas de hisHCPPro fueron almacenada a -20°C (-80°C para periodos de almacenamientos superiores a un mes).

### 5.3.- PURIFICACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES DE TEV

Las partículas virales fueron purificadas de plantas infectadas según el método descrito por Murphy (Murphy *et al.*, 1990). Se cortaron las hojas infectadas de *N. tabacum* L. var *xanthy* a los 7 días de la inoculación mecánica. Las hojas fueron homogeneizadas en tampón 0,5M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,5, 0,01M NaDIECA (dietil- ditio carbamato de sodio) conteniendo 0,5% de ácido tioglicólico (1,5 ml de tampón por gramo de tejido) al que se le añadió cloroformo (1 ml por gramo de tejido). El homogeneizado se centrifugó durante 15 minutos a 7.500 rpm en un rotor JA10 (Beckman), el sobrenadante se filtró por una capa de "miracloth" (Calbiochem) y se le añadió NaCl hasta 0,25M y PEG 6.000 hasta un 4%. El extracto se agitó durante 1 hora a 4°C. Tras centrifugar en las mismas condiciones, el sedimento se resuspendió en tampón en 0,1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7, 1M Urea y 1% Tritón X-100 (1ml de tampón por cada 1-2 gramos de hoja) y se agitó durante 1 hora a 4°C. Tras clarificar por centrifugación nuevamente, el sobrenadante se aplicó sobre un colchón de sacarosa del 30% en 0,02M Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA y se centrifugó durante 3 horas en un rotor 28SW (Beckman) a 25000 rpm y a 4°C. El precipitado se resuspendió en 0,5-1ml del último tampón.

La verificación de la correcta purificación de las partículas virales se determinó por tinción de proteínas (Comassie), comparando la banda correspondiente a la CP viral con un marcador comercial (Bio Rad) de pesos conocidos.

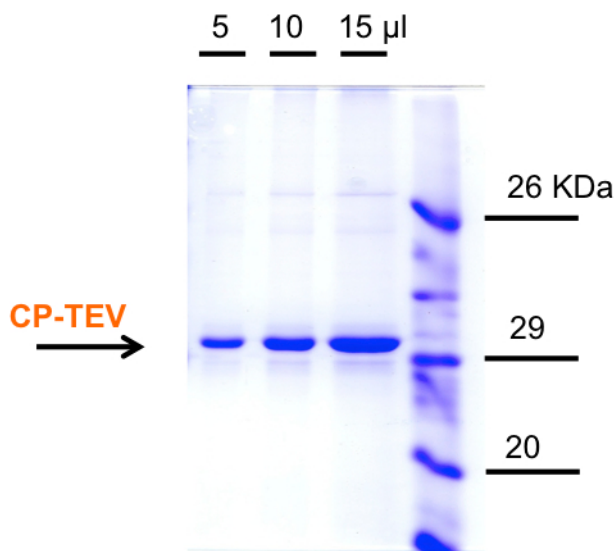


Figura 9. **Gel de proteínas para comprobar la correcta purificación de las partículas virales de TEV.** Para ello se dispensaron diferentes volúmenes de proteína, corroborando así la proporcionalidad de la cantidad con lo visto en el gel de acrilamida.

#### 5.4.- ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS PARA POSTERIOR ENSAYO DE INTERACCIÓN PROTEÍNA- PROTEÍNA

Las preparaciones de las purificaciones de partículas o proteínas virales derivadas de plantas, de la CP de TEV, del posible receptor MpRPS2, así como los extractos de tejido vegetal (tanto sano como infectado) se analizaron en geles unidimensionales discontinuos desnaturalizantes de acrilamida-bisacrilamida (37,5:1) (SDS-PAGE) del 4-10% (concentrador-separador), empleando el equipo Mini-Protean III (Bio Rad). Las muestras de proteínas y partículas virales purificadas se diluyeron en tampón de carga 2x y se hirvieron durante 2 min. Las muestras de tejido vegetal se trituraron previamente en tampón de carga 2x, y a continuación se hirvieron igualmente durante 2 min. La electroforesis se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante.

Las proteínas se visualizaron tiñendo el gel en una solución de azul de Coomassie. Los pesos moleculares de las proteínas se estimaron comparando su movilidad electroforética con la de marcadores de peso molecular conocido como los disponibles en el laboratorio o el comercial Precision Plus Protein Dual Color de la casa Bio- Rad.

### 5.5.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)

Esta técnica permite una detección con anticuerpos específicos contra la proteína que se desea identificar. Los ensayos de detección proteínas se realizaron mediante una transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (Amersham Biosciences) mediante el sistema Mini Trans-Blot Cell (BioRad), las membranas de PVDF fueron previamente activadas con tampón de transferencia (25mM Tris, 190mM glicina y 20% metanol) durante 1 minuto antes de ser utilizadas. Tras fijar las proteínas, se dejó bloqueando la membrana durante una noche en PBS-T con leche desnatada al 5% a 4°C con objetivo de bloquear los sitios de unión de anticuerpos a la membrana.

Al día siguiente, se lavó la membrana con PBS-T (al menos 3 veces) y se incubó con el antisuero primario en la dilución óptima contra las proteínas que se querían detectar. El antisuero primario se incubó durante 2 horas en agitación suave y temperatura ambiente. Tras esta incubación la membrana se lava 3 veces con PBS-T y se añade el anticuerpo secundario conjugado con un enzima, que reconoce al antisuero primario. El paso final se basó en un revelado de la actividad peroxidasa por quimioluminiscencia mediante el sistema ECL (Amersham Biosciences).

Los antisueros empleados y sus diluciones de uso se indican en la tabla XIV.

Tabla XIV . **Anticuerpos monoclonales (MAb) o policlonales (PAb) utilizados en los inmunoensayos realizados mediante la técnica Western Blot.**

Anticuerpos	MAb/PAb	Dilución
$\alpha$ hisHCPPro TEV (Ab 1°)	MAb	1:400
$\alpha$ MBP-CP TEV (Ab 1°)	MAb	1:500
$\alpha$ MBP- MpRPS2 (Ab 1°)	MAb	1:500
GARPO (Ab 2°)	PAb	1:10000

## **5.6.- ANÁLISIS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA- PROTEÍNA MEDIANTE FAR- WESTERN BLOT**

Siguiendo los pasos anteriores de la inmunoelectrotransferencia, es posible realizar ensayos de interacción entre proteínas, incubando la membrana (después de la incubación con la leche) con la proteína cebo, en nuestro caso hisHCPPro a una concentración de 100µg/ml.

A continuación se sigue como se ha mencionado anteriormente con la detección a través del antisuero primario y después el secundario.

## **5.7.- ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA- PROTEÍNA MEDIANTE EL SISTEMA DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS.**

El ensayo de doble híbrido es un experimento que permite demostrar interacciones proteína- proteína *in vivo*. El objetivo de esta técnica se basa en la expresión de las proteínas a ensayar como híbridos en el núcleo de una célula de levadura. Una de las proteínas se fusiona al dominio de unión al ADN (BD), mientras que la otra se fusiona a un dominio de activación de la transcripción (AD). Si las dos proteínas híbridas interactúan, se reconstituye funcionalmente un factor transcripcional activando así uno o más genes reporteros que contienen sitios de unión para el BD (figura 10) Esta tecnología ha sido ampliamente utilizada para identificar nuevas proteínas interactoras, para la confirmación de interacciones o para definir dominios de interacción.

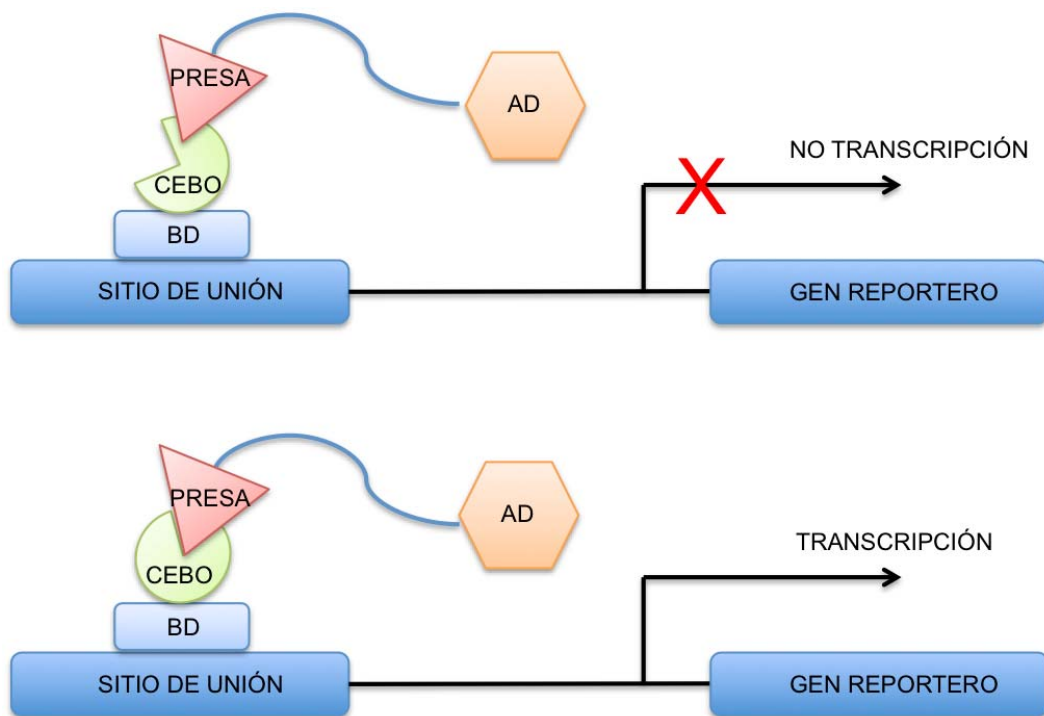


Figura 10. **Esquema representativo del sistema de doble híbrido en levadura.** Ensayo de interacción proteína- proteína (presa- cebo): si la presa, híbrida del dominio de activación (AD) no se une con el cebo (que a su vez es híbrido del dominio de unión, BD) no se activará la transcripción del gen reportero, tal y como se muestra en el esquema superior. Si por el contrario, hay interacción entre las dos proteínas ensayadas, habrá una activación transcripcional del gen reportero.

Una vez obtenidos los clones, se realizaron las transformaciones de cada vector en un tipo de cepa diferente, en este sistema de doble híbrido, dos células haploides se fusionan para formar una célula diploide. Así, obtendremos una librería de la cepa pJ694 $\alpha$  con el plásmido pGBKT7 con la proteína fusionada al BD, y otra de la cepa YM4271a con el plásmido pGADT con la proteína fusionada al AD. A partir de la incubación de ambas cepas, se obtendrá la célula diploide que será ensayada en medios restrictivos para dar lugar a la activación o no del gen reportero según la interacción probada.

Para llevar a cabo este ensayo es necesario transformar las construcciones en levadura y darse el proceso de "mating" tal y como se explica en el apartado 2.2.6.

## 6. MYZUS PERSICAE (VECTOR DE TRANSMISIÓN VIRAL)

Para la realización de bioensayos de transmisión e interferencia se empleó una población clonal de pulgones que procede de un único pulgón hembra áptero (*Myzus persicae*) cedido por Tomás Canto, CIB-CSIC, Madrid, y que deriva de una población recogida por Alberto Fereres, ICA-CSIC, Madrid (figura 11)



Figura 11. Familia de *Myzus persicae* alimentándose sobre planta de tabaco.

### 6.1.- IDENTIFICACIÓN DE CANDIDATOS A RECEPTOR EN PULGÓN

#### 6.1.1.-Extracción de proteínas de pulgón (enriquecimiento en proteína de tipo cuticular)

Para la realización de geles de poliacrilamida unidimensionales, los extractos se prepararon a partir de 0,1 g de pulgón (*Myzus persicae*) triturados en morteros con nitrógeno líquido y 1 ml de tampón DB5 (50mM Hepes, 500mM LiSO<sub>4</sub>, 0,5mM EGTA y 0,2% CHAPS p/v) y añadiendo DTT 5mM fresco. Se incubó el homogeneizado en agitación durante 5 horas a 4°C (todo el proceso posterior se hizo en frío). La suspensión fue centrifugada durante 10 minutos a 13.000 rpm, lavando el precipitado

con 1 ml de tampón DB5- DTT 5mM. Este último paso se repitió 2 veces, y posteriormente 3 veces más acortando el tiempo de la centrifuga a 5 minutos. El sedimento final se resuspendió en 1 ml de 8mM Urea, 2% SDS y 0,2% DTT manteniéndolo en agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó el extracto durante 10 minutos a 13.000 rpm. Por último, se resuspendió el precipitado en 1 ml de 8mM Urea, 2% SDS y 0,2% DTT, centrifugándolo para obtener el precipitado final, consiguiendo así un enriquecimiento y una separación específica de estas proteínas de tipo cuticular.

### 6.1.2.- Electroforesis utilizando proteínas de pulgón

#### **Separación electroforética en geles 1D**

La separación de proteínas de origen cuticular de pulgón, se llevó a cabo mediante geles unidimensionales, siendo el resultado más repetitivo que en el caso de los bidimensionales.

El gel se realizó tal y como se explica en el apartado 5.4, pero usando Hoefer TE 62 (Amersham Biosciences), que es mayor en tamaño y da lugar a una resolución más alta en este tipo de ensayos.

#### **Separación electroforética en geles 2D**

Se utilizaron tiras (IPG strips) prefabricadas de 18 cm de longitud, con un gradiente de pH 3-11 no lineal (immobilineDrystrip Gels). Las muestras de extracto de proteína cuticular, fueron previamente rehidratadas en una solución 7M urea, 2M tiourea, 2% CHAPS y 40mM TrisHCl pH8,8 y trazas de azul de bromofenol. La aplicación de las muestras se realizó en soportes de porcelana sobre los que posteriormente se colocaron las tiras de IPG, con especial atención para evitar la formación de burbujas, de forma que queden impregnadas en su totalidad por la muestra aplicada. Una vez cargada, la superficie de la tira IPG se cubrió con aceite mineral, para evitar la evaporación y cristalización de la urea. A continuación se colocó el soporte de porcelana de cada muestra en el equipo IPGphor II (Amersham Biosciences) y se aplicó el programa de isoelectroenfoco que se detalla a continuación:

- 10 horas a 50V (rehidratación).
- En 1 hora y 30 minutos pasa de 500V a 4000V

- Subida a 8000V en 2 horas hasta llegar a un estado constante.

Tras el isoelectroenfoque, las tiras fueron equilibradas durante 15 min en un tubo con 10 ml de un tampón 50mM Tris- HCl pH 8,8, 6M urea, 30% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, 2% (p/v) DTT con trazas de azul de bromofenol; y otros 15 min con el mismo tampón pero sustituyendo el DTT por 4% (p/v) de iodoacetamina.

Una vez equilibrada, la tira IPG se depositó sobre la superficie de un gel desnaturalizante homogéneo de acrilamida- bisacrilamida al 12,5% (SDS- PAGE), de 1 mm de espesor y tamaño 26x22 cm. Junto al extremo básico de la tira se aplicó, impregnado en un papel especial de isoelectroenfoque, un marcador de peso molecular preteñido (Precision Plus Protein Dual Color, Bio- Rad) que se utilizó como referencia para determinar la movilidad electroforética de las proteínas en el gel. Tanto la tira IPG como el papel con el marcador se sellaron con agarosa al 1%. La separación electroforética se realizó en un sistema de electroforesis Ettan™ DALTsix Electrophoresis System (Amersham Biosciences), en una etapa de 30 min a 2,5W/ gel, seguida de otra etapa de 4 horas a 20W/ gel y a temperatura constante, 25°C.

### 6.1.3- Tinción de proteínas con nitrato de plata

Este tipo de tinción se llevó a cabo tanto para los geles unidimensionales como para los bidimensionales siguiendo el siguiente protocolo:

1. Fijación en una solución, recién preparada, que contiene 40% metanol y una 10% de ácido acético, durante 30 minutos.
2. Sensibilización durante 30 minutos en una solución que contiene 30% de etanol absoluto, 5% de una solución preparada de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 68g/l de  $\text{CH}_3\text{COONa}$ .
3. Tres lavados en agua milliQ de 5 minutos de duración (cada uno).
4. Tinción en plata, con una solución de  $\text{AgNO}_3$  2,5 g/l durante 20 minutos.
5. Dos lavados en agua milliQ de 1 minuto de duración (cada uno).
6. Revelado con una solución que contiene  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  25g/l y formaldehído al 37% durante 2-5 minutos.
7. Parada de la reacción con 14,6 g/l de EDTA-  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$ .
8. Últimos tres lavados de 5 minutos de duración en agua milliQ.

Antes de llevar a cabo el protocolo de tinción es importante seguir las siguientes indicaciones:

- Todas las disoluciones deben guardarse a 4°C.



- Todas las disoluciones se preparan en agua milliQ.
- La tinción se realiza en un recipiente de vidrio, no de plástico.
- Todos los recipientes que se utilizan hay que lavarlos previamente en agua milliQ y metanol.

Tras la tinción los geles se escanearon y se utilizaron para localizar las manchas de las proteínas de interés.

## 6.2.- LOCALIZACIÓN IN SITU DE PROTEÍNAS EN EL ESTILETE DEL PULGÓN.

Recientemente se ha descrito una estructura anatómica situada en la parte más distal del estilete (Uzest *et al.*, 2010), llamada acrostilo. Debido a evidencias de gran acumulación de proteínas cuticulares en esta estructura y a la vez, relación de éstas con la transmisión de virus (Uzest *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 1996) se llevaron a cabo ensayos de localización de factores candidatos en el estilete del pulgón. Para ello fue necesario diseccionar el aparato bucal del insecto, separar los 4 estiletes que lo forman en 2 mandibulares (los más exteriores) y 2 maxilares (interiores) (todo esto con ayuda de una lupa y una aguja). Cada 10 pulgones diseccionados, se obtiene una acumulación de 40 estiletes (20 mandibulares y 20 maxilares), que depositados en portaobjetos siliconados, constituyen una muestra individualizada para analizar. Para fijar los estiletes al porta, fue necesario incubarlos en un bloque térmico a 50°C durante 2h. De esta manera se podían ir acumulando las muestras para realizar los distintos experimentos. Estos ensayos se realizaron gracias a una estancia breve otorgada por el programa FPI-MICINN en colaboración con Maryline Uzest y Stéphan Blanc (UMR- BGPI, Montpellier). A continuación, se enumera las diferentes aproximaciones probados con este tipo de ensayo:

### 1. Localización directa de MpRPS2 en estilete mediante su inmunolocalización con $\alpha$ MBP-MpRPS2

3 Muestras:

- Control positivo  $\alpha$ PepL (detecta proteínas cuticulares) 1:100 en tampón TS (Tris 50mM pH 7,4 y NaCl 200mM).
- Control negativo suero Pre-inmune de  $\alpha$ MBP-MpRPS2 a 1:500 en tampón TS.
- Antisuero  $\alpha$ MBP-MpRPS2 a 1:500 en tampón TS.

Estas muestras fueron incubadas con 450 µl de los antisueros primarios o el suero pre inmune, a las diluciones citadas en TS- leche al 2% (p/v). El tiempo de incubación fue 4 horas a temperatura ambiente, en total oscuridad. Para la eliminación de los antisueros, se lavaron 3 veces los portas con 500 µl de TS. A continuación, se incubaron los 3 portaobjetos con el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Invitrogen) diluido 1:300 en TS- leche al 2% (p/v). Este proceso se realizó también en total oscuridad durante 2 horas a temperatura ambiente. Para eliminar este anticuerpo, se lavó 3 veces el portaobjetos con tampón TS, finalizando el proceso con la eliminación también del TS. Los resultados se analizaron gracias a un microscopio de epifluorescencia disponible en el laboratorio.

## **2. Localización directa de MpRPS2 en estilete mediante su inmunolocalización con αMBP-MpRPS2 usando quitinasa.**

6 Muestras:

- 3 muestras diluídas en tampón TS-leche al 2% (p/v) utilizando αPepL
  - Control negativo sin quitinasa
  - 2 tratamientos con quitinasa a diferentes tiempos de incubación: 15 y 45 minutos
- 3 muestras diluídas en tampón PBS-leche al 5% (p/v) utilizando αMBP-MpRPS2
  - Control negativo sin quitinasa
  - 2 tratamientos con quitinasa a diferentes tiempos de incubación: 15 y 45 minutos
  -

La quitinasa es un enzima degrada la quitina, que es uno de los principales elementos que forman el exoesqueleto de los artrópodos. Esta prueba se hizo con objetivo de dejar aún más expuestos los factores que componen el estilete.

Las muestras se incubaron con 500 µl de una solución de quitinasa (Invitrogen) 2U/ml en KPO<sub>4</sub> 50mM pH 6, 15 o 45 minutos a 37°C en un bloque térmico. Los controles negativos se incubaron 45 minutos con la misma solución pero sin añadir la quitinasa. A continuación, los portaobjetos se lavaron dos veces con KPO<sub>4</sub> 50mM pH 6 y se trataron con el antisuero primario αMBP-MpRPS2 o αPepL y el secundario tal y como se ha explicado hasta ahora.

### **3. Localización de MpRPS2 a través de la interacción con HcPro- GFP y EGTA (coadyuvante en la transmisión).**

3 muestras:

- 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
- 

Tal y como se llevaron a cabo los experimentos de este tipo, la muestra fue pre-incubada con 500 µl de tampón de extracción de HcPro (apartado 5.2), conteniendo las cantidades señaladas de EGTA según la muestra y el 3% de BSA (p/v) (Roche). Este proceso duró 30 minutos y se realizó a temperatura ambiente. A continuación se realizaron 3 lavados con el mismo tampón y se depositaron 500 µl en cada muestra de las interacciones a analizar, cada una se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad a los tiempos descritos anteriormente. En el caso de incubar con una segunda proteína, como es el caso de GST- MpRPS2, previamente se lava la muestra con tampón de extracción, para eluir después la purificación.

En estos casos, el objetivo fue localizar dónde se une HcPro en el estilete, así que se usó para la detección el antisuero primario  $\alpha$ hisHcPro.

### **4. Localización de MpRPS2 a través de la incubación de la proteína purificada GST- MpRPS2 en los estiletes.**

2 muestras:

- 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 HcPro- GFP purificada durante 2 horas.
- 

Como se ha descrito para casos anteriores, las incubaciones se hicieron en tampón de extracción, el primer caso con 300mM de EGTA y el segundo añadiendo 200mM EGTA. Las dos muestras fueron localizadas con el antisuero primario  $\alpha$ MBP-MpRPS2.

## **5. Localización de MpRPS2 cambiando condiciones de pH.**

Para este ensayo, se dializaron previamente dos muestras de GST- MpRPS2 purificada en dos tampones de pH diferente, obteniendo 2 muestras:

- 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
- 

Se localizaron con el antisuero primario  $\alpha$ MBP- MpRPS2.

Después de realizar estos análisis, se incubaron estas muestras con HCPPro-GFP y se observaron directamente bajo el microscopio (al llevar GFP no es necesario detectar con anticuerpo).

## **6. Localización de MpRPS2 cambiando condiciones de pH de HCPPro**

2 muestras:

- Muestra incubada con GST- MpRPS2 y HCPPro- GFP purificadas y dializadas en MES 1M pH 5,6
- Muestra incubada con GST- MpRPS2 y HCPPro purificadas y dializadas en MES 1M pH 5,6

La diferencia entre estas muestras fue la detección directa bajo microscopio de la primera muestra, mientras que la segunda fue tratada con antisuero primario  $\alpha$ HCPPro y revelada por el secundario.

## **6.3.- MEDIDA DE PARÁMETROS VITALES EN EL CICLO DE UN PULGÓN**

### **6.3.1- Medida de ciclo de vida**

Este clon se ha mantenido durante todo el estudio sobre plantas de tabaco (*Nicotiana xanthi*) en una cámara de cría a una temperatura de 18- 22°C y un fotoperíodo de día largo 16:8 horas (luz: oscuridad).

Para establecer un esquema del ciclo de vida del insecto a las condiciones mencionadas, se decidió hacer un seguimiento del pulgón día a día desde el nacimiento hasta la edad adulta. Para ello, se escogieron hembras de pulgón en estado reproductivo, a medida que se obtenían las ninfas, se separaban en hojas individualizadas. Cada día a la misma hora se les hizo una foto mediante la lupa Olympus DP71 a un aumento de 3,2. Además, se anotaron características como la aparición de muda y la medida de la cápsula cefálica, estableciendo así unos parámetros biológicos para escoger edades adecuadas para hacer los ensayos de este estudio.

### **6.3.2- Medida de la expresión de genes a lo largo del ciclo de vida del pulgón.**

De la misma manera que se hizo para medir el ciclo de vida del pulgón, estos estadios individualizados se congelaron a -80°C para luego ser procesados en cuanto a extracción de RNA (mediante el kit comercial de Ambion) y proceder después a la RT- qPCR (descrita en el apartado 4.5), obteniendo así una gráfica de expresión de los genes analizados a lo largo de la vida del insecto.

## **6.4.- ENSAYOS DE INTERFERENCIA EN GENES CANDIDATOS DE PULGÓN**

Con propósito de silenciar genes de pulgón implicados en la transmisión viral, se decidió llevar a cabo dos tipos de ensayos de transferencia en el que el pulgón mediante ingestión, es capaz de activar su propia ruta de silenciamiento contra los genes candidatos elegidos para este proyecto.

#### 6.4.1- Dieta artificial

La dieta artificial fue descrita inicialmente (Pirone, 1964) como un método para estudiar la transmisión viral, en este caso, lo que se hizo fue aprovechar esta infraestructura para alimentar a los insectos con dsRNA (síntesis descrita en el apartado 4.6) contra los genes candidatos. Para ello, fue necesario tener una dieta en la cual los pulgones lograran vivir y completar su ciclo sin problemas, así que, mediante una comunicación personal de Angela Douglas (Cornell University, Ithaca, EEUU), se obtuvo la dieta siguiente (Prosee and Douglas, 1992) que fue usada para los ensayos de este tipo:

Inicialmente, se deben preparar soluciones stock de lo siguiente que se guardará posteriormente a -20°C un máximo de 3 meses:

1. Aminoácidos: la composición de la dieta estándar usada en estos ensayos es de 150mM por cada aminoácido, aquí se señalan los mg de aminoácido para la concentración final estándar.

Alanina	50.8	Arginina	300.2
Asparagina	213.9	Histidina	182.4
Aspartato/ Ácido aspártico	189.7	Isoleucina	114.1
Cisteína	42.5	Leucina	114.1
Ácido Glutámico	123.6	Lisina	158.9
Glutamina	241.1	Metionina	42.5
Glicina	9.0	Fenilalanina	47.1
Prolina	65.6	Treonina	103.6
Serina	59.9	Triptófano	58.2
Tirosina	10.9	Valina	

Los aminoácidos son pesados de 5 en 5 en vidrios de reloj y se disuelven antes de añadir los 5 siguientes. Si es necesario, se pueden aplicar calor para ayudar a una mejor disolución. Al finalizarlos todos, se divide en 10 alícuotas de 5 ml y se congelan a -20°C. Esto corresponderá a 10 dietas.

2. Sales minerales: las sales se disuelven en 10 ml totales de agua milliQ y se dividen en alícuotas de 0,1 ml que se congelarán a -20°C.

	<b>mg</b>
<b>FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	11
<b>MnCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	4
<b>CuCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O</b>	2
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	17

3. Vitaminas: se disuelven individualmente en 10 ml totales, que se alícuotarán en volúmenes de 0,5 ml.

	<b>mg</b>
<b>Biotina</b>	0.2
<b>Pantotenato</b>	10
<b>Acido fólico</b>	2
<b>Acido nicotínico</b>	20
<b>Piridoxina</b>	5
<b>Tiamina</b>	5
<b>Colina</b>	100
<b>Mio-inositol</b>	100

La dieta debe ser fresca, así que previamente al ensayo se debe preparar lo siguiente en el orden que se describe:

1. Descongelar completamente los stocks de aminoácidos, minerales y vitaminas. Agitar en vortex antes de añadir cada uno, con especial cuidado con el stock de minerales.
2. Agregar una alícuota de sales minerales y 1 de vitaminas al stock de aminoácidos.
3. Pesarse la cantidad necesaria de mezcla de sacarosa y disolver en 3 ml de volumen total. Añadir a la mezcla de aminoácidos, minerales y vitaminas. Se mezcla y se revisa la correcta disolución de todos los componentes.

#### Mezcla de sacarosa (500mM)

	mg
<b>Ácido ascórbico</b>	10
<b>Ácido cítrico</b>	1
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	20
<b>sacarosa</b>	1,7

4. Pesar el 115 mg de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y disolver en 1 ml de agua. Agregar esta solución a la mix de aminoácidos, vitaminas, minerales y sacarosa. Revisar que la solución no esté turbia que podría estar causada por la precipitación de fosfato.
5. Revisar el pH con las cintas indicadoras. Debería estar en pH 7.0-7.5 (EM Science). Si el pH de la dieta total no está alrededor 7,0, es necesario volver a empezarlo todo.
6. Llevar la solución a un volumen final de 10 ml con agua milliQ.
7. Esterilizar la dieta mediante filtros de 0,22 micras (Whatman) en tubos de plástico estéril (Beckton Dickinson) y guardar a -20°C.

Este tipo de alimentación se llevó a cabo utilizando un sistema de alimentación artificial de pulgones a través de membranas de parafilm (Kunkel, 1976). Transcurrido el período de ayuno (unas 2 horas aproximadamente) los pulgones en estadio de ninfa, fueron transferidos en grupos de 30 individuos, a cilindros opacos cuya abertura superior se cubrió con membranas estiradas de Parafilm. Sobre la membrana se dispuso un volumen conocido de dieta mezclada con una concentración conocida de dsRNA. Sobre la dieta se colocó otra membrana de Parafilm estirada y se iluminó el dispositivo desde arriba con luz blanca. De esta forma los pulgones atraídos por la luz ascienden hacia la membrana y se alimentan mediante la introducción del estilete a través de la membrana.



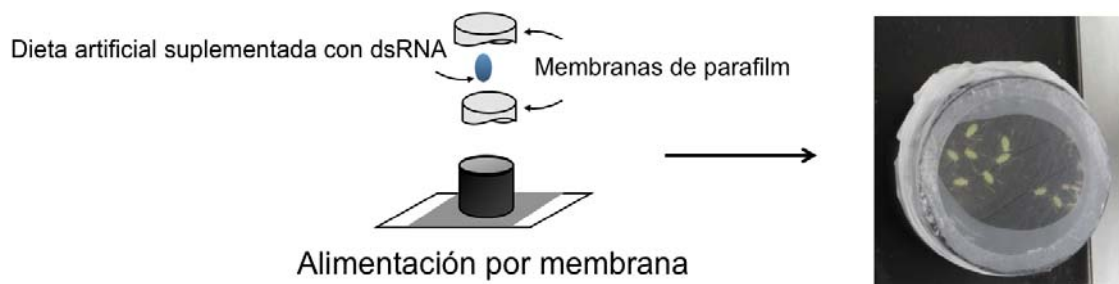


Figura 12. **Esquema representativo de la alimentación por membrana en pulgones.** En la parte izquierda se dibuja el resumen de la estructura que se monta para poder alimentar a los pulgones con un dsRNA diluído en dieta artificial. A la derecha se observa una foto real del sistema.

Los diferentes ensayos probados son los siguientes:

<b>Gen estudiado</b>	<b>Volumen final de dieta (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentración de dsRNA (<math>\mu</math>g/ <math>\mu</math>l)</b>
<b>MpRPS2</b>	75	1,3
<b>MpRR1Cp2</b>	75	1,3

En todos estos ensayos se establecieron dos controles negativos:

- Dieta sin dsRNA
- Dieta con dsRNA no relevante para el pulgón.
- 

Las muestras (pulgones individuales) se recogieron a los días 3, 5 y 8 post ingesta de la dieta, colocando pulgones nimfa al inicio de cada experimento. La expresión del gen fue analizado por RT-qPCR.

#### 6.4.2- Dieta vegetal

Otro método de silenciar genes de pulgón mediante ingesta, es la que se ha nombrado como dieta vegetal, donde el tabaco donde viven los insectos es transformado con un vector viral (TRV) donde se han insertado los genes a silenciar de pulgón. Éste capaz de inducir la ruta de silenciamiento en la planta y obtener así siRNA procesados por la misma en contra de los genes candidatos, siendo

posiblemente ingeridos por los pulgones que viven en esa planta activando así de otro modo su propia ruta de silenciamiento.

Para ello se agroinocularon las distintas construcciones en las plantas, se esperaron 7 días para la aparición de leves síntomas causados por este virus y a continuación se depositaron ninfas de pulgón. Las muestras se recogieron a 7, 10, 13 y 1 mes post- ingesta y fueron analizadas mediante RT- qPCR. Los controles negativos en este caso fueron los pulgones comiendo en planta no inoculada y los pulgones comiendo en planta agroinoculada con el vector TRV vacío.

Estos experimentos se llevaron a cabo en la cámara de cría en jaulas individualizadas en las mismas condiciones de crecimiento de los pulgones, construidas por el Sr Javier Urizarna y el Sr. Serafín Garrigos.

## 6.5.- TRANSMISIÓN POR PULGONES

En todos los experimentos de transmisión se utilizaron pulgones ápteros adultos que se sometieron a un período de ayuno de 1- 2 horas previo al ensayo, en viales de vidrio. Los pulgones fueron colocados sobre plantas de tabaco infectado con TEV, permitiéndoles un tiempo de adquisición de 10 minutos. A continuación, se transfirieron con un pincel a plantas sana, *N. benthamiana* o *tabacum* de 2 cm de altura (3- 4 hojas verdaderas) en grupos de 5 individuos o solamente un pulgón dependiendo del experimento. Una vez dispuestos los pulgones en las plantas, éstas fueron cubiertas con vasos de plástico para evitar desplazamientos indeseados de los insectos a otras plantas contiguas. Se utilizó un período de inoculación de unas 16 horas. Transcurrido este tiempo, se retiraron los vasos y se pulverizaron con insecticida Confidor (Bayer).

## 7. APLICACIONES BIOINFORMÁTICAS

Para la asistencia bioinformática en los procesos de clonaje de las proteínas de interés se utilizaron los siguientes programas:

- eBioX: conjunto de programas diferentes que permiten analizar secuencias de DNA y proteínas.
- Serial Cloner 2.1: permite realizar los mapas para el clonaje *in silico*.
- 4Peaks: utilizado para editar secuencias y analizar los histogramas derivados de los procesos de secuenciación automática de ácidos nucleicos proporcionados por el

Servicio de secuenciación.

También fueron calculados mediante las herramientas bioinformáticas disponibles en ExPASy Proteomics server (<http://www.expasy.ch/tools/>) el punto isoeléctrico teórico (pI) y el peso molecular (Mw) de las proteínas analizadas. Los porcentajes de identidad de secuencia fueron determinados utilizando BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>).

Por último, se han consultado los siguientes sitios como fuentes de información de utilidad para el proyecto:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

[www.geocities.com/plantmolbiol/](http://www.geocities.com/plantmolbiol/)

[www.mekentosj.com](http://www.mekentosj.com)

[www.urgi.versailles.inra.fr](http://www.urgi.versailles.inra.fr)

[www.aphidbase.com/aphidbase/](http://www.aphidbase.com/aphidbase/)

