



# 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

# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

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

Tal y como se ha descrito, los potyvirus como virus de transmisión no persistente se considera que son retenidos en el canal alimenticio del estilete del vector (Berger and Pirone, 1986; Ammar *et al.*, 1994) de forma que el factor auxiliar HCPro podría estar interaccionando con hipotéticos receptores allí presentes, y al mismo tiempo con la partícula viral, conforme a la conocida hipótesis de puente (Govier and Kassanis, 1974a). Las interacciones necesarias se considera que deben ser de tipo proteína-proteína. Por esta razón se planteó caracterizar en mayor detalle el comportamiento de todas las proteínas que presuntamente intervienen en el proceso de transmisión del potyvirus TEV, incluyendo el candidato a receptor caracterizado recientemente (Fernández-Calvino *et al.*, 2010).

#### 1.1.- SOBREEXPRESIÓN DE CP DE TEV y MpRPS2 Y PRODUCCIÓN DE ANTISUEROS CONTRA LAS MISMAS.

Anteriormente a este trabajo, separaciones electroforéticas 2D con proteínas procedentes de extractos de cabezas de pulgón permitieron identificar una proteína denominada MpRPS2, que mantenía una interacción con la proteína HCPro de TEV (Fernandez-Calvino *et al.*, 2010). A partir de aquí se decidió clonar este candidato y la proteína de la cápside de TEV (CP) para su posterior expresión y evaluación en experimentos de interacción. Para la sobreexpresión de estas proteínas se decidieron emplear sistemas basados en la expresión heteróloga en bacteria. Actualmente existen varios sistemas disponibles comercialmente para este propósito, y en nuestro laboratorio se utilizan frecuentemente los sistemas basados en fusiones a GST (sistema pGEX) y a MBP (sistema pMAL), que contienen además sitios estratégicos para poder procesar proteolíticamente la proteína recombinante con ayuda de proteasas específicas (trombina y factor Xa, respectivamente), lo que en teoría permite aislar finalmente la proteína de interés.

Para la recuperación y purificación del producto de fusión final, el protocolo a utilizar varía de acuerdo al sistema empleado, dependiendo de que la proteína recombinante sea secretada al medio extracelular, o bien sea retenida en algún compartimento intracelular. También depende de que se trate de un producto soluble, o se encuentre en cuerpos de inclusión.

En el caso particular del sistema pGEX, donde el producto recombinante es expresado como proteína de fusión con la enzima GST dentro del citoplasma, la purificación es efectuada por cromatografía de afinidad con glutatión sefarosa después de lisar las células. La especificidad del sistema y las condiciones poco desnaturalizantes en la que se produce la elución lo hacen adecuado para obtener la proteína de interés en forma activa. Además, debido a que la GST es poco inmunogénica, podría usarse la proteína de fusión entera en la preparación de reactivos para inmunodiagnóstico. Los rendimientos obtenidos en este trabajo fueron satisfactorios en lo que se refiere al uso de estas proteínas para ensayos de tipo Far-Western donde se verifican las interacciones proteicas.

Sin embargo, el rendimiento de expresión mejora usando el sistema de fusión a MBP a pesar de que por su mayor tamaño respecto la fusión a GST podría pensarse que sería sobre el papel menos adecuado. El mejor rendimiento podría deberse por ejemplo a un plegamiento diferente de las dos proteínas de fusión que afectara a la estabilidad del producto, o por otras razones desconocidas. Nuestra estrategia ha sido ensayar los dos sistemas y escoger el más adecuado en cada caso. Esta aproximación empírica nos ha permitido obtener unos rendimientos más adecuados con MBP, tal y como se muestra en los resultados, y en consecuencia, ésta fusión fue la elegida para producir antisueros que luego serán usados en los ensayos de interacción proteína-proteína.

Siguiendo con los protocolos habituales a partir de la obtención de las proteínas de fusión correspondientes (tanto de GST como de MBP), el siguiente paso fue aislar la proteína de interés de forma independiente. También con el sistema elegido basado en fusión a la MBP se logró una mejor separación de la proteína de interés gracias a la digestión con el factor Xa. Un ensayo con una cantidad pequeña de proteína nos ha permitido comprobar que es factible esta separación, aunque el rendimiento final se veía seriamente comprometido, por lo que sería necesario una mejora del proceso si se necesitara disponer de la proteína independiente. Por ello, la inmunización de los animales para obtener sueros específicos se realizó finalmente con las proteínas de fusión.

## 1.2.- OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA HCPro DE TEV Y SUS MUTANTES EITC Y PAK.

Para obtener proteína HCPro de TEV sin modificar y sus posibles mutantes, se utilizó la sobreexpresión del producto en planta (*N. benthamiana*) mediante el sistema de expresión transitoria por agroinfiltración, basado en la infiltración en hojas de cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* transformados con las construcciones adecuadas (Goytia *et al.*, 2006). Gracias a este sistema fuimos capaces de purificar la proteína HCPro y variantes de la misma para poder utilizarlas en los ensayos de interacción.

Al analizar los niveles de acumulación tanto de la proteína HCPro como de sus mutantes, se pudo observar como la expresión de las proteínas aumentaba a medida que avanzaba el tiempo post-agroinfiltración. Este resultado está en consonancia con la función de HCPro en la supresión del silenciamiento génico mediado por la planta en respuesta a componentes exógenos (Lakatos *et al.*, 2006). La proteína HCPro actúa secuestrando las moléculas inductoras del silenciamiento, los dúplex de siRNA, impidiendo el progreso del PTGS, es decir, en cuanto se produce la expresión de la proteína HCPro activa, esta proteína actúa como supresor de silenciamiento, impidiendo que su propio mensajero sea degradado, y contribuyendo a retroalimentar la expresión de la construcción, que se traducirá en un aumento de acumulación de proteína directamente proporcional al aumento de tiempo post-agroinfiltración.

HCPro es una proteína que se encuentra entre los supresores mejor caracterizados (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau and Carrington, 1998), por tanto este resultado de la acumulación de HCPro mediante agroinfiltrado era esperable. Las variantes EITC y PAK, mostraron el mismo comportamiento en cuanto a acumulación del producto. Esto puede ser debido a que estas mutaciones no influyen en la función de silenciamiento, y podrían ser específicas para la transmisión. La distribución de funciones dentro del producto viral HCPro ha sido diseccionada en detalle en el caso de TEV, y nuestro resultado coincide con los obtenidos en estudios anteriores (Torres-Barcelo *et al.*, 2010)

### 1.3.- 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.

La técnica de Far Western blot ha sido ampliamente utilizada en el estudio de interacciones de proteínas implicadas en transmisión por pulgones (Blanc, 1997; Peng *et al.*, 1998; Ruiz-Ferrer *et al.*, 2004). Por este motivo decidimos emplearla para analizar la interacción entre las distintas proteínas que intervienen de acuerdo con la “hipótesis de puente” (Govier and Kassanis, 1974a). Este sistema permite detectar las interacciones de la proteína HCPPro con las partículas virales de TEV, así como con posibles candidatos a receptores en la transmisión viral.

Respecto al análisis de la interacción entre HCPPro y las partículas virales, en los ensayos Far Western se observa una banda de aproximadamente 29 KDa coincidente con el peso esperado de la CP de TEV, lo cual demostraría la conocida interacción entre estas dos proteínas (Blanc, 1997). Además, se ha observado también que las muestras que contenían las fusiones de CP con GST daban señal en los ensayos de tipo Far Western, confirmando que la proteína de fusión mantiene la capacidad de interactuar con HCPPro.

En el previo análisis proteómico de extractos de cabezas de pulgón, se identificaron diversas proteínas candidatas a actuar como receptores durante la transmisión (Fernandez-Calvino *et al.*, 2010). De entre las candidatas, la proteína ribosomal S2 (MpRPS2), homóloga al receptor de laminina, fue elegida para confirmar la interacción con HCPPro. Este tipo de proteína ha sido descrita como receptor viral en células animales (Wang *et al.*, 1992; Akache *et al.*, 2006; Gauczynski *et al.*, 2001; Tio *et al.*, 2005; Senapin and Phongdara, 2006), además de encontrarse en las cutículas del mosquito *Anopheles gambiae* (He *et al.*, 2007), vector de numerosos arbovirus, lo que sugería que podría estar relacionada con la transmisión de otros virus como TEV.

Los ensayos tipo Far Western mostraron que las fusiones de MpRPS2 y GST/MBP son capaces de interactuar con el factor viral HCPPro, lo que confirmaba la proteómica llevada a cabo por la Dra. Fernández-Calvino.

El uso de mutantes de HCPPro afectado en dominios presumiblemente necesarios para la interacción permitió la realización de experimentos de interacción donde se podría comprobar la esperable interrupción de la unión tanto al posible receptor como a la proteína de la cápside del virus.

El mutante EITC se ha descrito que afecta al dominio de HCPPro que presumiblemente interviene en el proceso de transmisión uniéndose a estructuras del pulgón. Se buscaba interrumpir la interacción con el candidato MpRPS2, es decir, si la



variante EITC no se unía al receptor, el complejo formado por las partículas virales y el factor auxiliar HCPro no se retendría en el estilete del pulgón. A través de los ensayos Far Western, hemos podido demostrar cómo deja de interactuar MpRPS2 cuando se usa EITC como cebo, confirmando la posible implicación del dominio conservado KITC en la transmisión mediando la retención en el estilete, mientras que el mutante mantiene la capacidad de interactuar con la CP del virus.

Sin embargo, al probar estos mismos ensayos con la variante de HCPro, PAK, mutante relacionado con la unión entre partículas virales y HCPro, no se observó pérdida en la interacción ni con la CP ni con las fusiones de MpRPS2. Este resultado sugiere que el dominio PTK, aún habiendo sido implicado en la interacción entre la proteína HCPro y la partícula viral, podría no ser el único dominio que esté implicado en esta interacción. Resultados anteriores con otros potyvirus como ZYMV mostraban que el mutante PAK perdía la transmisibilidad y la capacidad de interactuar con la CP del virus (Peng *et al.*, 1998), pero trabajos posteriores con SMV sugieren que la interacción entre HCPro y CP puede ser más compleja e implicar más de un dominio (Seo *et al.*, 2010). Además el cambio de un aminoácido polar sin carga, como la treonina, por un aminoácido apolar, como la alanina, podría no tener la misma trascendencia estructural que por ejemplo el cambio de KITC por EITC (cambio de aminoácido básico por uno ácido), por lo que se puede pensar que no sea suficiente para abolir la interacción por completo en el caso de TEV.

#### **1.4.- INTERACCIÓN DEL FACTOR HCPro DE TEV CON LA CP DE TEV Y CON MpRPS2 MEDIANTE EL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURA.**

Con el objetivo de demostrar mediante otras técnicas diferentes del Far Western blot las interacciones postuladas en la “hipótesis del puente” se decidió analizar la capacidad de unión de HCPro de TEV con la CP del mismo virus y con el posible receptor MpRPS2 mediante el sistema de doble híbrido en levaduras.

Como se ha mencionado, la interacción entre HCPro y CP de potyvirus se ha abordado en otros sistemas virales mediante ensayos de doble híbrido (Seo *et al.*, 2010). Debido al poco conocimiento en lo que se refiere a las estructuras del pulgón que podrían estar interactuando con HCPro, se desconocía cómo MpRPS2 podría reaccionar en un sistema de levaduras. Además, la anterior demostración de interacción mediante el método Far Western blot, se lleva a cabo en condiciones desnaturalizantes donde la proteína está en teoría totalmente desplegada y con los dominios de unión expuestos, por esa razón se consideró interesante confirmar por

otros métodos más próximos a la situación *in vivo* esta interacción. Tal y como se muestra en el apartado de resultados, la interacción entre estas dos proteínas, fue por segunda vez demostrada gracias al sistema de doble híbrido. Estos resultados indican que MpRPS2 puede ser un firme candidato a ser un elemento participante en el proceso de transmisión, y que se mantiene el interés por explorar otros aspectos de esta proteína.

Por otra parte, se sabe que la interacción entre HCPro y CP se considera necesaria para que se produzca la transmisión. Estudios mediante este tipo de ensayo muestran que HCPro expresada en levaduras es activa en transmisión (Ruiz-Ferrer *et al.*, 2004) lo que sugiere que se puede utilizar también para comprobar interacciones.

A pesar de que esta metodología ha sido ampliamente utilizada para estudiar interacciones entre proteínas de potyvirus (Guo *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2004; Urcuqui-Inchima *et al.*, 1999b; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2001), nuestros resultados referentes a la conocida interacción entre CP de TEV con HCPro no han sido los esperados, resultando negativa la detección de interacción en las que esté implicada la proteína de la cápside de TEV. En el caso del virus PVA tampoco se lograba observar la esperada interacción en el sistema de doble híbrido (Guo *et al.*, 1999). Aún y así, la interacción anteriormente comprobada en ensayos de tipo Far Western entre CP y HCPro de TEV, hace pensar que la no detección en el sistema de doble híbrido, podría deberse a algún tipo de limitación experimental que esté afectando a la técnica. Además el problema parece estar afectando únicamente a la proteína CP y no a HCPro, puesto que tal y como se ha mencionado anteriormente, HCPro sí es capaz de interactuar con el candidato a receptor MpRPS2 en el sistema de doble híbrido.

Algunas de las causas que pueden explicar esta ausencia de interacción se basan en problemas estructurales, teniendo en cuenta que las proteínas interactoras se producen como proteínas de fusión unidas en su extremo amino terminal a los dominios encargados posteriormente de unirse al DNA y de activar la transcripción de los genes delatores, por lo que es posible que sufran algún tipo de cambio conformacional respecto a la proteína nativa sin esta fusión en su extremo amino terminal, y como consecuencia se vería impedida la interacción.

Como se ha explicado en la introducción, el dominio de CP implicado en transmisión se localiza en el contexto del triplete DAG, que supuestamente interactúa con el dominio PTK de HCPro, según la "hipótesis del puente". Este dominio DAG está situado en la parte amino terminal de la CP, quedando expuesto hacia el exterior de la estructura de la partícula viral (Baratova *et al.*, 2001; Shukla *et al.*, 1986). Por tanto, el hecho de añadir una fusión en esta región podría estar

alterando el plegamiento correcto de la CP respecto al que tiene en la partícula viral, y en consecuencia afectar su estructura e interferir con la interacción entre HCPro y CP. Es posible también, que se esté alterando la conformación de la región necesaria para la activación transcripcional de los genes delatores, anulando la funcionalidad del dominio de unión a DNA y del dominio de activación, imposibilitando así la detección de la interacción entre las proteínas estudiadas.

Un buen modelo estructural de la CP de potyvirus sería muy útil para poder valorar cuáles son los motivos reales que dificultan mostrar en el sistema del doble híbrido la interacción entre CP y HCPro. Cabe destacar que todavía ninguna CP de potyvirus ha sido resuelta mediante difracción de cristales. Además, existen otros miembros de este género además de TEV en los que tampoco se ha logrado detectar la interacción CP- HCPro mediante levaduras, como por ejemplo PSbMV o PVA (Guo *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2004).

Otra de las características de la proteína CP de potyvirus es que sufre modificaciones post traduccionales tales como la fosforilación y glicosilación (Fernandez-Fernandez *et al.*, 2002; Ivanov *et al.*, 2001). Este tipo de fenómenos dependen de enzimas del huésped en el que se produce la infección por el virus (Chen *et al.*, 2005), y por tanto no tienen por qué producirse del mismo modo en un sistema experimental como *S. cerevisiae*. Si realmente este tipo de modificaciones fueran necesarias para que se produjera la interacción entre las proteínas HCPro y CP, el doble híbrido no sería adecuado entonces para estudiarlas siendo otra causa para la no detección de la interacción entre las proteínas CP y HCPro de TEV con este sistema.

Ambas interacciones, tanto la de CP con HCPro como la de MpRPS2 con HCPro, tal y como predice la hipótesis del puente, han sido demostradas en ensayos de tipo Far Western con resultados claros. Aunque no funcionara con la interacción esperada entre CP y HCPro, el sistema de doble híbrido sí ha servido para confirmar la interacción con el candidato a receptor MpRPS2.

## 2. INTENTOS DE LOCALIZACIÓN DEL CANDIDATO A RECEPTOR MpRPS2 EN EL ESTILETE DEL PULGÓN.

Después de confirmar la interacción entre HCPPro y MpRPS2 mediante Far Western y doble híbrido en levaduras, se decidió dar un paso hacia adelante en la caracterización de este posible receptor dirigiendo el estudio hacia su localización anatómica en el pulgón.

Los pulgones reconocen las plantas huéspedes por una serie de procesos sensoriales: reconocimiento visual, reconocimiento mecánico, reconocimiento olfativo y reconocimiento gustativo. En el reconocimiento gustativo está directamente implicado el aparato bucal de los pulgones, más concretamente, el estilete. Éste, mediante acción muscular, puede penetrar en las hojas, siendo el órgano principal en la alimentación de tipo picador-chupador de estos insectos.

El aparato bucal de los pulgones consta de dos maxilas flanqueadas por dos mandíbulas organizadas en forma de estiletes; en los estiletes maxilares (formados al soldarse las dos maxilas), se distinguen dos canales: el canal alimenticio y el canal salival. Ambos canales se unen en la porción distal del estilete formando un canal único (Forbes, 1969). Los estiletes mandibulares se encuentran rodeando los estiletes maxilares, de forma que se permite el movimiento de los segundos en relación con los primeros. Es aquí, en los estiletes mandibulares donde se localizan las terminaciones nerviosas responsables de la mecano-recepción (Forbes and M., 1970; Wensler, 1974).

La característica principal de una transmisión no persistente de virus es la de tener lugar en tiempos de retención e inoculación muy cortos en el vector. Esta peculiaridad ha da lugar a diversas teorías sobre cómo el virus es adquirido primero e inoculado después en la planta. En un principio se creía que la retención del virus era un acto meramente casual, en el que el pulgón al alimentarse podía adquirir accidentalmente, transportar e inocular el virus a otra planta después de efectuar las correspondientes inserciones de prueba (Kennedy *et al.*, 1962). Posteriormente, se formuló la hipótesis “ingestión- egestión” (Harris, 1977; Gamez and Watson, 1964) donde se consideraba el papel del vector a modo de “jeringuilla voladora”, es decir, el virus era adquirido en el momento de la alimentación del insecto y posteriormente era inoculado mediante regurgitación en la nueva planta de contenidos celulares adquiridos en la planta de origen. El proceso de regurgitación podría tener como finalidad la de expulsar obstáculos en la entrada del canal alimenticio, que podrían contener a las partículas virales.

Una de las hipótesis más aceptadas hasta ahora, es la de “ingestión- salivación” (Martin *et al.*, 1997) donde la saliva juega un papel importante en el momento de la inoculación del virus. Así, el virus utilizaría la saliva del vector como vehículo de transporte y de dispersión. Los autores del trabajo citado utilizaron el sistema de monitorización del comportamiento alimenticio del pulgón para identificar procesos asociados a la adquisición y a la inoculación, y en efecto comprobaron que la inoculación tenía lugar durante la salivación.

Los datos disponibles sobre la localización del virus indicaban además una fuerte correlación entre transmisión y retención de partículas en el punto distal del estilete, donde, donde como se ha mencionado anteriormente, se unen los canales alimenticio y salival (Guo *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1996). Trabajos llevados a cabo con el caulimovirus CaMV mostraban la retención específica del factor auxiliar de la transmisión P2 en una proteína localizada en una zona discreta del conducto común (Uzest *et al.*, 2007). Se ha descrito recientemente que en esta región se encuentra una estructura anatómica, llamada acrostilo, donde existe una gran acumulación de proteína cuticular (Uzest *et al.*, 2010).

Estas evidencias nos llevaron a pensar que si en efecto MpRPS2 era un receptor de HCPro, podría estar localizado en el tejido cuticular, y concretamente encontrarse en la parte distal del estilete maxilar donde presumiblemente tiene lugar la retención del virus.

Con el objetivo de relacionar MpRPS2 con tejido cuticular, se realizó un Western blot contra la misma proteína en mudas de pulgón. La muda es el residuo del proceso de eliminación del exoesqueleto de las ninfas una vez tiene lugar su sustitución por uno nuevo. El exoesqueleto está formado por la cubierta de cutícula del insecto, por lo que las mudas se pueden considerar como tejido cuticular prácticamente puro. Los resultados positivos del Western blot indicaron la presencia de MpRPS2 en las mudas de *M. persicae*, lo que de nuevo sería consecuente con una posible intervención de esta proteína en el proceso de transmisión.

Avanzando en la localización, se realizaron experimentos de búsqueda de la presencia de la proteína a través de su antisuero específico en el estilete maxilar del pulgón. Para ello fue necesario separar el aparato bucal del pulgón en estiletes maxilares y mandibulares. Estos experimentos fueron realizados en dos especies de pulgón *M. persicae* y *A. pisum* (resultados no mostrados). La razón de usar estas dos especies fue la facilidad del aprendizaje para diseccionar estiletes en un pulgón más grande como es *A. pisum*, que además está descrito como posible vector de potyvirus y TEV. El antisuero específico de MpRPS2 es también capaz de detectar una proteína en individuos de *A. pisum* y en sus mudas (resultados no mostrados), lo que sugiere

que la proteína homóloga (90% de identidad de secuencia aminoacídica) de esta especie presentaba reacción cruzada con el antisuero.

Tal y como se muestra en los resultados, no se pudo demostrar mediante ensayos de inmunolocalización la presencia de MPRPS2 en el estilete de los pulgones, a pesar de emplear las mismas condiciones de incubación que con el anticuerpo  $\alpha$ PepL, capaz de señalar la acumulación de proteínas cuticulares propias del acrostilo. Después de un tratamiento de quitinasa, que se esperaba podría dejar más expuestos los posibles receptores, tampoco se obtuvo un resultado positivo.

Finalmente, se decidió tratar de mimetizar las condiciones en que se da la transmisión *in vivo* buscando en la variación de diferentes parámetros un sistema que nos permitiera la localización de MPRPS2.

Para estos experimentos se utilizó una purificación de una fusión de HCPro con la proteína fluorescente verde GFP, similar a la construcción P2-GFP empleada por Uzest y colaboradores en el caso de CaMV. Una utilidad adicional de la fusión HCPro-GFP es que permitiría evitar el uso del anticuerpo secundario, que obliga a realizar numerosos lavados, y puede añadir ruido de fondo a este tipo de ensayos.

La construcción HCPro-GFP fue utilizada para agroinfiltrar plantas y purificar el producto final, y se empleó éste en ensayos de localización. Los resultados muestran que no localizaba fluorescencia en los estiletes, aunque no es posible descartar que cambio de estructura y plegamiento de la proteína al tener unida la GFP pudieran afectar a la capacidad de interaccionar de HCPro.

## 2.1.- INTENTO DE LOCALIZACIÓN DE MPRPS2 A TRAVÉS DE LA INTERACCIÓN CON HCPro-GFP EN PRESENCIA DE EGTA

Estudios previos realizados en el laboratorio (resultados no publicados de Virginia Ruíz- Ferrer) demostraron que la proteína HCPro era activa en transmisión cuando era eluída con EGTA, y no con imidazol, tal como se especifica en las instrucciones de la resina comercial utilizada para la purificación de la variante hisHCPro marcada con cola de histidinas. Es probable que la actividad se vea favorecida de algún modo por la capacidad de este compuesto de quelar cationes divalentes (en concreto el  $\text{Ni}^{2+}$  de la columna). De hecho, los métodos bioquímicos de aislamiento de la actividad del HCPro exigían la inclusión de  $\text{Mg}^{2+}$  en el tampón de purificación (Thornbury et al., 1983; Thornbury et al., 1985). Estos datos se pueden interpretar como que la presencia de EGTA podría contribuir a dotar al HCPro de una estructura adecuada, y por tanto facilitar la unión entre el receptor y HCPro.

Variando las concentraciones de EGTA, tampoco se consiguieron señales concluyentes bajo estas condiciones.

## **2.2.- LOCALIZACIÓN DE MPRPS2 A TRAVÉS DE LA INCUBACIÓN DE LA PROTEÍNA PURIFICADA GST- MPRPS2 EN LOS ESTILETES.**

Partiendo de la capacidad conocida de los receptores de laminina en insectos (a los que es homóloga MpRPS2) de formar homo- y heterodímeros (Kumagai *et al.*, 1997), se pensó en la posibilidad de recrear una estructura parecida añadiendo al estilete la proteína purificada GST-MpRPS2 que podría interactuar con MpRPS2 si ésta en efecto se localizara allí. Los resultados mostraron que no había una señal específica, pero sí existía un halo alrededor del estilete, lo que se podría interpretar como indicativo de la existencia de este dímero, aunque no es un resultado concluyente. La adición de HCPPro-GFP tampoco permitió concretar una señal en el estilete.

## **2.3.- LOCALIZACIÓN DE MPRPS2 EN DOS CONDICIONES DE pH DIFERENTES.**

Una de las hipótesis que se barajó fue la de que MpRPS2 podría provenir de las glándulas salivares, necesitando unas condiciones específicas para activarse.

Los pulgones son capaces de secretar dos tipos de saliva: la gelificante y la acuosa. La primera sirve para sellar el camino que hace el estilete hasta llegar al punto de alimentación, y la segunda está relacionado con el proceso de succión del alimento.

La saliva acuosa presenta un pH de entre 8 y 9 en experimentos hechos en membrana donde se medía el pH de la secreción que provenía del estilete (Miles, 1972). Por eso, se decidió dializar la purificación GST-MpRPS2 en dos condiciones divergentes: tampón TrisHCl 1M pH 8 y tampón MES 1M pH 5,6. Ninguno de los dos ensayos mostró una señal clara de la posible localización de MpRPS2 en el estilete.

## 2.4.- LOCALIZACIÓN DE MPRPS2 CAMBIANDO LA CONDICIONES DE PH DE HCPRO

Como último experimento, se intentó la localización de esta proteína cambiando drásticamente todas las condiciones respecto al pH, es decir, se utilizan las proteínas HCPPro y MpRPS2 a pH 5,6, diferenciando el método de detección, usando en el primero HCPPro-GFP y en el segundo el antisuero específico contra MpRPS2 seguido de anticuerpo secundario unido al fluoróforo.

Los resultados obtenidos respecto a MpRPS2 podrían indicar que su posible función en transmisión no es la de actuar como un receptor canónico. Por una parte, no ha sido posible detectar su presencia en el estilete mediante un antisuero específico ni variando las condiciones, aunque no se puede descartar totalmente su presencia en la región distal del estilete en una concentración baja que resulte indetectable con las técnicas empleadas. Tampoco se observa señal de retención en el estilete si se interpone HCPPro. Sin descartar su posible papel como receptor propiamente dicho, se pueden explorar otras alternativas para explicar su posible papel en transmisión derivado de su interacción con HCPPro, comenzando por la hipótesis de una función como cofactor en la saliva del pulgón. En concreto se han intentado imitar *in vitro* las condiciones químicas propias de la saliva para confirmar si MpRPS2 podría mediar en la interacción con el estilete en esas condiciones. En ausencia de una explicación más plausible sobre cuál puede ser la verdadera función de esta proteína en el proceso de transmisión viral, los datos disponibles justifican que se mantenga MpRPS2 entre los candidatos cuyo análisis funcional se ha abordado en el presente trabajo.

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

Debido a las dificultades descritas para detectar la presencia de MpRPS2 en el estilete, y el desconocimiento del número y de la naturaleza de los hipotéticos receptores presentes en la cutícula del estilete del pulgón e implicados en el proceso de transmisión, el siguiente objetivo nos llevó a plantear experimentos para su



búsqueda, ampliando la lista de potenciales candidatos.

Partiendo de la hipótesis de que la transmisión en pulgones vectores se lleva a cabo gracias a la presencia de un/os hipotético/s receptor/es, que estarían presentes en la cutícula del estilete maxilar, y de que estos receptores podrían tener una naturaleza proteica cuticular que serviría para explicar su especificidad, una posible estrategia para identificarlos más fácilmente sería partir de una extracción de proteínas enriquecida en la fracción cuticular. Para llevar a cabo esta extracción, se compararon los protocolos descritos por el Dr. Dombrovsky (Dombrovsky *et al.*, 2007a) y una comunicación personal de la Dra. Uzest, realizando al final una serie de modificaciones en el protocolo anteriormente utilizado por la Dra. Fernández-Calvino, obteniendo como resultado una extracción conteniendo mayoritariamente proteínas cuticulares. La composición enriquecida en este tipo de proteínas fue verificada mediante ensayos Western usando el anticuerpo específico de proteína cuticular  $\alpha$ PepL.

La búsqueda del hipotético receptor se centró en las proteínas extraídas. Para ello se realizó una separación por electroforesis bidimensional. Los ensayos de interacción realizados confirmaron la existencia de varias proteínas del pulgón *M. persicae*, capaces de interactuar específicamente con la proteína HCPro de TEV. La existencia de interacciones entre HCPro y un número de proteínas de pulgón ya se había descrito anteriormente para potyvirus, incluyendo TEV (Fernández-Calvino *et al.*, 2010) y ZYMV (Dombrovsky *et al.*, ). En este último caso se utilizaba también una extracción enriquecida en proteínas cuticulares. La presencia de múltiples interactores no es por tanto una sorpresa, y podría estar reflejando la multifuncionalidad de la proteína HC-Pro y su implicación en múltiples procesos. De hecho nuestro conocimiento de las proteínas que interactúan con la proteína HCPro es todavía limitado, de forma que es posible descartar que algunas de las proteínas de insecto identificadas en estos trabajos representen proteínas homólogas de otras interacciones funcionales en plantas huéspedes.

Al comparar el interactoma de HCPro con el del mutante EITC, se observó la desaparición de algunas señales, lo que podría servir como un indicio: los factores implicados en la transmisión podrían ser los que pierden selectivamente la capacidad de interactuar con la proteína auxiliar funcional. No obstante, no hay evidencia de que la pérdida de interacción con el mutante EITC tenga que ser una característica necesaria en un hipotético receptor, y por tanto se decidió no utilizar ese criterio con un carácter muy restrictivo.

Los geles unidimensionales resultaron más uniformes y reproducibles que los bidimensionales realizados a partir de las mismas muestras. La identificación en los geles bidimensionales de los factores de pulgón que interaccionan con el HCPPro de TEV se veía dificultada por la distorsión del gel teñido con nitrato de plata

La identificación de los factores se basó en cortar las bandas de los geles unidimensionales que aparecían en el interactoma de HCPPro, pero que a su vez, desaparecían al tener como cebo a EITC. Se obtuvieron así 11 bandas conteniendo a posibles candidatos.

Por razones técnicas, estas bandas fueron recortadas dejando un margen de gel para garantizar que no se excluía la proteína o proteínas responsables de la interacción observada. Esto conlleva a la posibilidad de identificar proteínas con movilidad similar pero no relacionadas con la interacción. Tampoco se puede descartar que la interacción se deba a un complejo de proteínas diferentes que migren conjuntamente en las condiciones de la electroforesis. En efecto el número de proteínas identificadas en las 11 bandas fueron 167.

Las secuencias derivadas de genotecas procedentes de pulgones se utilizaron para refinar la identificación de estas proteínas permitiendo confirmar la presencia de dominios proteicos conservados en las proteínas identificadas y realizar comparaciones de identidad de secuencia con otras proteínas de insectos secuenciadas.

En conjunto estos resultados permitieron determinar la posible identidad de las proteínas seleccionadas con mayor certeza. La elección del candidato a estudiar en este trabajo se hizo a partir de criterios como la cobertura de la predicción de la secuencia proteica y los dominios típicos que indicaban posibles funciones de la proteína.

A partir de la desestimación de las predicciones con una cobertura menor al 40% se obtuvieron 48 proteínas de las cuales 11 tenían un dominio ribosomal, 9 uno cuticular y el resto carecían de dominio que pudiera indicar una función específica. Al haber hecho la mitad de este trabajo con una proteína presumiblemente ribosomal, como MpRPS2, se decidió estudiar las proteínas de tipo cuticular como potenciales factores implicados en la transmisión.

La proteína cuticular RR1Cp2 se repetía en bandas del mismo peso, y en otros geles de extracción de la otra especie de pulgón disponible en el laboratorio *A. Pisum*. Por estos motivos se decidió trabajar con ella.

Esta proteína está descrita (Dombrovsky *et al.*, 2007b) como tipo cuticular con la presencia del dominio de tipo RR1 que indica que forma parte de la cutícula blanda

o flexible (Togawa *et al.*, 2004). El análisis de secuencia genómica de esta proteína señala la existencia de dos intrones en medio de dos secuencias codificantes a la espera de identificar función, además de péptido señal y el dominio RR1 (figura 50).



Figura 50. **Esquema de la posición de los intrones en el gen que codifica para RR1Cp2** (adaptado de (Dombrovsky *et al.*, 2007b). Se muestra la región codificante para el péptido señal (S), la región N-terminal, los intrones (I), las dos proteínas no caracterizadas (P1 y P2), el dominio RR1 y la región C- terminal.

El carácter estructural que puede tener esta proteína y la posible interacción con HCPro, se puede interpretar como la necesidad de que el virus se una a una estructura en el momento de la dispersión a otra planta.

Este estudio, es el segundo realizado en el laboratorio, que ha intentado encontrar los hipotéticos receptores implicados en el proceso de transmisión no persistente mediante la utilización de ensayos de interacción y herramientas proteómicas, para dilucidar la posible función de las proteínas del insecto que muestran interacción con la proteína HC-Pro y la pierden con su variante implicado en transmisión EITC.

Los experimentos que se muestran más adelante, intentan explicar la verdadera implicación en transmisión de las proteína seleccionada, quedando un trabajo por delante en la identificación de otras proteínas que se han quedado en la proteómica por caracterizar debido al trabajo que conlleva cada una.

## 4. PARÁMETROS DEL CICLO VITAL DE UNA POBLACIÓN DE *M. PERSICAE* BAJO CONDICIONES ESPECÍFICAS DE MANTENIMIENTO EN TABACO Y EN EL LABORATORIO.

El trabajo con insectos requiere un estudio previo de cómo se comportan en una condiciones diferentes de las habituales en la Naturaleza, como las de un laboratorio.

El pulgón del melocotonero, *Myzus persicae*, es un insecto polífago que produce importantes daños directos e indirectos sobre los cultivos como ya hemos indicado. Presenta una gama muy amplia de especies huéspedes secundarias incluyendo algunos cultivos. En nuestro laboratorio, este insecto estaba mantenido sobre plantas de tabaco en las que era capaz de completar su ciclo vital, reproducirse y transmitir virus.

El origen de esta población se encontrará en un huevo, procedente de una hembra sexuada, que en su día produjo una hembra fundadora, de la que se deriva todas las sucesivas generaciones de pulgones clonales. Esta hembra fundadora es siempre áptera (sin alas) y se reproduce por partenogénesis. De ella se derivan otras muchas hembras ápteras que solo se diferencian de la hembra fundadora en que son algo más pequeñas y de menor fecundidad. De las primeras hembras ápteras se derivan, por partenogénesis, otras iguales. De estas hembras ápteras aparecen ocasionalmente otras hembras aladas, también partenogénicas, capaces de invadir otras plantas, y en los nuevos cultivos invadidos, se derivan otras ápteras idénticas a las primitivas. La población mantenida en las condiciones del laboratorio, somete a los insectos a vivir en un ciclo asexuado continuo, debido a que no es posible que invadan otras plantas, obteniendo así una población clonal en términos genéticos.

En las condiciones de la cámara de cría, el ciclo vital de los pulgones pasa por 4 estadios marcados por la muda (ecdysis), en los que cada ninfa aumenta su tamaño de manera proporcional hasta llegar al estadio de pre-adulto, sexualmente inmadura, para finalizar en la hembra adulta preparada para dar lugar a nuevas ninfas.

El hecho de que sea difícil determinar a simple vista en que fase se encontraban los pulgones, se decidió recurrir a una herramienta morfométrica basada en la medida de la cápsula cefálica (distancia de ojo a ojo). Se eligió este parámetro frente a otros

porque era el más fácil de medir y el más comparable, mostrando correlación con el aumento esperable de masa corporal a medida que avanza el ciclo vital.

Un primer aspecto que fue necesario estudiar a lo largo del ciclo vital del pulgón, fue la expresión relativa de los factores de pulgón que podrían estar jugando un papel en la transmisión de TEV: MpRPS2 y MpRR1Cp2.

Mediante la técnica de RT-qPCR, ambos genes fueron analizados a lo largo del ciclo vital obteniendo sus diferentes perfiles de expresión corregidos frente a la expresión del gen MpRPL7, considerado esencial y con una expresión basal más o menos constante (gen constitutivo o "housekeeping"). La elección de MpRPL7 fue realizada atendiendo a su uso en publicaciones sobre expresión génica en pulgones, y contando con el asesoramiento del Dr. D. Tagu (INRA-Rennes, Francia). En primer lugar, MpRPS2, identificado anteriormente (Fernandez-Calvino *et al.*, 2010), se comprobó que presentaba una expresión relativamente estable, y con expresión más baja que MpRPL7. Se podría deducir por comparación con el comportamiento del gen constitutivo, que MpRPS2 se estaría expresando en numerosas células del organismo y además codificaría una proteína con un papel que podría ser esencial para el funcionamiento general celular, lo que explicaría la presencia aproximadamente constante de transcritos a lo largo de todo el ciclo vital. No obstante, no disponemos de datos sobre distribución de la expresión en diferentes tejidos, por lo que no se puede descartar que la expresión se concentre en unas determinadas estructuras anatómicas más que en otras. Tampoco disponemos de datos sobre la estabilidad y persistencia de la proteína, excepto que su presencia es detectada en insectos enteros y también en mudas aisladas, lo que sugiere que la cutícula puede estar entre los destinos finales de acumulación de la proteína.

Por otra parte, el ciclo de expresión de MpRR1Cp2 muestra un esquema con una expresión muy superior a la del constitutivo, sugiriendo que su producción es elevada, y que debe ser un producto por tanto abundante. A lo largo del tiempo se observan al menos dos picos en el tercer y séptimo día, que podrían corresponder al cambio de ninfa 2 a ninfa 3 y con la entrada en el período de pre-adulto. El perfil tan variable que se observa podría tener una explicación razonable si consideramos que se trata de una proteína cuticular que previsiblemente será necesitada durante los procesos de muda. Al analizarse diariamente insectos en los que la sincronización de las mudas no es absoluta, se explica que haya una variabilidad relativamente alta, que reflejaría simplemente los momentos concretos del ciclo en que fueron analizados (antes o después de la ecdisis). Esta interpretación resulta razonable si consideramos que una vez ocurre la entrada en fase de pre-adulto, la expresión parece descender y estabilizarse (día 5), aunque de nuevo vuelve a subir y a resultar variable en días

posteriores, cuando en el interior de la hembra se estarían desarrollando individuos de la siguiente generación. Aclarar este aspecto exigiría disponer de una población sincronizada, y saturar de puntos temporales el análisis para identificar las fuentes de la variación observada, lo que excede los objetivos del presente trabajo.

En resumen, las expresiones de estos dos genes muestran grandes diferencias que llevan a pensar en que las funciones que pueden desempeñar estas proteínas en el insecto serían claramente diferentes (figura 51)

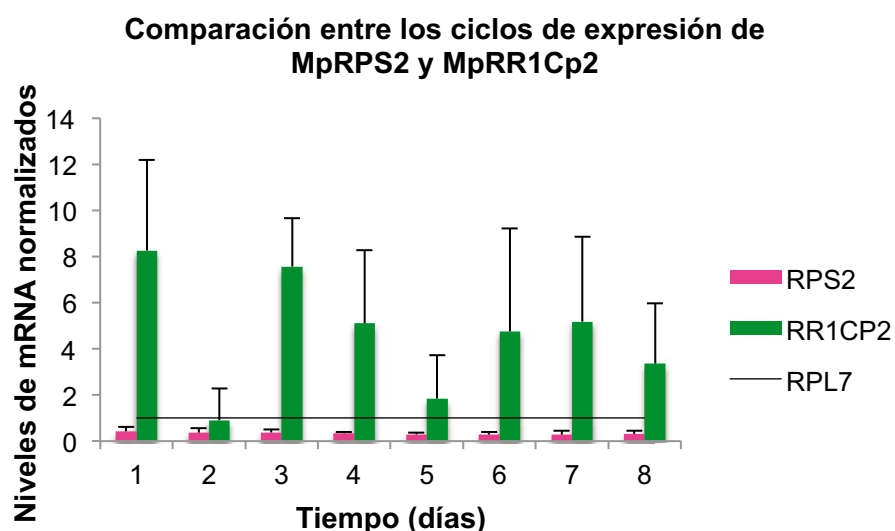


Figura 51. **Patrones de expresión de los genes de pulgón MpRPS2 y MpRR1Cp2 a lo largo de los diferentes estadios del ciclo vital.** Esta gráfica representa las variaciones de la expresión de dos genes MpRPS2 y MpRR1Cp2 a lo largo del ciclo medido por RT- qPCR y normalizados gracias a la medición conjunta del gen constitutivo MpRPL7 (se señala como línea continua negra en el valor 1).

Técnicas de interferencia o de silenciamiento de genes podrán ayudar a completar el conocimiento y la caracterización de estos dos genes, además de permitir analizar su posible función en el proceso de la transmisión.

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

Una de las principales estrategias utilizadas en la investigación científica para el estudio de los distintos mecanismos celulares, se basa en el análisis de fenotipos de “pérdida de función”. Se asume que la eliminación específica de la función de una proteína en la célula será crucial para la evaluación de su papel en el organismo. Esta estrategia ha sido extensamente utilizada desde hace tiempo, y la anulación de la función se puede lograr de varias maneras.

En general hay dos tipos de ensayos: los transitorios , donde la expresión del gen se interfiere sólo temporalmente) y los estables (donde las células o el organismo son permanentemente interferidos). En este proyecto, para averiguar la función de los candidatos a receptor en pulgones, se ha optado como primera aproximación por una interferencia transitoria. Si los resultados tuvieran un efecto profundo sobre el proceso de transmisión de virus, la interferencia estable podría ser considerada en un futuro para confirmar la validez de las observaciones, o incluso como estrategia de control de dispersión de virus mediante organismos vectores modificados. Este tipo de estrategias se está ensayando en algunos patosistemas concretos, como por ejemplo en mosquitos transmisores de enfermedades humanas como el dengue (Hoffmann *et al.*, 2011), aunque su posible uso frente a infecciones virales de interés agrícola está aún pendiente de ser evaluado.

En nuestro trabajo nos hemos centrado en sistemas de interferencia de caracter transitorio, y en concreto basados en alimentación. Otras aproximaciones, como las que utilizan por ejemplo microinyección (Tamborindéguy *et al.*, 2008), se descartaron después de realizar algunas pruebas preliminares, principalmente por las dificultades de evaluación de los efectos en bioensayos de transmisión y en la posible transferencia de la tecnología a condiciones de campo.

Se ensayaron por tanto dos estrategias de alimentación: la dieta artificial, o el uso de plantas infectadas con vectores VIGS. La dieta artificial está basada en utilizar moléculas grandes de dsRNA que serán procesadas a siRNA dentro de la célula. Estudios recientemente publicados reflejan que este método en efecto puede llegar a lograr interferir genes de pulgón (Mao and Zeng, 2012) cruciales para su desarrollo llegando a ser letal el efecto en el insecto.

En este trabajo, usando este método no se ha logrado obtener una interferencia significativa respecto a los dos controles utilizados para el gen ribosomal MpRPS2, y únicamente hay diferencias entre los pulgones alimentado por dieta suplementada con dsRNA de MpRPS2 y el control con RNA inespecífico en el primer día de análisis (tras 3 días de ingestión), pero esta diferencia no se ha mantenido con un nivel similar a lo largo del ensayo. En el caso de MpRR1Cp2 no se apreciaron diferencias significativas respecto al control negativo que indicaran interferencia en ninguno de los puntos temporales analizados. Una primera consideración que conviene tener en cuenta es que la dosis de dsRNAs que se puede incorporar a la dieta está limitada por razones técnicas (derivadas de la necesidad de producción *in vitro*), y en efecto se puede interpretar que un gen con niveles altos de expresión como MpRR1Cp2 podría precisar cantidades mayores para ser interferido eficazmente. En el laboratorio se realizaron ensayos preliminares en esta dirección con otra especie de pulgón, pero tampoco se lograron resultados concluyentes que indicaran una correlación positiva entre dosis de dsRNAs y niveles de interferencia (Lluïsa Vilaplana, comunicación personal). Estos resultados analizados en su conjunto sugieren que este método podría ser útil para averiguar funciones de ciertas proteínas, como se ha demostrado en el estudio mencionado anteriormente, pero podría no ser generalizable, no siendo adecuado para otro tipo de genes. En resumen, es razonable pensar que sería necesaria una mejora empírica respecto a cada gen, implicando variaciones en las cantidades de dsRNAs, optimización de los tiempo de ingestión o incluso de otras condiciones que no hemos considerado, como por ejemplo la temperatura durante la cría de los insectos o los ciclos diurnos-nocturnos. Además, considerando que este método no sería fácilmente aplicable como estrategia de control en campo, preferimos centrar nuestros esfuerzos en el uso de vectores virales VIGS, que nos permitiría evaluar la interferencia después de alimentación de los vectores sobre plantas.

Para ello, como se ha explicado anteriormente, el vector TRV (basado en el genoma de Tobacco rattle virus), se ha utilizado para introducir secuencias derivadas de los genes seleccionados en las plantas huéspedes, con lo que éstas acumularán siRNAs específicos, y la alimentación de los pulgones sobre ellas previsiblemente tendrá como consecuencia la interferencia (RNAi) sobre la expresión de los genes.

Previamente al ensayo de interferencia, se realizaron ensayos de supervivencia de colonias en las plantas experimentales generalmente utilizadas en el laboratorio (*N. benthamiana* y *N. tabacum*). Tal y como se esperaba, la supervivencia fue mayor en *N. tabacum* debido a que los insectos se crían en esta planta. En cambio en la otra especie las colonias no se establecían, y los parámetros de crecimiento se ven afectados. Es interesante resaltar que este efecto negativo se veía moderado en el



caso de que las plantas estuvieran infectadas por TRV, lo que sugiere que la infección viral modificaría de algún modo la fisiología de la planta haciéndola más adecuada como huésped de pulgones. Como una posible explicación a este fenómeno, efectores o productos secundarios producidos por *N. benthamiana* pueden ser utilizados como mecanismos de defensa de la planta frente al pulgón impidiendo un establecimiento de colonia en esta planta, y una infección viral podría alterar estos procesos. Existen trabajos recientes en la literatura que podrían ayudar a explicar este efecto (Eigenbrode *et al.*, 2002; Ingwell *et al.*, 2012; Bosque-Perez and Eigenbrode, 2011); también se plantea la hipótesis de que la presencia de los virus pueda modificar el comportamiento de los vectores (Ingwell *et al.*, 2012) aunque de nuevo el análisis en detalle de todos estos aspectos excede los objetivos de la presente tesis.

Debido a que numerosos estudios realizados mediante TRV como vector de VIGS (Lu *et al.*, 2003) se llevaron a cabo utilizando *N. benthamiana*, se decidió hacer los ensayos en las dos plantas, aunque en ocasiones la baja tasa de supervivencia de los pulgones en *N. benthamiana* no nos permitió completar todos los ensayos planificados.

Igual que con la dieta artificial, estudios recientes han confirmado la validez de esta técnica en diversos en pulgones (Pitino *et al.*, 2011) o en otros invertebrados como por ejemplo *M. sexta* (Kumar *et al.*, 2012), obteniendo mayores niveles de interferencia a medida que el tratamiento se prolongaba. Este fue uno de los motivos por el cual se decidió dejar a los pulgones establecerse como colonia en estas plantas, pudiendo analizar progenie de insectos de hasta 30 días alimentados en plantas agroinfectadas con variantes del vector viral TRV. En nuestros experimentos, los mayores valores de interferencia se lograron en tiempos más cortos, a 7 días de alimentación en *N. tabacum* y 13 días en *N. benthamiana*.

Tal y como se observa en el apartado de resultados, respecto a los ensayos realizados en *N. benthamiana*, se obtuvo una interferencia de aproximadamente un 12% para MpRPS2 y de un 50% para MpRR1CP2 (ambas comparadas sólo con el control de pulgones alimentándose en planta agroinoculada con vector vacío) después de 13 días sobre las plantas transformadas. Esto indica que, como se ha mencionado hasta ahora, no todos los genes responden del mismo modo a las técnicas de interferencia. En este caso, hay que destacar que el 12% de interferencia logrado para MpRPS2 podría ser un silenciamiento más efectivo en términos funcionales debido a la baja expresión pero constante de este gen. La falta de una modificación evidente de parámetros como supervivencia o número de descendientes podría sugerir que este gen no es esencial, o que su reducción parcial puede ser compensada de alguna forma. Por otro lado cabría esperar que la interferencia lograda en el caso de

MpRR1Cp2 resultara en efectos fenotípicos debido a su posible función como parte de la cutícula, y a pesar de esto, tampoco los efectos fueron observados. De todas formas no se puede descartar en ninguno de los casos que la hipotética función en el proceso de transmisión sea totalmente independiente de otras funciones que podrían producir un fenotipo posible. Por este motivo se decidió continuar con el ensayo.

Cuando *N. tabacum* se utilizó para interferir los candidatos estudiados, mientras que MpRPS2 no mostró una reducción de expresión, se obtuvieron niveles de silenciamiento significativos de MpRR1Cp2 al séptimo día de alimentación, del orden del 75% respecto a los dos controles (*N. tabacum* y *N. tabacum* agroinoculada con el vector TRV vacío). Tampoco se observaron efectos fenotípicos, por lo que para valorar si la reducción tenía algún efecto en transmisión, se realizaron los bioensayos de transmisión como se describe en el apartado siguiente.

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

Para valorar la implicación de los candidatos a receptor en transmisión, se llevaron a cabo bioensayos. Se midieron así las tasas de transmisión experimental de TEV (aislado 1179) utilizando pulgones vectores alimentados durante 7 días en plantas de *N. tabacum*, ó 13 días en plantas de *N. benthamiana*, agroinoculadas una semana antes de iniciar el período de alimentación con las construcciones descritas. A pesar de que nuestros datos indican que sí es posible reducir significativamente los niveles de expresión de genes concretos en determinados momentos, los bioensayos de transmisión de TEV realizados comparativamente con pulgones interferidos no mostraron reducciones significativas en la tasa de transmisión respecto a los controles. Una primera interpretación de este hecho es que ignoramos si MpRPS2 o MpRR1Cp2 participan realmente como receptores en la transmisión de TEV, y por tanto su reducción podría ser irrelevante para el proceso. También se puede considerar que las reducciones parciales de expresión no logran eliminar por completo la función de las proteínas, y que una cantidad reducida sea plenamente funcional y no se traduzca en reducción de transmisión. Tampoco es descartable que la variabilidad observada en la tasa de transmisión entre repeticiones de un mismo tratamiento sea mayor que las

posibles diferencias entre tratamientos dentro del mismo experimento. Esta variabilidad es lógica al tratarse de bioensayos complejos donde intervienen múltiples factores difícilmente predecibles, como por ejemplo el comportamiento de los vectores. Por ello los experimentos se diseñaron para minimizar efectos accidentales que puedan enmascarar un posible efecto debido a la interferencia de un hipotético receptor.

A la vista de estos resultados, hay que considerar que es necesario adecuar las técnicas de interferencia al tipo de gen que se quiere interferir . Al disponer de perfiles de expresión tan diferentes, la función de los candidatos identificados podría variar en cuanto a implicación en el proceso de transmisión viral, y no es posible por el momento concluir si alguno de los productos analizados interviene o no. A partir de los resultados de transmisión se podría validar o descartar la hipótesis de participación en el proceso de determinados productos del pulgón. Para ello sería adecuado utilizar la metodología de silenciamiento basada en alimentación sobre plantas con capacidad de alterar la expresión de genes concretos del pulgón (dieta vegetal). Además, esta última técnica se podría proponer como estrategia de control, mediante plantas transformadas que ejercieran de elemento silenciador de genes de pulgón con capacidad real de interferir en la dispersión del virus. Nuestro sistema abre la puerta a futuros desarrollos prácticos en esta línea, para lo que sería necesario primero identificar de forma clara los elementos del insecto esenciales para la transmisión, y en segundo lugar optimizar el sistema de silenciamiento inducido.

