

# 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)  
DEPARTAMENT GENÈTICA 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



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

CENTRE DE RECERCA EN AGRIGENÒMICA (CRAG)  
DEPARTAMENTO GENÉTICA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO BIOTECNOLOGÍA

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

Memoria presentada por María Urizarna España para optar al título de doctora  
por la universidad de Barcelona

Director:

Dr. Juan José López- Moya

Doctoranda:

María Urizarna España

Tutora:

Dra. Josefa Badía

MARÍA URIZARNA ESPAÑA 2012



Este trabajo se ha llevado a cabo en el Laboratorio de Virología Vegetal del Departamento de Genética Molecular de Plantas, en el Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG), Barcelona, y en estancias breves realizadas en el Laboratorio de "Caulimoviridae & Geminiviridae : Transmission & Evolution (CaGeTE)" del Instituto UMR- BGPI, Montpellier, Francia, y en el laboratorio "Understanding the Genetic Basis of Plant-Insect Interaction" del instituto BTI, Universidad de Cornell, Ithaca, Estados Unidos.



# RESUMEN





## RESUMEN

En esta tesis se aborda la identificación de factores del pulgón *Myzus persicae* que podrían participar en el proceso de transmisión del potyvirus del grabado del tabaco, *Tobacco etch virus* (TEV), y se explora the posibilidad de alterar la expresión de genes particulares en el insecto vector como una manera de dificultar o impedir la diseminación de este virus.

Se conoce la intervención de un factor auxiliar de origen viral, la proteína HCPro, en la transmisión de potyvirus, actuando como un puente molecular reversible para retener las partículas de virus en el aparato bucal del pulgón. La proteína HCPro interacciona con la proteína de la cápside viral, CP, y previsiblemente con receptores específicos en el pulgón. Después de analizar un conjunto de productos capaces de interaccionar con la proteína HCPro de TEV (interactoma), se han considerado dos proteínas candidatas. La primera, MpRPS2, presenta homología con proteínas ribosomales, y la segunda MpRR1Cp2 es una proteína cuticular. La interacción entre HCPro y MpRPS2 se ha verificado en ensayos Far Western Blot y en el sistema de doble híbrido de levaduras. Los intentos para confirmar la localización de esta proteína en estiletes diseccionados de pulgón no fueron concluyentes, aunque con un antisuero específico sí se ha podido detectar la presencia de MpRPS2 en la cutícula de mudas de pulgón aisladas.

Para validar la participación de estos hipotéticos receptores en el proceso de transmisión viral, se han explorado estrategias de interferencia con la expresión génica de MpRPS2 y MpRR1Cp2 en pulgones. Tras analizar sus niveles de expresión durante a lo largo del desarrollo, se consideraron dos sistemas para inducir respuestas de silenciamiento (RNAi) basados en la alimentación. El uso de dietas artificiales suplementadas con dobles cadenas de RNA específicas sintetizadas *in vitro* no produjo en general reducciones de la acumulación de RNA mensajeros, mientras que la alimentación de pulgones sobre plantas infectadas con un vector viral basado en el virus del cascabeleo del tabaco, *Tobacco rattle virus* (TRV), que contiene un fragmento de la secuencia del gen, tuvo un efecto más pronunciado. Las reducciones de expresión observadas fueron variables entre los dos genes, con el efecto más fuerte en el caso del gen MpRR1Cp2 en pulgones alimentados en plantas de tabaco infectadas con una variante de TRV que incorporaba un fragmento de este gen. Este sistema de RNAi nos ha permitido ensayar el efecto de la reducción de la expresión de los dos candidatos seleccionados en experimentos de transmisión de TEV.

Estos resultados podrían ayudar a mejorar la comprensión de las interacciones moleculares necesarias durante la transmisión, a identificar factores en el vector que participan en el proceso, y eventualmente podrían usarse para el diseño de estrategias innovadoras de bloqueo de la diseminación viral basadas en la interferencia de la expresión de dichos factores.

# SUMMARY



## SUMMARY

This thesis addresses the identification of *Myzus persicae* aphid factors that could be involved in the transmission process of Tobacco etch virus (TEV), a potyvirus, and explores the possibility of altering the expression of specific genes in the insect vector as a way to prevent virus spread.

An auxiliary factor of viral origin, the HCPro protein is known to participate in potyvirus transmission. HCPro acts as a reversible molecular bridge retaining virus particles in aphid mouthparts. HCPro interacts with the viral coat protein, CP, and predictably with specific receptors in aphid mouthparts. After analyzing a set of products able to interact with the TEV HCPro (interactome), we have considered two candidate proteins. The first one MpRPS2, shows homology with ribosomal proteins, and the second one, MpRR1Cp2 is a cuticular protein. The interaction between HCPro and MpRPS2 has been verified in Far Western Blot assays and in yeast two-hybrids. Attempts to confirm the localization of this protein in dissected aphid stylets were not conclusive, although using an specific antiserum it has been possible to detect the presence of the MpRPS2 in the cuticle of isolated aphid moults.

To confirm the involvement of these hypothetical receptors in the viral transmission process, strategies of interference with expression of MpRR1Cp2 and MpRPS2 have been explored in aphids. After analyzing their expression levels along development, two systems based on feeding were considered to induce silencing responses (RNAi). The use of artificial diets supplemented with specific *in vitro* synthesized dsRNA did not produced reductions in mRNA accumulation, while aphids fed on plants infected with a viral vector based on *Tobacco rattle virus* (TRV), which contains a fragment of the targeted genes, showed more clear effects. The observed reductions in expression were rather variable between the two genes considered, with a stronger effect in the case of MpRR1Cp2 in aphids fed on tobacco plants infected with a TRV variant that incorporates a fragment of this gene. This RNAi system allowed us to test the effect of knocking down the expression of the two selected candidates in TEV transmission experiments.

Our results might help to improve our understanding of the molecular interactions during transmission, to identify factors in the vector that participate in the process, and eventually could serve to design new strategies to interfere with viral dissemination based on specifically interfering with their expression.

