

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

María Urizarna España

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

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

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

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

CENTRE DE RECERCA EN AGRIGENÒMICA (CRAG)
DEPARTAMENTO GENÉTICA MOLECULAR

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

MARÍA URIZARNA ESPAÑA
2012

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Mediante ensayos de tipo Far-Western Blot, se ha demostrado que el candidato a receptor del pulgón MpRPS2 interacciona con HCPPro de TEV, al mismo tiempo que deja de hacerlo con el mutante EITC que tiene afectado el dominio de unión a posibles receptores en el estilete del pulgón. Se confirma así la posible implicación de esta región KITC en la transmisión del virus.
2. En el caso de la CP, los ensayos Far-Western Blot permiten confirmar la interacción con el factor HCPPro, que se mantiene cuando se ensaya la variante PAK, mutada en el posible dominio de unión a CP. Estos resultados sugieren que esta región no es la única implicada en dicha interacción.
3. El sistema de doble híbrido en levaduras nos ha servido para analizar las interacciones de la proteína HCPPro con la CP y con MpRPS2. La proteína HCPPro interacciona con el candidato a receptor MpRPS2, confirmando esta unión en un sistema experimental diferente. En cambio, el análisis de interacciones en las que interviene la proteína de la cápside CP no da lugar a resultados concluyentes.
4. Se ha obtenido un antisuero específico que permite identificar la presencia de la proteína MpRPS2 en tejido cuticular de mudas del insecto vector *Myzus persicae*. Sin embargo, los intentos de localización en el estilete no fueron suficientes para concluir si dicha proteína se encuentra o no en la región distal del mismo, donde presumiblemente tiene lugar la retención de partículas virales durante la transmisión.
5. Un total de 167 proteínas, procedentes de extracciones enriquecidas en componentes cuticulares de *M. persicae* fueron identificadas gracias a ensayos de interacción *in vitro* con la proteína HCPPro en electroforesis unidimensionales. Entre estas proteínas se encontró de nuevo MpRPS2, y se eligió además la proteína cuticular MpRR1Cp2 como otro posible candidato implicado en el proceso de transmisión.

6. La dieta artificial suplementada con dsRNA ha sido utilizada para ensayos de interferencia de genes de pulgón. Con la dosis de dsRNA ensayada, no se observó reducción de la expresión relativa de los genes diana respecto a los controles.
7. Pulgones alimentados sobre tejido infectado con un vector viral capaz de generar siRNAs en planta, mostraron una reducción de la expresión de los genes diana. En el caso de MpRR1Cp2 la reducción llega a ser de aproximadamente un 75% a los 7 días de alimentación sobre plantas de tabaco, y del 50% a los 13 días sobre *N. benthamiana* . En cambio, para MpRPS2 no se observa reducción en el caso de tabaco, y de apenas un 12% en *N. benthamiana*.
8. Ensayos de transmisión con pulgones interferidos mediante dieta vegetal, no permiten confirmar por el momento la implicación de los dos posibles candidatos analizados en el proceso de transmisión. No obstante, el sistema podría utilizarse para validar funciones de genes de pulgón.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Far-western assays were used to demonstrate the interaction between the viral protein HCPPro and the aphid candidate receptor, MpRPS2. A variant of HCPPro (EITC), mutated in the conserved KITC motif presumably involved in transmission, failed to interact with MpRPS2. This data confirm the possible involvement of the KITC motif in viral transmission.
2. Focussing on the CP, Far-Western assays allowed us to confirm its interaction with HCPPro. This binding was maintained when testing a variant of HCPPro (PAK), affected in the PTK motif described to be involved in the interaction with the CP. These results suggest that this motif might not be the only one involved in the interaction.
3. By using a yeast two hybrid system, interactions of the HCPPro protein with CP and MpRPS2 were studied. HCPPro interacts with the aphid candidate receptor, MpRPS2, validating this interaction with a different experimental system. On the contrary, results obtained when analysing putative interactions of the CP weren't conclusive in this kind of assay.
4. An specific antibody was obtained against MpRPS2 protein, allowing us to identify its presence in cuticular tissue (moult) of *Myzus persicae*. In contrast, several attempts to localize this protein in the stylet of the aphid did not provide enough evidence about its presence in the distal region of the stylet, where presumably viral particle retention occurs during the transmission process.
5. A total of 167 proteins were identified from *M. persicae* extracts enriched in cuticular components, using an *in vitro* HCPPro interaction assay combined with unidimensional electrophoresis. Among these proteins, MpRPS2 was found again, and in addition, the cuticular protein MpRR1Cp2 was also chosen as another possible candidate involved in the transmission process.
6. An artificial diet supplemented with dsRNA was used as a system for developing an assay to interfere gene expression in aphids. With the dose of dsRNA tested, no reductions of the relative expression of the target genes compared with the corresponding controls were observed.

7. Aphids fed on tissues infected with a viral vector that is able to generate siRNAs in plants, showed reduced expression of the target genes. For MpRR1Cp2, reductions around 75% were observed in aphids after feeding 7 days on tobacco plants, and around 50% after feeding 13 days on *N. benthamiana* plants. In contrast, a reduction was not observed for MpRPS2 in the case of tobacco plants, and only a 12% decrease was obtained when the assay was performed with *N. benthamiana* plants.

8. Involvement on transmission of the two possible aphid candidate receptors could not be confirmed by transmission assays using aphids interfered with the vegetal diet. However, this system could be potentially used to validate functional roles of aphid genes.