TESIS DOCTORAL

"Non-circulative virus transmission by aphids: new insights into the mechanisms of transmission and the interference for retention sites in the vector"

DOCTORANDO: Jaime Jiménez Ruiz, del Grupo de Investigación Insectos Vectores de Patógenos de Plantas (IVPP) en el Departamento de Protección Vegetal del Instituto de Ciencias Agrarias del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ICA-CSIC)

DIRECTORES: Prof. Alberto Fereres Castiel y Dra. Aránzazu Moreno Lozano

TUTOR: Dr. Jesús Israel Pagán Muñoz

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 5 de junio de 2019, en la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (ETSIAAB) de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM)

RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se propuso profundizar en el conocimiento de diversos conceptos sobre virus no-circulativos transmitidos por pulgones. El objetivo principal fue generar nuevos conocimientos sobre el proceso de transmisión viral por pulgones que permita desarrollar nuevas estrategias que lleven a un mejor control de los virus vegetales. En cada uno de los objetivos se empleó la técnica de Gráficos de penetración eléctrica (Electrical penetration graphs 'EPG' technique). Gracias a esta técnica pudimos monitorizar el comportamiento alimenticio de insectos con aparato bucal picador-chupador y asociar la posición del extremo distal del estilete en los diferentes tejidos de la planta. De esta manera, pudimos asociar las actividades de los estiletes del insecto a la inoculación y adquisición de virus vegetales.

El primer objetivo de la Tesis Doctoral tuvo como finalidad estudiar el efecto del ayuno de pulgones previo a la adquisición de virus transmitidos de manera no persistente (NP). Para ello, se usaron individuos ayunados y no ayunados de *Myzus persicae* y *Aphis gossypii*. Los pulgones se conectaron al equipo de EPG para monitorizar una prueba intracelular en una planta de calabacín infectada con *Cucumber mosaic virus* (CMV, *Cucumovirus*) con o sin ayuno previo. Posteriormente, los pulgones fueron trasferidos individualmente a una planta sana de calabacín para evaluar la tasa de transmisión de CMV mediante inspección visual y detección serológica mediante test de ELISA. Los registros de EPG mostraron un aumento de la actividad del pulgón asociada a la adquisición de virus no persistentes en individuos ayunados tanto de *M. persicae* como *A. gossypii*. Además, se observó un incremento en la transmisión de CMV en individuos ayunados de *M. persicae* en comparación con los no ayunados. Sin embargo, la eficacia en la transmisión de CMV fue similar entre individuos ayunados y no ayunados de *A. gossypii* (Fig. 1). Por tanto, los resultados obtenidos demuestran que el ayuno de pulgones previo a la adquisición no siempre necesariamente aumenta la tasa de transmisión de todos los virus transmitidos de manera NP, como tradicionalmente había sido postulado para dicho tipo de transmisión viral. Esta diferencia en la eficiencia de transmisión entre individuos ayunados de *M. persicae* y *A. gossypii* sugirió posibles diferencias anatómicas en los estiletes de ambas especies o la presencia diferencial de compuestos en la saliva de dichos pulgones que puedan interferir o favorecer de forma específica la interacción con las partículas de CMV.

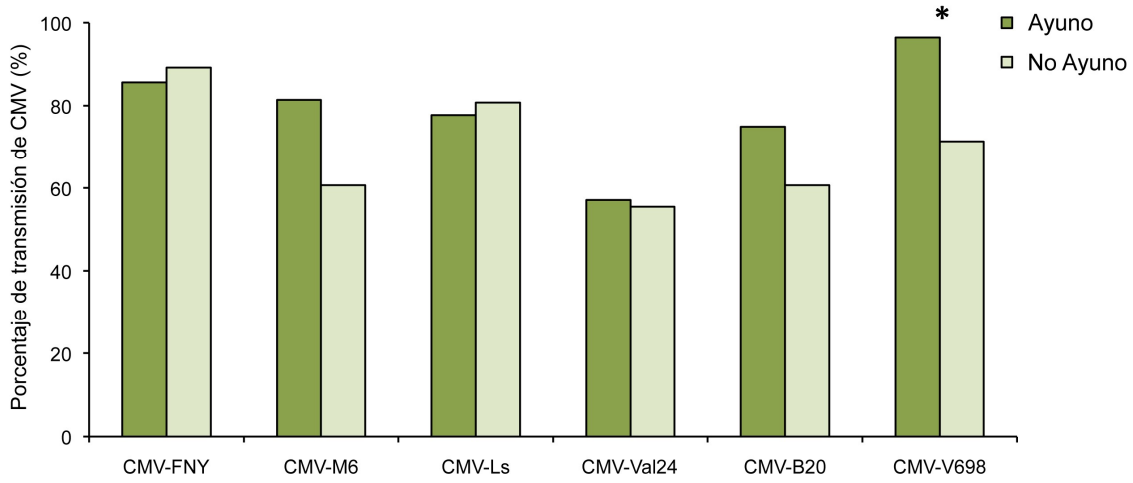

Figura 1. Eficiencia en la transmisión de 6 aislados de *Cucumber mosaic virus* (CMV, *Cucumovirus*) por individuos ayunados y no ayunados de *Aphis gossypii*. El asterisco muestra diferencias significativas en la transmisión de CMV entre pulgones ayunados y no ayunados [test de Chi cuadrado (p<0.05)].

En el segundo objetivo, se estudió la competencia e interferencia entre diferentes virus no-circulativos (NC) transmitidos por pulgones por los receptores existentes en el aparato bucal del vector. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de transmisión secuenciales con períodos de adquisición fijos o monitorizados mediante EPG, tanto en plantas infectadas como en dieta artificial. Para el estudio de la competencia entre *Cauliflower mosaic virus* (CaMV, *Caulimovirus*) y *Turnip mosaic virus* (TuMV, *Potyvirus*), individuos de *Brevicoryne brassicae* fueron expuestos a plantas de nabo coinfectadas con TuMV y CaMV, mientras que para el estudio de la interferencia entre ambos géneros virales, los pulgones se expusieron a dos adquisiciones/transmisiones secuenciales, primero en planta de nabo infectada con CaMV o virus purificado en dieta artificial y posteriormente en planta de nabo infectada con TuMV. En los estudios correspondientes a la interferencia entre CaMV y CMV, se usaron individuos de *M. persicae* que adquirieron CaMV en una planta infectada de nabo o la proteína helper de CaMV (P2-CaMV) en dieta artificial y posteriormente CMV en una planta de calabacín. Por último, se evaluó la interferencia entre *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, *Potyvirus*) y CMV usando *A. gossypii* como vector. Para ello, los pulgones adquirieron individualmente bien ZYMV o CMV en plantas infectadas de melón y después eran transferidos a una planta de melón infectada con CMV o ZYMV, respectivamente. Tras la realización de los experimentos los pulgones fueron transferidos individualmente a diferentes especies de plantas receptoras teniendo en cuenta las especies de virus estudiadas. Los resultados revelaron que la adquisición previa de ZYMV interfiere en la posterior adquisición de CMV, reduciendo la tasa de transmisión de este último (Fig. 2). Sin embargo, no se observó competencia o interferencia en el resto de combinaciones de virus-vector estudiadas: competencia/interferencia entre CaMV y TuMV e interferencia entre CaMV y CMV. Estos resultados revelaron la interacción entre los virus CMV y ZYMV durante el proceso de adquisición por el vector, sugiriendo cierta afinidad por los mismos lugares de retención en el estilete. Los resultados obtenidos también sugirieron que los receptores usados por CaMV en los estiletes del vector debieran ser diferentes a los empleados por potyvirus y cucumovirus.

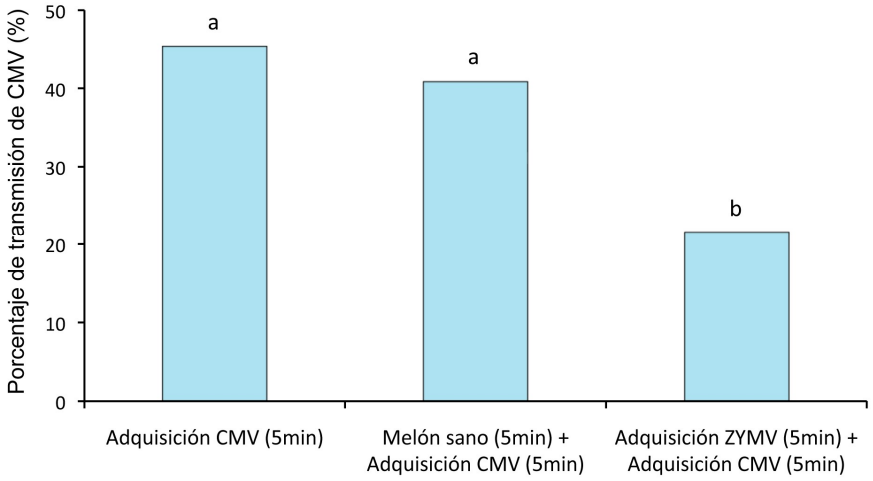

Figura 2. Eficiencias de transmisión de *Cucumber mosaic virus* (CMV, *Cucumovirus*) en los diferentes tratamientos establecidos en los ensayos sobre el estudio de la interferencia entre primera adquisición de *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, *Potyvirus*) y posterior adquisición CMV por el vector *Aphis gossypii*. Diferentes letras muestran diferencias significativas estudiadas mediante un test de Chi cuadrado (p<0.05).

En el tercer objetivo, se estudió el comportamiento alimenticio de *M. persicae* en relación a la inoculación y adquisición de *Beet yellows virus* (BYV, *Closterovirus*), el cual es un virus transmitido de manera semipersistente y que se encuentra restringido al floema de la planta huésped. En primer lugar, se realizaron ensayos utilizando las dos especies de vectores más eficientes en la transmisión de BYV, *M. persicae* y *Aphis fabae*, así como tres especies de plantas huésped de BYV: *Chenopodium album*, *Claytonia perfoliata* y *Beta vulgaris* para determinar el sistema virus-vector-planta huésped más eficiente. Los resultados mostraron que *M. persicae* fue el vector más eficaz, y *B. vulgaris* (remolacha azucarera) la especie de planta más susceptible a la infección por BYV, por lo que se escogió el modelo *M. persicae*-BYV-remolacha azucarera para la realización de los posteriores estudios monitorizando el comportamiento alimenticio del pulgón mediante EPG. Para ello, se conectaron individuos no virulíferos al equipo de EPG para alimentarse en remolacha azucarera infectada con BYV y se interrumpió el proceso de alimentación de *M. persicae* tras observar unos patrones específicos de onda. Así, las diferentes actividades del pulgón producidas en la planta fuente de virus eran posteriormente asociadas a la adquisición de BYV. Una vez terminado artificialmente el proceso de alimentación, los pulgones eran transferidos individualmente a una planta sana de remolacha para evaluar la eficacia de transmisión de BYV. Por otra parte, se conectaron pulgones virulíferos al equipo de EPG y se colocaron sobre plantas sanas de remolacha azucarera para estudiar las actividades de los estiletes del pulgón relacionadas con la inoculación de BYV. El análisis de los registros de EPG reveló la producción de una prueba intracelular que difería significativamente, tanto en la duración total como en la magnitud de caída de potencial, del resto de pruebas intracelulares, realizadas fuera de los tejidos floemáticos y asociadas a la transmisión de virus no persistentes. Dicha nueva prueba intracelular de características diferentes a las pds estándar se denominó "phloem-pd" o pd de floema, debido a que siempre ocurría precediendo a la onda asociada como primer contacto de los estiletes del pulgón con los vasos cribosos del floema (onda E1), lo

que sugería su posible localización en células del floema. Además, la magnitud de caída de potencial de la "phloem-pd" era similar a la observada en la subsiguiente onda E1. Asimismo, la "phloem-pd" resultó ser la onda clave en la inoculación de BYV, obteniéndose el óptimo de inoculación tras su realización. Todo ello sugería que los estiletes de *M. persicae* se podrían encontrar en células de floema durante la realización de las "phloem-pd".

En el cuarto objetivo, se llevó a cabo la localización exacta de la posición del extremo distal del estilete de *M. persicae* durante la realización de una inserción intracelular "phloem-pd" en plantas de remolacha azucarera. Para ello, se llevó a cabo la criofijación del estilete durante la observación de dicho tipo de prueba intracelular, y el posterior estudio de la posición del extremo distal de los estiletes usando tanto la microscopía confocal (CLSM) como la tomografía microcomputerizada (Micro-CT). Asimismo, se llevaron a cabo dos tratamientos control, criofijando los estiletes durante la observación de i) una prueba intracelular estándar ("standard-pd": prueba asociada a penetraciones de los estiletes en tejidos no floemáticos) y ii) onda E1 (inserción de los estiletes en tubos cribosos de floema). El análisis de las imágenes obtenidas por microscopía confocal mostró la localización del extremo distal del estilete penetrando tejidos floemáticos, concretamente células acompañantes y tubos cribosos del floema (Fig. 3). Las imágenes producidas por Micro-CT confirmaron la intrusión de los estiletes en tubos cribosos de floema. Los tratamientos control reflejaron la inserción de los estiletes en células del mesófilo o en la vaina del haz vascular durante la realización de la "standard-pd", y penetraciones en tubos cribosos del floema durante la visualización de la onda E1, tal y como se había descrito previamente para ambos tipos de onda.

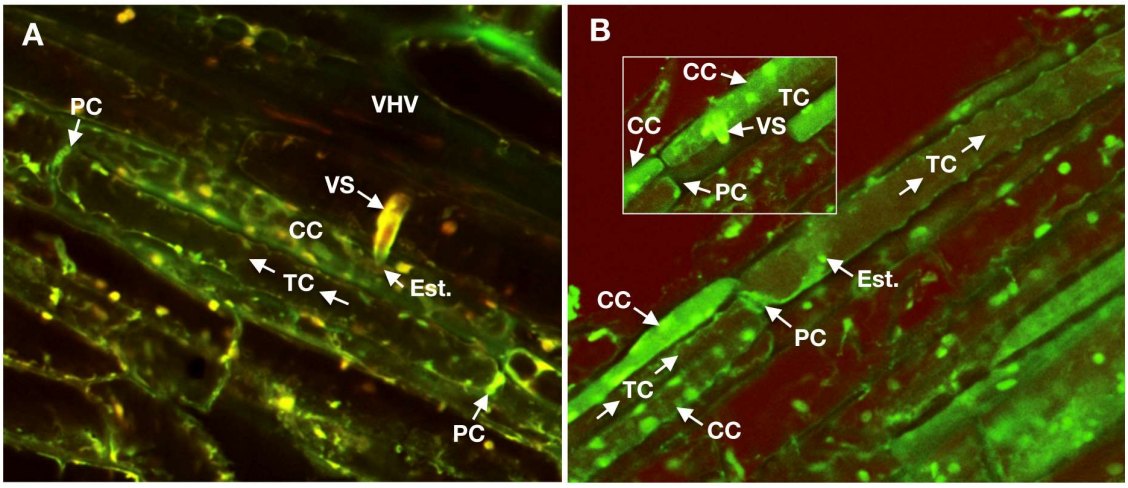

Figura 3. Imágenes de microscopía confocal de muestras de criofijadas durante la realización de una prueba floemática 'phloem-pd' por el pulgón *Myzus persicae* en remolacha azucarera. A) Inserción intracelular en una célula acompañante de floema. B) Inserción intracelular en un tubo criboso de floema. En B) se muestra un detalle de una imagen previa de la sección analizada, con una clara observación de la vaina salival. VHV: vaina del haz vascular; PC: placa cribosa; TC: tubo criboso de floema; CC: célula acompañante de floema; VS: vaina salival; Est.: extremo distal del estilete del pulgón.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral podrían tener claras implicaciones en futuras líneas de investigación relacionadas con las interacciones virus-vector-planta así como en el desarrollo de nuevas estrategias innovadoras que permitan interferir con el proceso de transmisión y consiguiente dispersión de los virus vegetales en los cultivos.

Publicaciones derivadas de este trabajo

Jaime Jiménez, Craig G. Webster, Aránzazu Moreno, Rodrigo P.P. Almeida, Stéphane Blanc, Alberto Fereres, Marilyne Uzest. 2017. Fasting Alters Aphid Probing Behaviour but Does not Universally Increase the Transmission Rate of Non-Circulative Viruses. *Journal of General Virology*, 98(12): 3111-3121. (doi: https://doi.org/10.1000/jgv.0.000971)

Jiménez, W. Fred Tjallingii, Aránzazu Moreno, Alberto Fereres. 2018. Newly Distinguished Cell Punctures Associated with Transmission of the Semipersistent Phloem-Limited *Beet yellows virus*. *Journal of Virology*, 92(21): e01076-18. (doi: https://doi.org/10.1128/JVI.01076-18)

Jaime Jiménez, Elisa Garzo, Javier Alba-Tercedor, Aránzazu Moreno, Alberto Fereres, Gregory P. Walker. 2019. The Phloem-pd: a Distinctive Brief Element Stylet Puncture Prior to Sieve Element Phase of Aphid Feeding Behaviour. *Arthropod-Plant Interactions* (Aceptado para publicación con comentarios menores en abril de 2019)

Fotografía del acto de lectura y defensa. Presidente: Prof. Fernando García Arenal (Centro de Investigación en Biotecnología y Genómica de Plantas, CBGP, UPM-INIA, Madrid, España). Secretaria: Dra. Soledad Sacristán Benayas (CBGP, UPM-INIA, Madrid, España). Vocal 1: Prof. Marilyne Uzest (National Institute for Agricultural Research, INRA, Montepellier, Francia). Vocal 2: Dr. Juan José López-Moya Gómez (Centre de Recerca en Agrigenòmica, CRAG, Barcelona, España). Vocal 3: Prof. Vicente Medina Piles (Universitat de Lleida, España). Calificación: Sobresaliente *Cum Laude*.