

PepGPFm2, PepDsRed and PepBar, a new generation of viral vectors based on pepino mosaic virus

PepGPFm2, PepDsRed and PepBar, una nueva generación de vectores virales basados en el virus del mosaico del pepino dulce

F. Ruiz-Ramón^{1,2*}, R.N. Sempere², F.E. Méndez-López¹, M.A. Sánchez-Pina¹, M.A. Aranda¹

¹Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal, PO Box 164, 30100 Espinardo, Murcia. Spain

²R+D+I Department, Abiopep S.L., Murcia. Spain

*fruiz@abiopep.es

Abstract

Our group has already developed an efficient Pepino mosaic virus (PepMV; genus Potexvirus)-based vector (pBPepGFP2a) for protein expression and virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. We have improved pJLPepGFP2a in terms of stability and suitability for reporting infections in *N. benthamiana* and tomato, producing pJLPepGFPm2 and pJLPepDsRed. These new vectors have been used for PepMV subcellular localization assays. Moreover, to be used in massive susceptibility screenings, we also developed PepBar, in which the *gfp* gene from PepGFPm2 was substituted by the *bar* gene, an herbicide resistance gene. This vector was stable for at least two passages both in *N. benthamiana* and tomato plants.

Keywords: GFP; dSRed; mCherry; BAR; tomato.

Resumen

Nuestro grupo ya ha desarrollado un vector eficiente (pBPepGFP2a) basado en el virus del mosaico de pepino dulce (PepMV; género Potexvirus) para la expresión de proteínas y el silenciamiento génico inducido por virus en *Nicotiana benthamiana*. Tras mejorar pJLPepGFP2a en términos de estabilidad e idoneidad para la monitorización de la infección tanto en *N. benthamiana* como en tomate, los vectores pJLPepGFPm2 y pJLPepDsRed han sido empleados para el estudio de localización subcelular de PepMV. A la vez hemos desarrollado un vector, PepBar, para su empleo en escrutinios masivos de susceptibilidad, en el que el gen *gfp* de PepGFPm2 fue sustituido por el gen *bar*, un gen de resistencia a herbicidas. Este vector fue estable durante al menos dos pasajes tanto en *N. benthamiana* como en plantas de tomate.

Palabras clave: GFP; dSRed; mCherry; BAR; tomate.

1. INTRODUCCIÓN

El virus del mosaico de Pepino dulce (PepMV) es un virus que causa unas importantes pérdidas económicas en cultivos de tomate a nivel mundial. PepMV pertenece al género Potexvirus (familia Flexiviridae). El genoma de PepMV está formado por una molécula de ARN

monocatenario de aproximadamente 6,4 kb de longitud, que comprende cinco marcos de lectura abiertos (ORF) flanqueados por regiones 5' y 3' UTR. Los ORF codifican una ARN polimerasa dependiente de ARN de 164 kDa (RdRp); tres proteínas de bloque de genes triples (TGB) llamadas TGBp1 (26 kDa), TGBp2 (14 kDa) y TGBp3 (9 kDa); y la proteína de cápsida de 25 kDa (CP) [1]. PepMV es un buen candidato como vector de expresión en plantas debido a su alto nivel de acumulación y la ausencia de síntomas de infección severa para algunos aislados, factores que ya han llevado al desarrollo de otros vectores de potexvirus [2]. Los virus de plantas son vectores de expresión útiles porque pueden provocar infecciones sistémicas que permiten que se produzcan rápidamente grandes cantidades de proteína recombinante en tejidos vegetales diferenciados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Construcciones de DNA y vectores de PepMV

Todos los mutantes y vectores de PepMV se construyeron mediante PCR solapantes y posteriormente se clonaron, pBPepBar en el vector pBIN61, mientras que pJLPepGFPm2 y pJL89PepDsRed se clonaron en el vector pJL89.

2.2 Agroinoculación y visualización de la fluorescencia e inoculación

Se transformó *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58C1) con las diferentes construcciones de PepMV mediante electroporación. El producto de la transformación se incubó 2 h a 28°C y posteriormente se plaqueó. Posteriormente se picó una colonia de cada placa y se pasó a 10 mL de cultivo líquido, que se incubó durante una noche a 28°C. A la mañana siguiente estos cultivos se centrifugaron a 2500 g durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en el mismo volumen de 10 mM de MES (pH 5,5), 10 mM de MgSO₄ y 100 µM de acetosirina y se dejó incubando a 3 horas a 25°C. A continuación, se agroinfiltraron con jeringa las hojas de *N. benthamiana* con una mezcla del cultivo y supresor de silenciamiento p19 en una proporción 1:3. La inoculación mecánica en tomate y *N. benthamiana* se llevó a cabo homogeneizando el tejido de la hoja sistémica infectada en fosfato de sodio 30 mM, pH 8,0. Las plantas de *N. benthamiana* y tomate se cultivaron en una cámara de crecimiento (fotoperíodo de 16 h, 25°C). La fluorescencia se observó bajo luz UV (365 nm) proporcionada por una lámpara de mano (lámpara Blak Ray B100-AP, Upland, CA 91786, EE. UU.).

2.3 Extracciones de RNA y RT-PCR

El ARN total se extrajo usando Tri-reagent (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). La transcripción inversa se realizó con el kit One-Step RT-PCR (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µL, contenían 250 ng de ARN y 0,6 µM de cada par de cebadores. Después de 25 y 30 ciclos, los fragmentos generados por PCR se analizaron en geles de agarosa al 1%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Empleo de los vectores marcados para un análisis de localización subcelular de PepMV

Los vectores pJLPepGFPm2 y pJL89PepDsRed fueron usados para un estudio de localización de PepMV en células de *N. Benthamiana* y tomate. Las plantas de *N. Benthamiana* fueron inoculadas con ambos vectores, obteniendo resultados similares, mientras que las plantas de tomate fueron inoculadas con pJL89PepDsRed. La emisión de la fluorescencia fue analizada con microscopio de laser confocal (MLC) en hoja agroinfiltrada. Tanto en *N. Benthamiana* como en tomate observamos unos cuerpos fluorescentes que estaban presentes en casi todas las células (Fig. 1a-d). Estos cuerpos parecían tener una localización citoplasmática, cercana al núcleo. (Fig. 1b, d). Para estudiar su posible relación con orgánulos como el retículo endoplásmico (RE) o el

aparato de Golgi (G) realizamos nuevos experimentos en *N. Benthamiana*, en los que co-agroinfiltramos pJLPepGFPm2 y un marcador de RE o G que portan la proteína fluorescente mCherry. En plantas co-agroinfiltradas con pJLPepGFPm2 y RE-mCherry, observamos una aparente reorganización de la fluorescencia emitida por ER-mCherry, localizándose en unos agregados similares a los que habíamos descritos anteriormente en infecciones simples con pJLPepGFPm2 o pJL89PepDsRed (Fig.1f-h). Tomando estas imágenes a mayor aumento, observamos como la fluorescencia verde del virus y la fluorescencia fucsia de RE-mCherry están asociadas pero no se solapan (Fig.1i-j). En análisis similares usando esta vez el marcador G-mCherry, obtenemos resultados similares (Fig.1l-o), en los que se observa una asociación entre la fluorescencia emitida por el virus (verde) y la emitida por el marcado G-mCherry (fucsia) pero las señales no llegan a solapar (Fig.1p-r). Estos resultados sugieren que, tanto el RE como el G parecen estar íntimamente relacionados con los cuerpos formados a consecuencia de la infección de PepMV, pero no parecen formar parte de ellos.

3.2 Vector PepBar como herramienta de selección en escrutinios masivos en tomate

Mientras que PepDsRed parece ser un vector suficientemente eficiente para tomate, consideramos que un vector que expresa el gen *bar* de resistencia a herbicidas podría completar el conjunto de herramientas basadas en PepMV, particularmente para su uso como herramienta de selección en escrutinios masivos de susceptibilidad. La construcción pBPepBar está nuevamente basada en la estructura de PepGFPm2, siendo el gen *gfp* sustituido por el gen *bar* (Fig. 2a). Este vector fue empleado para inocular plantas de *N. Benthamiana* a la vez que se inoculaban plantas con el virus silvestre. A los 15dpi, todas las plantas fueron tratadas con glufosinato de amonio al 0,05%. Una semana después del tratamiento las plantas inoculadas con el virus silvestre mostraban síntomas de marchitamiento severo, mientras que las inoculadas con PepBar se mostraban totalmente sanas (Fig. 2b). A las dos semanas post-tratamiento las plantas control estaban totalmente muertas mientras que las inoculadas con PepBar lucían sanas y vigorosas. Posteriormente se empleó extracto de hoja sistémica de *N. Benthamiana* inoculada con PepBar para inocular mecánicamente plantas de tomate. A los 15 dpi se trataron, las plantas inoculadas con PepBar y plantas de tomate inoculadas con el virus silvestre, con glufosinato de amonio al 0,05%. A las dos semanas del tratamiento con el herbicida, las plantas inoculadas con el virus silvestre estaban marchitas mientras que las plantas inoculadas con PepBar seguían completamente sanas (Fig. 2c). El ensayo de estabilidad realizado a lo largo de una serie de pases, muestra la estabilidad del vector al menos durante tres pases, aunque en este último se observó ya una cierta inestabilidad del mismo (Fig. 2d).

4. CONCLUSIONES

En resumen, el vector PepDsRed es capaz de mejorar los niveles de expresión y la estabilidad en *N. Benthamiana* y especialmente en tomate, especie en la cual se han descrito por primera vez los cuerpos multivesiculares resultantes de la infección de PepMV, lo que abre una nueva vía de investigación centrada en la interacción molecular entre el huésped/potexvirus.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradezco la financiación de la beca FPI a la Fundación Séneca de la Región de Murcia, y la financiación de los experimentos al proyecto de Plan Estatal AGL2015-65838-R (Ministerio de Economía y Competitividad).

6. REFERENCIAS

- [1] Aguilar J.M., Hernandez-Gallarod M.D., Cenis J.L., Lacasa A., Aranda M.A. 2002. Complete sequence of the Pepino mosaic virus RNA genome. Arch Virol. 147:2009-2015.
- [2] Baulcombe D.C., Chapman S., Cruz S. 1995. Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. Plant J 7:1045-1053.
- [3] Sempere R.N., Gomez P., Truniger V., Aranda M.A. 2011. Development of expression vectors based on pepino mosaic virus. Plant Methods. 7:6.

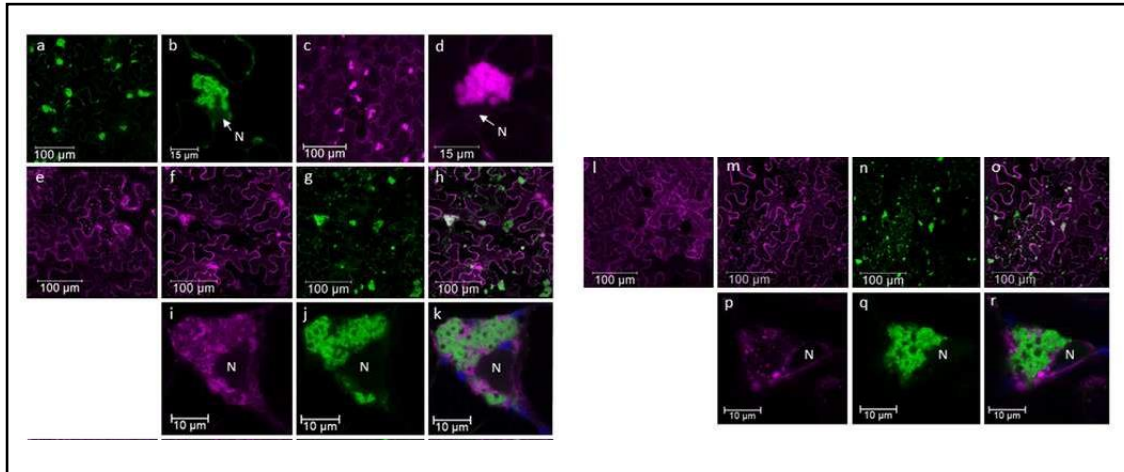


Figura 1. Cuerpos subcelulares inducidos por PepMV en *N. Benthamiana* y planta de tomate (a-b) Imagen de MLC de la infección con pJLPepGFPm2 en *N. Benthamiana* (c-d) y pJL89PepDsRed en tomate. (e) Distribución del marcador RE-mCherry, (f-h) Re-distribución del marcador RE-mCherry en presencia de pJLPepGFPm2. (i) Magnificación de la distribución de RE-mCherry en presencia de (j) pJLPepGFPm2 e (k) imágenes solapadas. (l) Distribución del marcador G-mCherry, (m-o) Re-distribución del marcador G-mCherry en presencia de pJLPepGFPm2. (p) Magnificación de la distribución de G-mCherry en presencia de (q) pJLPepGFPm2 e (r) imágenes solapadas. N, núcleo.

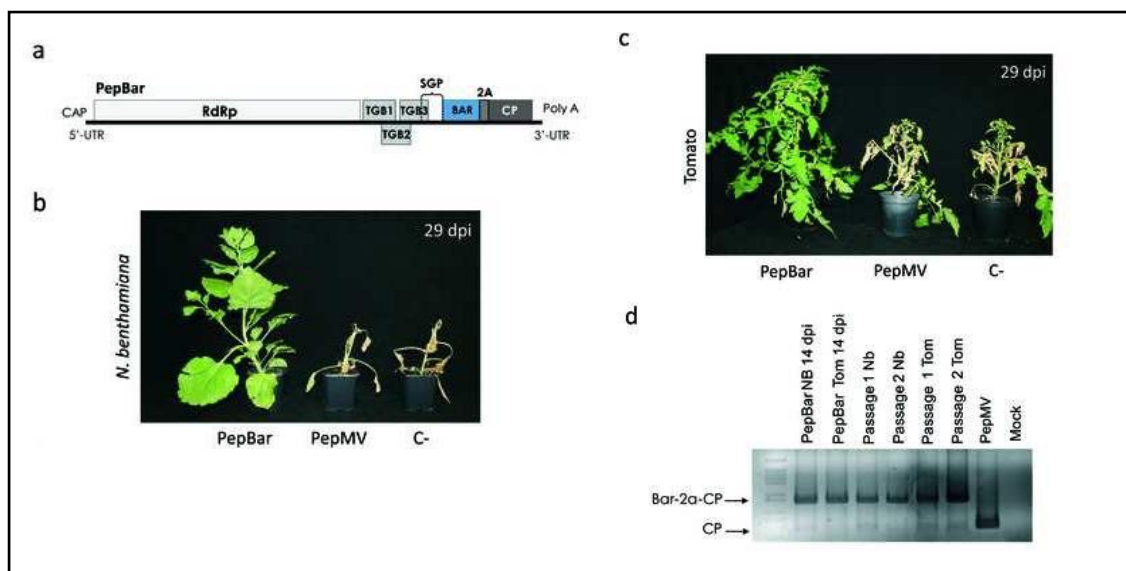


Figura 2. *N. Benthamiana* y planta de tomate infectadas con PepBar. (a) Representación esquemática de PepBar (b) y (c) *N. Benthamiana* y planta de tomate inoculadas con PepBar y Pep-SP13(silvestres). (d) RT-PCR para analizar la estabilidad del inserto.