

# Factores de susceptibilidad al Virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV): Identificación, caracterización de su papel en la biología del virus y uso como dianas de mejora de resistencias

F. Ruiz-Ramón, M. Aranda

Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal, apdo. correos 164, 30100 Espinardo, Murcia, España. fruiz@cebas.csic.es

## RESUMEN

El virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV) se ha convertido en un factor limitante para la producción y calidad del tomate en la Región de Murcia. Aunque se ha descrito la existencia de algunas posibles fuentes donadoras de resistencia a PepMV, éstas parecen parciales, controladas por genéticas complejas y específicas de cepa viral. Por lo tanto, se hace necesario abordar estrategias alternativas para el desarrollo de variedades de tomate resistentes a PepMV. Esta es la finalidad de este trabajo, cuyo fundamento es el siguiente: Los virus son parásitos obligados que necesitan de la maquinaria celular del huésped para su multiplicación. La mutación o pérdida de los factores del huésped que son requeridos por los virus para completar sus ciclos (factores de susceptibilidad) puede dar lugar a alelos recesivos que confieran resistencia a virus. Así pues, el presente trabajo, que parte de resultados obtenidos por el grupo de Patología Vegetal del CEBAS-CSIC, pretende identificar las proteínas de tomate que interaccionan con las proteínas de PepMV (i.e., caracterizar el interactoma de PepMV) con el objetivo de identificar factores de susceptibilidad al virus para su posible uso como dianas de mejora de resistencias.

**Palabras clave:** Interactoma, silenciamiento, VIGS, resistencia, tomate.

## 1. Introducción

El virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV) se ha convertido en un factor limitante para la producción y calidad del tomate en la Región de Murcia. Aunque se ha descrito la existencia de algunas posibles fuentes donadoras de resistencia a PepMV, éstas parecen parciales, controladas por genéticas complejas y específicas de cepa viral. Por lo que se hace necesario buscar estrategias alternativas para la creación de variedades resistentes a PepMV.

El virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) se detectó por primera vez en el año 1974 en Perú en plantas de pepino dulce (*Solanum muricatum* Aiton) infectadas. En 1999, se detectó por primera vez en planta de tomate en cultivo bajo invernadero en Holanda [1]. En la actualidad se ha detectado PepMV en varios países de América del Norte y del Sur, Europa, África y Asia. En España la mayor incidencia de la enfermedad se da en las provincias de Murcia, Almería y en el

archipiélago canario [2,3]. En algunas de estas comunidades autónomas, como la Región de Murcia, las pérdidas alcanzaron hasta el 40% de la producción en parcelas afectadas en el año 2000 [4]. Los síntomas causados por este virus son muy variables dependiendo de la variedad de tomate afectado, el estado fenológico de la planta, las condiciones ambientales (luz y temperatura) y el aislado de PepMV que infecte la planta. Los principales síntomas comprenden mosaicos verdes, amarillos y brillantes, abullonados, filimorfismos, estriaduras verdes en tallo. En fruto maduro puede presentar mosaicos o maduración irregular además de afectar al rendimiento de la planta. Estos daños se ven atenuados a temperaturas superiores a 25°C [4]. Por el momento, no se han identificado vectores específicos para este virus, pero su eficiente transmisión mecánica y la alta estabilidad de su partícula viral pueden estar facilitando notablemente su rápida extensión [5].

A nivel molecular el genoma de PepMV está compuesto por una cadena de RNA de sentido positivo con un tamaño de 6,4 kb [6] que contiene 5 ORFs. El ORF más próximo al extremo 5' codifica la replicasa viral, una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) (163-164 kDa). Los ORFs 2, 3 y 4 se solapan parcialmente en diferentes marcos de lectura, poseen la organización típica del bloque triple de genes de potexvirus (*triple gene block*, TGB), y codifican péptidos de 26, 14 y 9 kDa, respectivamente. El ORF más cercano al extremo 3' codifica la proteína de la cápsida (CP), con un tamaño de 25 kDa. La estrategia de expresión de los ORFs codificados por el genoma de PepMV presumiblemente sea la misma que la de otros potexvirus, de forma que el gRNA actuaría como mensajero para la expresión de la replicasa viral mientras que los ORFs próximos al extremo 3' se expresarían a través de RNAs mensajeros subgenómicos (sgRNAs).

Los métodos de control de las enfermedades inducidas por PepMV incluyen esencialmente la destrucción de plantas infectadas y la prevención de la transmisión del virus mediante medidas higiénicas durante el cultivo y la propagación de material vegetal. Sería muy deseable poder contar con variedades comerciales de tomate resistentes a PepMV, pero de momento no existe en el mercado ninguna de estas variedades. Sí se ha descrito la existencia de algunas posibles fuentes donadoras de resistencia, como por ejemplo la entrada LA 1708 de *Solanum peruvianum*. Sin embargo, las fuentes de resistencia a PepMV descritas por el momento parecen consistir en resistencias parciales, controladas por genéticas complejas y a menudo, específicas de cepa viral [7]. Es por tanto conveniente y oportuno abordar estrategias alternativas para la identificación de nuevas fuentes de resistencia a PepMV. En este trabajo se plantea la identificación de las proteínas de tomate que interactúan con las proteínas de PepMV (i.e., caracterizar el interactoma de PepMV) con el objetivo de identificar factores de susceptibilidad al virus para su posible uso como dianas de mejora de resistencias. Así pues, la hipótesis de partida de este trabajo consiste en que al menos una parte de las proteínas de tomate que interactúen con las proteínas de PepMV sean probablemente utilizadas por el virus en alguna fase de su ciclo; la modificación o ausencia de alguna de estas proteínas puede tener como consecuencia la ausencia de multiplicación del virus. Estas proteínas del huésped, denominadas factores de

susceptibilidad, constituyen dianas para la mejora biotecnológica de resistencias. Es importante destacar que existen técnicas descritas de forma relativamente reciente (ej. TILLING) que hacen que esta mejora biotecnológica no deba pasar necesariamente por la obtención y uso de plantas transgénicas. Por tanto este trabajo se basa en la generación de mutantes de predad de susceptibilidad mediante la identificación de proteínas del huésped que interactúan con proteínas codificadas por el genoma viral. Hasta el momento se han identificado 26 interactores y 9 parálogos con la técnica de Yeast two-hybrid y con la finalidad de identificar entre estos interactores aquellos factores cuyo silenciamiento esté asociado con la pérdida de susceptibilidad a PepMV se va a emplear la técnica de VIGS.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Material vegetal

El material vegetal empleado van a ser como planta modelo *Nicotiana Benthamina* y posteriormente se reproducirán los resultados en tomate var. "Moneymaker".

### 2.2 Métodos

La principal técnica a emplear en este trabajo es el silenciamiento de genes inducido por virus (VIGS). VIGS es un método relativamente rápido de silenciamiento de genes de planta que permite la descripción de su función. La popularidad de este método puede ser atribuida a cuatro razones. La primera de ellas es que es un sistema simple que se basa en la agroinfiltración de las plantas. En segundo lugar, los resultados se obtienen de forma rápida de dos a tres semanas de la post-inoculación. En tercer lugar, la tecnología no pasa por etapas de transformación y por lo tanto es aplicable al número de especies de plantas y por último es un método con gran potencial ya que permite silenciar genes multicopia.

VIGS se basa en el ARN de interferencia (ARNi), que se basa a el silenciamiento de la expresión génica mediada por un pequeño fragmento de ARN específico.

## 3. Resultados y Discusión

Los resultados esperados se basan en la identificación entre los interactores de la TGBp1, aquellos factores cuyo silenciamiento esté

asociado con la pérdida de susceptibilidad a PepMV, así como caracterizarlos y estudiar sus mecanismos de interacción.

#### **4. Agradecimientos**

A la Fundación Seneca por financiar esta tesis doctoral.

#### **5. Referencias bibliográficas**

- [1] Van der Vlugt *et al.*, 2000. Report of pepino mosaic virus en tomato. *Plant disease*,84 (1), 103
- [2] Pagán, I. *et al.*, 2006 Genetic structure of the population of Pepino mosaic virus infecting tomato crops in Spain. *Phytopathology* 96:274–279.
- [3] Soler-Aleixandre, S. *et al.*, 2007. Sources of resistance to *Pepino mosaic virus* (PepMV) in tomato. *HortScience*, 42, 40–45.
- [4] Soler, S. *et al.*, 2000. El Pepino Mosaic Virus (PepMV), una nueva amenaza para el cultivo del tomate II. *Vida Rural* 119:48–52.
- [5] Hanssen, I.M. *et al.*, 2010. Pepino mosaic virus: a successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. *Molecular Plant Pathology* 11:179-189.
- [6] Aguilar, J.M. *et al.*, 2002. Complete sequence of the Pepino mosaic virus RNA genome. *Archives of Virology* 147, 2009-2015.
- [7] Pico, B., *et al.* 2002. Widening the genetic basis of virus resistance in tomato. *Scientia Horticulturae* 94:73-89.