

Pepino mosaic virus RNA-Dependent RNA Polymerase POL Domain Is a Hypersensitive Response-Like Elicitor Shared by Necrotic and Mild Isolate

El dominio POL de la replicasa es el elicitor de necrosis del virus del mosaico del pepino dulce

R. Sempere¹, C. Gómez-Aix¹, F. Ruíz-Ramón^{1*}, P. Gómez¹, B. Hasiów-Jaroszewska², M. Sánchez-Pina¹, and M. Aranda¹

¹Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), CSIC, 30100 Espinardo, Murcia, Spain

²Institute of Plant Protection-National Research Institute, Department of Virology and Bacteriology, ul. Władysława Wegorka 20, 60-318 Poznań (Poland)

*fruíz@cebas.csic.es

Abstract

Pepino mosaic virus (PepMV) is an emerging pathogen that represents a serious threat to tomato production worldwide. PepMV-induced diseases manifest with a wide range of symptoms, including systemic necrosis. Our results showed that PepMV accumulation depends on the virus isolate, tomato cultivar, and environmental conditions, and associates with the development of necrosis. Substitution of lysine for glutamic acid at position 67 in the triple gene block 3 (TGB3) protein, previously described as a necrosis determinant, led to increased virus accumulation and was necessary but not sufficient to induce systemic necrosis. Overexpression of both TGB3 and the polymerase domain (POL) of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) resulted in necrosis, although only local expression of POL triggered HR-like symptoms. Altogether, our data suggest that the RdRp-POL domain plays an important role in PepMV necrosis induction, with necrosis development depending on the virus accumulation level, which can be modulated by the nature of TGB3, host genotype and environmental conditions.

Keywords: necrosis; potexvirus; *Solanum lycopersicum*.

Resumen

El virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) es un patógeno emergente que representa una grave amenaza para la producción de tomate. Las enfermedades inducidas por PepMV se manifiestan con una amplia gama de síntomas, incluyendo la necrosis sistémica. Nuestros resultados muestran que la acumulación de PepMV depende tanto del aislado del virus, como de la variedad de tomate o las condiciones ambientales, asociado todo ello al desarrollo de la necrosis. La sustitución de una lisina por un ácido glutámico en la posición 67 del triple bloque de genes (TGB3), previamente descrita como un determinante de la necrosis, parece favorecer una mayor acumulación del virus pero no parece ser el elemento elicitor de la necrosis sistémica. La sobreexpresión tanto de TGB3 como del dominio polimerasa (POL) de la replicasa (RdRp) produjo necrosis, aunque sólo la expresión local de POL desencadenó síntomas característicos de HR. En conjunto, nuestros datos sugieren que el dominio RdRp-POL desempeña un papel importante en la inducción de necrosis de PepMV, dependiendo del nivel de acumulación del virus, que puede ser modulado por la naturaleza de TGB3, el genotipo del huésped y las condiciones ambientales.

Keywords: necrosis; potexvirus; *Solanum lycopersicum*.

1. INTRODUCCIÓN

La necrosis sistémica es uno de los síntomas inducidos por patógenos de las plantas que más pérdidas provoca en cultivos agrícolas. Un amplio número de estudios han demostrado que la necrosis sistémica tiene características de respuesta hipersensible (HR), incluyendo la inducción de la muerte celular programada. Más recientemente, algunos trabajos han descrito que los virus que inducen necrosis sistémica codifican una proteína elicitora, como lo hacen los virus inductores de HR [1]

El virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) causa una grave enfermedad en los cultivos de tomate en todo el mundo [2]. PepMV pertenece al género Potexvirus de la familia Alphaflexiviridae. Su genoma está formado por un ARN monocatenario de aproximadamente 6,4 kb que incluye 5 marcos abiertos de lectura (ORFs). El primero de ellos codifica la replicasa, que posee tres dominios, metiltransferasa (MET), helicasa (HEL) y polimerasa (POL), a continuación se encuentra el triple bloque de genes (TGB) que codifica TGB1, TGB2 y TGB3, involucrados en el movimiento viral y supresión de silenciamiento, y la proteína de la capsida (CP) que tiene un papel estructural, además de ser un supresor silenciador y necesario para el movimiento viral [3].

Se han descrito cinco genotipos diferentes de PepMV [4]. Pequeñas diferencias genéticas entre ellos dan lugar a grandes diferencias en la naturaleza y la gravedad de los síntomas. Se ha descrito que una sola mutación en el aminoácido número 67 del gen TGB3 (ácido glutámico en lugar de lisina, K67E) puede ser la causante de la conversión de una cepa suave de PepMV en una necrótica [5], aunque los mecanismos subyacentes siguen sin conocerse.

En este trabajo hemos estudiado la implicación de diferentes factores sobre la acumulación de PepMV y la inducción de necrosis, caracterizando el fenotipo de la misma.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Construcción de los plásmidos.

La mutación que causa la sustitución de aminoácidos K67E en TGB3 se generó por mutagénesis dirigida basada en PCR empleando cebadores específicos [3]. Las construcciones diseñadas para la expresión transitoria de los diferentes dominios de RdRp o proteínas de PepMV, se clonaron por sistema Gateway empleando pGWB como vector binario de destino.

2.2 Material vegetal e inoculación

Se han empleado seis variedades de tomate (Beta Lux, Malinowy Ozarowski y Koneser, de Polonia, y Boludo, Moneymaker, y Muchamiel de España). Estas plantas han crecido bajo dos condiciones medioambientales, la primera (condición ambiental I) 26 a 28 C día, 18 a 20 C noche, 16 h luz y la segunda (condición ambiental II) 21 a 22 C día, 15 a 16 C noche, 8 h luz, simulando verano e invierno, respectivamente. En tomate la inoculación se realizó de forma mecánica a partir de inóculo obtenido de plantas de *N. benthamiana* previamente agroinfectadas. La inoculación se realizó sobre la primera hoja totalmente expandida.

2.3 Detección de respuesta asociada a la defensa.

La detección histoquímica de H₂O₂ en hojas de tomate y *N. benthamiana* se realizó con tinción histoquímica in situ dependiente de peroxidasa endógena. La detección histoquímica de O₂ se realizó por infiltración foliar d con tetrazolio nitro azul (NBT) a 0,1 mg/ml en tampón K-HEPES 25 mM (pH 7,6) e incubación a 25°C en la oscuridad durante 2 h. Las hojas se enjuagaron en etanol al 95% (vol/vol) durante 10min a 80°C, se montaron bajo agua destilada y se fotografiaron directamente usando un estereomicroscopio Olympus SZX PT.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

En un primer ensayo se analizó la influencia sobre la acumulación viral de las condiciones ambientales y del genotipo del virus. Para ello se inocularon plantas de seis variedades de tomate con dos cepas no necróticas, PepMV-Sp13 (tipo UE) y PepMV-PS5 (tipo CH2) [4], y con dos mutantes necróticos, PepMV-Sp13/TGB3_{K67E} y PepMV-PS5/TGB3_{K67E} (Figura 1A). 24 días post inoculación la acumulación de PepMV fue notablemente afectada por la interacción entre el tipo de aislado, las condiciones ambientales y la variedad de tomate. En concreto, los aislados necróticos se acumularon a niveles significativamente más altos que los aislados no necróticos y la condición ambiental I aumentó significativamente (doble) la acumulación viral con respecto a la condición II (Figura 1B). Cada variedad de tomate tuvo un efecto sobre la acumulación viral, Malinowy Ozarowski fue la variedad en la que se detectó una mayor carga viral seguida por Moneymaker, Koneser, Boludo, Muchamiel, siendo Beta Lux la variedad en la que menor título viral se detectó. A continuación, se examinó el impacto de la necrosis en todos los tratamientos. Los síntomas necróticos sólo se observaron en cultivares de tomate inoculados con PepMV-PS5/TGB3_{K67E}. La gravedad de los síntomas necróticos varió de acuerdo con las condiciones ambientales, siendo mayor en la condición I y con los cultivares Beta Lux y Moneymaker. Los resultados sugieren que el desarrollo de necrosis está asociado con altos títulos virales, que a su vez depende del aislado y condiciones ambientales. Por lo tanto, la sustitución de aminoácidos K67E en TGB3 parece ser necesaria, pero no suficiente para la inducción de la necrosis sistémica. Una explicación plausible es que TGB3 esté implicado en la determinación de la necrosis aumentando la acumulación del virus en plantas infectadas con PepMV.

Para caracterizar la necrosis sistémica inducida en tomate por las cepas necróticas de PepMV, se analizaron las características bioquímicas asociadas con la muerte celular. Se inocularon plantas de tomate Moneymaker con los cuatro aislados de PepMV. Seis semanas después de la inoculación sólo las plantas infectadas con los aislados necróticos mostraron necrosis (Figura 2A). No se detectó acumulación de H₂O₂ o O₂ en hojas infectadas con aislados no necróticos. Se analizó la necrosis también en plantas de *N. benthamiana* inoculadas con PepMV-PS5 y PepMV-PS5/TGB3_{K67E} y se encontraron resultados similares (Figura 2B). Los niveles de acumulación viral son casi diez veces mayores en plantas inoculadas con PepMV-PS5/TGB3_{K67E} que en plantas inoculadas con PepMV-PS5 (Figura 2C). En *N. benthamiana* los resultados sugirieron que la inducción de necrosis estaba correlacionada con una mayor acumulación de virus. Para evaluar si un aislado no necrótico de PepMV puede causar necrosis al acumularse en niveles altos, coinfiltramos clones agroinfectivos de longitud completa de PepMV-Sp13 o PepMV-PS5 junto con el supresor silenciador p19. A los 5 días postinfiltración aparecieron manchas necróticas sólo en hojas co-agroinfiltradas con p19, que se asemeja a la respuesta necrogénica descrita anteriormente (mostrada para PepMV-Sp13). Estos resultados sugieren fuertemente que un aislado no necrótico puede causar la necrosis cuando alcanza niveles de acumulación altos.

Con la finalidad de mapear el elicitor de la necrosis en el genoma viral, se expresaron en *N. benthamiana* los diferentes genes de PepMV utilizando vectores pGWBs. La expresión transitoria de ambas versiones de TGB3, TGB3_K y TGB3_E, indujo el mismo fenotipo que consistente en necrosis venosa débil que se asemeja a un efecto citotóxico. Sin embargo la expresión de dominio POL desencadenó un fenotipo característico de necrosis que se asemeja claramente al fenotipo de necrosis descrito anteriormente para inoculaciones con toda la construcción del virus. Estos resultados indican que el dominio POL de la RdRp codificada por los aislados sintomáticos y asintomáticos de PepMV es un inductor de necrosis.

4. CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que el desarrollo de la necrosis se asocia con altos títulos virales, que a su vez dependen del aislado, del cultivar de tomate y de las condiciones ambientales. La sustitución de aminoácidos K67E en TGB3 parece ser necesaria pero no suficiente para la inducción sistémica de necrosis. Se demostró que la necrosis sistémica, tanto en tomate y *N. benthamiana* comparte características de respuesta hipersensible. También se mapeó el elicitor de la necrosis en el genoma de PepMV, en un dominio conservado de la RdRp.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecer la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2012-37390) y la fundación Séneca por la financiación de la Beca FPI.

6. REFERENCIAS

- [1] Sempere, R., Gómez-Aix C, Ruíz-Ramón F, Gómez P, Hasiów-Jaroszewska B, Sánchez-Pina M.A, Aranda M.A. 2016 Pepino mosaic virus RNA-Dependent RNA Polymerase POL Domain Is a Hypersensitive Response-Like Elicitor Shared by Necrotic and Mild Isolates. *Virology*.
- [2] Gómez, P., Sempere, R., and Aranda, M. A. 2012. Pepino mosaic virus and Tomato torrado virus: Two emerging viruses affecting tomato crops in the Mediterranean Basin. *Adv. Virus Res.* 84:505-532.
- [3] Sempere, R., Gomez, P., Truniger, V., and Aranda, M. A. 2011. Development of expression vectors based on Pepino mosaic virus. *Plant Methods* 7:6.
- [4] Gómez, P., Sempere, R., Elena, S., and Aranda, M. A. 2009. Mixed infections of Pepino mosaic virus strains modulate the evolutionary dynamics of this emergent virus. *J. Virol.* 83:12378-12387
- [5] Hasiów-Jaroszewska, B., and Borodynko, N. 2012. Characterization of the necrosis determinants of the European genotype of Pepino mosaic virus by site specific mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Arch. Virol.* 157: 337-341.

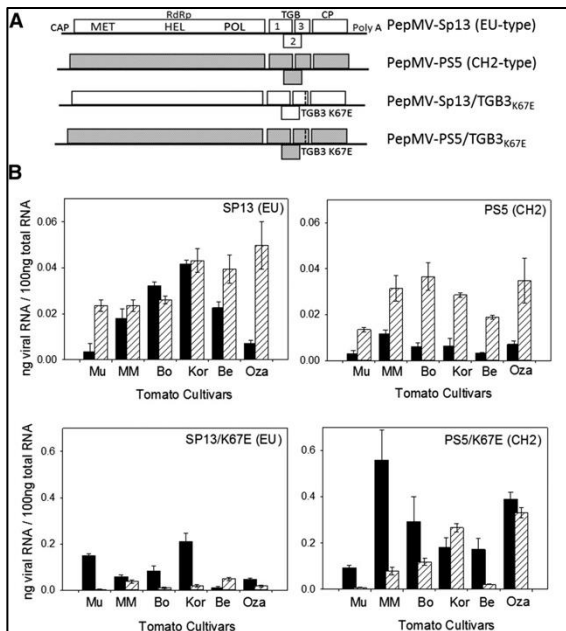


Figura 1. Necrosis sistémica producida por PepMV asociada al título viral.

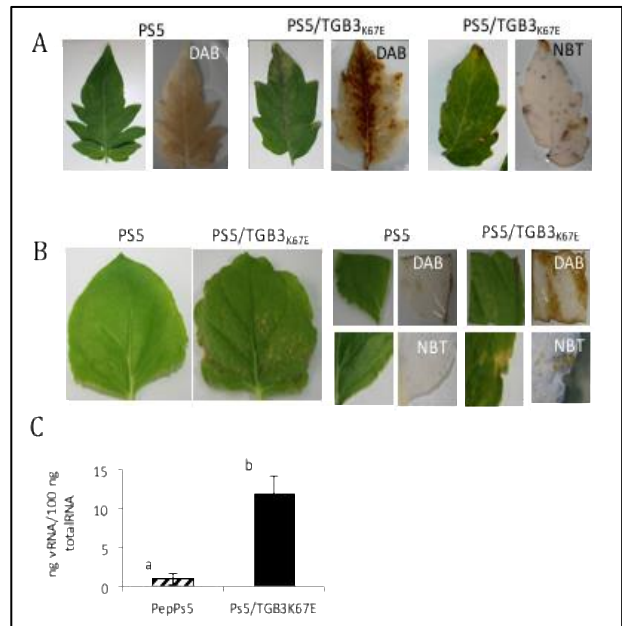


Figura 2. Caracterización de la necrosis en tomate y *N. benthamiana*.