

Second generation of viral vectors based on pepino mosaic virus

Segunda generación de vectores virales basados en el virus del mosaico del pepino dulce

F. Ruiz-Ramón*, N.R. Sempere, F.E. Méndez-López, M.A. Sánchez-Pina, M.A. Aranda

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

*frui@cebas.csic.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*. The aim of this work was to further improve pBPepGFP2a in terms of stability and suitability for reporting infections in tomato. To avoid homologous recombination due to sequence duplication, two new constructs with different number of mutations were designed, pBPepGFPm1 and pBPepGFPm2, using pBPepGFP2a as backbone. Stability assays showed that PepGFPm2 was stable in *N. benthamiana* plants for at least 3 passages, but not in tomato plants, in which no GFP expression was detected with any of the vectors. Then, the *gfp* gene from pBPepGFPm2 was replaced by the *DsRed* or *mCherry* genes, giving rise to the PepDsRed and PepmCherry vectors. Both vectors were stable in *N. benthamiana* and PepDsRed was also stable in tomato at least during two passages.

Keywords: GFP; dSRed; mCherry; 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*. El objetivo de este trabajo fue mejorar aún más pBPepGFP2a en términos de idoneidad y estabilidad en infecciones en tomate. Para evitar la recombinación homóloga debido a la duplicación de la secuencia, se diseñaron dos construcciones nuevas con diferente número de mutaciones, pBPepGFPm1 y pBPepGFPm2, utilizando pBPepGFP2a como molde. Los ensayos de estabilidad mostraron que PepGFPm2 era estable en plantas de *N. benthamiana* durante al menos 3 pases, pero no en plantas de tomate, en las que no se detectó expresión de GFP con ninguno de los vectores. Posteriormente, el gen *gfp* de pBPepGFPm2 fue reemplazado por los genes *DsRed* o *mCherry*, dando lugar a los vectores PepDsRed y PepmCherry. Ambos vectores fueron estables en *N. benthamiana* y PepDsRed fue también estable en tomate al menos durante dos pases.

Palabras clave: GFP; dSRed; mCherry; tomate.

1. INTRODUCCIÓN

El Virus del mosaico de pepino dulce (PepMV) 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' no codificantes. Los ORF codifican una ARN polimerasa de 164 kDa (RdRp); tres proteínas del bloque de tres genes (TGB) llamadas TGB1 (26 kDa), TGB2 (14 kDa) y TGB3 (9 kDa); y la proteína de cápsida (CP) de 25 kDa [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 métodos de clonación molecular. Para pBPepGFPm2 se empleó el método de clonación Gateway, clonando ambas construcciones en el vector pBIN61, mientras que para pJL89PepDsRed y pJL89PepmCherry se empleó el método Gibson Assembly, clonando ambas construcciones en el vector pJL89. En ambos casos se procedió según el protocolo suministrado en el kit.

2.2 Visualización de la fluorescencia e inoculación

Se transformó *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58C1) con las diferentes construcciones de PepMV mediante electroporación. Las agroinfiltraciones de *N. benthamiana* se realizaron con jeringa con una mezcla del cultivo y el supresor de silenciamiento p19 en una proporción 1:3. La inoculación mecánica en tomate (cv. M82) 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 250ng de ARN y 0,6µM 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. Mejora de un vector basado en PepMV para la expresión estable de GFP

En trabajos previos del grupo se ha descrito la obtención y análisis de un vector basado en PepMV que expresa el gen *gfp* (PepGFP2a), estable en *N. benthamiana* [3] pero no en plantas de tomate (datos no mostrados). En este vector viral se fusionó a la CP del virus el gen *gfp* a través del péptido autocatalítico 2A del Food-and-mouth disease virus. Para mantener intacta la secuencia codificante de la CP fue necesario introducir una duplicación, dado que el promotor del ARN subgenómico de la CP se extiende aguas abajo del codón de inicio de la traducción de este gen (Fig. 1). Con la finalidad de mejorar la estabilidad de este vector en tomate, se diseñaron dos nuevas construcciones, pBPepGFPm1 and pBPepGFPm2, basadas en la estructura de pBPepGFP2a. Para ello se introdujeron, por mutagénesis dirigida, una serie de modificaciones en

la secuencia duplicada. Para pBPepGFPm1, se introdujeron seis mutaciones sinónimas, una en cada uno de los seis últimos tripletes de nucleótidos de la secuencia duplicada, mientras que para pBPepGFPm2 se introdujeron mutaciones sinónimas en los doce últimos tripletes de la secuencia duplicada, con el objetivo de reducir aún más la duplicación de secuencia (Fig. 1). Posteriormente se llevaron a cabo ensayos de estabilidad en *N. benthamiana*. Para ello se agroinfiltraron hojas con *A. tumefaciens* transformado con pBPepGFPm1, pBPepGFPm2 y pBPepGFP2a en presencia del supresor de silenciamiento p19 y la expresión de la GFP fue monitorizada desde los 3dpi hasta los 12dpi bajo luz UV. Se detectaron niveles de expresión similares para los tres vectores en hoja inoculada a los 5dpi. A los 7dpi, la infección se hizo sistémica para los tres vectores, sin embargo, en las plantas infectadas con pBPepGFPm2 se observaron áreas más amplias de tejido fluorescente que en las plantas inoculadas con los otros dos vectores, diferencia que se acentuó a los 12dpi. Se tomaron muestras de hoja a los 7dpi en hoja inoculada y sistémica y a los 12dpi solo en hoja sistémica y se realizó una RT-PCR. Estos análisis revelaron la presencia de la banda correspondiente a la fusión GFP-2a-CP a 7dpi y 12dpi para todos los vectores, sin embargo, para PepGFP2a es posible intuir la banda correspondiente a la CP silvestre en todas las muestras. Para PepGFPm1 y PepGFPm2 solo se intuye la banda correspondiente a la CP silvestre a los 12 dpi. Se analizó la estabilidad del vector más prometedor, PepGFPm2 a lo largo de sucesivos pases, y se detectó expresión de GFP al menos durante tres pases. Para este vector se realizó también un estudio de estabilidad en tomate, pero solo se observaban focos aislados de GFP en un tercio de las plantas. Un análisis de RT-PCR desveló que este vector no era estable en tomate, no detectando la banda correspondiente a la fusión GFP-2a-CP a los 12dpi (ver a continuación), indicando la pérdida del inserto.

3.2. Expresión de DsRed y mCherry empleando el vector PepGFPm2 como molde

Partiendo de la hipótesis de que la selección negativa frente a una proteína fluorescente diferente a GFP podría ser menor en tomate, decidimos diseñar dos nuevos vectores basados en PepGFPm2 en el que reemplazamos el gen que codifica la *gfp* por el gen que codifica la *Dsred* y la *mCherry* (Fig.1). Posteriormente se inocularon plantas de *N. Benthamiana* con estos nuevos vectores en presencia del supresor de silenciamiento p19 y la fluorescencia fue monitorizada durante dos semanas bajo luz UV. Comparando la fluorescencia de estos dos nuevos vectores con la de PepGFPm2, a 5dpi, solo se observó fluorescencia de GFP en hoja inoculada, mientras que ya se detectó fluorescencia correspondiente a DsRed y mCherry en hoja sistémica, lo que sugiere que la infección del virus cuando porta el gen que codifica la *Dsred* y la *mCherry* se expande más rápidamente que cuando porta el gen *gfp*, además de que la expresión de estos dos genes reporteros sea más eficiente que la del gen *gfp*. A los 7 dpi, la fluorescencia se observaba ya en hoja sistémica para los tres vectores, sin embargo, era bastante más intensa para PepDsRed y PepmCherry, pudiendo ser comparada con la fluorescencia emitida por PepGFPm2 a los 12dpi. A los 12dpi la fluorescencia de PepmCherry comenzó a decaer, mientras que la de PepDsRed y PepGFPm2 se mantenía constante (Fig, 2a y 2b). Se realizó una RT-PCR a partir de extracciones de ARN de material infectado con PepDsRed y PepmCherry a 7 y 12dpi. Se observó que tanto la fusión DsRed-2a-CP como la mCherry-2a-CP se mantuvieron estables durante este periodo, no detectando en ningún momento banda correspondiente a la CP silvestre (Fig. 2c). Se realizaron también análisis de estabilidad a través de sucesivos pases, y se observó cómo la fluorescencia de DsRed y mCherry se mantuvo estable al menos durante tres pases, aunque la fluorescencia de mCherry en este último pase era bastante más débil. Se realizó una RT-PCR con las muestras de los pases a 7dpi y se observó cómo la banda correspondiente a la fusión DsRed-2a-CP se mantiene a lo largo de los pases, sin embargo, para la fusión mCherry-2a-CP en el tercer pase se observa una banda de tamaño correspondiente a la CP silvestre, indicando que eventualmente este vector pierde su integridad. Tras evaluar la estabilidad en *N. Benthamiana* se inocularon plantas de tomate con PepDsRed y PepmCherry. Se monitorizó la fluorescencia y se observó cómo bajo luz UV era posible detectar la fluorescencia de DsRed tanto en hoja inoculada como en hoja sistémica, sin embargo, en ningún momento se observó fluorescencia emitida por PepmCherry, al igual que

ocurría con PepGFPm2. Se realizó una RT-PCR que confirmó la estabilidad durante al menos 12 dpi para la fusión DsRed-2a-CP, mientras que para la fusión GFP-2a-CP y la mCherry-2a-CP solo se detectaron bandas débiles a los 7dpi, siendo mucho más intensa la señal correspondiente al producto de la CP silvestre. Se detectó fluorescencia durante al menos dos pases para el vector PepDsRed y análisis de RT-PCR mostraron la estabilidad de este vector durante los dos primeros pases, ya que en el tercero se detectó banda correspondiente a la CP. Resumiendo, el vector PepDsRed fue el vector más estable consiguiendo la expresión de la proteína fluorescente DsRed tanto en *N. Benthamiana* como en tomate.

4. CONCLUSIONES

Hemos mejorado la expresión de un vector basado en PepMV que expresa el gen de la *gfp*, a partir del cual hemos creado nuevos vectores que expresan el gen *DsRed* y *mCherry*, ampliando así el set de herramientas basadas en PepMV para su uso en estudios de mejora, patología y biología molecular.

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

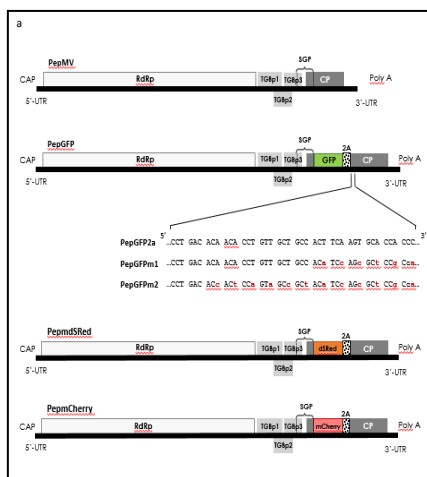


Figura 1. Representación esquemática de los vectores.

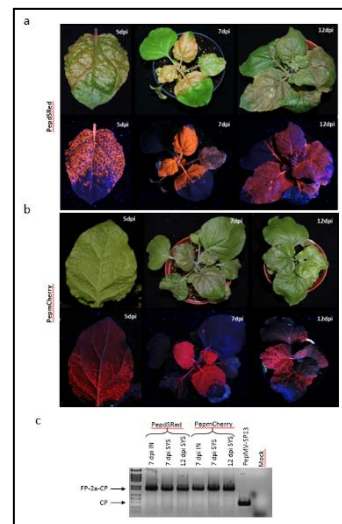


Figura 2. (a)(b) Expresión de dSRed y mCherry bajo luz UV en plantas inoculadas con los vectores que las expresan. (c) RT-PCR de plantas inoculadas los vectores que expresan dSRed y mCherry