

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA

AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## **“Desenvolupament d’un vector d’expressió en plantes derivat del virus del mosaic de la tomaca”**

TREBALL DE FINAL DE GRAU

GRAU EN BIOTECNOLOGIA

Autora del treball:	Glòria Martínez Llidó
Localitat i data:	València, juliol 2016
Tutor U.P.V.:	Prof. Dr. Carmelo López Del Rincón
Cotutor extern:	Dr. José Antonio Darós Arnau
Curs acadèmic:	2015-2016





**Títol: Desenvolupament d'un vector d'expressió en plantes derivat del virus del mosaic de la tomaca.**

**Resum**

El virus del mosaic de la tomaca (ToMV; gènere *Tobamovirus*, família *Virgaviridae*) consisteix en un ARN genòmic d'aproximadament 6400 nucleòtids que s'encapsida en virions en forma de vareta formats per subunitats de la proteïna de coberta (CP). Les partícules d'aquest virus són molt estables i es transmeten molt eficientment a plantes de tomaca i altres espècies hortícoles d'interès agronòmic provocant importants pèrdues en els cultius. Existeixen gens de resistència contra aquest virus, però en la natura apareixen contínuament variants de seqüència virals amb la capacitat de superar-la. Els tobamovirus es caracteritzen per envair els seus hostes amb gran rapidesa i produir enormes quantitats de les seues CP en els teixits infectats. Aquestes propietats converteixen el ToMV en un virus molt interessant com a punt de partida per generar un vector d'expressió de proteïnes en tomaca, aprofitant així la seua capacitat de moviment en l'hoste i la potència del promotor subgenòmic que produeix l'ARN missatger de la seua CP.

L'objectiu d'aquest projecte va ser construir un vector d'expressió derivat d'un clon infecció del ToMV i emprar-lo per produir carotenoides, una classe de productes naturals d'interès farmacèutic, nutricional i industrial, en plantes. Els carotenoides, a més, com que són compostos acolorits actuen com a reporters que permeten el seguiment visual de la infecció viral. Primer es va construir un clon recombinant viral en el que un ADN còpia que codificava la fitoé sintasa (*crtB*) de la bactèria *Pantoea ananatis* va substituir la major part de la CP del ToMV. En aquest clon viral la *crtB* s'expressava a partir del promotor de la CP del virus. Els teixits de *Nicotiana benthamiana* infectats per aquests virus mostraren una forta coloració groga als pocs dies postinoculació. Tanmateix, la pigmentació groga no es va estendre més enllà del teixit infiltrat, ja que al manca-li la CP el virus era incapaç d'envair la planta a nivell sistèmic. A continuació, partint d'aquest clon viral, es va inserir el gen de la CP (incloent el seu promotor) i la major part de la regió 3' no traduïda d'un altre tobamovirus, el virus del mosaic del tabac, per darrere de la *crtB*. La inoculació de plantes de *N. benthamiana* amb aquest segon clon viral recombinant va provocar una forta pigmentació groga al teixit inoculat però també en fulles superiors no inoculades, indicant que aquest virus sí era capaç de moure's sistèmicament.

En conclusió, en aquest treball s'ha construït un clon viral derivat del ToMV que, per una banda, permet seguir visualment la infecció viral, fet que ajudarà a investigar la biologia del virus i a cercar nous gens de resistència i, per altra banda, és una ferramenta biotecnològica que permet produir grans quantitats de carotenoides en teixits vegetals.

**Paraules clau**

Virus de plantes, tomaca, ToMV, vector d'expressió, virus recombinant, carotenoides

**Dades del treball**

Autora del treball: Glòria Martínez Llidó

Localitat i data: València, juliol 2016

Cotutor extern: Dr. José Antonio Darós Arnau

Tutor U.P.V.: Prof. Dr. Carmelo López Del Rincón



**Título: Desarrollo de un vector de expresión en plantas derivado del virus del mosaico del tomate.**

**Resumen**

El virus del mosaico del tomate (ToMV; genero *Tobamovirus*, familia *Virgaviridae*) consiste en un ARN genómico de aproximadamente 6400 nucleótidos que se encapsida en viriones en forma de varilla formados por subunidades de la proteína de cubierta (CP). Las partículas de este virus son muy estables y se transmiten muy eficientemente a plantas de tomate y otras especies hortícolas de interés agronómico, provocando importantes pérdidas en los cultivos. Existen genes de resistencia contra este virus, pero en la naturaleza aparecen continuamente variantes de secuencia virales con la capacidad de superarla. Los tobamovirus se caracterizan por invadir sus huéspedes con gran rapidez y producir enormes cantidades de sus CP en los tejidos infectados. Estas propiedades convierten al ToMV en un virus muy interesante como punto de partida para generar un vector de expresión de proteínas en tomate, aprovechando así su capacidad de movimiento en el huésped y la potencia del promotor subgenómico que produce el ARN mensajero de su CP.

El objetivo de este proyecto fue construir un vector de expresión derivado de un clon infeccioso del ToMV y utilizarlo para producir carotenoides, una clase de productos naturales de interés farmacéutico, nutricional e industrial, en plantas. Los carotenoides, además, como son compuestos coloreados actúan como reporteros que permiten el seguimiento visual de la infección viral. Primero se construyó un clon recombinante viral en el que un ADN copia que codificaba la fitoeno sintasa (*crtB*) de la bacteria *Pantoea ananatis* sustituyó la mayor parte de la CP del ToMV. En este clon viral la *crtB* se expresaba a partir del promotor de la CP del virus. Los tejidos de *Nicotiana benthamiana* infectados por este virus mostraron una fuerte coloración amarilla a los pocos días postinoculación. Pero la pigmentación amarilla no se extendió más allá de los tejidos infiltrados, ya que al carecer de la CP el virus era incapaz de invadir la planta a nivel sistémico. A continuación, a partir de este clon viral, se insertó el gen de la CP (incluyendo su promotor) y la mayor parte de la región 3' no traducida de otro tobamovirus, el virus del mosaico del tabaco, por detrás de la *crtB*. La inoculación de plantas de *N. benthamiana* con este segundo clon viral recombinante provocó una fuerte pigmentación amarilla en el tejido inoculado y también en hojas superiores no inoculadas, indicativo de que este virus sí era capaz de moverse sistémicamente.

En conclusión, en este trabajo se ha construido un clon viral derivado del ToMV que, por una parte, permite seguir visualmente la infección viral, hecho que ayudará a investigar la biología del

**Palabras clave**

Virus de plantas, tomate, ToMV, vector de expresión, virus recombinante, carotenoides

**Datos del trabajo**

Autora del trabajo: Glòria Martínez Llidó

Localidad y fecha: Valencia, julio 2016

Cotutor externo: Dr. José Antonio Darós Arnau

Tutor U.P.V.: Prof. Dr. Carmelo López Del Rincón



**Title: Development of an expression vector in plants derived from the tomato mosaic virus.**

**Abstract**

Tomato mosaic virus (ToMV; genus *Tobamovirus*, family *Virgaviridae*) consists of a genomic RNA of about 6400 nucleotides which is encapsidated in virions formed by the coat protein (CP). The particles of this virus are very stable and they are transmitted very efficiently to tomato plants and other horticultural species of agronomic interest, causing significant crop losses. There are resistance genes against this virus, but in nature viral sequence variants with the ability to overcome it continuously appear. Tobamoviruses are characterized by invading their guests very quickly and by producing huge amounts of their CP in infected tissues. These properties make the ToMV a very interesting virus as a starting point to generate a protein expression vector in tomato, exploiting their movement in the host and their powerful subgenomic promoter to produce the CP messenger RNA.

The objective of this project was to construct an expression vector derived from an infectious clone of ToMV and to use it to produce carotenoids in plants. Carotenoids are natural products of pharmaceutical, nutritional and industrial interest. Furthermore, as carotenoids are coloured compounds, they can act as reporters that allow visual monitoring of viral infection. In brief, a copy DNA encoding phytoene synthase (*crtB*) of the bacterium *Pantoea ananatis* was used to replace most of the CP sequence of ToMV, allowing expression under the virus CP promoter control. *Nicotiana benthamiana* tissues infected with this viral construction showed strong yellow colouration within a few days after inoculation. The yellow pigmentation did not spread beyond infiltrated tissues, since the virus CP was missing and the virus was unable to invade the plant systemically. Next, the CP gene (including its promoter) and most of the 3' untranslated region of another tobamovirus, tobacco mosaic virus, was inserted downstream the *crtB* sequence in the viral construct. Inoculation of *N. benthamiana* plants with this second recombinant viral clone caused a strong yellow pigmentation in the inoculated tissue, but also in non-agroinoculated upper leaves. This results show that the virus itself was able to move systemically.

In conclusion, a viral clone derived from ToMV has been constructed that allows following visually the viral infection, which will help to study the biology of the virus and to screen for new resistance genes, and also offers a biotechnology tool to produce large amounts of carotenoids in plant tissues.

**Key words**

Plant viruses, tomato, ToMV, expression vector, recombinant virus, carotenoids

**Project data**

Project author: Glòria Martínez Llidó  
Place and date: Valencia-July 2016  
External co-tutor: Dr. José Antonio Darós Arnau  
U.P.V. tutor: Prof. Dr. Carmelo López Del Rincón

# ÍNDIX DE CONTINGUTS

<b>I. INTRODUCCIÓ</b> .....	1
I.I. Virus de plantes .....	1
I.II. Tobamovirus .....	6
I.III. Virus del mosaic de la tomaca .....	8
I.IV. Clons infecciosos de virus .....	10
I.V. Gens reporters .....	11
I.VI. Carotenoides i fitoé sintasa .....	12
<b>II. OBJECTIUS</b> .....	14
<b>III. MATERIALS I MÈTODES</b> .....	15
III.I. Plasmidis .....	15
III.I.I. pGToMV-Ara .....	15
III.I.II. pGEM-T Easy .....	15
III.I.III. pG53crtB .....	15
III.I.IV. pGTMV .....	15
III.II. Amplificació d'ADN per la PCR .....	15
III.III. Digestió de plasmidis .....	17
III.IV. Electroforesi en gel d'agarosa .....	17
III.V. Purificació d'àcids nucleics a partir d'un gel d'agarosa .....	17
III.VI. Lligació .....	18
III.VII. Acoblament Gibson .....	18
III.VIII. Purificació d'àcids nucleics en solució .....	18
III.IX. Transformació de cèl·lules competents per electroporació .....	18
III.X. Creixement de cèl·lules en medi de cultiu sòlid .....	19
III.XI. Creixement de colònies aïllades en medi de cultiu líquid .....	19
III.XII. Extracció ràpida de plasmidis per a anàlisi electroforètic .....	19
III.XIII. Purificació de plasmidis .....	19
III.XIV. Quantificació d'ADN .....	20
III.XV. Agroinoculació de plantes .....	20
III.XVI. Seqüenciació .....	20
<b>IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ</b> .....	21
IV.I. Digestió dels plasmidis pGToMV-Ara i pGEM-T Easy i lligació dels fragments ..	21
IV.II. Mutació de la ATG de la CP del ToMV a AGA .....	22

IV.III. Inserció de l'ADNc de la crtB en el clon viral.....	24
IV.IV. Inserció del promotor de la CP, l'ADNc de la CP i la 3' no traduïda (UTR) del virus del mosaic del tabac (TMV) darrere de la crtB .....	26
IV.V. Inoculació de plantes .....	31
<b>V. CONCLUSIONS</b> .....	34
<b>VI. BIBLIOGRAFIA</b> .....	36

## ÍNDIX DE FIGURES I TAULES

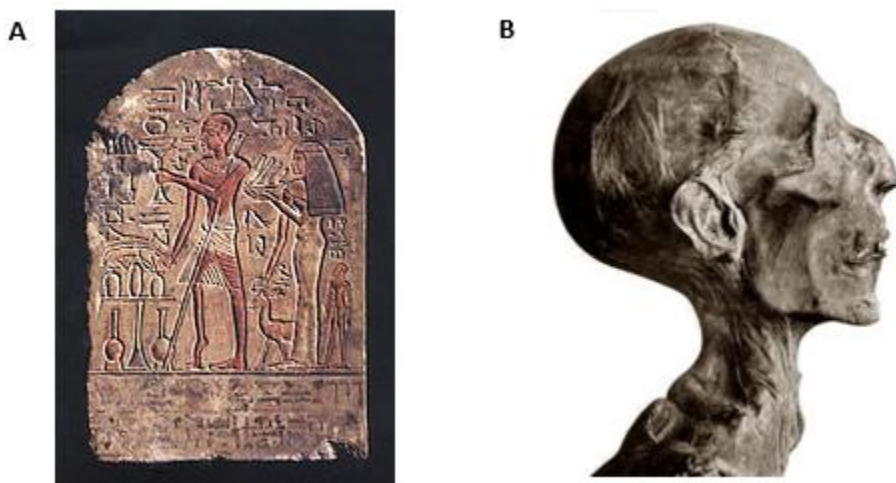
<b>Figura 1.</b> A) Pedra tallada en una tomba durant la XVIII Dinastia Egípcia (1400 a. C.). (B) Mòmia de Ramsés V, el segle XII a. C., que presenta símptomes de la verola .....	1 6
<b>Figura 2.</b> Esquema de l'organització genètica dels tobamovirus .....	7
<b>Figura 3.</b> Diagrama de l'organització dels tobamovirus .....	9
<b>Figura 4.</b> Simptomatologia del ToMV en fulles i fruits de tomaca .....	13
<b>Figura 5.</b> Ruta de biosíntesi dels carotens .....	
<b>Figura 6.</b> (A) Anàlisi electroforètic de la digestió NcoI-SphI dels plasmidis pGToMV-Ara i pGEM-T Easy. (B) Esquema del marcador de pesos moleculars d'1 kpb .....	21 22
<b>Figura 7.</b> Separació electroforètica dels plasmidis resultants de la lligació del fragment NcoI-SphI de ToMV i el pGEMT-Easy .....	23
<b>Figura 8.</b> Electroforesi amb els productes de PCR del canvi d'ATG a AGA en la CP del ToMV .....	23
<b>Figura 9.</b> Gel d'agarosa amb els plasmidis pGEM-ToMV mutagenitzats .....	24
<b>Figura 10.</b> Electroforesi amb els productes de PCR resultants de l'amplificació pGEM-ToMV mutagenitzat i la crtB .....	25
<b>Figura 11.</b> Anàlisi electroforètic de la construcció pGEM-ToMV-crtB .....	
<b>Figura 12.</b> (A) Anàlisi electroforètic de la digestió amb NcoI i SphI del plasmidi pGToMV-Ara i el plasmidi pGEM-ToMV-crtB. (B) Gel d'electroforesi de les digestions analítiques dels plasmidis pGToMVΔCP-crtB amb NcoI i SphI .....	26 27 28
<b>Figura 13.</b> Anàlisi electroforètic dels productes de PCR resultants de l'amplificació del plasmidi pGEM-ToMV 2 i el plasmidi pGTMV .....	28 29

<b>Figura 14.</b> Anàlisi electroforètic de la construcció pGEM-ToMV-3'	30
.....	
<b>Figura 15.</b> Anàlisi electroforètic dels productes de PCR de l'amplificació dels plasmidis pGEM-ToMV-3' (A) i pGEM-ToMV-crtB mutagenitzat (B)	30
.....	
<b>Figura 16.</b> Anàlisi electroforètic de la construcció pGEM-ToMV-crtB-3'	31
.....	
<b>Figura 17.</b> Anàlisi electroforètic de la digestió amb NcoI i SphI del plasmidi pGToMV- Ara i el plasmidi pGEM-ToMV-crtB-3'	32 11
.....	16
<b>Figura 18.</b> (A) Anàlisi electroforètic de la construcció pGToMV $\Delta$ CP-crtB-3'. (B) Anàlisi electroforètic de les digestions analítiques del plasmidi pGToMV-crtB amb NcoI i SphI....	
<b>Figura 19.</b> Fulla d'una planta de <i>N. benthamiana</i> agroinoculada amb ToMV $\Delta$ CP-crtB als 12 dpi (A), als 14 dpi (B) i als 16 dpi (C).....	
<b>Figura 20.</b> Fulla d'una planta de <i>N. benthamiana</i> agroinoculada amb ToMV-crtB als 8 dpi, (A) i als 13 dpi (B)	
.....	
<b>Taula 1.</b> Comparació de gens reporters comunament utilitzats	
.....	
<b>Taula 2.</b> Encebadors utilitzats per a les amplificacions dels diferents fragments d'ADN	
..	

# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. Virus de plantes

Els sers vius habiten envoltats de virus i els genomes virals s'han incorporat al material genètic de molts organismes degut a que són capaços d'infectar totes les coses vives. Les estimacions de l'evolució molecular situen alguns virus entre els dinosaures, encara que probablement han evolucionat des de molt abans. L'existència de virus ja es va fer patent en l'antiguitat com es demostra en múltiples representacions (Figura 1). Fins al naixement de la Virologia es desconeixien les causes de moltes malalties tant animals com vegetals que ara se sap que són provocades per virus. Tanmateix, possiblement la gran majoria dels virus tenen un nul o irrellevant efecte sobre l'hoste.



**Figura 1.** (A) Pedra tallada en una tomba durant la XVIII Dinastia Egípcia (1400 a. C.) on s'observa la simptomatologia de la poliomièlitis paralítica. (B) Mòmia de Ramsés V, el segle XII a. C., que presenta símptomes de la verola.

A finals del segle XIX es va descriure la malaltia vegetal coneguda com a mosaic del tabac (Zaitlin, 1998). En 1892, el científic rus Dmitrii Ivanovsky observà que aquesta malaltia estava causada per un agent capaç de passar a través de filtres de porcellana però va atribuir la seua causa a una toxina bacteriana. No va ser fins 1898 quan el microbiòleg holandès Martinus Beijerinck va demostrar l'existència d'un nou agent infecciós amb la identificació del virus del mosaic del tabac (TMV). Va comprovar que aquest agent tenia una mida molt menuda, es podia aïllar a partir dels extractes filtrats de plantes infectades o per difusió a través d'agar i era capaç d'infectar altres plantes sanes, encara que no era cultivable. En 1935 el bioquímic Wendell Meredith Stanley va cristal·litzar el TMV i va visualitzar la seua estructura. Amb el desenvolupament del microscopi electrònic a la dècada de 1940 es van poder observar



directament els virus i es van establir les seues formes i mides. El desenvolupament de centrífugues d'alta velocitat va permetre la seua concentració i purificació, alhora que el desenvolupament de mètodes de cultiu de cèl·lules van suposar un suport per a la investigació de la replicació viral al laboratori.

Des de llavors s'han descrit un gran número de virus en plantes, animals, fongs i bacteries. Realment l'origen dels virus encara roman desconegut, entre altres causes perquè no hi ha registres fòssils. Tot i això, existeixen tres teories que no són mútuament excloents: diferents línies de virus poden haver tingut diferents orígens. Segons la "Teoria de la Regressió", els virus provenen d'un microorganisme paràsit obligatori que ha sofert una pèrdua gradual de components cel·lulars, fins a dependre de la cèl·lula hoste. La "Teoria de l'Origen Cel·lular" explica que els virus procedeixen de fragments d'àcids nucleics que van escapar d'una cèl·lula original, transferint-se a altra cèl·lula d'una espècie diferent on, per causes desconegudes, no són degradats. La "Teoria de la Coevolució" es basa en el fet de que els virus són un dels factors principals per a que es produeixin bots evolutius. Per tant, els virus coevolucionen amb els seus organismes hostes perquè requereixen de la seua supervivència per sobreviure ells mateixos. A banda d'aquestes teories, hi ha quatre aspectes principals de l'evolució dels virus que cal tindre en compte: donen lloc a una progènie molt abundant, s'originen un gran número de mutants, existeixen els efectes de quasi-espècie (els virus són distribucions dinàmiques de replicons no idèntics però relacionats) i té lloc una selecció de les poblacions virals més aptes.

Els virus són paràsits intracel·lulars obligats, agents no cel·lulars que necessiten la maquinària d'una cèl·lula hoste per reproduir-se. No es repliquen per divisió, sinó per acoblament dels seus components, i requereixen un període de latència per formar i acoblar les diferents parts. No són capaços de produir energia per sí mateixos. No són actius fora dels seus hostes i per a ser transportats requereixen de vectors. La forma més simple de virus està formada per un àcid nucleic envoltat d'una coberta proteica (càpsida), que pot estar protegida per un embolcall lipoproteic (Gergerich i Dolja, 2006). Són els organismes coneguts més menuts encara que la seua mida i forma varia molt entre espècies; el diàmetre típic d'un virus vegetal esfèric és aproximadament de 30 nm. Segons l'arquitectura de les partícules virals es poden diferenciar dos grans grups arquitectònics de virus. Els virus amb simetria helicoidal poden tindre forma de vara rígida o filaments flexuosos i l'àcid nucleic, molt organitzat, pren la mateixa conformació helicoidal que la càpsida proteica. En canvi, en els virus icosaèdrics l'àcid nucleic està parcialment organitzat i adquireix forma d'esfera.

El genoma víric està compost per un sol tipus d'àcid nucleic, ja siga ADN o ARN, i existeix una major varietat que en la resta d'organismes. Es troba empaquetat per poder ser transmès de cèl·lula a cèl·lula. Conté la informació necessària per iniciar i completar el cicle infecciós a l'interior cel·lular, codificant qualsevol procés que la cèl·lula infectada no siga capaç de proporcionar-li. Tots els virus han de sintetitzar l'ARN missatger (ARNm) per a que la informació genètica pugui ser traduïda pels ribosomes de la cèl·lula hoste. De forma general els virus segueixen un cicle per reproduir-se. La penetració cel·lular està precedida d'una fase de fixació o absorció. Una vegada a l'interior, la càpsida vírica es degrada i s'allibera l'àcid nucleic. L'objectiu del virus és realitzar múltiples còpies del genoma i sintetitzar les proteïnes de la càpsida per formar la progènie viral. Després de la replicació té lloc l'acoblament i l'alliberació dels nous virions.

Amb el temps es va fer necessari l'establiment d'una classificació per descriure la diversitat dels virus, assignant-los noms i agrupant-los segons les seues semblances. Els virus es poden classificar en base a la seua morfologia, relacions filogenètiques, criteris serològics o epidemiològics... Però actualment la classificació més utilitzada és una combinació entre el sistema de classificació del ICTV (Comitè Internacional de Taxonomia de Virus) i el sistema de classificació de Baltimore. El biòleg David Baltimore, Premi Nobel de Fisiologia o Medicina en 1975, va establir una classificació dels virus basada en el mecanisme de producció del ARNm. Es diferencien set grups:

- I. Virus de DNA de doble cadena (ANDdc). Necessiten un ARN que actue com a intermediari per a la seua replicació. És una categoria poc nombrosa i entre els virus de plantes sols s'inclou la família *Caulimoviridae*.
- II. Virus de DNA de cadena senzilla (ADNsc). Requereixen de un dsDNA intermediari per a la seua replicació. Els de les plantes pertanyen a la família *Geminiviridae*, important per les seues conseqüències agrícoles arreu del món.
- III. Virus de RNA de doble cadena (ARNsc). La família més extensa d'aquesta categoria és la família *Reoviridae*.
- IV. Virus de RNA de cadena senzilla positiva (ARNsc+). Inclouen la majoria de virus de plantes, destacant les famílies *Bromoviridae*, *Closteroviridae*, *Luteoviridae* i *Potyviridae* per la seua importància econòmica.
- V. Virus de RNA de cadena senzilla negativa (ARNsc-). Compren importants famílies com *Bunyaviridae* i *Rhabdoviridae*.

- VI. Virus de RNA de cadena senzilla amb retrotranscriptasa (ARNsc-RT). Es repliquen a través d'un intermediari de DNA mitjançant una transcriptasa reversa. Aquesta categoria està representada per la família *Retroviridae*. No està representada entre els virus de plantes.
- VII. Virus de DNA de doble cadena amb retrotranscriptasa (ADNdc-RT). La doble cadena de DNA es troba fragmentada, per això requereix de l'acció d'una transcriptasa reversa per a la replicació del genoma, formant l'ARN intermediari a partir del motlle d'ADN. Inclou famílies importants com *Hepadnaviridae*. Tampoc hi ha virus de plantes d'aquets grup.

Històricament, els virus s'han concebut com una amenaça a la salut humana, animal i vegetal. El motiu principal d'estudi dels virus vegetals és l'impacte negatiu que poden causar les malalties virals sobre el rendiment i la qualitat dels cultius. Però la comprensió de les interaccions virus-hoste ha permès el desenvolupament de ferramentes biomèdiques i biotecnològiques derivades de virus. Aquestes s'empren actualment per a la identificació de bacteries patògenes, com una font d'enzims, per exemple la transcriptasa inversa dels retrovirus, com a pesticides (baculovirus) o control de plagues (myxoma), i permeten la construcció de vectors genètics per a la producció de proteïnes d'interès en plantes (Pogue *et al.*, 2002) o vectors genètics per al tractament de malalties genètiques.

La infecció viral de les cèl·lules vegetals és diferent a la de les cèl·lules animals. Com que les plantes tenen una paret cel·lular composta de cel·lulosa, els virus sols poden penetrar en les cèl·lules quan té lloc una ruptura d'aquesta paret cel·lular. Es requereix una major concentració de virus per realitzar la infecció. Tanmateix, organismes vectors, com artròpodes nematodes o fongs, poden actuar com a vectors molt eficients en la transmissió de virus de plantes. Una vegada en l'interior de la planta els virions passen d'unes cèl·lules a altres a través dels plasmodesmes. Alguns virions són transportats de forma passiva pel floema, movent-se grans distàncies dins de la planta. En els meristemes, regions de creixement molt actiu, els virus no són capaços d'estendre's.

Els virus de plantes són els causants d'importants reduccions en la qualitat i rendiment dels cultius. Alguns exemples significatius són el virus de l'inflament dels brots de cacau (*Cacao swollen shoot virus*) (Bailey *et al.*, 2001), la infecció de l'arròs pel virus de la tungro de l'arròs (*Rice tungro virus*) (Hull, 2002), o el virus del marciment tacat de la tomaca (*Tomato spotted wilt virus*) (Hull, 2002). El resultat de la infecció viral és una reducció del creixement vegetal, disminució del rendiment, menor qualitat i pèrdues econòmiques. Com que no existeixen

compostos antivirals per curar les malalties en plantes, un dels objectius principals dels agricultors i patòlegs vegetals és el desenvolupament de mesures de control eficients, i el primer pas és la identificació del virus. Els mètodes tradicionals de prevenció inclouen l'eliminació dels reservoris de virus circumdants, el control del vector del virus, la modificació de les pràctiques agrícoles o l'ús de materials certificats com a lliures de virus. Una estratègia alternativa és la utilització de resistència a la infecció viral mitjançant procediments de millora tradicional, però les varietats resistents obtingudes no sempre aporten els resultats esperats i necessiten molt de temps per al seu desenvolupament. Finalment, la protecció de la planta també es pot realitzar per protecció creuada. És a dir, amb la inoculació d'una soca poc virulenta del virus per minvar la posterior infecció per altra soca més nociva. Però aquesta és una tècnica costosa tant tècnica com econòmicament, que presenta problemes associats a la variabilitat en la virulència a l'infectar diferents cultius (Scholthof *et al.*, 1993).

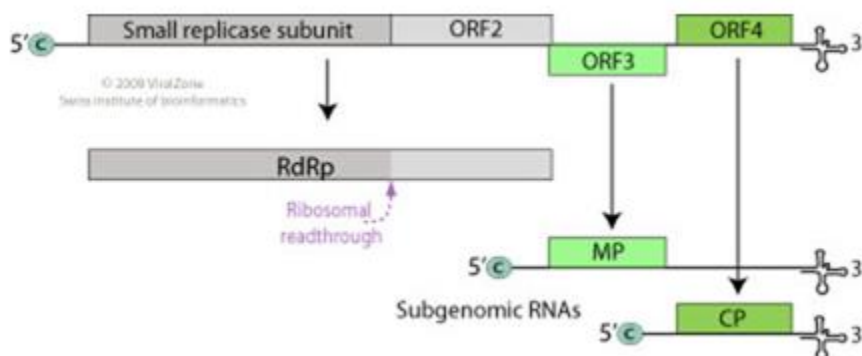
El desenvolupament de la biologia molecular i les tècniques biotecnològiques ha permès la producció de plantes transgèniques resistents a virus, obrint el ventall de possibilitats de tractament d'aquestes malalties. La resistència es pot introduir per diferents estratègies (Scholthof *et al.*, 1993), bé amb la identificació i introducció dels gens de resistència en plantes silvestres, bé amb el disseny de ARN antisentit per provocar silenciament, bé amb l'expressió de proteïnes de la càpsida del virus. A pesar d'això, la gran variabilitat en la interacció virus-hoste impedeix la utilització d'un protocol únic i general. D'altra banda, a pesar de les grans oportunitats que ofereix l'enginyeria genètica, l'obtenció de noves varietats a través dels nous mètodes biotecnològics avança amb una menor rapidesa del que cabria esperar. Existeixen controls i regulacions estrictes per a la seua aprovació degut en gran part a la percepció negativa de la societat cap als organismes modificats genèticament, més en concret quan van dirigits a l'alimentació humana o animal. Com a conseqüència, actualment és necessària la combinació de les tècniques biotecnològiques amb les tècniques tradicionals.

A més a més, els virus vegetals també poden ser molt útils com a ferramenta biotecnològica dirigida a la producció de proteïnes en plantes. Alguns exemples d'aplicacions són la producció de vacunes humanes i animals en plantes, la producció de nanopartícules mitjançant proteïnes de la càpsida o l'ús de virus com a vectors per a l'expressió transitòria de proteïnes (Scholthof *et al.*, 1996; Bashir, 2007; Lomonossoff *et al.*, 2011).

## 1.2. Tobamovirus

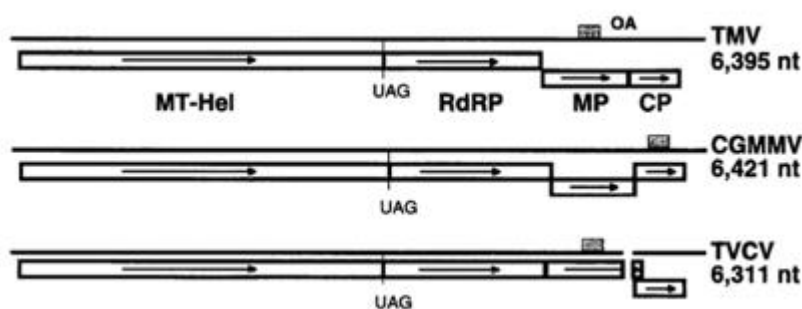
Els tobamovirus (gènere *Tobamovirus*, família *Virgaviridae*) són virus vegetals que infecten un ampli rang d'hostes, incloent alguns importants cultius agrícoles com la creïlla, tomaca o carabassa (cucurbitàcies en general) o diferents espècies del tabac, molt emprades en investigació. Actualment hi ha 35 espècies identificades dins d'aquest gènere. S'ha proposat que han evolucionat per co-divergència (Gibbs, 1999; Lartey *et al.*, 1996), és a dir, la seua diversificació és deguda en gran part a l'associació dels virus amb els seus hostes durant la divergència i proliferació d'aquests últims.

El genoma dels tobamovirus està format per una cadena simple d'ARN de sentit positiu, no segmentat. És lineal, amb una longitud al voltant de 6.3-6.5 kb. Els virions tenen forma de vareta i la proteïna de coberta (CP) té aproximadament 18 nm de diàmetre i 300-310 nm de longitud. La molècula d'ARN té a l'extrem 3' una estructura similar a un ARN de transferència (ARNt). El genoma codifica per a quatre o cinc polipèptids. Dos d'ells es tradueixen a partir del codó d'inici present a l'extrem 5' i estan relacionats amb la replicació. El polipèptid més llarg forma mitjançant la supressió de la terminació en el codó UAG situat prop del centre del genoma (Beier *et al.*, 1984); el més curt conté motius identificats com a una metiltransferasa (MT), participa en l'addició de la caputxa a l'extrem 5' i té acció helicasa (Hel) (Hodgman, 1988; Gorbalenya i Koonin, 1989; Rozanov, Koonin, i Gorbalenya, 1992). A més a més, el polipèptid més llarg conté els motius que identifiquen el domini C-terminal com una ARN polimerasa dependent d'ARN (RdRp) (Koonin, 1991). L'extrem 3' del genoma dels tobamovirus codifica el polipèptid necessari per al moviment intracel·lular del virus (proteïna de moviment, MP) i el polipèptid CP (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema de l'organització genètica dels tobamovirus.

Segons la ubicació genòmica de l'origen de l'acoblament del virió es difere ncien dos subgrups de tobamovirus (Figura 3) (Fukuda *et al.*, 1981). El subgrup 1, que afecta majoritàriament a solanàcies, té l'origen d'acoblament dins del marc de lectura oberta (ORF) de la MP. En el subgrup 2, al qual pertanyen el *Sunn-hemp mosaic virus* (SHMV) i el *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), l'origen es troba en l'extrem 3', en la ORF que codifica la CP (Fukuda *et al.*, 1981). Aquesta subdivisió dels tobamovirus ha sigut recolzada posteriorment amb altres anàlisis, com els anàlisis filogenètics, però les comparacions de les seqüències de nucleòtids i la diferent organització de les ORFs de la MP i la CP suggereixen que existeix un tercer subgrup de tomabovirus (Aguilar *et al.*, 1996). Aquest suggeriment recolza la hipòtesi de que els tomabovirus tenen un origen antic i han evolucionat per codivergència amb els seus hostes.



**Figura 3.** Diagrama de l'organització dels tobamovirus. El subgrup 1 està representat pel TMV, el subgrup 2 pel CGMMV i del subgrup 3 pel nom del virus (TVCV). En cadascun d'ells, s'observa la posició relativa de les regions que codifiquen per a l'helicasa (MT-Hel), la RNA polimerasa dependent de RNA (RdRP), la proteïna de moviment (MP) i la proteïna de la càpsida (CP).

Les partícules dels tobamovirus són extremadament estables. Tenen una àmplia gamma d'hostes i han sigut detectats en diversos ambients. No es coneixen insectes vector que el transporten, sinó que la transmissió és mecànica i pot tindre lloc per contacte planta a planta, per la manipulació dels treballadors o per la propagació de la planta (Costello *et al.*, 1999; Spence *et al.*, 2001). Aquesta transmissió té lloc de forma molt eficient entre plantes de tomaca i altres espècies hortícoles d'interès agronòmic, provocant importants pèrdues en els cultius.

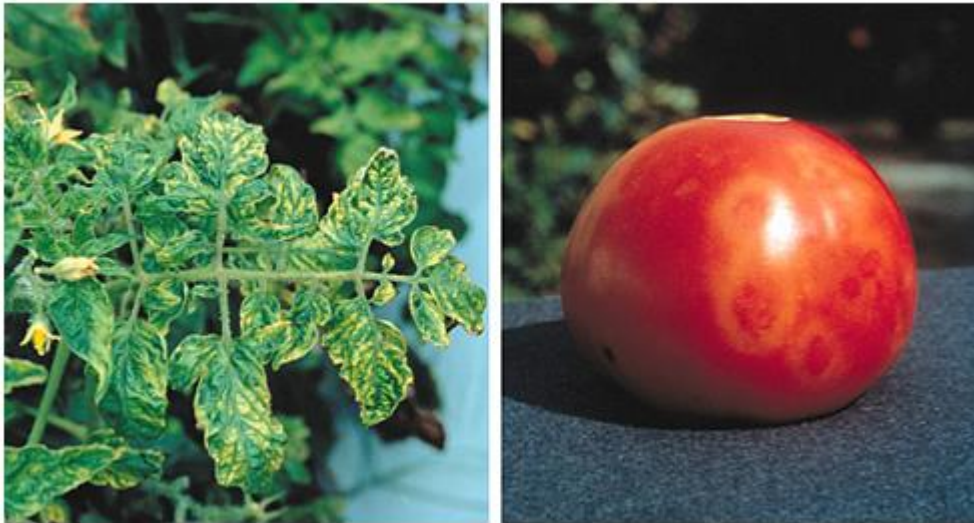
La replicació viral és citoplasmàtica. El virus penetra en la cèl·lula hoste i té lloc la descapsidació i l'alliberament de l'ARN genòmic viral en el citoplasma. L'ARN viral es tradueix per produir les dues proteïnes necessàries per a la síntesi d'ARN (transcripció i replicació). A partir d'aquest ARN motlle se sintetitza un genoma de ARNdc que es replica per proporcionar

nous ARNm virals. La RdRp reconeix els promotors subgenòmics interns de l'ARN de sentit negatiu per transcriure els RNAs subgenòmics, permetent l'expressió de la MP i la CP. L'acoblament de les diferents parts del virus (encapsidació) té lloc al mateix citoplasma. A continuació el virus ix de la cèl·lula hoste a través dels plasmodesmes per començar el moviment cèl·lula a cèl·lula. En aquest procés és important la interacció entre la MP i la pectina metilesterasa, un enzim cel·lular important en el metabolisme de la paret cel·lular i desenvolupament de la planta (Chen *et al.*, 2003). Finalment, quan el virus arriba al teixit vascular, es capaç de viatjar pels vasos floemàtics per a distribuir-se per tota la planta.

### **1.3. Virus del mosaic de la tomaca**

El virus del mosaic de la tomaca (ToMV) pertany al gènere *Tobamovirus*. El seu genoma està compost per una molècula de cadena simple d'ARN en sentit positiu i té 6,4 kb. Constitueix el 5% del virió. Es tracta d'una partícula cilíndrica i rígida que té aproximadament 300 nm de longitud i 18 nm de diàmetre. Inicialment es considerava que era una soca del virus del mosaic del tabac (TMV), però el 1976 es va descriure com un virus diferent en base a la seqüència del genoma viral, gamma d'espècies indicadores i afinitats serològiques. El ToMV està distribuït arreu del món. Afecta especialment a cultius de tomaca (Aramburu J. i Galipienso L., 2005), però també a altres espècies cultivades de la família *Solanaceae* (pebrera, tabac, albergínia) i d'altres famílies com *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Rosaceae*, etc. És a dir, el virus afecta una àmplia gamma de cultius i plantes ornamentals. Aquestes últimes inclouen, entre altres, la boca de drac, l'esperó i la calèndula.

A nivell cel·lular es caracteritza per la presència d'inclusions cristal·lines i amorfes en el teixit infectat. Apareixen cristalls hexagonals i agregats de partícules. Els símptomes que presenten els cultius afectats són molt variables en funció de la raça o aïllat, del cultiu, del moment de la infecció i de les condicions ambientals. En tomaca apareix un mosaic amb àrees cloròtiques, verd obscur i verd clar, i els folíols adquireixen forma arrissada o aspecte filiforme. A més, es redueix el rendiment del cultiu. Hi ha una disminució del creixement i de la mida de la planta. Es redueix el número i mida dels fruits, que presenten taques groguenques amb formes irregulars o en forma d'anell. Té lloc una necrosi de les tiges, pecíols, fulles i fruits. En pebrera s'originen mosaics foliars verds clar i grocs en les fulles apicals, hi ha una reducció de la mida de les fulles i apareixen taques necròtiques en tiges. Es produeix abscisió foliar i nanisme de les plantes. En el fruit es produeixen deformacions amb bonys i necrosi.



**Figura 4.** *Sintomatologia del ToMV en fulles i fruits de tomaca.*

No hi ha vectors específics naturals coneguts del ToMV. El virus es transmet essencialment per contacte i l'home és el principal vector. S'introdueix en els cultius a través de les plàntules procedents de llavors contaminades, del sòl contaminat que afecta les arrels (Doolittle, 1928; Broadbent, 1965; Fletcher, 1969) i de restes de plantes infectades. A partir d'aquests focus d'infecció es propaga fàcilment de forma mecànica, ja siga per contacte entre plantes o per les pràctiques agrícoles (Broadbent, 1965, 1965b; Broadbent i Fletcher, 1966). El virus està present en els embolcalls de la llavor i, en menor mesura, en l'endosperma on pot conservar-se fins a 9 anys. No s'ha demostrat la seua presència a l'interior de l'embrió (Taylor *et al.*, 1961; Broadbent, 1965). El percentatge de llavors contaminades varia molt segons els fruits, podent arribar fins a 94% de les llavors contaminades (Van Winckel, 1965). La infecció de les llavors s'origina durant el trasplantament (Broadbent, 1965).

Si la infecció té lloc en les primeres etapes del desenvolupament el seu efecte serà major i el cultiu es vorà més afectat. A més, existeix la possibilitat de que tinguen lloc infeccions juntament amb altres virus com el virus X de la creïlla o el mosaic del cogombre, originant efectes sinèrgics. Amb tot, el coneixement del mecanisme d'infecció i transmissió així com de les seues característiques moleculars és fonamental per a dur a terme estratègies de control. Algunes de les mesures utilitzades per al control d'aquest virus són la realització de pràctiques agrícoles adequades com l'ús de material vegetal sanejat o l'obtenció de varietats resistents mitjançant millora tradicional.



#### 1.4. Clons infecciosos de virus

Un clon infecció és una còpia del genoma d'un virus que s'ha introduït en un plasmidi, o un altre vector, i és capaç de produir una infecció si s'inocula adequadament en la planta hoste. En l'àrea de la investigació tenen múltiples aplicacions. Incloure el genoma del virus en un vector permet la conservació de les seues característiques durant llargs períodes de temps i, entre altres, no afecta a la seua capacitat d'infecció. Aquest fet és important perquè els virus, i més especialment els virus d'ARN, tenen elevades taxes de mutació, és a dir, són molt variables (Wain-Hobson, 1996; Drake i Holland, 1999). Així s'aconsegueix uniformitat en els estudis i homogeneïtat del material en tots els assajos. A banda, la construcció de clons de virus facilita l'estudi del propi clon i de les poblacions virals, la manipulació del mateix virus i la seua amplificació, ja siga per PCR o mitjançant llevats i bacteries (Cuevas *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 2012).

Si es treballa amb un virus d'ARN, el clon estarà format pel plasmidi amb el ADN còpia (ADNc) del virus obtingut a través de transcripció reversa. Aquests constitueixen una ferramenta important per a l'estudi de processos moleculars com la replicació o la interacció entre el virus i l'hoste, i més recentment també són utilitzats en la biotecnologia (Boyer i Haenni, 1994; Yusibov *et al.*, 2000; Marillonnet *et al.*, 2005; Lindbo, 2007). Aquests plasmidis no sempre són estables i poden degenerar-se durant la propagació en bacteries. Un dels motius que expliquen aquesta inestabilitat són la toxicitat dels productes virals expressats en bacteries (Bedoya i Darós, 2010). Aquest fet limita prou el seu ús i és un problema comú en tobamovirus degut a que tenen un genoma d'ARN d'aproximadament 6.5 kb que cal inserir en un plasmidi en forma de ADNc.

Existeixen algunes estratègies per tal d'evitar la síntesi *in vitro* de RNA de tot el genoma viral per a provocar una infecció. Un exemple és l'ús de clons agro-infecciosos (Turpen *et al.*, 1993; Kapila *et al.*, 1997), però sovint apareixen problemes degut a la inestabilitat del plasmidi en la bactèria *Escherichia coli* transformada. Per millorar l'estabilitat d'aquests vectors virals s'ha recorregut a la inserció d'introns per interrompre la seqüència d'ADNc (Johansen, 1996). Així s'evita l'expressió dels productes virals que resulten tòxics en la bactèria però es manté l'expressió del ADNc en la cèl·lula hoste vegetal, ja que aquestes últimes són capaces de processar els introns i donar lloc als productes gènics virals. Aquesta estratègia també

presenta una sèrie de problemes com l'increment de la mida del ADNc o la necessitat de crear via mutagènesi, si no existeixen, els llocs de restricció adequats per a la introducció dels introns i del seu processament correctament en el nucli (Desbiefz *et al.*, 2012). Com a alternativa pot realitzar-se la supressió del gen de la CP viral, fet que contribueix a augmentar l'estabilitat del plasmidi i l'efectivitat del procediment per a l'expressió de proteïnes en plantes (Lindbo, 2007). Altra estratègia consisteix en modificar els gens que codifiquen productes tòxics, alterant la pauta de lectura en les seues zones adjacents (Satyanarayana *et al.*, 2003). Amb aquestes diferents estratègies s'han pogut obtenir resultats eficaços, però les metodologies són costoses, lentes i no es pot predir els seus efectes amb seguretat. Per això, una vegada s'ha construït el clon cal comprovar la seua capacitat d'infecció mitjançant la seua inoculació en plantes. També és necessari verificar que les plantes presenten símptomes d'infecció, encara que cap la possibilitat que, a pesar que el clon siga infecciós, les plantes no presenten la simptomatologia esperada. En aquest cas, és molt útil l'ús de gens reporters. Aquests s'introdueixen en el propi clon, de manera que dona informació sobre la seua capacitat d'infecció.

### 1.5. Gens reporters

Un gen reporter és aquell que codifica un producte que és pot detectar fàcilment. És molt útil per visualitzar esdeveniments associats a la transducció de senyals i a l'expressió gènica. A més, si s'inclou en un clon viral, permet el seguiment de l'expansió d'un virus en l'hoste (Swick *et al.*, 2013). Algunes de les seues característiques més importants poden ser l'elevada fiabilitat i sensibilitat, l'alt rang dinàmic i la possibilitat d'ús a gran escala (Naylor, 1999). Amb els gens reporters es poden fer múltiples estudis. Alguns exemples són estudis de les característiques dels promotors (Dale *et al.*, 2011), la funció i localització d'una determinada proteïna (Giepmans *et al.*, 2006; Lalonde *et al.*, 2008), l'avanç de la infecció viral, la mesura de títol de virus (Gilbert *et al.*, 2000) o la capacitat d'infecció d'aquest (Swick *et al.*, 2013). Existeix una gran varietat de gens reporters i l'elecció de cadascun d'ells dependrà del tipus d'estudi a realitzar (Taula 1).

Gen reporter	Avantatges	Inconvenients
<b><math>\beta</math>-galactosidasa (bacteriana)</b>	Sistema caracteritzat. Estable. Lectures simples.	Activitat endògena

<b>Taula 1. Comparació de gens reporters comunament utilitzats.</b>		sensible. No adequat per a cèl·lules de mamífers.
	analitzar la transcripció en procarïotes.	
<b>Proteïna verda fluorescent (GFP)</b>	No requereix l'addició de substrat. No té activitat endògena.	Requereix modificacions post-transcripcionals. Poc sensible perquè no hi ha amplificació de senyal.

Els factors de transcripció o enzims biosintètics de gens que indueixen la producció de pigments en plantes són molt útils com a marcadors degut a que permeten apreciar la coloració a simple vista. Així doncs, es pot realitzar un anàlisi *in vivo* de la planta sense la necessitat d'instrumentació especialitzada (Bedoya et al., 2012). Un exemple d'aquests marcadors són els factors de transcripció de la ruta dels carotenoides com la fitoeno sintasa procedent de la bactèria *Pantoea ananatis* (Majer et al., 2016).

### 1.6. Carotenoides i fitoé sintasa

Els carotenoides són compostos naturals presents en diverses estructures de plantes i en una gran varietat d'animals, algues, fongs i bactèries. Són tetra-terpens constituïts per múltiples unitats d'isoprens amb un anell de ciclohexà substituït i insaturat en cadascun dels extrems. Són molècules lipofíliques i hidrofòbiques. La seua capacitat d'absorbir llum deriva de la presència de set o més enllaços dobles conjugats que absorbeixen llum visible amb colors que van del groc al roig. Existeixen dos tipus de carotenoides: els carotens, que no contenen oxigen en els seus anells terminals (per exemple  $\beta$ -caroté o licopè), i les xantofil·les, que contenen oxigen en els seus anells terminals (per exemple luteïna) (Armstrong, 1997). En plantes són pigments responsables d'alguns dels colors de les flors i els fruits. En general, els carotenoides realitzen funcions importants en la planta com la protecció contra la foto-oxidació en cèl·lules i teixits, com a pigments accessoris i com a determinants estructurals dels complexos pigment-proteïna en els plastidis (Bartley i Scolnik, 1995). També actuen com a atenuadors dels estats excitats generats durant la fotosíntesi en les clorofil·les i tenen unes fortes propietats antioxidants. Els factors que influeixen en la presència de carotenoides són les condicions de temperatura i intensitat de llum en les pràctiques pre-collita, en l'estat de maduració i en les operacions de processat i conservació.

Com que els carotenoides són pigments, la utilització d'enzims de la seua ruta de biosíntesi com a gens reporters permet el seguiment a simple vista de la infecció viral sense necessitat d'instrumentació especialitzada (Majer et al., 2016). La fitoé sintasa és l'enzim que catalitza la conversió de pirofosfat de geranilgeranil a fitoeno (Cunningham, 2002). El fitoé és un compost intermedi de 40 carbonis i totes les reaccions successives de ruta de biosíntesi de carotenoides involucren la conversió d'aquesta estructura bàsica (Cunningham i Grantte, 1998).

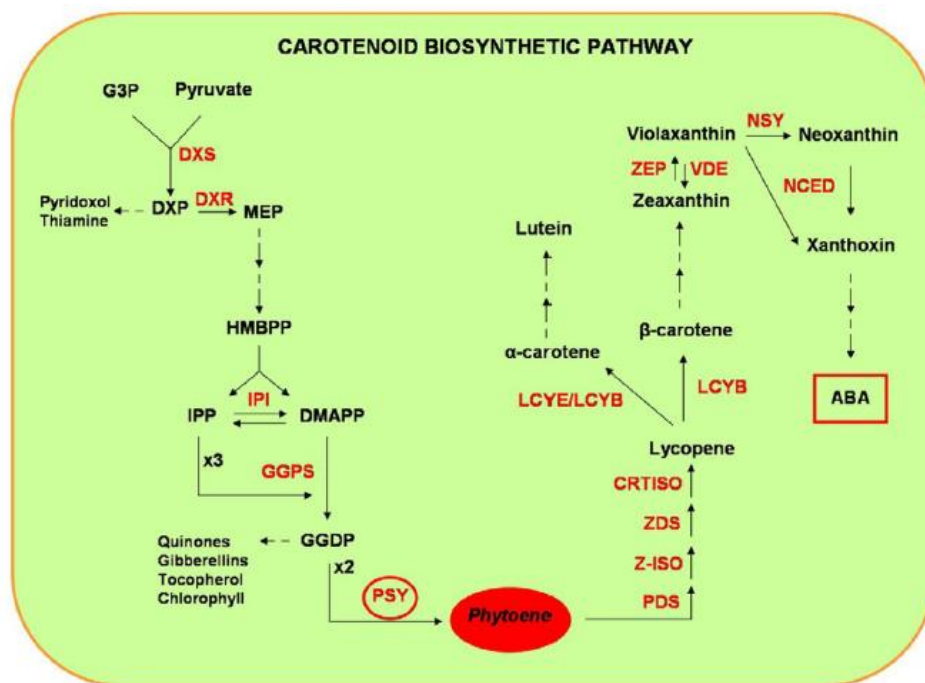


Figura 5. Ruta de biosíntesi dels carotens (Dibari, B. et al., 2012).

La crtB (fitoé sintasa) és un enzim procedent de de la bactèria del sòl *Pantoea ananatis* (Terrier et al., 2001), constituït per 296 aminoàcids. Aquesta bactèria està considerada com un patògen emergent degut a que, a banda de provocar malalties en una àmplia gamma de cultius agrícoles i forestals d'importància econòmica, també és capaç d'infectar els éssers humans. Infecta tant plantes monocotiledònies com dicotiledònies, amb una simptomatologia molt diversa depenent de la localització i de l'hoste afectat (Coutinho i Venter, 2009). La expressió de crtB mitjançant un vector viral en plantes té dos interessos, per una banda augmentar la producció de carotens en el teixit infectat (Fett-Neto, 2010) i per altra, aprofitar

la pigmentació groga com a marcadora de la infecció viral (Majer et al., 2016; enviat a publicar).

## 2. OBJECTIUS

Els clons infecciosos de virus de plantes, com ara el del virus del mosaic de la tomaca (ToMV) poden arribar a ser la base de molts projectes d'investigació i una ferramenta molt útil en biotecnologia vegetal. La clonació del genoma d'un virus de plantes en un plasmidi permet la seua caracterització, conservació, manipulació i utilització de manera més controlada en multitud d'experiments. Partint d'un clon infecció del ToMV, els objectius concrets d'aquest projecte han sigut:

1. Construir un clon recombinant del virus en el que la major part del gen que codifica la proteïna de coberta (CP) ha sigut reemplaçat per un ADN còpia que codifica la fitoé sintasa (crtB) de la bactèria *Pantoea ananatis*.
2. Assajar la producció de carotenoides en teixits de tabac (*Nicotiana benthamiana*).
3. Inserir el gen de la CP i la major part de la regió 3' no traduïda d'un virus homòleg, el virus del mosaic del tabac, en el clon recombinant del ToMV que expressa crtB.
4. Analitzar si el clon viral resultant adquireix la capacitat de moure's sistèmicament en plantes de *N. benthamiana* i analitzar la seua potencial capacitat de produir carotenoides.

### 3. MATERIALS I MÈTODES

#### 3.1. Plasmidis

##### 3.1.1. *pGToMV-Ara*

El *pGToMV-Ara* és un plasmidi binari que conté dos orígens de replicació, per a *Escherichia coli* i per a *Agrobacterium tumefaciens*, i resistència a kanamicina. Davall el control del promotor i terminador 35S del virus del mosaic de la florícol (CaMV) conté un clon infecció d'un aïllat espanyol del virus del mosaic de la tomaca (ToMV). Ha sigut construït recentment al laboratori del Dr. José-Antonio Daròs al IBMCP (València). Per a la seua replicació en *A. tumefaciens* és necessària la presència en la bactèria d'un altre plasmidi auxiliar, *pCLEAN-S48* (Thole *et al.*, 2007). Aquest plasmidi conté gens necessaris per a la replicació i la patogènesi, i presenta resistència a tetraciclina.

##### 3.1.2. *pGEM-T Easy*

El plasmidi que s'utilitzà per clonar un fragment del genoma del ToMV, *pGEM-T Easy* (Promega), és un vector de clonació general que conté resistència a ampicil·lina.

##### 3.1.3. *pG53crtB*

*pG53crtB* conté el ADNc de l'enzim fitoé sintasa (*crtB*) de la ruta biosintètica de licopè en la bactèria *Pantoea ananatis*.

##### 3.1.4. *pGTMV*

És un plasmidi binari que conté un clon infecció del virus del mosaic del tabac (TMV).

#### 3.2. Amplificació d'ADN per la PCR.

Les PCR es realitzen en un volum final de 20 µl en tampó HF, 0.2 µM dNTPs, DMSO al 3%, 25 µM dels encebadors adequats (Taula 2) i 0.4 U de la ADN polimerasa Phusion (Thermo Scientific). A més, s'afegí una quantitat d'ADN motlle d'entre 1 i 50 ng, segons el cas. De forma general, la reacció de PCR s'incubà en un termociclador amb un programa de 30 s a 98°C per a la desnaturalització inicial, seguida de 30 cicles de 10 s a 98°C (desnaturalització), 30 s a 55°C (anellament) i 30 s a 72°C (extensió). Per últim, el programa va incloure 10 min a 72°C per assegurar una correcta extensió dels productes finals. Quan els productes esperats eren de

mes de 2 kpb, s'ajustà un temps d'extensió en funció de la longitud del producte a raó de 15 s per kb.

**Taula 2.** Encebadors utilitzats per a les amplificacions dels diferents fragments d'ADN.

Encebadors	Ús
D2236: 5'-CTATTTAATACGAATCAGAATC-3'	Mutació de la ATG (a AGA) de la CP del ToMV.
D2237: 5'-ATCTTACTCAATCACTTCTCCA-3'	
D2238: 5'-TGACAAAAACACAAATTGC-3'	Amplificació de pGEM-ToMV amb la CP mutada.
D2239: 5'-GCACCTGCATCTTAAATG-3'	
D2240: 5'-gcaatttgtgttttgtcaATGAATAATCCGTCGTTACTCAATCATGC-3	Amplificació de la crtB de <i>P. ananatis</i> .
D2241: 5'-attaagatgcaggtgcTTAGAGCGGGCGCTGCCA-3'	
D2242: 5'-CGAATCCCTCGCTTTTTTACG-3'	Amplificació del vector pGEM-ToMV amb la crtB inserida.
D2243: 5'-GGGTCGGCATGGCATCTC-3'	
D2244: 5'-aaaagcgaggattcgGAAAAAGAGTGATGTCCGCAAAGGG-3'	Amplificació del fragment 3' del genoma del TMV a partir de pGTMV.
D2245: 5'-atgcatgccgaccctGGGCCCTACCGGGGGT-3'	
D2330: 5'-AGCGAAGCCTTCCAGATGATCA-3'	Mutació silenciosa del lloc de restricció NcoI de la crtB.
D2331: 5'-ATGGATGTACGCGAAGCGCAAT-3'	
D2332: 5'-AGCATCGTCCACAATATCGCGA-3'	Mutació silenciosa del lloc de restricció SphI de la crtB.
D2333: 5'-CATGCGGGCCGCTGTTATCTGC-3'	



### **3.3. Digestió de plasmidis**

En general els plasmidis es digeriren amb 10 U (1 µl) de l'enzim de restricció en el tampó de reacció adequat per a cada enzim i aigua fins assolir un volum final de reacció de 20 o 40 µl, segons el cas. Les reaccions s'incubaren 1 h a 37°C.

### **3.4. Electroforesi en gel d'agarosa**

Per analitzar els fragments d'ADN es van realitzar electroforesis en gels d'agarosa 1%. La solució d'agarosa es va preparar afegint 4 g d'agarosa sòlida a 360 ml d'aigua i 40 ml de tampó TAE (x10) (TAE x1 és 40 mM Tris, 20 mM acetat de sodi, 1 mM EDTA), i escalfant la mescla fins a la seua dissolució. Aquesta solució es mantenia líquida en un incubador a 60°C. Depenent del número de mostres a analitzar, es van utilitzar minigels (8x 6.5 x 0.5 cm) o gels més grans (15 x 11 x 0.5 cm). Per a preparar-los, es van abocar sobre el suport 25 o 75 ml de solució d'agarosa i es va deixar refredar en presència del raspall amb els pouets adequats durant 15 min. Després, es va retirar el raspall i es va situar el gel en la cubeta d'electroforesi. Per altra banda, a les mostres se'ls va afegir aproximadament una desena part de tampó de càrrega LB (x10) (50% glicerol, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.0025% blau de bromofenol i 0.0025% xilencianol) i estes es van carregar als pouets. Les electroforesis es corregueren durant 60 min a 75 V en el cas dels minigels o 95 min a 75 V en el cas dels gels de mida mitjana. L'ADN separat en el gel es va detectar mitjançant tinció amb bromur d'etidi i posterior observació amb llum ultraviolada. Els gels es van tenyir col·locant-los en una cubeta de plàstic amb una solució de 1 µg/ml de bromur d'etidi, deixant-los en agitació durant 15 min. Abans de la visualització, el gel es va llavar tres vegades amb aigua.

### **3.5. Purificació dels àcids nucleics a partir d'un gel d'agarosa**

Per a la purificació dels fragments d'ADN separats en els gels d'agarosa s'utilitzà un estoig de la casa comercial Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research). Els fragments del gel amb l'ADN d'interès es tallaren amb un bisturí emprant llum ultraviolada i es traspasaren a un tub Eppendorf d'1.5 ml. Es pesaren i s'afegiren tres volums de tampó de dissolució d'agarosa (ADB). S'incubaren a 55°C durant 5-10 minuts amb la finalitat de que el gel quedara totalment dissolt i poder passar la mescla per una columna de gel de silici situada sobre un tub Eppendorf de 2 ml. Amb aquesta finalitat, es va centrifugar durant 10 s a 13000 rpm i es va descartar el filtrat. A continuació es llavà la columna afegint 200 µl de tampó de llavat (WB), centrifugant

10 s a 13000 rpm i retirant el filtrat. El llavat es va repetir però aquesta vegada amb 30 s de centrifugació per posteriorment traspasar la columna a un nou tub Eppendorf de 1.5 ml. Finalment, l'ADN retingut en la columna es va eluir en un volum adequat de tampó d'elució (TEL, 10 mM Tris-HCl pH 8.5) incubant durant 1 min a temperatura ambient i centrifugant 1 min a 13000 rpm. La quantitat de TEL utilitzada en l'elució va dependre del volum de l'eluit requerit en els passos posteriors.

### **3.6. Lligació**

Les reaccions de lligació d'ADN es dugueren a terme en un volum final de 20 o 40 µl, segons el cas, amb 5 U de T4 ADN lligasa (Thermo Scientific) en 40 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT i 0.5 mM ATP. Les reaccions es van incubar durant 1 h a 22°C.

### **3.7. Acoblament Gibson**

La reacció Gibson d'acoblament de fragments d'ADN es va realitzar afegint un volum de la Gibson Assembly Master Mix (x2) (New England Biolabs) a la mescla d'ADNs. Les reaccions s'incubaren durant 1 h a 50°C.

### **3.8. Purificació d'àcids nucleics en solució**

Una vegada realitzades algunes reaccions, per purificar l'ADN es van afegir 100 µl de DNA Binding Buffer (DBB) a la reacció, es va traspasar a una columna de gel de silici (Zymo Research) i se centrifugà 10 s a 13000 rpm. Una vegada descartat el filtrat, s'afegiren 200 µl de WB i se centrifugà durant 10 s, descartant de nou el filtrat. El llavat es va repetir amb 200 µl de WB però centrifugant 30 s. A continuació, la columna es va traspasar a un nou tub Eppendorf de 1.5 ml. S'incubà 1 min en TEL, se centrifugà 1 min i es recollí l'eluit. La quantitat de TEL emprada per a eluir va dependre de l'ús posterior de l'ADN. En el cas de la purificació d'ADN per a posterior electroporació, es va seguir el mateix protocol però realitzant un llavat addicional amb 200 µl d'etanol 80% i eluint amb 8 µl de TEL (x0.1, 1 mM Tris-HCl pH 8.5).

### **3.9. Transformació de cèl·lules competents per electroporació**

Per transformar bacteries amb plasmidis s'afegiren 8 µl del producte de les lligacions, prèviament purificat, a 40 µl de cèl·lules competents d'*E. coli* (soca DH5α) sobre un tub Eppendorf de 1.5 ml. Es va traspasar tot a una cubeta de 0.1 cm refredada sobre gel i es va electroporar a 1500 V durant 5 ms en un electroporador ECM399 (BTX). Ràpidament s'afegí 1 ml de SOC (20 g/l triptona, 5 g/l extracte de llevat, 0.5 g/l NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>,

glucosa 20 mM, pH 7.0), es recolliren les cèl·lules amb una pipeta i es retornaren al tub Eppendorf. Les cèl·lules s'incubaren a 37°C en agitació (200 rpm) durant 1 h i posteriorment es plaquejaren. En el cas de la transformació en *A. tumefaciens*, s'utilitzà la soca C58C1 amb el plasmidi auxiliar pCLEANS48. Es van utilitzar 0.5 µl (aproximadament 25 ng) de plasmidi en 40 µl de cèl·lules competents seguint el mateix protocol descrit per a *E. coli*, però incubant 2 h a 28°C després de l'electroporació.

### **3.10. Creixement de cèl·lules en medi de cultiu sòlid**

Per poder seleccionar clons que havien incorporat la construcció d'interès es plaquejaren 10 µl, 100 µl i la resta del cultiu en plaques Petri. Les plaques d'*E. coli* s'incubaren a 37°C tota la nit. Les plaques contenen LB-agar (10 g/l NaCl, 10 g/l triptona, 5 g/l extracte de llevat i 15 g/l d'agar), a més de l'antibiòtic corresponent (ampicil·lina o kanamicina) a una concentració de 50 µg/ml. El plaqueig es dugué a terme baix la flama de l'encenedor per evitar contaminacions. En el cas d'*A. tumefaciens* les plaques contenen 7.5 µg/ml tetraciclina, 50 µg/ml kanamicina i 50 µg/ml rifampicina, i s'incubaren entre 3 i 5 dies, segons el cas, a 28°C.

### **3.11. Creixement de colònies aïllades en medi de cultiu líquid**

Les colònies aïllades que complien les característiques desitjades es cresqueren en 2.5 ml de medi LB líquid amb l'antibiòtic adequat (kanamicina o ampicil·lina) a una concentració de 50 µg/ml. Els cultius s'incubaren en agitació a 37°C durant tota la nit (*E. coli*) o a 28°C tot un dia (*A. tumefaciens*).

### **3.12. Extracció ràpida de plasmidis per a anàlisi electroforètic**

S'introduïren 0.5 ml de cultiu saturat d'*E. coli* en un tub Eppendorf de 1.5 ml i se centrifugà durant 2 min. Es retirà el sobrenedant i el sediment es va resuspendre en 30 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) agitant intensament amb vòrtex. A continuació s'afegiren 30 µl d'una mescla 1:1 de fenol:cloroform (saturada amb tampó Tris-HCl a pH 8.0). Es va mesclar amb vòrtex i es va centrifugar durant 5 min. Sense tocar la interfase, es prengueren 5 µl de la fase aquosa, als quals s'afegiren 5 µl de tampó de càrrega LB (x10) amb RNasa A (10 ng/µl). Els extractes s'analitzaren per electroforesi.

### **3.13. Purificació de plasmidis**

La purificació de plasmidis es dugué a terme utilitzant l'estoig Genejet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific). Per a això es van abocar 2 ml de cultiu saturat de cèl·lules en un tub

Eppendorf, se centrifugà 2 min i es descartà el sobrenedant. El sediment es va resuspendre en 250 µl de la solució de resuspensió, que conté la RNasa A, fent ús del vòrtex. Després s'afegiren 250 µl de la solució de lisi cel·lular i es mesclà per inversió. Posteriorment s'afegiren 350 µl de la solució de neutralització i es mesclà exhaustivament per inversió. A continuació se centrifugà durant 5 min i el sobrenedant es transferí a una columna situada sobre un tub de 2 ml. Se centrifugà 1 min i es descartà el filtrat. Seguidament es llavà la columna amb 500 µl de la solució de llavat, centrifugant durant 30 s i descartant de nou el filtrat. Després d'aquest primer llavat, es realitzà un segon amb altres 500 µl de la solució de llavat i centrifugant durant 1 min. Finalment, la columna es va transferir a un tub Eppendorf de 1.5 ml i s'afegiren 100 µl del tampó d'elució. S'incubà durant 2 min a temperatura ambient i se centrifugà 2 min per recollir l'eluit.

### **3.14. Quantificació d'ADN**

La concentració dels plasmidis es va determinar mitjançant mesura espectrofotomètrica amb un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

### **3.15. Agroinoculació de plantes**

Colònies corresponents a *A. tumefaciens* transformades es van seleccionar i s'inocularen en 10 ml de LB amb kanamicina (50 µg/ml). Els tubs amb el cultiu líquid es mantingueren a 28°C en agitació fins que s'observà que estaven tèrbols. En general, es tractà d'assolir una densitat òptica (DO) del cultiu a 600 nm d'entre 0.5 i 1. A continuació, segons l'experiment, es prepararen 2 o 5 ml de solució d'agroinoculació a DO 0.5. Per fer-ho, es prengué la quantitat adequada del cultiu líquid que se centrifugà durant 2 min a 13000 rpm. Una vegada retirat el sobrenedant, es resuspengueren les cèl·lules amb el tampó d'agroinoculació (10 mM MES-NaOH pH 5.6, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>). A aquesta solució se li afegí acetosiringona a una concentració final de 150 µM. El cultiu es va incubar 2 h a 28°C i s'infiltraren les plantes.

La infiltració es va realitzar recolzant una xeringa sense agulla carregada amb la solució d'*A. tumefaciens* sobre el revers de la fulla, exercint una lleugera pressió amb el dit. En *N. benthamiana* s'inoculà una fulla amb un halo, mentre que en tomaca s'inocularen dues fulles i un cotiledó.

### **4.16. Seqüenciació**

Per realitzar el disseny d'encebadors, per a la localització de llocs de restricció i per al seguiment de la construcció dels clons virals fou necessària la seqüenciació d'algunes regions

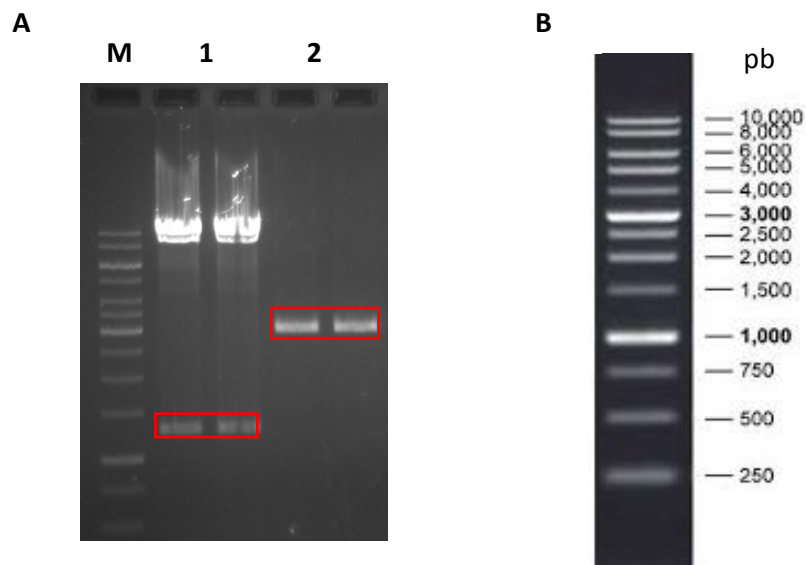
del seu genoma. S'utilitzà el servei de seqüenciació de l'IBMCP que disposa d'un seqüenciador automàtic (ABI 3100; Applied Biosystems). Les mostres a seqüenciar es proporcionaren com alíquotes de 5 µl.

## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

El primer objectiu d'aquest treball fou la construcció d'un clon recombinant del virus del mosaic de la tomaca (ToMV) en el qual la major part del gen que codifica la proteïna de coberta (CP) viral fóra substituït pel gen que codifica la fitoé sintasa (crtB) de la bactèria *Pantoea ananatis*. Per aconseguir-ho, la primera activitat del treball va consistir en la construcció d'un plasmidi intermedi que facilitara el procediment. Es transferí un fragment del genoma viral des del plasmidi amb el clon infecciós complet del virus (pGToMV-Ara) a un vector de clonació, el pGEM-T Easy.

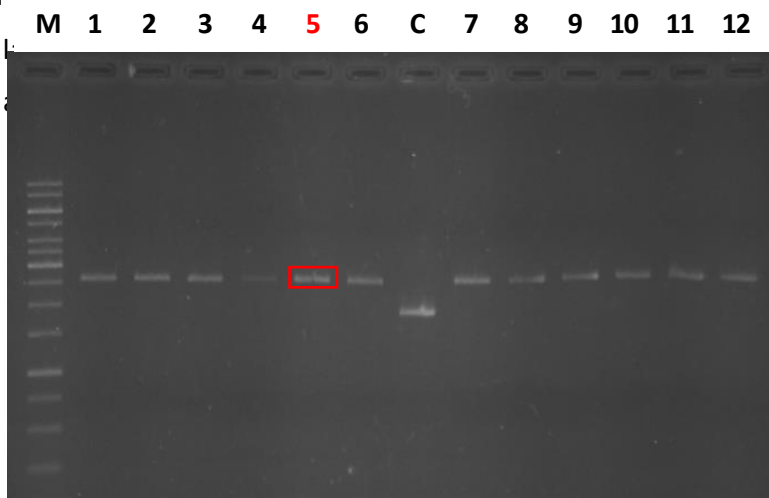
### 4.1. Digestió dels plasmidis pGToMV-Ara i pGEM-T Easy i lligació dels fragments.

La regió del genoma del ToMV que es volia manipular està flanquejada per dos llocs de restricció únics, NcoI i SphI, de manera que els dos plasmidis pGToMV-Ara i pGEM-T Easy es digeriren amb aquests enzims. Es generaren els fragments d'ADN corresponents al genoma del ToMV, aproximadament 1275 pb, i al plasmidi pGEM-T Easy obert, de 3000 pb. Per comprovar que la digestió havia tingut lloc correctament, els productes de la digestió es carregaren en un gel d'agarosa i se separaren per electroforesi. Els productes de la digestió es visualitzaren baix llum ultraviolada després de tenyir el gel amb bromur d'etidi (Figura 6).



**Figura 6.** (A) Anàlisi electroforètic de la digestió NcoI-SphI dels plasmidis pGToMV-Ara i pGEM-T Easy. M, marcador de pes molecular d'1 kpb; 1, plasmidi pGToMV digerit; 2, plasmidi pGEM-T Easy digerit. (B) Esquema del marcador de pesos moleculars d'1 kpb. Els fragments d'ADN d'interès estan enquadrats en roig.

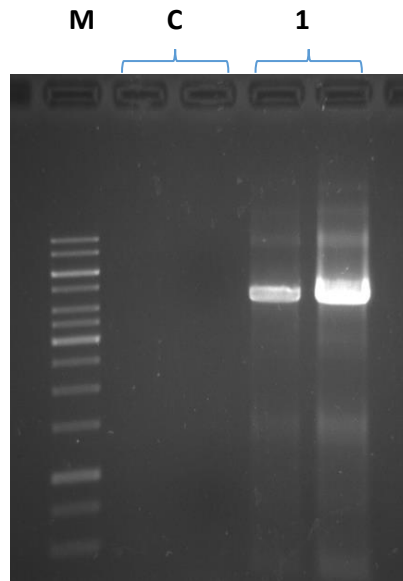
Els ADNs es purificaren en una columna de gel de silici per a la seua posterior lligació mitjançant T4 ADN lligasa. Els productes de la lligació s'electroporaren en *Escherichia coli*. Se seleccionaren colònies i es cresqueren cultius líquids en presència d'ampicil·lina. Es purificaren els plasmidis a partir d'aquest cultius bacterians mitjançant un protocol de miniprep i s'analitzaren per electroforesi contrastant la seua migració amb el plasmidi control sense insert (Figura 7). Totes les mostres presentaren un retard respecte al plasmidi control, suggerint que l'insert s'ha integrat correctament. El plasmidi del carril 5 per a seguir el desenvolupament del ToMV.



**Figura 7.** Separació electroforètica dels plasmidis resultants de la lligació del fragment NcoI-SphI de ToMV i el pGEMT-Easy. M, marcador d'1 kpb (Figura 6B); C, plasmidi control sense insert (pGEMT-Easy); 1 a 12, plasmidis pGEM-ToMV. En roig es remarca el plasmidi seleccionat.

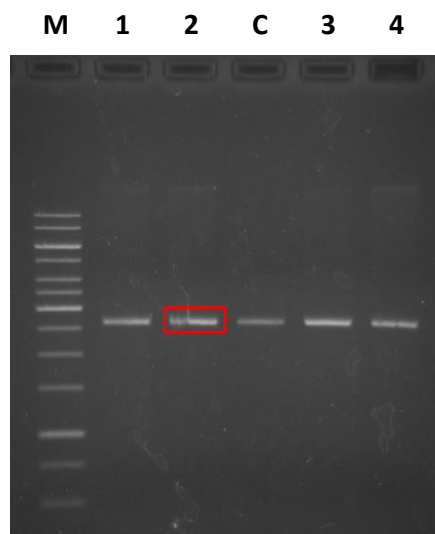
#### 4.2. Mutació de la ATG de la CP del ToMV a AGA.

Una vegada seleccionat un plasmidi intermedi amb el fragment NcoI-SphI del genoma del ToMV, el següent pas fou modificar el codó d'inici de la CP mitjançant l'ús dels encebadors adjacents D2236 i D2237 (Taula 2). Per poder lligar posteriorment els fragments, els encebadors hagueren de ser fosforilats abans de realitzar l'amplificació per PCR. Com que el producte a amplificar tenia aproximadament 4000 pb, es programà el temps d'extensió d'1 min. Seguidament, es tractà el producte durant 1 h amb l'enzim de restricció DpnI per eliminar les restes de plasmidi motlle. El producte es carregà en un gel d'agarosa, se separà per electroforesi i es visualitzà per tinció amb bromur d'etidi (Figura 8).



**Figura 8.** Electroforesi amb els productes de PCR del canvi d'ATG a AGA en la CP del ToMV. M, marcador de pes molecular d'1 kpb (Figura 6B); C, control de PCR sense motlle; 1, producte de l'amplificació de pGEM-ToMV amb D2236 i D2237.

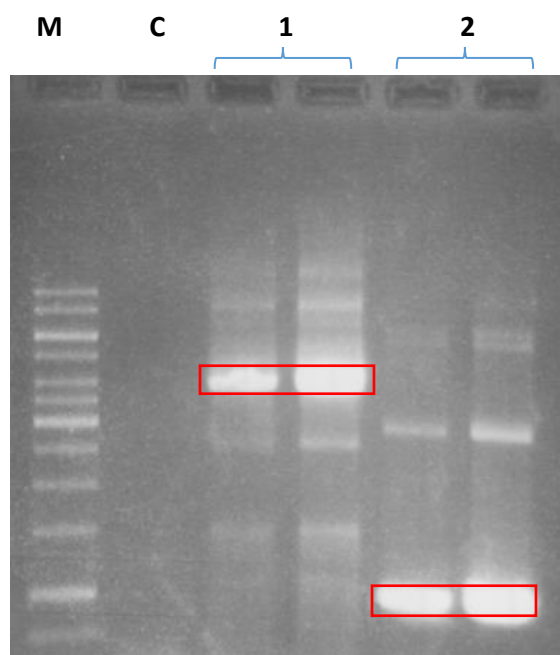
Aquest producte d'amplificació es purificà i es relligà mitjançant T4ADN lligasa per reconstruir el plasmidi. El producte de la lligació s'electroporà en *E. coli*, es picaren colònies i es cresqueren cultius líquids en presència d'ampicil·lina. Es realitzaren miniprep de plasmidis a partir d'aquests cultius i s'analitzaren per electroforesi comprovant que la seua mida no s'havia vist modificada respecte al plasmidi control sense mutació (Figura 9). Es quantificà la concentració del plasmidi 2 mitjançant mesura espectrofotomètrica, amb un resultat de 30 ng/μl. La mutació es confirma mitjançant la seqüenciació del plasmidi.



**Figura 9.** Gel d'agarosa amb els plasmidis pGEM-ToMV mutagenitzats. M, marcador de pes molecular d'1 kpb (Figura 6B); C, plasmidi sense la mutació (pGEM-ToMV); 1 a 4, plasmidis pGEM-ToMV mutagenitzats.

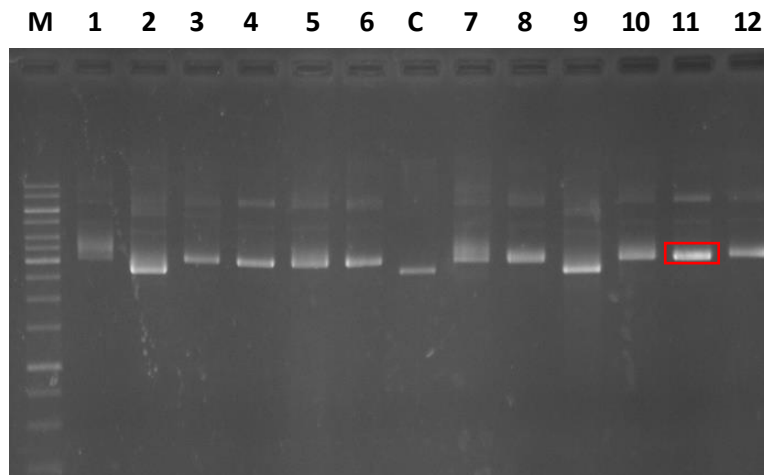
### 4.3. Inserció de l'ADNc de la crtB en el clon viral.

Una vegada mutagenitzada l'ATG d'inici de traducció de la CP del ToMV, el següent objectiu va ser reemplaçar la major part de l'ADNc d'aquesta CP per l'ADNc de crtB. La delecció de la CP no va ser completa. Es mantingueren els extrems 5' i 3' de l'ADNc de la CP per ser importants en la síntesi de l'ARN missatger (ARNm) subgenòmic a partir de la qual es tradueix la proteïna (Lindbo, 2007). Per inserir l'ADNc de la crtB (930 pb) reemplaçant part de la CP (420 pb) del ToMV, l'ADNc del gen s'amplificà per PCR, emprant com a motlle el plasmidi pG53crtB amb els encebadors D2240 i D2241 (Taula 2). Per la seua part, el plasmidi intermedi 2 s'utilitzà com a motlle per produir un ADN amb els encebadors D2238 i D2239 en el que es produí la delecció desitjada de la CP (Taula 2). Els productes de PCR se separaren per electroforesi en un gel d'agarosa (Figura 10) i s'elüïren els fragments d'ADN. Els dos fragments d'ADN s'acoblaren mitjançant la reacció de Gibson. El producte es purificà i s'electroporà en *E. coli*. Es picaren colònies i es cresqueren cultius líquids en presència d'ampicil·lina. Els plasmidis purificats a partir de cultius d'aquestes colònies s'analitzaren per electroforesi en un gel d'agarosa (Figura 11). La majoria mostraren una migració retardada respecte del plasmidi control (Figura 11, carril 7). D'acord amb les migracions, se seleccionà el plasmidi 11 (Figura 11), que s'anomenà pGEM-ToMV-crtB.



**Figura 10.** Electroforesi amb els productes de PCR resultants de l'amplificació de pGEM-ToMV mutagenitzat i la crtB. M, marcador de pes molecular d'1 kpb (Figura 6B); C, control de PCR sense motlle; 1, producte d'amplificació del pGEM-ToMV mutagenitzat amb els encebadors D2238 i D2239; 2, producte d'amplificació del plasmidi pG53crtB amb els encebadors D2240 i D2241. Els productes d'interès s'han remarcat amb rectangles rojos.



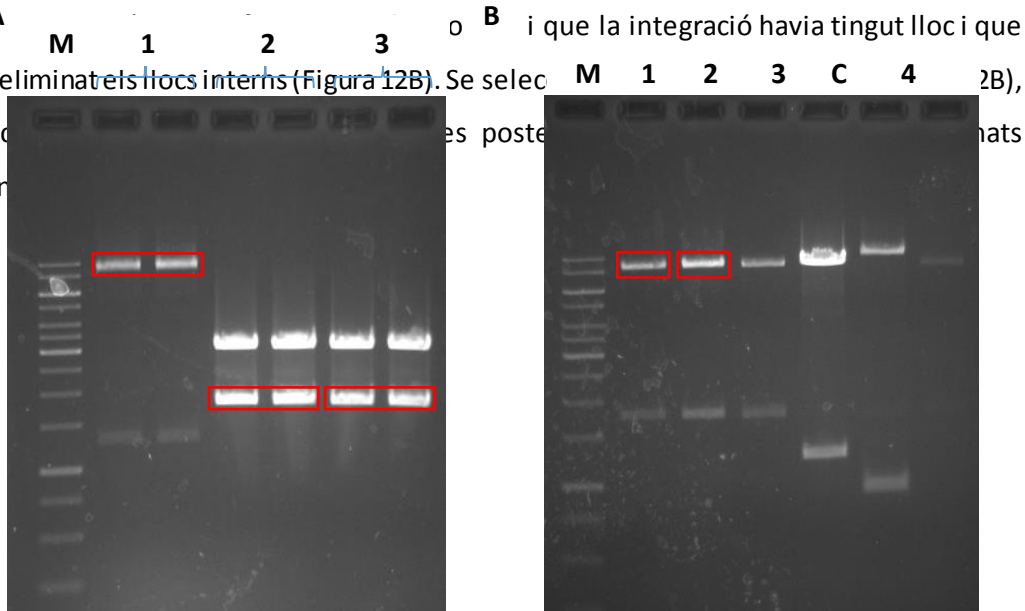


**Figura 11.** Anàlisi electroforètic de la construcció pGEM-ToMV-crtB. M, marcadore de pes molecular d'1 kpb (Figura 6B); C, plasmidi control pGEM-ToMV sense insert; 1 a 12, plasmidis (pGEM-ToMV-crtB) purificats a partir de diferents cultius de clons recombinants de *E. coli*.

El ANDc viral modificat es transferí de nou al plasmidi original pGToMV-Ara amb el clon infecció del virus per procedir a la seua transformació en *Agrobacterium tumefaciens*. Ambdós plasmidis es digeriren amb els enzims de restricció NcoI i SphI. Al separar els productes de la digestió per electroforesi s'observà que la seqüència de crtB contenia llocs NcoI i SphI interns que dificultaven la clonació. Per solucionar-ho es dissenyaren encebadors (Taula 2) per introduir mutacions silencioses en la seqüència de crtB eliminant aquests dos llocs de restricció. En ambdós casos, s'elegí un codó d'alanina per fer la mutagènesi silenciosa. Els encebadors es fosforilaren per poder lligar posteriorment els productes obtinguts. Es realitzaren dues PCR consecutives, amb els encebadors corresponents en cadascuna d'elles, que permeteren la substitució del nucleòtid elegit. Després de cada PCR els productes es tractaren amb l'enzim DpnI i s'analitzaren per electroforesi en gel d'agarosa. Els productes s'elüïren per poder relligar-los amb T4 ADN lligasa. Una vegada feta la lligació, el producte es purificà i amb ell es transformà *E. coli*. Es picaren colònies i es cresqueren cultius líquids en presència d'ampicil·lina. Es realitzaren minipreps a partir d'aquests cultius. La mutagènesi es confirmà mitjançant seqüenciació dels plasmidis.

Una vegada mutagenitzats els llocs interns de la seqüència de crtB, es procedí a digerir tant el vector modificat com el vector pGToMV-Ara amb NcoI-SphI. Els productes de la digestió se separaren per electroforesi en gel d'agarosa (Figura 12A). S'elüïren els ADNs corresponents a la major part del plasmidi pGToMV-Ara, d'aproximadament 9000 pb, i al fragment amb crtB,

d'unes 1786 pb. El patró de bandes suggereix que la digestió va tindre lloc correctament (Figura 12A). Els ADN es lligaren fent ús de la T4 ADN lligasa i el producte es purificà. De nou, l'ADN purificat s'electroporà en *E. coli*, es picaren colònies i es cresqueren cultius líquids en presència de kanamicina. A partir d'aquests cultius es purificaren els plasmidis i s'analitzaren per electroforesi en un gel d'agarosa. Es realitzà una digestió analítica amb els corresponents enzims **A** i **B** i que la integració havia tingut lloc i que s'havien eliminat els llocs interns (Figura 12B). Se seleccionaren més clones i es posteriors s'anomenaren



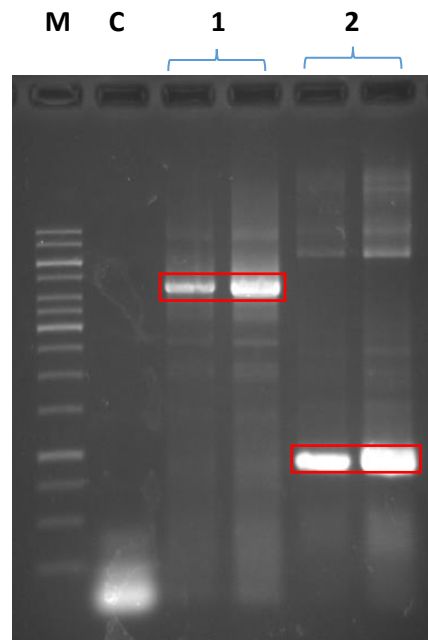
**Figura 12.** (A) Anàlisi electroforètic de la digestió amb *Nco*I i *Sph*I del plasmidi pGToMV-Ara i el plasmidi pGEM-ToMV-crtB. 1, producte de la digestió de ToMV-Ara; 2 i 3, plasmidis pGEM-ToMV-crtB digerits. S'elüïren els fragments enquadrats en roig. (B) Gel d'electroforesi de les digestions analítiques dels plasmidis pGToMVΔCP-crtB amb *Nco*I i *Sph*I. C, digestió de pGToMV-Ara; 1 a 5, digestió dels plasmidis pGToMVΔCP-crtB. M, marcador de pes molecular d'1 kpb (Figura 6B).

#### 4.4. Inserció del promotor de la CP, l'ADNc de la CP i la 3' no traduïda (UTR) del virus del mosaic del tabac (TMV) darrere de la crtB.

El plasmidi pGToMVΔCP-crtB devia produir un virus recombinant capaç d'expressar crtB en lloc de la CP. Tanmateix, al mancar la CP viral el virus recombinant no devia poder moure's per la planta. Per recuperar la funció de moviment sistèmic, es pensà en inserir un fragment del genoma d'un virus relacionat filogenèticament, com el TMV. Aquest fragment estaria compost

del promotor de l'ARNm de la CP, la seqüència codificant de la CP i la 3' UTR viral. L'objectiu era inserir aquest fragment del genoma del TMV (850 pb) reemplaçant els últims 31 nucleòtids del virus recombinant ToMV $\Delta$ CP-crtB. La construcció es va dur a terme introduint primerament el ADNc 3' del TMV en el plasmidi pGEM-ToMV amb la mutació ATG i després tornant a introduir la crtB mutagenitzada.

Primerament s'amplificaren per PCR per una banda el vector pGEM-ToMV 2 (amb la ATG mutada) i per altra banda el fragment 3' del TMV contès al plasmidi pGTMV amb els encebadors D2242-D2243 i D2244-D2245 (Taula 2), respectivament. Els productes s'analitzaren per electroforesi en gel d'agarosa (Figura 13) i s'el·luïren els ADNs adequats. Aquests fragments s'acoblaren mitjançant la reacció Gibson.



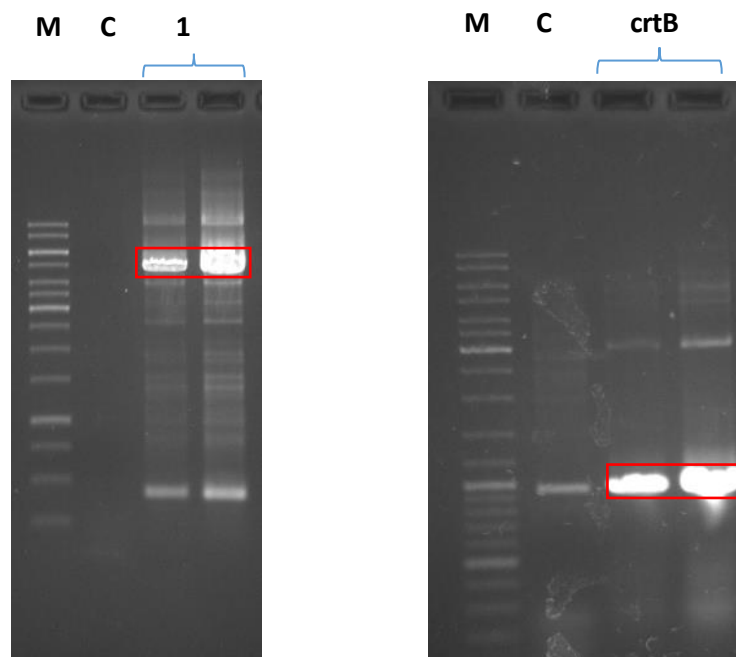
**Figura 13.** Anàlisi electroforètic dels productes de PCR resultants de l'amplificació del plasmidi pGEM-ToMV 2 i el plasmidi pGTMV. M, marcador de pes molecular d'1 kpb (Figura 6B); C, control de PCR sense motlle; 1, producte de PCR del pGEM-ToMV 2 amb els encebadors D2242 i D2243; 2, producte de PCR del pGTMV amb els encebadors D2244 i D2245. Els productes d'interès s'han marcat amb rectangles rojos.

Una vegada transformades les cèl·lules es realitzaren preparacions de plasmidis que s'analitzaren per electroforesi en gel d'agarosa (Figura 14). La mostra 1 presentà un retard respecte al control (Figura 14, carril 4), indicatiu de que el fragment 3' del TMV s'havia inserit adequadament. A continuació s'amplificà per PCR el plasmidi seleccionat amb els encebadors D2238 i D2239 i la crtB mutagenitzada amb els encebadors D2240 i D2241 (Taula 2) (Figures



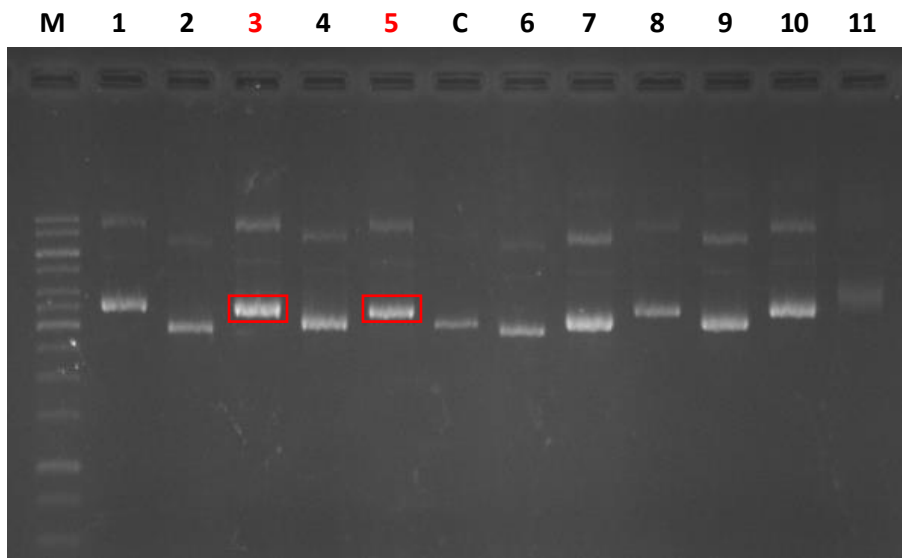
**Figura 14.** Anàlisi electroforètic de la construcció pGEM-ToMV-3'. M, marcador de pes molecular d'1 kpb (Figura 6B); C, plasmidi control pGEM-ToMV 2 sense insert; 1 a 6, plasmidis extrets a partir de diferents cultius de clons recombinants de *E. coli*.

15A i B, respectivament). Els ADNs d'interès s'elüïren i se sotmeteren a la reacció d'acoblament Gibson.



**Figura 15.** Anàlisi electroforètic dels productes de PCR de l'amplificació dels plasmidis pGEM-ToMV-3' (A) i pGEM-ToMV-crtB mutagenitzat (B). M, marcador de pes molecular d'1 kpb (Figura 6B); C, control de PCR sense motlle; 1, producte de l'amplificació de pGEM-ToMV-3' amb els encebadors D2238 i D2239; crtB, producte de l'amplificació de pGEM-ToMV-crtB mutagenitzat amb els encebadors D2240 i D2241.

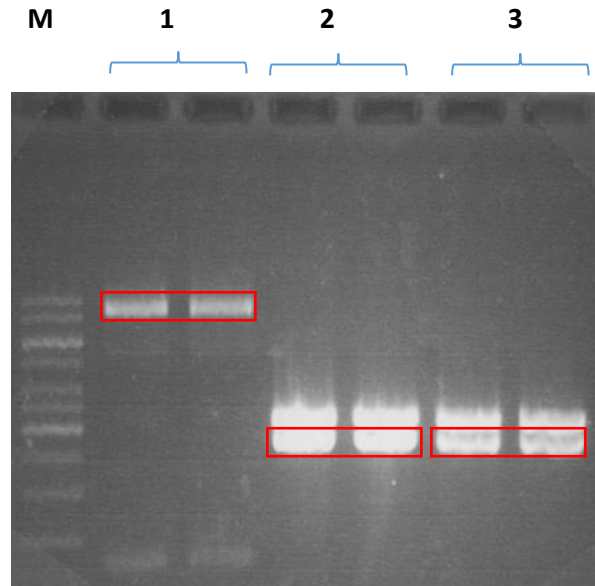
Després de la reacció, el producte es purificà i es transformà *E. coli*. Es picaren colònies i es cresqueren cultius líquids en presència d'ampicil·lina. Es purificaren els plasmidis i s'analitzaren per electroforesi (Figura 16). Se seleccionaren les mostres 3 i 5 ja que presentaven un retard respecte al plasmidi control (Figura 16, carril C) i mostraren una major concentració. Aquestes mostres s'enviaren a seqüenciar per corroborar que les construccions eren correctes. Els plasmidis s'anomenaren pGEM-ToMV-crtB-3'.



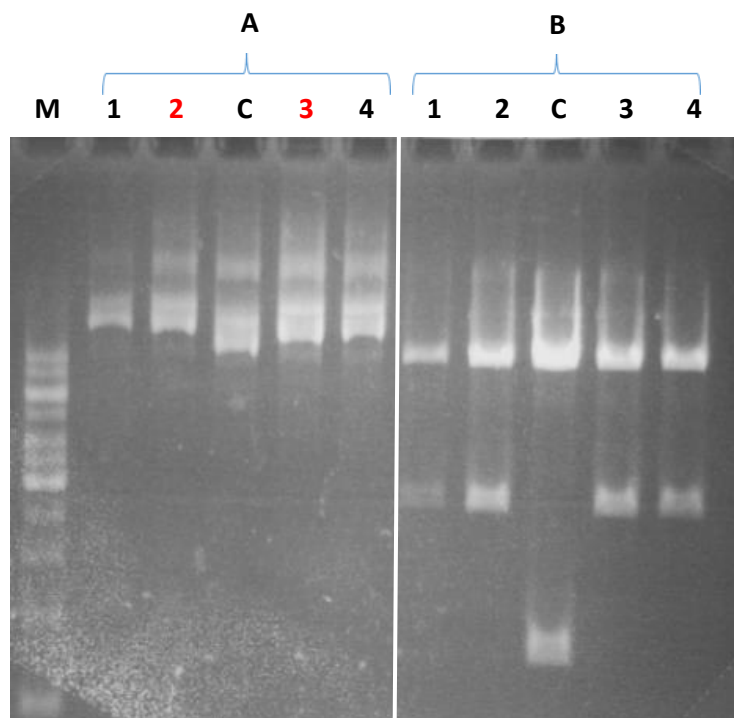
**Figura 16.** Anàlisi electroforètic de la construcció pGEM-ToMV-crtB-3'. M, marcador de pes molecular d'1 kpb (Figura 6B); C, plasmidi control pGEM-ToMV-3' sense la crtB; 1 a 11, construccions pGEM-ToMV-crtB-3'. Els plasmidis seleccionats estan remarcats en roig.

Arribat a aquest punt, la regió modificada del genoma del ToMV s'havia de transferir al vector pGToMV-Ara, amb el clon infecció del virus. Per això, es digeriren tant aquest plasmidi com el plasmidi amb el fragment del genoma del ToMV manipulat amb els enzims de restricció NcoI i SphI. Els productes de les digestions es visualitzaren per electroforesi en gel d'agarosa (Figura 17) i s'el·luïren els ADNs corresponents a la major part del vector pGToMV-Ara, aproximadament 9000 pb, i a l'íncert manipulat, de 2600 pb, confirmant que la digestió havia tingut lloc correctament. Una vegada obtinguts els plasmidis (Figura 18A), per confirmar la inserció es realitzà una digestió analítica (Figura 18B). Se seleccionaren els plasmidis 2 i 3, que mostraren una migració electroforètica coherent amb la inserció i major concentració, per

assajar la infectivitat i producció de carotenoides. A aquests plasmidis se'ls anomenà pGToMV-crtB.



**Figura 17.** Anàlisi electroforètic de la digestió amb *NcoI* i *SphI* del plasmidi pGToMV-Ara i el plasmidi pGEM-ToMV-crtB-3'. M, marcador de pes molecular d'1 kpb (Figura 6B); 1, producte de la digestió de ToMV-Ara; 2 i 3, plasmidis pGEM-ToMV-crtB-3'3 i 5 digerits. S'elüïren els fragments enquadrats en roig.



**Figura 18.** (A) Anàlisi electroforètic de la construcció pGToMVΔCP-crtB-3'; C, plasmidi control pGToMVΔCP-crtB; 1 a 4, construccions pGEM-ToMV-crtB-3'. (B) Anàlisi electroforètic de les digestions analítiques dels plasmidis pGToMV-crtB amb *NcoI* i *SphI*; C, digestió de pGToMVΔCP-crtB; 1 a 4, digestió dels plasmidis pGToMV-crtB. Els cultius seleccionats estan remarcats en roig. M, marcador de pes molecular d'1 kpb (Figura 6B)

#### 4.5. Inoculació de les plantes.

Les plantes es van inocular amb els dos clons virals recombinants obtinguts en aquest treball: ToMV $\Delta$ CP-crtB (plasmidi pGToMV $\Delta$ CP-crtB), on la major part de la CP estava substituïda per crtB; i ToMV-crtB (plasmidi pGToMV-crtB), on a més s'havia inserit l'extrem 3' del genoma del TMV incloent el seu gen de la CP. A més a més, les plantes també s'inocularen amb el pGToMV-Ara com a control, que permet l'expressió del clon infeccions del ToMV. *A. tumefaciens* s'electroporaren amb els plasmidis i s'incubaren durant 4 dies. Se seleccionaren tres colònies d'*A. tumefaciens* corresponents a cada plasmidi i es cresqueren en cultiu líquid. Les plantes de *N. benthamiana* i tomaca s'agroinfiltraren amb cultius a densitat òptica (DO) 0.5. Les plantes es cultivaren al fitotrò i es realitzà un seguiment durant 20 dies del progrés de la infecció viral. Es prengueren fotografies a diferents dies post inoculació (dpi) (Figures 19 i 20).

A



B



C





Les fulles de les plantes de *N. benthamiana* mostraren coloració groga en les zones on s'havia inoculat el clon viral a partir dels 12 dpi (Figura 19A). Amb el pas dels dies aquesta coloració s'incrementà en intensitat, causant una intensa infecció local en la zona d'agroinoculació (Figura 19). Aquesta pigmentació ens informa de que el virus és infectiu i que a més l'enzim heteròleg crtB s'expressa eficientment i indueix la producció de carotenoides colorits.

A



B



**Figura 20.** Plantes de *N. benthamiana* agroinoculades amb ToMV-crtB als (A) 8 dpi i (B) 13

En canvi, el clon viral que conté el genoma del ToMV, la crtB i la 3' del TMV fou capaç de causar una infecció sistèmica en les plantes. El virus es va moure a través de la planta de manera eficient, desplaçant-se a altres fulles i causant una intensa coloració groga. Els símptomes aparegueren sobre el dia 8 post inoculació (Figura 20A) i a mesura que avançaven els dies la pigmentació era més forta (Figura 20B). L'aparició d'aquesta coloració groga indica la acumulació de carotenoides.

Els carotenoides formen part de diverses estructures de les plantes. S'encarreguen, entre d'altres, de protegir-les contra la foto-oxidació i d'actuar com a pigments accessoris (Bartley i Scolnik, 1995). A banda, els carotenoides també estan presents en una gran varietat d'animals,



algues, fongs i bacteries. Concretament, els animals són incapaços de sintetitzar-los i deuen obtenir-los a través de la dieta. Els carotenoides exerceixen una important funció biològica degut als seus efectes antioxidants, protegint el cos dels efectes nocius dels radicals lliures. Per tant, la seua suficient ingesta és fonamental, entre altres per a la producció de vitamina A o per a la protecció front a malalties oculars degeneratives (Meléndez et al., 2004).

La crtB és un enzim clau de les reaccions de biosíntesi dels diferents carotenoides (Cunningham i Grantte, 1998). Encara que gràcies a la coloració groga es pot confirmar la producció de carotenoides en les plantes infectades, no s'ha arribat a determinar quin tipus de carotenoides s'han produït. Tot i així, la seua acumulació en teixit vegetal té l'avantatge de que permet la ràpida visualització de la infecció viral. Aquest fet pot suposar un punt de partida per a múltiples estudis. A més, aquest virus recombinant o versions més elaborades es podria utilitzar per a produir grans quantitats de carotenoides i pal·liar les deficiències en aquelles poblacions que ho requeriren o bé per al seu ús industrial.

Els sistemes de producció de proteïnes recombinants en plantes són una tecnologia amb un enorme potencial. A banda de la producció de metabòlits, com és aquest cas dels carotenoides, molts estudis estan centrant la seua atenció en la producció de proteïnes biofarmacèutiques (Daniell *et al.*, 2009). Degut a les reticències socials als organismes transgènics, l'ús de vectors virals que no modifiquen el genoma de la planta ofereix un ampli ventall d'oportunitats. S'ha demostrat que la utilització de vectors amb promotors subgenòmics homòlegs i heteròlegs del TMV permet la co-expressió de diverses proteïnes (Roy *et al.*, 2011). Aquests tipus de vectors tenen un gran potencial per a la producció d'alts nivells de múltiples proteïnes, fins i tot per a la producció d'anticossos monoclonals.

## 6. CONCLUSIONS

1. S'ha construït amb èxit un clon infecció derivat del virus del mosaic de la tomaca (ToMV) que expressa el gen que codifica la fitoé sintasa (crtB) de la bactèria *Pantoea ananatis* baix el control del promotor de la proteïna de coberta (CP) viral, al temps que s'encapsida i es mou sistèmicament per expressar una CP heteròloga del virus del mosaic del tabac.
2. Aquest clon viral recombinant és capaç d'infectar plantes de tabac, *Nicotiana benthamiana*, produint una intensa pigmentació groga, tant en el teixit inoculat com en fulles superiors no inoculades.
3. El clon viral indueix l'activació de la ruta de biosíntesi dels carotenoides i és capaç de moure's sistèmicament per la planta.
4. Aquest clon viral, amb el qual es pot seguir visualment la infecció, facilitarà la recerca de gens de resistència contra el virus. A més, gràcies a la seua capacitat de produir grans quantitats de carotenoides, es podrà emprar com a ferramenta biotecnològica per a produir en plantes aquests compostos d'interès farmacèutic, nutricional i industrial.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, I., Sánchez, F., Martín, A. M., Martínez-Herrera, D., & Ponz, F. (1996). Nucleotide sequence of Chinese rape mosaic virus (oilseed rape mosaic virus), a crucifer tobamovirus infectious on *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 30(1), 191-197.
- Aramburu, J., & Galipienso, L. (2005). First report in Spain of a variant of Tomato mosaic virus (ToMV) overcoming the Tm-22 resistance gene in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Pathology*, 54(4), 566-566.
- Armstrong, G. A. (1997). Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. *Annual Reviews in Microbiology*, 51(1), 629-659.
- Bailey, B. A., Hebbar, P. K., Sanogo, S., & Lumsden, R. D. (2001). The impact of plant diseases on world chocolate production. *APSnet*.
- Bartley, G. E., & Scolnik, P. A. (1995). Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell*, 7(7), 1027.
- Bashir, N. S. (2007). Recent developments in design and application of plant virus-based gene vectors. *Recent patents on DNA & gene sequences*, 1(3), 214-226.
- Bedoya L.C., Darós J.A. (2010). Stability of Tobacco etch virus infectious clones in plasmid vectors. *Virus Research* 149: 234–240.
- Bedoya L.C., Martinez F., Orzáez D., Darós J.A. (2012). Visual Tracking of Plant Virus Infection and Movement Using a Reporter MYB Transcription Factor That Activates Anthocyanin Biosynthesis. *Plant Physiology* 158 (3): 1130-1138.
- Beier, H., Barciszewska, M., & Sickinger, H. D. (1984). The molecular basis for the differential translation of TMV RNA in tobacco protoplasts and wheat germ extracts. *The EMBO Journal*, 3(5), 1091.
- Boyer, J. C., & Haenni, A. L. (1994). Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology*, 198(2), 415-426.
- Broadbent, L. (1965). The epidemiology of tomato mosaic VIII. Virus infection through tomato roots. *Annals of Applied Biology*, 55(1), 57-66.
- Broadbent, L., & Fletcher, J. T. (1966). The epidemiology of tomato mosaic: Sources of TMV in commercial tomato crops under glass. *Annals of Applied Biology*, 57(1), 113-120.
- Castello, J. D., Rogers, S. O., Starmer, W. T., Catranis, C. M., Ma, L., Bachand, G. D., ... & Smith, J. E. (1999). Detection of tomato mosaic tobamovirus RNA in ancient glacial ice. *Polar Biology*, 22(3), 207-212.
- Chen, M. H., & Citovsky, V. (2003). Systemic movement of a tobamovirus requires host cell pectin methylesterase. *The Plant Journal*, 35(3), 386-392.
- Coutinho, T. A., & Venter, S. N. (2009). *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 325-335.
- Cuevas J.M., Moyaand A., Sanjua R. (2005). Following the very initial growth of biological ARN viral clones. *Journal of General Virology* 86: 435–443. doi: 10.1099/vir.0.80359-0.
- Cunningham Jr, F. X., & Gantt, E. (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 49(1), 557-583.

- Cunningham, F. X. (2002). Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure and Applied Chemistry*, 74(8), 1409-1417.
- Dale J.W., Schantz M., Plant N. (2011). Analysis of gene expression. En: *Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology*. 3<sup>a</sup> ed. New Deli: Willey Blackwell. p. 169-187
- Daniell, H., Singh, N. D., Mason, H., & Streatfield, S. J. (2009). Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends in Plant Science*, 14(12), 669-679.
- Desbiez C., Chandeysson C., Lecoq H., Moury B. (2012). A simple, rapid and efficient way to obtain infectious clones of potyviruses. *Journal of Virological Methods* 183 (1):94-7. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.03.035.
- Doolittle, S. P. (1928). Soil transmission of tomato mosaic and streak in the greenhouse. *Phytopathology*, 18, 155.
- Drake, J. W., & Holland, J. J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 96(24), 13910-13913.
- Fett-Neto, A. G. (2010). *Plant Secondary Metabolism Engineering*. Springer: Berlin/Heidelberg, Germany.
- Fletcher, J. T. (1969). Studies on the overwintering of tomato mosaic in root debris. *Plant Pathology*, 18(3), 97-108.
- Fukuda, A., Asada, M., Koyasu, S., Yoshida, H., Yaginuma, K., & Okada, Y. (1981). Regulation of polar morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 145(1), 559-572.
- Gergerich R.C., Dolja V.V. (2006). Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. The Plant Health Instructor doi: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01.
- Gibbs, A. (1999). Evolution and origins of tobamoviruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 354(1383), 593-602.
- Giepmans B.N.G., Adams S.R., Ellisman M.H., Tsien R.Y. (2006). The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function. *Science* 312(5771): 217-224.
- Gilbert P.A., Garnier A., Jacob D., Kamen A. (2000). On-line measurement of green fluorescent protein (GFP) fluorescence for the monitoring of recombinant adenovirus production. *Biotechnology Letters* 22(7):561-567.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P., & Blinov, V. M. (1989). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Research*, 17(12), 4713-4730.
- Hall R.N., Meers J., Fowler E., Mahony T. (2012). Back to BAC: The Use of Infectious Clone Technologies for Viral Mutagenesis. *Viruses* 4: 211-235. doi:10.3390/v4020211.
- Hodgman, T. C. (1988). A new superfamily of replicative proteins. *Nature*, 333, 578.
- Hull, R. (2002). *Matthews Plant Virology*, edn.
- Johansen, I.E. (1996). Intron insertion facilitates amplification of cloned virus cDNA in *Escherichia coli* while biological activity is reestablished after transcription in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 93: 12400–12405.
- Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M., & Angenon, G. (1997). An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*, 122(1), 101-108.

- Koonin, E. V. (1991). The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology*, 72(9), 2197-2206.
- Lalonde S., Ehrhardt D. W., Loque D., Chen J., Rhee S. Y., & Frommer W. B. (2008). Molecular and cellular approaches for the detection of protein–protein interactions: latest techniques and current limitations. *The Plant Journal* 53(4): 610-635.
- Lartey, R. T., Voss, T. C., & Melcher, U. (1996). Tobamovirus evolution: gene overlaps, recombination, and taxonomic implications. *Molecular Biology and Evolution*, 13(10), 1327-1338.
- Lindbo, J. A. (2007). High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible Tobacco mosaic virus expression vectors. *BMC Biotechnology*, 7(1), 52.
- Lindbo, J. A. (2007). TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector. *Plant Physiology*, 145(4), 1232-1240.
- Lomonosoff G.P., Evans D.J. (2011). Applications of plant viruses in bionanotechnology. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 375: 61-87. doi: 10.1007/82\_2011\_184.
- Majer, Llorente, Rodríguez-Concepción and Daròs. Virus-enabled rewiring of carotenoid biosynthesis for extraplasmidial accumulation and visual tracking of infection dynamics in plants; submitted (2016) to *Plant Biotechnology Journal*.
- Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V., & Gleba, Y. (2005). Systemic *Agrobacterium tumefaciens*–mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnology*, 23(6), 718-723.
- Meléndez Martínez, A. J., Vicario Romero, I., & Mira, H. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides.
- Naylor L.H. (1999). Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochemical Pharmacology* 58:749-757.
- Pogue, G. P., Lindbo, J. A., Garger, S. J., & Fitzmaurice, W. P. (2002). Making an ally from an enemy: plant virology and the new agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), 45-74.
- Roy, G., Weisburg, S., Foy, K., Rabindran, S., Mett, V., & Yusibov, V. (2011). Co-expression of multiple target proteins in plants from a tobacco mosaic virus vector using a combination of homologous and heterologous subgenomic promoters. *Archives of Virology*, 156(11), 2057-2061.
- Rozanov, M. N., Koonin, E. V., & Gorbalenya, A. E. (1992). Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the ‘Sindbis-like’ supergroup of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology*, 73(8), 2129-2134.
- Satyanarayana T., Gowda S., Ayllón M.A., Dawson W.O. (2003). Frameshift mutations in infectious cDNA clones of Citrus tristeza virus: a strategy to minimize the toxicity of viral sequences to *Escherichia coli*. *Virology* 313: 481–491.
- Scholthof H.B., Scholthof K.B., Jackson A.O. (1996). Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annual Review of Phytopathology* 34: 299-323.
- Scholthof K., Scholthof H.B., Jackson A.O. (1993). Control of Plant Virus Diseases by Pathogen-Derived Resistance in Transgenic Plants. *Plant Physiology* 102(1):7-12.
- Spence, N. J., Sealy, I., Mills, P. R., & Foster, G. D. (2001). Characterisation of a tobamovirus from trailing petunias. *European Journal of Plant Pathology*, 107(6), 633-638.

- Spence, N. J., Sealy, I., Mills, P. R., & Foster, G. D. (2001). Characterisation of a tobamovirus from trailing petunias. *European journal of plant pathology*, 107(6), 633-638.
- Swick A., Baltes A., Yin J. (2013). Visualizing infection spread: dual-color fluorescent reporting of virus-host interactions. *Biotechnology and Bioengineering* doi: 10.1002/bit.25170.
- Swick A., Baltes A., Yin J. (2013). Visualizing infection spread: dual-color fluorescent reporting of virus-host interactions. *Biotechnology and Bioengineering* doi: 10.1002/bit.25170.
- Taylor, R. H., Grogan, R. G., & Kimble, K. A. (1961). Transmission of tobacco mosaic virus in tomato seed. *Phytopathology*, 51, 837-42.
- Terrier, N., Ageorges, A., Abbal, P., & Romieu, C. (2001). Generation of ESTs from grape berry at various developmental stages. *Journal of Plant Physiology*, 158(12), 1575-1583.
- Thole V., Worland B., Snape J.W., Vain P. (2007). The pCLEAN dual binary vector system for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Physiology* 145: 1211–1219.
- Turpen, T. H., Turpen, A. M., Weinzettl, N., Kumagai, M. H., & Dawson, W. O. (1993). Transfection of whole plants from wounds inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* containing cDNA of tobacco mosaic virus. *Journal of Virological Methods*, 42(2-3), 227-239.
- Van Regenmortel, M. H., Fauquet, C. M., Bishop, D. H., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., ... & Wickner, R. B. (2000). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press.
- Van Winckel, A. (1965). Tobakmosaikvirus op Tomatenzaad. *Agricultura (Louvain)*, 13, 721.
- Wain-Hobson, S. (1996). Running the gamut of retroviral variation. *Trends in Microbiology*, 4(4), 135-141.
- Yusibov, V., Shivprasad, S., Turpen, T. H., Dawson, W., & Koprowski, H. (2000). Plant viral vectors based on tobamoviruses. In *Plant Biotechnology* (pp. 81-94). Springer Berlin Heidelberg.
- Zaitlin, M. (1998). The discovery of the causal agent of the tobacco mosaic disease. *Discoveries in Plant Biology*, 1, 105-110.