

IDENTIFICACIÓN MEDIANTE SECUENCIACIÓN PROFUNDA DEL MECANISMO DE SILENCIAMIENTO CONTRA TOMATO YELLOW LEAF CURL VIRUS EN PLANTAS DE TOMATE CULTIVADAS EN CAMPO

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

AUTORES PRINCIPALES: Alejandro D. Fuentes Martínez; Natacha Carlos Victoria; Yoslane Ruíz Otaño; Danay Callard Barrera; Yadira Sánchez Guerra; María Elena Ochagavía; Rosabel Pérez Castillo; Merardo Pujol Ferrer.

OTROS AUTORES: Kenia Tiel González; Aleines Ferreira Fabrè; Karen Cobas Acosta.

COLABORADORES: Jonathan Seguin^{2,3}, Nachelli Malpica-López², Thomas Hohn², Maria Rita Lecca⁴, Hubert Rehrauer⁴, Laurent Farinelli³, Mikhail M. Pooggin²; Alejandro M. Martín Dunn¹; Lázaro Hernández García¹; Yamilka Rosabal Ayan¹; Osmany Ramos González¹; Ricardo Bringas Perez¹; Cigry Perez Perez¹; Aymee Orquin Fernández¹; Sergio Cruz Castillo¹; Ariel Cruz Jimenez¹; Ada Abad Perez¹

OTRAS ENTIDADES PARTICIPANTES:

² University of Basel, Department of Environmental Sciences, Botany, Hebelstrasse 1, 4056 Basel, Switzerland

³ FASTERIS SA, Ch. Du Pont-du-Centenaire 109, 1228 Plan-les-Ouates, Switzerland

⁴ Functional Genomics Center ETH Zurich, University of Zurich, Winterthurerstrasse 190/ Y32 H80, 8057 Zurich, Switzerland

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA:

Alejandro Divo Fuentes Martínez

Ave 31 e/ 158 y 190, Playa, La Habana 10600, Cuba.

Correo electrónico: alejandro.fuentes@cigb.edu.cu;

Teléfono: 72504369.

RESUMEN:

El silenciamiento del ARN es un mecanismo natural que se puede emplear para generar plantas resistentes a virus. En resultados previos (Premio de la Academia de Ciencias de Cuba en el 2005 con el título "Obtención de plantas inmunes a la infección por virus con genoma de ADN mediante el silenciamiento génico post-transcripcional: Herramientas moleculares para el control y seguimiento de enfermedades causadas por geminivirus") se demostró la inhibición de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) en plantas de tomate transformadas con una estructura de ARN viral de doble cadena en forma de horquilla, inoculadas en casa climatizada (Fuentes y col., 2006). En el presente trabajo, nos propusimos caracterizar el mecanismo de silenciamiento viral desplegado por la horquilla así como su estabilidad y consistencia en comparación con

el proceso natural contra TYLCV en condiciones de cultivo en campo. Para ello se utilizaron dos eventos-modelos, 126 y B1 en las generaciones F6 y F4 respectivamente, portadores de idéntico diseño de la horquilla pero con diferentes marcadores de selección (Fuentes y col., 2006; Fuentes y col., 2008). Ambos eventos fueron cultivados en campo y evaluados en cuanto a la severidad de los síntomas que provoca TYLCV y el nivel de replicación viral. Además, se aplicó el ensayo de *Northern blot* de alta resolución y la tecnología de secuenciación profunda para la caracterización del proceso de silenciamiento viral inducido y natural. Como resultado, se demostró por primera vez en condiciones de campo la efectividad y superioridad de la horquilla para la protección de las plantas de tomate contra TYLCV. Se logró distinguir el mecanismo de silenciamiento y los componentes involucrados en los eventos resistentes 126 y B1 en comparación con las plantas no transformadas de la variedad Campbell 28. Por primera vez se demostró la consistencia y durabilidad del silenciamiento inducido por la horquilla en condiciones de campo frente a TYLCV, lo cual sustenta la aplicabilidad de esta estrategia en la protección de las plantas de tomate contra este patógeno. Se evidenciaron por primera vez las probables debilidades del mecanismo natural de silenciamiento contra TYLCV y por qué la respuesta natural es insuficiente. Estos resultados permiten establecer estrategias moleculares similares para otros cultivos afectados por geminivirus y proporciona nuevas herramientas para el estudio del proceso de silenciamiento en las plantas.

Los resultados de este trabajo están contenidos en dos publicaciones: “Field trial and molecular characterization of RNAi transgenic tomato plants that exhibit resistance to Tomato yellow leaf curl geminivirus”, 2016. MPMI, vol 29, N 3, pp 197-209 (factor de impacto 4); y “A transformation procedure for recalcitrant tomato by addressing transgenic plant-recovery limiting factors”, 2008. Biotechnol. J., 3, 1088–1093 (factor de impacto 3.7). El trabajo, además, está avalado por varias personalidades del ámbito científico, por la Dra. Marta Alvarez Gil (Cuba); el Dr. Basavaprabhu L. Patil (India); los Drs. John P. Carr y Dr. Steven A. Whitham (editores de la revista MPMI) y el Dr. Francisco Aragao (Brasil).

COMUNICACIÓN CORTA

El silenciamiento del ARN es un mecanismo de regulación que funciona en la mayoría de los eucariotas e inhibe la expresión génica de manera específica a nivel postranscripcional y/o transcripcional. De forma general, el silenciamiento se inicia por la formación de una estructura de ARN doble cadena (ARNdc) y los efectores principales son los siRNA (del inglés *short interfering RNAs*, o ARN interferente) que se producen a partir del ARNdc por mediación de las proteínas Dicer o semejantes a Dicer (DCL, del inglés Dicer like proteins). Los siRNA procesados se reclutan por la proteína Argonauta (AGO) para formar, junto a otros factores, un complejo ribonucleoproteico (RISC, del inglés RNA-induced silencing complex). Una de las cadenas del siRNA se mantiene unida a RISC (cadena guía) y la otra (cadena pasajera) se degrada. Por complementariedad de secuencias, los pequeños ARN

determinan la unión del complejo efector RISC con el ARN mensajero diana. Según los siRNA y las proteínas AGO involucrados, dicha interacción puede producir i) el corte del transcrito o la inhibición de su traducción, denominándose silenciamiento génico postranscripcional (PTGS); ii) metilación del ADN que codifica el transcrito, lo que se da en llamar silenciamiento génico transcripcional (TGS) o iii) una combinación de estos procesos (Raja y col., 2014). El silenciamiento génico se postuló, desde su descubrimiento, como un mecanismo de defensa antiviral en las plantas (Waterhouse y col., 2001; Wang y col., 2012). Sin embargo, todavía sigue siendo un reto la aplicación de su conocimiento. La introducción en las plantas de estructuras de ARN de dos cadenas de origen viral, sin embargo, ya es un hecho en la actualidad y su utilidad ha sido comprobada para la protección de plantas contra virus. No obstante, en pocas ocasiones se ha observado una resistencia eficaz contra virus ADN. Por ello, el estudio de los mecanismos naturales y los desatados por estructuras de ARN de doble cadena, introducidas mediante las herramientas de la ingeniería genética, pudiera desentrañar nuevos conceptos, regularidades y particularidades útiles para el diseño e implementación de estrategias de silenciamiento en la protección de los cultivos.

Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) es un geminivirus monopartita. Su genoma está compuesto por un ADN circular simple cadena, estructurado en seis marcos abiertos de lectura parcialmente solapados, organizados bidireccionalmente en dos unidades transcripcionales que se hallan separadas por una región intergénica (RI). El marco de lectura C1 codifica para una proteína asociada a la replicación de TYLCV y es considerada la única proteína indispensable para el ciclo de vida de este patógeno. TYLCV provoca la enfermedad del encrespamiento y amarillamiento de las hojas del tomate (Cohen y Nitzany, 1966) y está ampliamente diseminado por el mundo en las regiones tropicales y subtropicales. Las plantas afectadas muestran retardo en el crecimiento, amarillamiento de las hojas y encrespamiento, así como la caída prematura de las flores, lo que acarrea la reducción de frutos comercializables. Cuando la infección se produce durante las etapas tempranas de crecimiento puede conllevar a una pérdida de hasta el 100% del rendimiento (Moriones y Navas-Castillo, 2000; Glick y col., 2009; Hanssen y col., 2010). En Cuba, en la década del 90 del siglo XX, la incidencia alta de esta enfermedad ocasionó la pérdida de campos completos de tomate y la proscripción de las variedades susceptibles. Entre ellas, la Campbell 28 llegó a ocupar el 50% del territorio cubano destinado a ese cultivo (Gómez y col., 2004). El control de TYLCV es arduo y muy costoso. El impacto creciente de las infecciones de este virus en el rendimiento del tomate enfatiza la importancia de desarrollar una estrategia antiviral eficiente y sustentable (Lapidot y Friedmann, 2002). En trabajo previo, se demostró la eficacia de una estructura de ARN de doble cadena en forma de horquilla, compuesta por el extremo 3' prima de la región C1 de TYLCV, para inducir el silenciamiento contra TYLCV en plantas transformadas con ese tipo de estructura. Las plantas de tomate productoras de esta estructura fueron capaces de disminuir en su totalidad la infección por TYLCV en condiciones de casa climatizada (Fuentes y col., 2006). Sin embargo, por qué el mecanismo natural de silenciamiento de la planta no es capaz de inhibir TYLCV? Cuáles son los componentes involucrados en el proceso de silenciamiento y cuál sería la ruta de silenciamiento natural y activada por la horquilla? Cuán durable y consistente es el mecanismo de silenciamiento contra TYLCV desplegado por la horquilla? Para dar respuesta, nos propusimos caracterizar el silenciamiento contra TYLCV en las plantas productoras de la horquilla antiviral en comparación con las plantas no transformadas. Con ese propósito, las plantas de tomate de dos eventos transformados con la horquilla con

diferentes marcadores de selección, 126 y B1 (Fuentes y col., 2006; Fuentes y col., 2008), se cultivaron en campo en condiciones de verano y se evaluó su resistencia contra TYLCV. Se caracterizó el grado de severidad de los síntomas provocados por TYLCV (por la escala descrita por Friedmann y col., 1998) así como el nivel de replicación viral en ambos eventos. El desarrollo de los síntomas se evaluó a los 45, 60 y 75 días después del trasplante al campo (“días post-trasplante” o dpt). Las plantas testigos de Campbell 28 no transformadas presentaron un alto nivel de afectación desde el inicio de la evaluación. De un total de 110 plantas, a los 45 dpt, 18 presentaron grado 1 (mínimo) de sintomatología (17,3%); 28, grado 2 (26,4%); 35, grado 3 (31,8%) y 15, grado 4 (máximo) (13,6%). En la última evaluación (75 dpt) la mayoría de las plantas no transformadas (88,2%) reflejaron grado 4 de severidad de síntomas, mientras que el 1,8% mostró grado 2 y el 10%, grado 3, para un 100% de incidencia de la enfermedad. Esto reflejó una infección generalizada por TYLCV en el área experimental. En contraste, la mayoría de las plantas de los eventos 126 y B1 se mantuvieron asintomáticas y sólo unas pocas (una de 126 y tres de B1) exhibieron algún amarillamiento de las hojas superiores, lo que indicó grado 1 en la escala de severidad de los síntomas. La carga viral detectada en estas plantas varió entre 0 y 0,5 ng, es decir, por debajo del límite inferior de acumulación del virus que mostraron las Campbell 28 testigos (1-10ng). Estos resultados confirmaron y ampliaron los obtenidos previamente acerca de la resistencia contra TYLCV en este tipo de evento (Fuentes y col., 2006). La poca o ninguna replicación de TYLCV y la escasa presencia de síntomas indicaron que ambos eventos son altamente resistentes al virus, no sólo en época de cultivo (datos no mostrados), sino, también, bajo condiciones adversas del verano con elevada incidencia de la enfermedad en el campo. En paralelo, el análisis molecular del proceso de silenciamiento en estas plantas se realizó mediante la caracterización de la población de siRNA utilizando la técnica de *Northern blot* de alta resolución y la secuenciación profunda. De forma general, en el *Northern blot*, todas las plantas 126 y B1 mostraron abundante representación de siRNA generados a partir de la horquilla transgénica. Sin embargo, las plantas Campbell 28 acumularon muy poca cantidad de siRNA virales (vsRNA) derivados de C1. La escasa representación de tales vsRNA en las Campbell 28 sugiere que los precursores de ARNdc virales son menos abundantes que la horquilla de ARN precursora de siRNA en las plantas 126 y B1. Por otro lado, las señales de los vsRNA derivados de TYLCV en las plantas Campbell 28 no son tan fuertes como las de los siRNA derivados de la horquilla, a pesar de la alta carga viral en las plantas Campbell 28 enfermas. Ello corrobora el bajo rendimiento del silenciamiento natural en las plantas Campbell 28 inducido a partir de los transcriptos virales. Los resultados de secuenciación profunda confirmaron los mayores niveles de producción de siRNA a partir de la horquilla de ARN con respecto a la totalidad de los vsRNA derivados de TYLCV, estos últimos resultaron 3 veces menos abundantes que los siRNA derivados de la horquilla. Los siRNA, generados a priori en las células de las plantas 126 y B1, pueden desencadenar el silenciamiento contra TYLCV entrante de un modo más efectivo que los siRNA derivados del propio virus, que estarían menos representados. Probablemente, de esta forma se previene la replicación de TYLCV y su diseminación sistémica en las plantas transgénicas. Los patrones de tallas de vsRNA derivados de TYLCV y los derivados de la horquilla reflejaron algunas peculiaridades también. Por ejemplo, los patrones de tallas de vsRNA derivados de TYLCV no fueron exactamente iguales. En las dos réplicas de plantas de campo de Campbell 28 analizadas por secuenciación profunda la cantidad de vsRNA de 21 nt producida en la planta 5, es considerablemente mayor que la de 22 nt, pero en la

planta 308 ambas clases de siRNA se acumularon al mismo nivel lo cual refleja inconsistencia del proceso natural de silenciamiento. Así, aunque el promedio de lecturas entre ambas plantas apuntó a la superioridad de vsRNA de 21 nt, su prevalencia pudo afectarse por algún factor o condición desconocida. En cambio, los eventos 126 y B1 mostraron una predominancia indiscutible de los siRNA de 21 nucleótidos, seguidos por los de 22 (dos veces menos abundante), lo cual ratifica la prevalencia del proceso de silenciamiento post-transcripcional y sugiere que la horquilla se procesa fundamentalmente por proteínas de tomate homólogas a DCL4 y DCL2. Es interesante que el perfil de tallas de los siRNA derivados del transgén en las plantas 126 y B1 sigue aproximadamente el mismo esquema que el de los vsRNA en las Campbell 28. Se producen preferentemente en el orden: 21-22-24 nt, lo cual puede asociarse con una actividad preponderante de las proteínas DCL4-DCL2-DCL3, en ambos casos. Más aún, la abundancia de las tallas de 21 y 22 nt tanto en la respuesta natural como en el silenciamiento inducido por la horquilla, indica una interacción cooperativa entre DCL4 y DCL2, tal como se ha observado en diversas infecciones virales sistémicas (Llave, 2010; Garcia-Ruiz y col., 2010). Esto se corresponde con el criterio de que el mecanismo de ARN de interferencia inducido por una horquilla actúa a través de la ruta de defensa antiviral (Fusaro y col., 2006). Se plantea que en una infección, el efecto de silenciamiento antiviral de los siRNA de 21 nt es más potente que el de las especies de 22 nt (Wang y col., 2011), lo cual respalda la idea de que la alta producción de siRNA de 21 nt a partir del transgén puede explicar la potencia del silenciamiento contra TYLCV en los eventos 126 y B1. Además, la horquilla contempla precisamente la extensa región de C1 de la que se derivan pocos vsRNA en la infección natural (la maquinaria de silenciamiento de la planta no es capaz de dar una mayor respuesta a partir de esta secuencia). Por lo tanto, el transgén confiere a los eventos una poderosa fuente de siRNA contra TYLCV. La distribución de regiones calientes productoras de siRNA de las tres clases principales a lo largo de la secuencia de la horquilla, permite hacer varias inferencias adicionales. Los mayores puntos calientes de siRNA de 21 nt se generaron en ambos extremos de la horquilla. Esto sugiere que DCL4 y/o DCL1 procesaron la horquilla a partir de ambos extremos con la misma eficiencia. En el caso de los siRNA de 22 nt, los principales puntos calientes se encontraron en las secuencias colindantes con el intrón (secuencia dispuesta entre los dos brazos de ADN que dan lugar a la horquilla) por lo que DCL2 parece funcionar mejor a partir de ese extremo. Por otra parte, DCL3 produce siRNA de 24 nt preferentemente a partir del lado opuesto, es decir, de los extremos 3' y 5' protuberantes no complementarios de la horquilla transgénica. Una explicación alternativa para esta distribución de puntos calientes tiene en cuenta la contribución de las proteínas AGO en la estabilización de los siRNA de manera secuencia específica y según su talla, tal como se estableció en *Arabidopsis thaliana* (Mi y col., 2008; Takeda y col., 2008; Montgomery y col., 2008a; Havecker y col., 2010). En ese sentido, el perfil del nucleótido 5' de los siRNA derivados del transgén, difiere del perfil de los sRNA de tomate en dos de las clases. Los siRNA de 22 y 24 nt transgénicos contienen fundamentalmente 5'U, mientras que los 5'A de estas tallas están poco representados, contrario a lo que sucede con los análogos endógenos. Sin embargo, los siRNA de 21 nt derivados de la horquilla son los más abundantes y, similar a los sRNA de 21 nt de tomate, poseen principalmente 5'U. La expresión de la horquilla no produjo cambios notables en los porcentajes de los nucleótidos 5' de los sRNA endógenos (así como tampoco la presencia del virus). Esto indica que, a pesar de la alta producción de siRNA derivados de la horquilla, lo cual mantiene "ocupada" la maquinaria de silenciamiento,

no se afectan los procesos normales de silenciamiento en la planta relacionados con otras funciones. Los valores de siRNA derivados del transgén, respecto al total de 20-25 nt, son semejantes en las dos plantas que representan los eventos en condiciones controladas: 7,1% en la muestra de 126 y 6,8% en la de B1. En condiciones de campo abierto, la acumulación de siRNA transgénicos es ligeramente menor en cada caso, pero también muestran cifras semejantes: 126 con 6,8% y B1 con 5,7%. De modo que, ambos eventos, expuestos o no a condiciones adversas del verano, expresan de forma estable, niveles de siRNA altos y comparables. De marcada relevancia resulta que los patrones de puntos calientes de siRNA a lo largo de las secuencias repetidas e invertidas del transgén, tanto en una orientación como en otra, prácticamente no se diferencian entre las dos líneas, ni en cada una en los dos entornos analizados. De hecho, la distribución de puntos calientes y las cantidades de lecturas correspondientes a las clases de siRNA de 21, 22 y 24 nt independientes, son extraordinariamente similares. Es decir, el mecanismo de biogénesis de siRNA a partir de la horquilla de ARN, es notablemente reproducible en las dos líneas transgénicas y no se afecta sustancialmente por las condiciones ambientales. En su conjunto, los resultados presentados demuestran la consistencia del silenciamiento contra TYLCV, “reprogramado” por una estructura de ARNdc integrada por una larga región 3’ de C1 dispuesta en dos copias invertidas separadas por un intrón. Los eventos transgénicos 126 y B1 de *S. lycopersicum* expresan abundantes siRNA antivirales a partir de la horquilla de ARN transgénica, por al menos seis generaciones y expuestas a condiciones de verano intenso. En el campo, las plantas transgénicas se sometieron de forma marcada a varios factores bióticos y abióticos estresantes, incluyendo cantidades masivas de moscas blancas virulíferas que transmitieron TYLCV y potencialmente, otros geminivirus. A pesar de esto, los dos eventos mantuvieron una expresión estable de abundantes cantidades de siRNA derivados del transgén y exhibieron una alta resistencia a la enfermedad provocada por TYLCV, que afectó severamente las plantas de tomate no transgénicas colindantes. Los datos presentados fundamentan la estabilidad, fortaleza y consistencia antiviral de este tipo de eventos (Fuentes y col., 2016).

PUBLICACIONES ASOCIADAS A LOS RESULTADOS DEL TRABAJO:

1-Alejandro Fuentes, Natacha Carlos, Yoslaine Ruíz, Danay Callard, Yadira Sanchez, Maria Elena Ochagavía, Jonathan Seguin, Nachelli Malpica-López, Thomas Hohn, Maria Rita Lecca, Rosabel Pérez, Vivian Doreste, Hubert Rehrauer, Laurent Farinelli, Merardo Pujol, and Mikhail M. Pooggin.” Field trial and molecular characterization of RNAi transgenic tomato plants that exhibit resistance to Tomato yellow leaf curl geminivirus”, 2016. MPMI, vol 29, No. 3, pp 197-209;

2- Alejandro D. Fuentes, Pedro L. Ramos, Yadira Sánchez, Danay Callard, Aleines Ferreira, Kenia Tiel, Karen Cobas, Raisa Rodríguez, Carlos Borroto, Vivian Doreste y Merardo Pujol. “A transformation procedure for recalcitrant tomato by addressing transgenic plant-recovery limiting factors”, 2008. Biotechnol. J., 3, 1088–1093.