



**Vicente Pallás,
Frederic Aparicio
y Jesús A. Sánchez-
Navarro**

Departamento de
Virología Molecular y
Evolutiva de Plantas.
Instituto de Biología
Molecular y Celular
de Plantas (IBMCP)
(UPV-CSIC). Universitat
Politècnica de Valencia.
Email: vpallas@ibmcp.
upv.es

Nuevas tecnologías para el control de las virosis en tomate

Las nuevas tecnologías han venido habitualmente acompañadas de sendas revoluciones conceptuales derivadas del progreso en la generación de conocimiento científico básico. La determinación de la estructura de la molécula del ADN permitió, entre otros muchos avances tecnológicos, el desarrollo e implementación de la tecnología del ADN recombinante. Además, la demostración de la complementariedad de sus bases nitrogenadas dio lugar a una serie de técnicas esenciales en biología molecular en general y en el fitodiagnóstico en particular, tales como la detección de patógenos basada en la hibridación molecular. Más recientemente, el descubrimiento y aplicación de la técnica CRISPR-Cas (siglas inglesas de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) ha tenido un impacto decisivo en el campo del fitodiagnóstico y en el del control de enfermedades en plantas y animales estando sus potencialidades todavía con mucho margen por explotar. En esta pequeña revisión describimos las contribuciones de la hibridación molecular a la detección polivalente de virus que afectan al tomate y la aplicación de la tecnología CRISPR-Cas al control de estos importantes patógenos.

POLISONDAS DE TOMATE

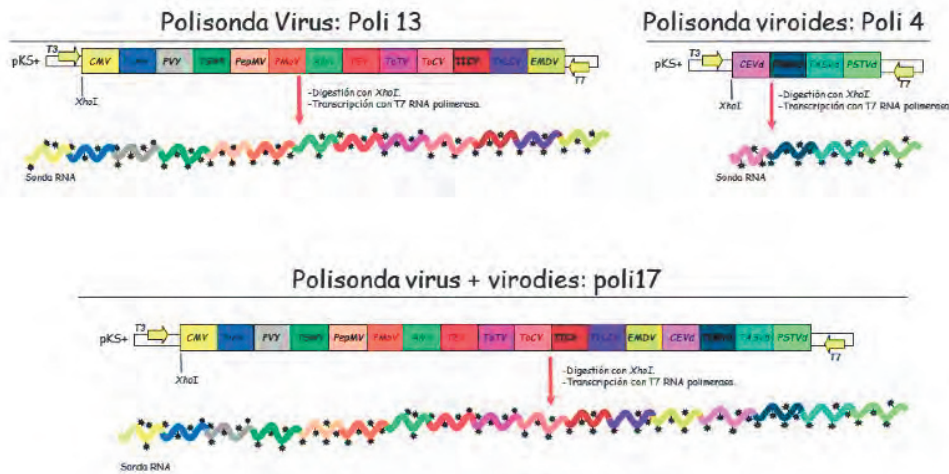


Figura 1. Representación esquemática del diseño y obtención de una polisonda para la detección de trece virus y cuatro viroides que afectan al tomate. En la parte superior izquierda se representa la concatenación de fragmentos de secuencia de los virus más importantes del tomate fusionados en tándem bajo el control de dos promotores T3 y T7 para la síntesis del transcrito correspondiente marcado con digoxigenina (asteriscos). Los virus de ARN incluidos en esta polisonda son: el del mosaico de la alfalfa (AMV), el del mosaico del pepino (CMV), del moteado de la Parietaria (PMoV), del mosaico del pepino dulce (PepMV), Y de la patata (PVY), del grabado de tabaco (TEV), de la clorosis del tomate (ToCV), de la clorosis infecciosa del tomate (TICV), del mosaico del tomate (ToMV), del bronceado del tomate (TSWV), del torrado del tomate (ToTV) y el del rizado amarillo de la hoja del tomate (TYLCV), virus del enanismo moteado de la berenjena (EMDV). En la polisonda de viroides (superior derecha) están representados las secuencias parciales fusionadas en tándem del viroide de la exocortis (CEVd), el del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd), el del enanismo apical del tomate (TASVd) y el de la planta macho del tomate (TPMVd). En la parte inferior se representa la polisonda conjunta que detecta tanto los virus como los viroides anteriormente descritos.

Los virus de las plantas son los agentes causales de enfermedades en cultivos de importancia económica que pueden llegar a provocar pérdidas de hasta 50.000 millones de euros anuales en todo el mundo. Este escenario puede agravarse debido esencialmente a los efectos que el cambio climático está teniendo sobre los vectores de estos patógenos y sus correspondientes huéspedes.

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los cultivos de hortalizas más importantes, representando el 72% del valor de las hortalizas frescas producidas en todo el mundo. El número de virus y viroides que infectan los cultivos de tomate es de 141, lo que representa uno de los huéspedes más susceptibles, detrás del pepino (*Cucumis sativus*), con 153 patógenos virales (Brunt y col., 1996). Los cultivos de tomate infectados con estas especies de virus/viroides, solos o en combinación, pueden mostrar una variedad de patrones de desorden fuertes y severos, como síntomas necróticos en hojas y frutos, reducción en el rendimiento del fruto, maduración irregular del fruto y, en algunos casos, colapso del crecimiento de las plantas. Además, el

hecho de que parte de estos patógenos sean transmitidos por semillas o insectos contribuye a su rápida propagación.

Detección polivalente de virus de tomate mediante el uso de polisondas

Los métodos de detección temprana siguen siendo una de las principales y más efectivas estrategias de control para las enfermedades virales de las plantas. Durante muchos años el principal objetivo de los estudios en el campo del fitodiagnóstico ha tratado de ir superando umbrales de sensibilidad que han permitido detectar a día de hoy a nivel de molécula. Los retos en esta disciplina se han desplazado recientemente a la consecución de formatos multidiana (revisado en Pallás y col., 2018). En este sentido, el uso de 'polisondas', o sondas de RNA que llevan secuencias parciales de diferentes virus o viroides de plantas fusionados en tándem, ha permitido la detección polivalente de hasta diez patógenos diferentes mediante un procedimiento basado en hibridación molecular no radiactiva. Esta técnica permite además

la detección simultánea de patógenos con diferente estilo de vida/infección en un mismo cultivo, tal y como se ha puesto de manifiesto en la detección de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, Pepino mosaic virus y Mexican papita viroid en tomate (Zamora-Macorra y col., 2015). También puede aplicarse, con ligeras variaciones en la temperatura de hibridación, para la detección polivalente de todas las especies de un género viral, tal y como se ha puesto de manifiesto para los potyvirus (Sánchez-Navarro y col., 2018). En este caso, una polisonda dirigida a una región de 500 nt del gen N1b de los potyvirus, permite la detección cruzada de diferentes especies cuando el porcentaje de identidad es superior al 68%. La utilización de polisondas con diferentes fragmentos fusionados en tándem que cubren la diversidad observada en esta región dentro del género Potyvirus, ha permitido detectar todas las especies ensayadas (32) junto con dos rymovirus, indicando la capacidad potencial de la GP (Genus Probe) de detectar todos los potyvirus descritos y los no caracterizados.

En nuestro grupo de trabajo hemos

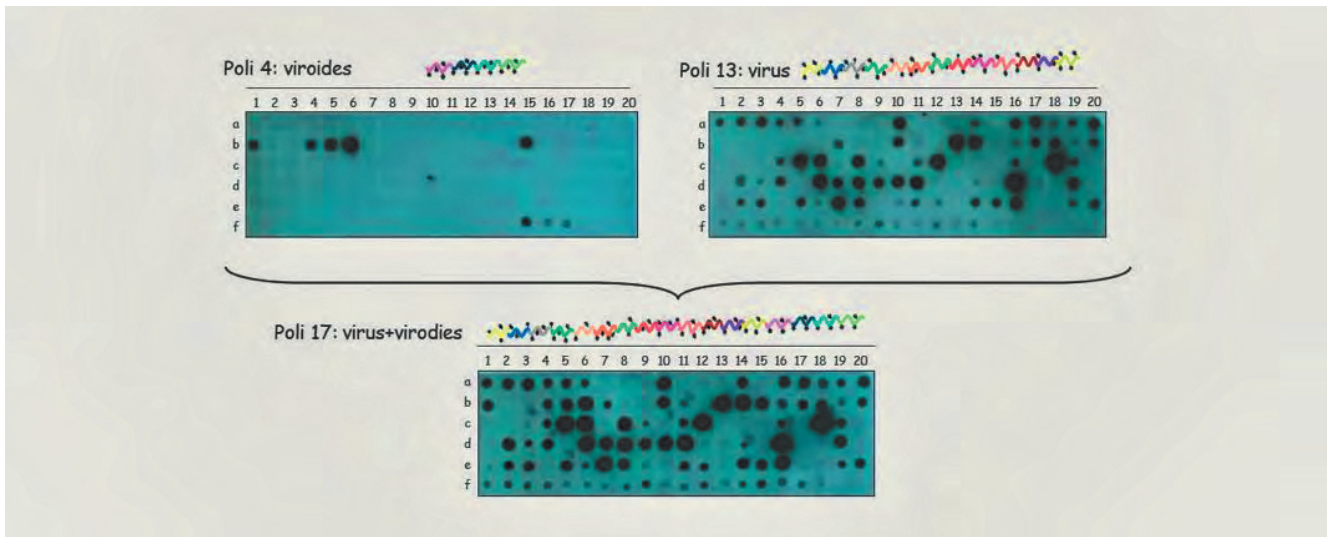


Figura 2. Ejemplo práctico de la detección polivalente de virus y viroides que afectan al tomate de 120 muestras de campo. Los blots superiores corresponden a la detección de viroides (superior izquierda) y virus (superior derecha) revelando una mayor incidencia de éstos últimos. El blot de la parte inferior corresponde a la detección polivalente de ambos patógenos.

desarrollado una polisonda que es capaz de detectar simultáneamente la presencia de trece virus y cuatro viroides que afectan al tomate (Figura 1), no viéndose alterada la sensibilidad con respecto a las sondas individuales y alcanzando un límite de detección de hasta 0,2 pg/μl de RNA viral o viroidal (Sánchez-Navarro y col., 2019) (Figura 2). Además, esta tecnología nos permitió detectar una semilla de tomate infectada en un pool de 250, proporción recomendada por EPPO para análisis en semilla. La robustez y reproducibilidad de la polisonda de tomate se demostró utilizando cincuenta muestras de campo y mediante un ensayo inter-laboratorio que implicaron a seis laboratorios, obteniéndose un índice Kappa muy alto.

La tecnología CRISPR-Cas para el control de las virosis en tomate

La tecnología CRISPR-Cas está revolucionando las posibilidades y estrategias de mejora genética vegetal en general y del control de las virosis en particular. Basada en el complejo sistema inmunitario de las bacterias que les protege frente a virus (Figura 3), su robustez y sobre todo su versatilidad han hecho posible que se haya convertido en muy pocos años en una herramienta muy prometedora para la generación de re-

sistencias frente a virus de plantas. El mecanismo por el cual opera y las peculiaridades de su modo de acción no se describen aquí por falta de espacio y se remite al lector a la reciente excelente revisión sobre el tema (López-Marquez y col., 2018). Aquí se describen las aplicaciones de esta tecnología en el control de las enfermedades virales de plantas. El reconocimiento y corte de los genes diana pueden dirigirse al genoma viral o a un factor de huésped que elimine la susceptibilidad viral.

CRISPR-Cas dirigido contra el genoma viral

Dado que las primeras enzimas tipo Cas que se describieron reconocían y cortaban secuencias de ADN, no es de extrañar que las primeras aplicaciones de esta tecnología en el control de virosis de plantas lo fueran para los geminivirus, en concreto contra el TYLCV (Ali y col., 2015, 2016), el del enanismo amarillo de la cebada (BeYDV, Baltes y col., 2015), el virus del ápice rizado severo de la remolacha (BSCTV, Ji y col., 2015, 2018) y más recientemente el virus del enanismo del trigo (Kis y col., 2019). Todos estos trabajos constituyeron la prueba de concepto de que esta tecnología confería resistencia en mayor o menor medida a virus DNA y se llevaron a cabo en plantas modelo de *Nicotiana benthamiana* o *Arabidopsis thaliana* y pusieron de

manifiesto que: i) la región más eficiente para dirigir la edición génica era la región intergénica del origen de replicación de estos virus frente a las regiones codificantes y ii) que aun siendo la técnica de modificación génica más precisa que cualesquiera de las que se había utilizado antes, todavía aparecían modificaciones no deseadas en regiones diferentes a las diseñadas. La primera edición genética en tomate para un agente patógeno se realizó para generar resistencia frente al mildiu (Nekrasov y col., 2017), mientras que para un virus se demoró un año más, siendo de nuevo el TYLCV el elegido, observándose una disminución significativa del título viral en plantas de tomate y en sus descendientes (Tashkandi y col., 2018).

La tremenda variedad de proteínas Cas que se han encontrado y caracterizado recientemente ha revelado la existencia de algunas de ellas que son capaces de reconocer y cortar el ARN (ej. Cas13a), lo que ha posibilitado la aplicación de esta técnica a virus de genoma de ARN. Así, Aman y col. (2018) han obtenido plantas de *N. benthamiana* parcialmente resistentes al virus del mosaico del nabo (TuMV) dirigiendo el sistema CRISPR-Cas a la región de la proteína supresora del silenciamiento HC-Pro. Zhag y col. (2018) han observado que plantas que expresan FnCas9 y ARNs guías dirigidos al CMV y TMV

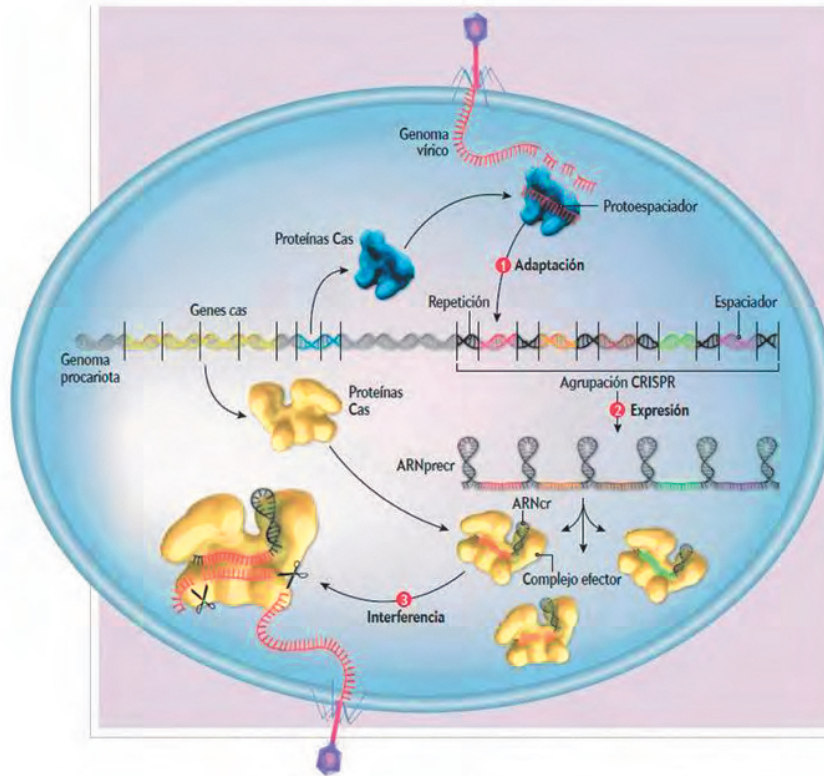


Figura 3. Representación esquemática de las fases del sistema general de defensa bacteriano frente a virus mediado por CRISPR-Cas. (1) Adaptación: la bacteria/arquea integra fragmentos pequeños de ADN viral entre las repeticiones presentes en los loci CRISPR mediante el concurso de las proteínas Cas (azul) generándose un nuevo espaciador. (2). Expresión: en esta fase la agrupación CRISPR se transcribe y se procesa el ARN precursor (ARNprecr) uniéndose a otras proteínas Cas (amarillo) para formar complejos efectores. (3). Interferencia: el ARNcr maduro forma un complejo efector que cortará el ácido nucleico de un nuevo virus invasor. Reproducido de Investigación y Ciencia, Mojica y Almendros 2017, con permiso de Prensa Científica S.A.®.

presentaban síntomas significativamente más débiles y una acumulación del ARN viral muy reducida.

CRISPR-Cas dirigido contra factores del huésped

El progreso en el conocimiento del modo de acción de alelos que generan una resistencia recesiva a los virus de plantas (Díaz-Pendón y col., 2004) ha permitido diseñar estrategias derivadas de CRISPR para el control de las virosis, especialmente en potyvirus. Mediante esta tecnología se ha podido diseñar una mutación en el factor de eIF(iso)4E de *Arabidopsis* para conseguir una resistencia completa al TuMV (Pyott y col., 2016). Chandrasekaran y col. (2016) desarrollaron un mutante de pepino no transgénico inactivando la función del factor eIF4E mediante CRISPR/Cas9. El mutante generado reveló inmunidad al virus del amarilleamiento de las venas del pepino (CVYV), al virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV) y al virus de la mancha anular de la papaya (PRSV).

Mutaciones en el factor eIF4G de variedades susceptibles de arroz ha posibilitado la obtención de resistencias a los virus causantes de la enfermedad del tungro del arroz con unas tasas de mutación del 36% al 86.6%, trasmitiéndose con éxito a las generaciones siguientes (Maccovei y col., 2018). Recientemente, Tripathi y col. (2019) han inactivado el virus endógeno del estriado de la banana (eBSV) localizado en el genoma B y observado que el 75% de las plantas editadas permanecieron asintomáticas.

Una de las principales restricciones al uso de esta tecnología es la forma en la que el complejo de edición se suministra a la planta. La mayoría de los casos anteriormente descritos ha requerido el concurso de transgénesis, con las obvias limitaciones que ello supone. Una alternativa a la transgénesis es el uso de vectores virales. Ali y col. (2019) han desarrollado vectores basados en el virus del cascabeleo del tabaco (TRV) y del virus del pardeamiento temprano del

guisante (PEBV), pero hasta el momento no se ha utilizado esta alternativa en tomate.

Conclusiones

El uso de polisondas puede ser una tecnología muy recomendable en la detección polivalente como un primer paso para evaluar la incidencia de los virus en plantas madre y proceder a su certificación, o bien en programas de cuarentena y saneamiento donde se requieren análisis de amplio espectro. Por otra parte, la gran versatilidad de la tecnología CRISPR-Cas está permitiendo desarrollar estrategias de control de las virosis del tomate que eviten la aplicación de transgénesis.

Bibliografía

- ! Ali, Z., Ali, S., Tashkandi, M., Shan-e-Ali Zaidi, S. and Mahfouz, M.M. 2016. CRISPR/Cas9-Mediated Immunity to Geminiviruses: Differential Interference and Evasion. *Scientific Reports* 6:26912.
- Ali, Z., Abulfaraj, A., Idris, A., Ali, S., Tashkandi, M. and Mahfouz, M.M. 2015. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome Biol.* 16:238.
- Ali, Z., Abulfaraj, A., Li, L., Ghosh, N., Piatek, M., Mahjoub, A., Aouida, M., Piatek, A., Baltes, N.J., Voytas, D.F., Dinesh-Kumar S. and Mahfouz, M.M. 2015. Efficient Virus-Mediated Genome Editing in Plants Using the CRISPR/Cas9 System. *Mol. Plant* 8, 1288–1291.
- Ali, Z., Eid, A., Ali, S. and Mahfouz, M.M. 2019. Pea early-browning virus-mediated genome editing via the CRISPR/Cas9 system in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *Virus Res.* 244, 333-337.
- Aman, R., Ali, Z., Butt, H., Mahas, A., Aljedaani, F., Khan, M.Z., Ding2 and Mahfouz, M.S. 2018. RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. *Genome Biol.* 19:1.
- Aman, R., Mahas, A., Butt, H., Ali, Z., Aljedaani, F. and Mahfouz, M. 2018. Engineering RNA Virus Interference via the CRISPR/Cas13 Machinery in *Arabidopsis*. *Viruses* 10, 732.
- Baltes, N., Hummel, A.W., Konecna, E., Cegan, R., Bruns, A.N., Bisaro, D.M. and Voytas, D.F. 2015. Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR–Cas prokaryotic immune system. *Nature Plants* 1, 15145.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L., and Zurcher, E. J. 1996. Plant viruses online. Descriptions and lists from the VIDE database. Wallingford, UK: CAB International.
- Chandrasekaran, J., Brumin, M., Wolf, D., Leibman, D., Klap, C., Pearlsman, M., Sherman, A., Arazi, T. and Gal-On, A. 2016. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol. Plant Pathol.* 17(7), 1140–1153.
- Diaz-Pendon, J.A., Truniger, V., Nieto, C., Garcia-Mas, J., Bendahmane, A. and Aranda, M.A. 2004. Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Mol. Plant Pathol.* 5, 223–233.
- Iqbal, Z., Sattar, M.N. and Shafiq, M. 2016. CRISPR/Cas9: A Tool to Circumscribe Cotton Leaf Curl Disease. *Front. Plant Sci.* 7:475.
- Ji, X., Si, X., Zhang, Y., Zhang, H., Zhang, F. and Gao, F. 2018. Conferring DNA virus resistance with high specificity in plants using virus-inducible genome-editing system. *Genome Biol.* 19:197
- Ji, X., Zhang, H., Zhang, Y., Wang, Y. and Gao, C. 2015. Establishing a CRISPR–Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. *Nature Plants* 1, 15144.
- Khatodia, S., Bhatotia, K. and Tuteja, N. 2017. Development of CRISPR/Cas9 mediated virus resistance in agriculturally important crops. *Bioengineered* 8, 274–279.
- Kis, A., Hamar, E., Tholt, G., Ban, R. and Havelda, Z. 2019. Creating highly efficient resistance against wheat dwarf virus in barley by employing CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotech. J.* 17, 1004–1006.
- López-Márquez, D., Bejarano, E.R. y Luna; A.P. 2018. El sistema CRISPR/Cas, un poderoso aliado en la lucha contra los organismos fitopatógenos. *Fitopatología. Revista de la SEF* 3, 26-35.
- Macovei, A., Sevilla, N.R., Cantos, C., Jonson, G.B., Slamet-Loedin, I., Cermak, T., Voytas, D.F., Choi, I.R. and Chadha-Mohanty, P. 2018. Novel alleles of rice eIF4G generated by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis confer resistance to Rice tungro spherical virus. *Plant Biotech. J.* 6, 1918–1927.
- Mahas, A. and Mahfouz, M. 2018. Engineering virus resistance via CRISPR–Cas systems. *Curr. Opp. Virol.* 32:1–8
- Nekrasov, V., Wang, C., Win, J., Lanz, C., Weigel, D. and Kamoun, S. 2017. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Scientific Reports* 7: 482.
- Pallás, V., Sánchez-Navarro, J.A. and James, D. 2018. Recent Advances on the Multiplex Molecular Detection of Plant Viruses and Viroids. *Front. Microbiol.* 9:2087.
- Pyott, D.E., Sheehan, E. and Molnar, A. 2016. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants. *Mol. Plant Pathol.* 17(8), 1276–1288.
- Sánchez-Navarro, J.A., Cooper, C.N., and Pallás, V. 2018. Polyvalent detection of members of the genus potyvirus by molecular hybridization using a genus-probe. *Phytopathology* 108 (12), 1522-1529.
- Sánchez-Navarro, J.Á., Corachán, L., Font, I., Alfaro-Fernández, A., Pallás, V. 2019. Polyvalent detection of twelve viruses and four viroids affecting tomato by using a unique polyprobe. *Eur. J. Plant Pathol.* 155:361–368.
- Tashkandi, M., Ali, Z., Aljedaani, F., Shami, A. and Mahfouz, M.M. 2018. Engineering resistance against Tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato. *Plant Sig. Beh.* 13, e1525996.
- Tripathi, J.N., Ntui, V. O., Ron, M., Muiruri, S.K., Britt, A. and Tripathi, L. 2019. CRISPR/Cas9 editing of endogenous banana streak virus in the B genome of *Musa* spp. overcomes a major challenge in banana breeding. *Comm. Biol.* 2:46.
- Uniyal, A.P., Yadav, S.K. and Kumar, V. 2019. The CRISPR–Cas9, genome editing approach: a promising tool for drafting defense strategy against begomoviruses including cotton leaf curl viruses. *J. Plant Biochem. Biotech.* 28(2):121–132.
- Wang, Z., Hardcastle, T.J., Canto Pastor, A., Yip, W.H., Tang, S. and Baulcombe, D.C. 2018. A novel DCL2-dependent miRNA pathway in tomato affects susceptibility to RNA viruses. *Genes & Development* 32:1155–1160
- Zaidi, S.S., Mansoor, S. Ali, Z., Tashkandi, M. and Mahfouz, M.M. 2016. Engineering Plants for Geminivirus Resistance with CRISPR/Cas9 System. *Trends Plant Sci.*, 21, 279-281.
- Zamora-Macorra, E. J., Ochoa-Martínez, D. L., Valdovinos-Ponce, G., Rojas-Martínez, R., Ramírez-Rojas, S., Sánchez-Navarro, J. Á. 2015. Simultaneous detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Pepino mosaic virus and Mexican papita viroid by non-radioactive molecular hybridization using a unique polyprobe. *Eur. J. Plant Pathol.* 143(4), 779–787.
- Zhang, T., Zheng, Q., Yi, X., An, H., Zhao, Y., Ma, S. and Zhou, G. 2018. Establishing RNA virus resistance in plants by harnessing CRISPR immune system. *Plant Biotech. J.* 16, 1415–1423.