

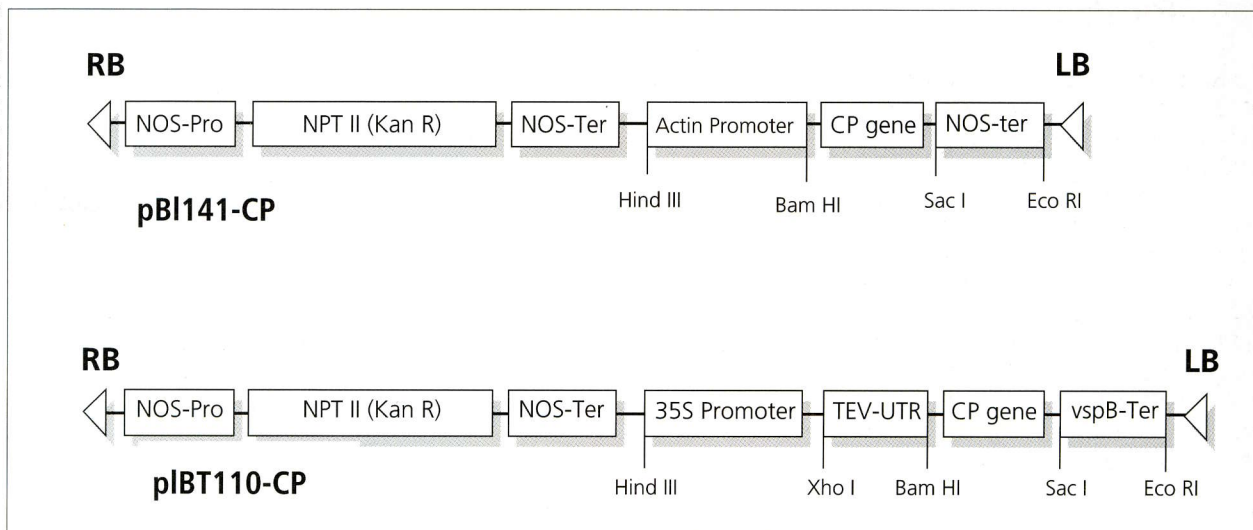
NOTA DE INVESTIGACIÓN

Leonardo Mariño Ramírez¹

1. Programa Nacional de Biotecnología Agrícola, CORPOICA, A.A. 240142-Las Palmas, Santa Fe de Bogotá, Colombia, e-mail: redbtad@colciencias.gov.co.

Figura 1. Diagrama esquemático de la región t-ADN de los constructos pBI141-CP y pIBT110-CP. RB: borde derecho del t-ADN; LB: borde izquierdo del t-ADN; NOS-Pro: promotor nopalina sintetasa; NOS-Ter: terminador nopalina sintetasa; Promotor 35S: Virus del Mosaico del Coliflor; TEV-UTR: región no traducible del Virus del Grabado del Tabaco; vspB-Ter: Región terminadora vspB de la soya con señal de poliadenilación.

Figure 1. Schematic diagram of the t-DNA region of pBI141-CP and pIBT110-CP. RB: right t-DNA border; LB: left t-DNA border; NOS-Pro: nopaline synthase promoter; NOS-Ter: nopaline synthase terminator; 35S-promoter: Cauliflower Mosaic Virus; TEV-UTR: Tobacco Etch Virus 5'-UTR; vspB-Ter: soybean vspB 3'-UTR and polyadenylation signal.



Clonación del gen de la cápside protéica de una cepa colombiana del Virus del Mosaico del Pepino (CMV) para su expresión en plantas por transformación mediante *Agrobacterium*

El Virus del Mosaico del Pepino (*Cucumber Mosaic Virus*, CMV) forma parte del grupo Cucumovirus de la familia *Bromoviridae*; este virus tiene su genoma dividido en tres cadenas positivas de ARN y un ARN-4 subgenómico el cual se genera de la transcripción del ARN-3 y sirve como ARN mensajero para la síntesis de proteína de la cápside (Davies, 1988). El CMV puede infectar más de 800 especies de plantas y se encuentra distribuido en todo el mundo. El gen de la cápside proteica (CP) del CMV se ha usado para producir plantas transgénicas que han mostrado protección contra infecciones causadas por el CMV (Nakajima, 1993; Quemada, 1991); recientemente un gen CP, procedente de una cepa de CMV que infecta el plátano, ha sido caracterizado (Reichel, 1996) y su secuencia fue depositada en el Banco de Genes (GenBank) (Benson, 1996). A continuación se describe la construcción de dos vectores binarios para la expresión del gen CP en plantas.

El gen CP (GenBank Acc. N^o U32858) se clonó usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), introduciendo los sitios de restricción *Bam* HI y *Sac* I en los extremos 5' y 3' de la región codificadora (estos sitios de restricción se subrayan en la secuencia de oligonucleótidos *primers*). El gen CP se amplificó en una reacción que contenía 10 ng de ADN plasmídico (Rei-

chel, 1996), 1 μ M de cada oligonucleótido *primer* (5'-CGGGATCCATGGACAAATCT-GAATCAAC-3' y 5'-CGGAGCTCGAATCA-GACTGGGAGCAC-3'), 200 μ M dNTP's, 1X PCR Buffer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 1,5 mM MgCl₂), y 2,5 U Taq-ADN-polimerasa (Gibco-BRL, U.S.A.). La PCR se efectuó mediante 25 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, con un paso de extensión final de 72°C por 5 minutos en un termociclador de bloque PTC-100 (M.J. Research, U.S.A.). Se analizaron 5 μ L de esta reacción en un gel de agarosa que contenía 0,5 μ g/ml de EtBr bajo luz ultravioleta. El fragmento amplificado fue de 0,65 kb de largo, y se purificó mediante extracción con fenol y precipitación con etanol. Después de la purificación, la secuencia codificante del gen CP se clonó como un fragmento *Bam* HI-*Sac* I en el plásmido pBluescript SK (Stratagene, U.S.A.), mediante técnicas estándar de ADN recombinante (Sambrook, 1989). La secuencia entera del clon se determinó usando oligonucleótidos *primers* internos y el kit de secuencia T7 Sequenase versión 2.0 (Amersham, U.K.), con modificaciones menores (Barker, 1993).

El gen CP fue subclonado en los sitios *Bam* HI y *Sac* I del vector binario pIBT110 (Mason, 1995); sus elementos se describen en el trabajo de Haq (1995) e incluyen un casete de resistencia a la kanamicina para

la selección de transformantes putativos, tal como se observa en la Figura 1. Esta construcción, designada como pIBT110-CP, se preparó para la expresión del gen CP en el tabaco. El gen CP también se subclonó en los sitios *Bam* HI y *Sac* I del vector binario pBI141 (May, 1995), reemplazando el gen *gus* por el gen CP (Figura 1). Esta construcción se preparó para la expresión del gen CP en *Musa* spp. usando la kanamicina como marcador selectivo. Las construcciones mencionadas (pIBT110-CP y pBI141-CP) se prepararon en *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene, U.S.A.) y fueron usadas para la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Clonetech, U.S.A.). En la actualidad, el plásmido pIBT110-CP está siendo probado en plantas de tabaco (Santamaría, 1997). Los resultados de esta prueba proporcionarán información sobre la funcionalidad de la construcción mencionada; también aportarán datos sobre los niveles de protección de las plantas de tabaco transgénicas infectadas por otras razas de CMV del mismo subgrupo.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue parcialmente financiado mediante una beca otorgada al autor por el Programa de Becas Cochran (Departamento de Agricultura de Estados Unidos). El autor agradece al Dr. H.S. Mason por proveer los vectores binarios y por la lectura crítica del manuscrito.

Cloning of the coat protein gene from a Colombian strain of CMV for its expression in plants using *Agrobacterium*-mediated transformation

Cucumber Mosaic Virus (CMV) is a member of the cucumovirus group in the *Bromoviridae* family which members have divided genomes consisting of three positive-strand RNA's and a subgenomic RNA 4 that is generated from the transcription of RNA 3 and serves as a messenger RNA for the viral coat protein (Davies, 1988). CMV can infect over 800 species of plants and has a world-wide distribution. The coat protein (CP) gene of CMV has been used for the production of transgenic plants that have shown protection against infections by CMV (Nakajima, 1993; Quemada, 1991). Recently, the CP gene from a CMV strain infecting plantains has been

characterized (Reichel, 1996) and its sequence was deposited in GenBank (Benson, 1996). This manuscript describes the construction of two binary vectors for the expression of the CP gene in plants.

The CP gene (GenBank Acc. N° U32858) was cloned using the Polymerase Chain Reaction (PCR), introducing the restriction sites *Bam* HI and *Sac* I at the 5' and 3'-ends of the coding sequence (restriction sites are underlined in the next primer sequences). The CP gene was amplified in a reaction containing 10 ng of plasmid DNA (Reichel, 1996), 1 µM of each oligonucleotide primer (5'-CGGGATCCATGGACAAATCTGAATCAAC-3' and 5'-CGGAGCTCGAATCAGACTGGGAGCAC-3'), 200 µM dNTP's, 1X PCR Buffer (50 mM KCl; 10 mM Tris HCl, pH 8.3; 1.5 mM MgCl₂), and 2.5 U Taq-DNA-polymerase (Gibco-BRL, USA). The PCR was performed for 25 cycles at 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds, with a final extension step of 72°C for 5 minutes on a PTC-100 thermal-cycler (MJ Research, U.S.A.). The reaction mixture (5 µL) was analyzed on a 1% agarose gel containing 0.5 µg/mL EtBr under UV light. The fragment amplified was 0.65 kb long, and it was purified using phenol extraction and ethanol precipitation. After the purification, the coding sequence of the CP gene was cloned as a *Bam* HI-*Sac* I fragment into pBluescript SK (Stratagene, U.S.A.) by standard recombinant DNA techniques (Sambrook, 1989). The entire sequence of the clone was determined using internal oligonucleotide primers and the T7 Sequenase version 2.0 DNA sequencing kit (Amersham, U.K.) with minor modifications (Barker, 1993).

The CP gene was subcloned into the binary vector pIBT110 (Mason, 1995); its elements are described elsewhere (Haq, 1995); these include a kanamycin resistance gene (*npt-II*) cassette for selection of putative transformants (Figure 1). This new construct, designated as pIBT110-CP, was prepared for the expression of the CP gene in tobacco. The CP gene was also subcloned into the binary vector pBI141 (May, 1995) replacing the *gus* gene with the CP gene (Figure 1). This new construct (pBI141-CP) was prepared for the expression of the CP gene in *Musa* spp. with kanamycin as the selectable marker. The pIBT110-CP and pBI141-CP were prepared in *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene, U.S.A.) and were used for the transformation of *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Clonetech, U.S.A.). The pIBT110-CP is now being tested in tobacco plants (Santamaría, 1997).

The results of this test will give information about the function of the cons-

truct but also bring data about the protection levels of transgenic tobacco plants infected by other CMV strains of the same subgroup.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported, in part, by a fellowship from the Cochran Fellowship Program (USDA). I thank Dr. H.S. Mason for providing binary vectors and critical review of this technical note.

BIBLIOGRAPHY

- Barker, D. F. 1993. A More Robust, Rapid Alkaline Denaturation Sequencing Method. *BioTechniques* 14:168-170.
- Benson, D. A., Boguski, M., Lipman, D.J. and Ostell, J. 1996. GenBank. *Nucleic Acids Research* 24:1-5.
- Davies, C. and Symons, R.H. 1988. Further implications for the evolutionary relationships between tripartite plant viruses based on cucumber mosaic virus RNA 3. *Virology* 165:216-224.
- Haq, T. A., Mason, H.S., Clements, J.D. and Arntzen, C.J. 1995. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268:714-716.
- Mason, H. S. 1995. Plant Expression Vectors. Unpublished.
- May, G. D., Afza, R., Mason, H.S., Wiecko, A., Novak, F.J. and Arntzen, C.J. 1995. Generation of Transgenic Banana (*Musa acuminata*) Plants via *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Bio/Technology* 13:486-492.
- Nakajima M., Hayakawa, T., Nakamura, I. and Suzuki, M. 1993. Protection against cucumber mosaic virus (CMV) strains O and Y and chrysanthemum mild mottle virus in transgenic tobacco plants expressing CMV-O coat protein. *Journal of General Virology* 74:319-322.
- Quemada, H.D., Gonsalves, D. and Slightom, J.L. 1991. Expression of coat protein gene from cucumber mosaic virus strain C in tobacco: protection against infections by CMV strains transmitted mechanically or by aphids. *Phytopathology* 81:794-802.
- Reichel, H., Mariño, L., Kummert, J., Belalcazar, S. and Narváez, J. 1996. Caracterización del gen de la proteína de la cápsida de dos aislamientos del virus del mosaico del pepino (CMV), obtenidos de plátano y banano (*Musa* spp.). *Revista Corpoica* 1:1-5.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, U.S.A.
- Santamaría, M., Rodríguez, M., Mariño, L. y Toro, N. 1997. Genetic Engineering of Cucumber Mosaic Virus Resistance in Edible *Musa* spp. in Colombia. In: Semana de Intercambio Técnico-Científico. Centro de Investigación Tibaitatá, Santa Fe de Bogotá, Colombia.