

## La organización y función del genoma del virus del mosaico dorado del frijol

Douglas P. Maxwell, Stephen F. Hanson, Rebecca, A. Hoogstraten, Paul Ahlquist, James S. Beaver<sup>1</sup>, Ossmat Azzam, and James Karkashian. Department of Plant Pathology, University of Wisconsin, Madison, WI 53706; <sup>1</sup>University of Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico.

La biología molecular explora la posibilidad de solucionar problemas genéticos que no han sido resueltos mediante la aplicación de técnicas convencionales de mejoramiento. Por ejemplo, se han producido plantas con resistencia a virus que poseen ARN, utilizando métodos de ADN recombinantes (Fitchen y Beaver, 1993; Wilson, 1993). Estos resultados promisorios, demuestran el valor de estudiar la organización y la función del genoma de los patógenos virales con el fin de desarrollar plantas transgénicas resistentes a los geminivirus.

El virus del mosaico dorado del frijol (BGMV) es un miembro de los geminivirus transmitidos por mosca blanca. La mayor parte del conocimiento que se posee sobre estos geminivirus viene de estudios realizados con otros virus del grupo, como el virus del mosaico dorado del tomate (TGMV) y el del mosaico africano de la yuca (ACMV) (Lazarowitz, 1992).

El genoma del BGMV consiste de dos moléculas covalentemente cerradas y circulares de ADN de cadena sencilla, cada una de aproximadamente 2,650 nucleótidos (Faría *et al.*, 1994; Gilbertson *et al.*, 1993a; Howarth *et al.*, 1985; Morinaga *et al.*, 1987). Estas dos moléculas son designadas ADN-A y ADN-B (Fig. 1) y están encapsidadas en partículas diferentes pero unidas en parejas. Estas dos moléculas tienen una secuencia de nucleótidos diferente con excepción de una 'región común' que posee una secuencia de aproximadamente 200 nucleótidos, casi idéntica en las dos moléculas. Análisis por computador del genoma, para identificar genes capaces de codificar proteínas de peso molecular mayor de 10kDa, han revelado la existencia de cuatro secuencias traducibles en el ADN-A y dos en el ADN-B. Para los dos ADNs, los genes son traducidos tanto de la secuencia viral como de la complementaria que se encuentra en la forma replicativa de doble cadena.

Los estudios del funcionamiento de los genes del BGMV han sido facilitados por la adaptación de un método de inoculación de clones de ADN. Estos clones son disparados con un acelerador a semillas de frijol germinadas, utilizando formas monoméricas cortadas del ADN-A y ADN-B, colocadas sobre micropartículas de oro. Ambos ADNs son necesarios para causar una infección sistémica y para el desarrollo de síntomas (Gilbertson *et al.*, 1991); sin embargo, solo el ADN-A puede replicarse en suspensiones de células vegetales. Por consiguiente, el gen o genes requeridos para la replicación esta(n) asociados(s) con el ADN-A. Análisis por mutación, han mostrado que el gen AC1 y no el AV1 (que codifica por la cápside o cubierta proteica del virus) es necesario para que ocurra la replicación del virus. Por ejemplo, sustituciones de ciertos

aminoácidos en regiones funcionales del AC1 detienen los procesos de replicación e infectividad, mientras que mutantes con modificaciones considerables en el gen AV1 permanecen infectivos y causan síntomas en plantas de frijol inoculadas. Fuera de su papel en la cobertura del ácido nucleico viral, el gen de la cápside proteica (AV1), es necesario para la transmisión biológica del BGMV por *Bemisia tabaci*. Por analogía con el TGMV, otras funciones asociadas al ADN-1 incluyen la regulación de la expresión genética del gen de la capsida y de uno de los genes del ADN-B, el BV1 (Sunter y Bisaro, 1992).

Las funciones de la proteína del ADN-B han sido asociadas con la expresión de síntomas en el caso del TGMV (von Arnim y Stanley, 1992) y con la determinación del rango de hospederas, en el caso del virus del enrollamiento foliar de la calabaza (SqLCV) (Ingham y Lazarowitz, 1993). Para el BGMV, algunos mutantes en el BC1 (Smith y Maxwell, 1994) y en el BV1 no son infecciosos y otros causan atenuación de síntomas. Todos los mutantes del ADN-B sugieren que las proteínas codificadas por este componente, son responsables por el movimiento del ADN viral dentro de la planta (Lazarowitz, 1992).

La replicación de los geminivirus involucra una interacción específica de la proteína AC1 y la región común (Fontes *et al.*, 1992). Lazarowitz *et al.* (1992) sugirieron que la región común funciona como el origen de la replicación del ADN viral. La importancia de esta interacción se demostró por la falta de infectividad después de que las plantas de frijol fueron co-inoculadas con el ADN-A del aislamiento guatemalteco del BGMV (tipo II) y el ADN-B de aislamiento brasileño del BGMV (tipo I).

Estos dos tipos del BGMV están asociados con ramas filogenéticas diferentes debido a que existen diferencias significativas en la secuencia de nucleótidos de sus regiones comunes (Faria *et al.*, 1994). Cuando dos geminivirus están colocados en la misma rama filogenética, la inoculación de mezclas del ADN-A y ADN-B son infecciosas, por ejemplo, los aislamientos tipo II del BGMV de Guatemala y la República Dominicana (Faria *et al.*, 1994) o el virus del mosaico enano del frijol y el virus del moteado del tomate (Gilbertson *et al.*, 1993b).

Estos estudios indican que las estrategias anti-virales que buscan impedir la replicación viral o el movimiento del virus, serían dignas de atención. Para el TGMV, un esquema anti-sentido ha sido propuesto para reducir el nivel de la proteína asociada a la replicación en plantas transgénicas de tabaco (Day *et al.*, 1991). De igual manera, la posibilidad de interferir con el movimiento del ADN viral, ha sido sugerida para producir plantas transgénicas de tabaco con secuencias del ADN-B del virus del mosaico africano de la yuca (Frischmuth y Stanley, 1993). Ninguno de estos dos casos ha sido evaluado usando *B. tabaci* como la fuente de inóculo o el huésped natural del virus.

**Traducción:** Francisco J. Morales - Unidad de Virología - CIAT

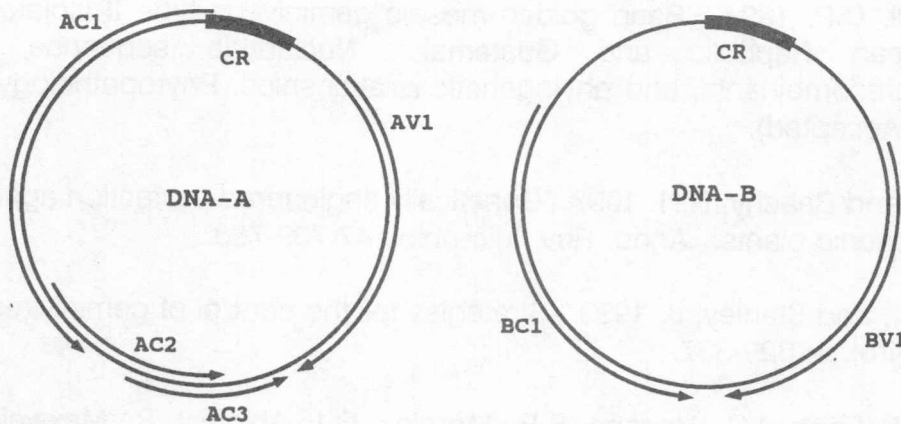


Fig. 1. Genome of bean golden mosaic geminivirus from Guatemala. Open reading (ORFs) are designated A or B (DNA-A or DNA-B component), V or C (viral or complementary sense polarity), and 1, 2, or 3 (position of ORF relative to the common region). The common region (CR) is represented by the wide bar.

Fig. 1. Organización genómica del virus del mosaico dorado del frijol, aislamiento de Guatemala. Los genes (ORFs) se designan como A o B, según el componente genómico al cual pertenecen; V o C, según la polaridad del ácido nucleico viral o complementario, respectivamente; y como 1, 2, o 3, según la posición del ORF relativo a la región común (CR, representada por una línea gruesa).

## Referencias

- Day, A.G., Bejarano, E.R., Buck, K.W., Burrell, M., and Lichtenstein, C.P. 1991. Expression of an antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus tomato golden mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6721-6725.
- Faria, J.C., Gilbertson, R.L., Hanson, S.F., Morales, F.J., Ahlquist, P., Loniello, A.O., and Maxwell, D.P. 1994. Bean golden mosaic geminivirus type II isolates from the Dominican Republic and Guatemala: Nucleotide sequence, infectious pseudorecombinants, and phylogenetic relationships. *Phytopathology* 83: \_\_\_\_ - \_\_\_\_\_. (Accepted).
- Fitchen, J.H., and Beachy, R.N. 1993. Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:739-763.
- Frischmuth, T., and Stanley, J. 1993. Strategies for the control of geminivirus diseases. *Sem. Virol.* 4: 329-337.
- Gilbertson, R.L. Faria, J.C., Hanson, S.F., Morales, F.J., Ahlquist, P., Maxwell, D.P., and Russell, D.R. 1991. Cloning of the complete DNA genomes of four bean-infecting geminiviruses and determining their infectivity by electric discharge particle acceleration. *Phytopathology* 81: 980-985.
- Gilbertson, R.L., Faria, J.C., Ahlquist, P., and Maxwell, D.P. 1993. Genetic diversity in geminiviruses causing bean golden mosaic disease: The nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of a Brazilian isolate of bean golden mosaic geminivirus. *Phytopathology* 83: 709-715.
- Gilbertson, R.L., Hidayat, S.H., Paplomatas, E.J., Rojas, M.R., Hou, Y.-M., and Maxwell, D.P. 1993b. Pseudorecombination between the infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses. *J. Gen. Virol.* 74:23-31.
- Howarth, A.J., Caton, J., Bossert, M., and Goodman, R.M. 1985. Nucleotide sequence of bean golden mosaic virus and a model for gene regulation in geminiviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 82:3572-3576.
- Ingham, D.I., and Lazarowitz, S.G. 1993. A single missense mutation in the BR1 movement protein alters the host range of the squash leaf curl geminivirus. *Virology* 196:694-702.
- Lazarowitz, S.G. 1992. Geminiviruses: Genome Structure and Gene Function. *CRC Crit. Rev. Plant Dis.* 11:327-349.

- Morinaga, T., Ikegami, M., Shimotohno, K., and Miura, K. 1987. Total nucleotide sequences of the infectious cloned DNAs of bean golden mosaic virus. *Microbiol. Immunol.* 31. 147-154.
- Smith, D.R., and Maxwell, D.P. 1994. Requirement of the common region of DNA-B and the BL1 ORF of bean golden mosaic geminivirus for infectivity and symptom development. *Phytopathology* 84:(In press).
- Von Arnim, A., and Stanley, J. 1992. Determinants of tomato golden mosaic virus symptom development located on DNA-B. *Virology* 186:286-293.
- Wilson, T.M.A. 1993. Strategies to protect crop plants against viruses: Pathogen-derived resistance blossoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3134-3141.

## **English Summary**

### **Genome organization and functions of bean golden mosaic geminivirus**

Douglas P. Maxwell, Stephen F. Hanson, Rebecca, A. Hoogstraten, Paul Ahlquist, James S. Beaver<sup>1</sup>, Osmmat Azzam, and James Karkashian. Department of Plant Pathology, University of Wisconsin, Madison, WI 53706; <sup>1</sup>University of Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico.

Molecular approaches are providing solutions to crop improvement problems that have not been solved by more traditional methods. Plants with resistance to RNA viruses have been engineered by recombinant DNA methods (Fitchen and Beachy, 1993; Wilson, 1993). These promising results indicate the value of studying virus-derived schemes for the development of transgenic plants resistant to geminivirus.

Most of what is known about gene function of geminiviruses comes from studies with two other members of this group, tomato golden mosaic virus (TGMV) from Brazil, and African cassava mosaic virus (ACMV) (Lazarowitz, 1992). The viral genome of BGMV is composed of two covalently-closed, circular, single-stranded DNAs of about 2.650 nucleotides each (Faría *et al.*, 1994; Gilbertson *et al.*, 1993a; Howarth *et al.*, 1985; Morinaga *et al.*, 1987). These DNAs are currently designated DNA-A and DNA-B and are encapsidated into separate twinned particles. The only region with a nearly identical DNA sequence shared by these two molecules is an ~200 nucleotide intergenic region called the common region. Computer analysis of the genome for genes which code for a protein greater than 10 kDa, has shown that four open reading frames (genes) occur on DNA-A and two on DNA-B. For both DNAs, genes are transcribed from the viral strand and the complementary strand of the double-stranded replicative form.

Both DNAs are required for systemic infection and symptom development (Gilbertson, *et al.*, 1991); however DNA-A, but not DNA-B, can replicate in plant suspension cells. Thus,

the gene(s) required for replication is associated with DNA-A. Mutational analyses showed that the AC1 gene was necessary for replication. Individual amino acid substitutions in conserved functional regions of AC1 completely abolished replication, whereas mutants with large deletions in the AV1 gene are infectious and cause symptoms on beans. Besides the involvement of the coat protein gene in encapsidation, it is essential for the whitefly transmission of BGMV. When *Bemisia tabaci* was fed on beans infected with coat protein deletion mutants, BGMV was not transmitted. Other functions associated DNA-A are likely to involve regulations of gene expression for the coat protein gene and one of the DNA-B genes, BV1 (Sunter and Bisaro, 1992).

The functions of proteins from DNA-B are associated with symptom expression for TGMV (von Arnim and Stanley, 1992) and host range determinants in the bipartite, whitefly-transmitted geminivirus, squash leaf curl virus (Ingham and Lazarowitz, 1993). For BGMV, some mutants in BC1 (Smith and Maxwell, 1994) and BV1 are not infectious and others cause attenuation of symptoms. All mutants of DNA-B are consistent with the involvement of DNA-B proteins in the movement of the viral DNA within the plant (Lazarowitz, 1992).

The replication of geminiviruses involves the specific interaction of the AC1 protein and the common region (Fontes *et al.*, 1992). This specific interaction for bean-infecting geminiviruses was shown by the lack of infection when beans were coinoculated with the DNA-A of a BGMV isolate from Guatemala (type II) and DNA-B of BGMV from Brazil (type I). When two geminiviruses have similar common regions, coinoculation with mixtures of DNA-A and DNA-B are infectious, e.g., the type II BGMVs from Guatemala and the Dominican Republic (Faria *et al.*, 1994). These studies of genome function indicate that antiviral strategies which disrupt viral replication of movement would be worthy of experimentation.