

Detección molecular de geminivirus del frijol común y estrategias antivirales

Douglas P. Maxwell y **Stephen F. Hanson**, Departamento de Patología, University of Wisconsin, Madison; **Josias C. Faria**, EMBRAPA-CNPAP, Brasil; y **Robert L. Gilbertson**, Departamento de Patología, Universidad de California, Davis.

Métodos moleculares para la detección de geminivirus

Se han evaluado tres métodos moleculares para la detección de geminivirus. La producción de anticuerpos monoclonales contra el BGMV y el BGYMV (Cancino *et al.*, 1995) resultó en la selección de un anticuerpo monoclonal para un aislamiento del BGYMV proveniente de Guatemala. Este monoclonal resultó específico para reconocer los aislamientos del BGYMV mesoamericanos. Otro anticuerpo monoclonal, resultó ser de amplio espectro, y detectó todos los begomovirus transmitidos por mosca blanca evaluados hasta ahora, con excepción del *Tomato yellow leaf curl virus* (F.J. Morales, *comunicación personal*). El anticuerpo monoclonal producido para el aislamiento del BGMV de Brasil, fue producido a partir de la proteína de la cápside, expresada en un vector bacterial (los anticuerpos monoclonales para el BGYMV se produjeron a partir de viriones purificados), resultando específico para aislamientos del BGMV provenientes de la América del Sur (F.J. Morales, *comunicación personal*). Estos anticuerpos monoclonales constituyen la técnica molecular de mayor difusión y de más fácil aplicación en laboratorios de países en vías de desarrollo.

La segunda técnica molecular es el uso de iniciadores de replicación o “primers”, diseñados para amplificar una región que abarca desde parte del gen que codifica por la replicasa (AC1) hasta parte del gen de la cápside del virus (AV1) en el DNA-A. Estos primers fueron diseñados por Rojas y colaboradores (1993), y ha sido una técnica molecular de gran adopción en laboratorios avanzados donde se investigan los begomovirus. La mayor parte de las secuencias obtenidas de las regiones amplificadas por estos “primers”, han sido la base de la caracterización molecular de un gran número de begomovirus. Posteriormente, se diseñaron otros “primers” para amplificar la región central del gen (AV1) de la cápside viral (Wyatt y Brown, 1996). Estos iniciadores son más prácticos que los anteriores, en el sentido de que

la región amplificada es de menor tamaño y, por lo tanto, más fácil de secuenciar, permitiendo la detección e identificación del virus al mismo tiempo. Sin embargo, el gen AV1 es uno de los más conservados en el caso de los begomovirus, por lo que se prefieren los iniciadores diseñados por Rojas para producir secuencia que permita identificar los begomovirus con mayor confiabilidad.

La técnica de “hibridación DNA:DNA” ha sido utilizada para la detección de geminivirus (Gilbertson *et al.*, 1991), adaptándola, como en el caso de los anticuerpos monoclonales, para la detección de secuencias altamente específicas (sondas específicas) o conservadas (sondas universales o de amplio espectro). Esta técnica puede ser utilizada con radioisótopos o materiales no radiactivos, para hacerlas más prácticas en laboratorios convencionales. Recientemente, se diseñó una sonda para la región más conservada del gen de la cápside (500 pb), con el fin de detectar los geminivirus del Hemisferio Occidental (M.K. Nakhla y D.P. Maxwell, *información no publicada*).

Detección de geminivirus del frijol en malezas

El desarrollo de técnicas moleculares de detección de geminivirus, ha permitido confirmar observaciones realizadas anteriormente (Gálvez y Morales, 1989) sobre el posible papel que juegan las plantas silvestres en la supervivencia y diseminación de los begomovirus que infectan el frijol común. Por ejemplo, se han examinado varias malezas que presentaban síntomas de mosaico dorado amarillo en zonas de producción de frijol en la República Dominicana (Gilbertson *et al.*, 1991b). Las siguientes malezas dieron una reacción positiva con una sonda universal (de amplio espectro), pero negativa con la sonda específica para el BGYMV: *Croton lobatus*, *Jatropha* spp., *Macroptilium lathyroides*, *Sida* spp., *Urena lobata*, *Bastardia bivalvis*, y *Euphorbia heterophylla*. La leguminosa *Rhynchosia minima* dió una reacción positiva con ambas sondas, por lo que se le considera como un reservorio del BGYMV.

Función genómica y estrategias antivirales

Desde la primera descripción de la organización genómica del BGYMV (Howarth *et al.*, 1985), muchas investigaciones posteriores han contribuido

al conocimiento de las funciones genómicas, la organización y función de la región *ori*, y de la organización de la región “promotora” (ver revisión hecha por Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Karkashian, 1998; y Timmermans *et al.*, 1994). Los begomovirus nativos del Hemisferio Occidental son bipartitas; las funciones asociadas a su replicación y producción de la cápside protéica son codificadas por el DNA-A, mientras que el movimiento del virus en la planta, es determinado por genes que se encuentran en el DNA-B (Noueiry *et al.*, 1994). La disponibilidad de clones infecciosos de los begomovirus (Gilbertson *et al.*, 1991a), ha facilitado grandemente el estudio de estos geminivirus que infectan al frijol común. Ahora sabemos que el gen *ac2* (*trap*) del BGYMV, produce una proteína *trans*-activadora de la cápside viral (Karkashian, 1998). La cápside viral del BGYMV es esencial para la transmisión del virus por *Bemisia tabaci*, pero no es necesaria para completar el proceso de infección (Azzam *et al.*, 1994). Las características de la cápside del virus determina el agente vector, sea la mosca blanca, o cicadélidos en el caso de otros geminivirus (Bridon *et al.*, 1990).

Los geminivirus se replican a través del sistema de “círculo rodante”, el cual involucra la fijación específica de la replicasa (*rep*) a la región *ori* (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Experimentos conducidos con el BGYMV y el begomovirus del mosaico del tomate, determinaron que la fijación de la proteína *rep* a las repeticiones del extremo 5' de la secuencia compartimentalizada TATA del gen *rep*, es específica para cada geminivirus. Por consiguiente, una proteína *rep* no puede replicar geminivirus heterólogos. Basados en esta observación, se propuso una estrategia antiviral que busca producir una proteína *rep* no-funcional, la cual interferiría con la fijación de la proteína del virus (Hanson *et al.*, 1991). Un análisis mutacional de la proteína *Rep* del BGYMV, mostró que cambios de codones sencillos en los “motivos” (secuencia tridimensional en una molécula que permite la fijación de otra, *nota del editor*) DNA-corte (DNA-nicking) o en el NTP-fijación (NTP-binding) son letales (Hanson *et al.*, 1995). Estos dos “motivos” son conservados en el genoma de los geminivirus y, por lo tanto, son un blanco potencial para su mutación en construcciones de ingeniería genética que involucren el gen *rep trans*-dominante.

Un ensayo de replicación del DNA-A transitorio, utilizando suspensiones de células de tabaco NT-1, fué utilizado para medir la replicación viral (Hanson *et al.*, 1995). Genes *rep* mutados *trans*-expresados, con cambios de codón para Y103 a F o D262 a R, previno la replicación del DNA-A del BGYMV

homólogo, pero no de begomovirus heterólogos, como el BGMV y el BDMV (Hanson y Maxwell, *información no publicada*). De interés, construcciones del gen *rep/trap/ac3* con los mismos “motivos” (DNA-binding y nicking) mutados, interfirieron la replicación del DNA-A de aislamientos homólogos de la República Dominicana y de Guatemala, al igual que dos virus heterólogos, como el BDMV y el BGMV (Hanson y Maxwell, 1999). Mutaciones similares al gen *rep* del *Virus del moteado del tomate* en tomate, confirieron resistencia a este virus transmitido tanto por agro-inoculación como por la mosca blanca *B. tabaci* (Sout *et al.*, 1997). Actualmente, se intenta producir plantas de frijol transgénicas con construcciones letales *trans*-dominantes del gen *rep* (Aragão y colaboradores, *comunicación personal*).

Otras estrategias de ingeniería genética para geminivirus, involucran construcciones del gen *cp* de la cápside, y estrategias “anti-sentido”. Las primeras plantas transgénicas de frijol, contenían el gen *cp* del BGYMV, el gen *bar* de resistencia a herbicidas, y el gen GUS (Russel *et al.*, 1993). Desafortunadamente, estas plantas no expresaron el *cp* ni mostraron niveles de resistencia adecuados (Azzam *et al.*, 1996). Resultados más prometedores han sido obtenidos siguiendo la estrategia “anti-sentido” de la construcción *rep/trap/ac3* y del gen *bcl1*, donde las plantas transgénicas de frijol mostraron un retardo y atenuación de síntomas al ser expuestas al BGYMV transmitido por mosca blanca (Aragão *et al.*, 1998).

Referencias

- Aragão, S. G. Ribeiro, L. M. G. Barros, A. C. M. Brasileiro, D. P. Maxwell, E. L. Rech, J. C. Faria. 1998. Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs showed delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. *Molecular Breeding* 4:491-499.
- Azzam, O., Diaz, O., Beaver, J. S., Gilbertson, R. L., Russell, D. R., and Maxwell, D. P. 1996. Transgenic beans with the bean golden mosaic geminivirus coat protein gene are susceptible to virus infection. *Annual Repr. Bean Improv. Cooperative* 39: 276-277.
- Azzam, O., Frazer, J., De la Rosa, D., Beaver, J. S., Ahlquist, P., and Maxwell, D. P. 1994. Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* 204:289-296.

Blair, M. W., Bassett, M. J., Abouzid, A. M., Hiebert, E., Polston, J. E., McMillan, Jr., R. T., Graves, W., and Lamberts, M. 1995. Occurrence of bean golden mosaic virus in Florida. *Plant Dis.* 79:529-533.

Briddon, R. W., Pinner, M. S., Stanley, J., and Markham, P. G. 1990. Geminiviruses coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 177:84-94.

Brown, J. K., Chapman, M. A., and Nelson, M. R. 1990. Bean calico mosaic, a new disease of common bean caused by a whitefly-transmitted geminivirus. *Plant Dis.* 74:81.

Brown, J. K., Ostrow, K. M., Idris, A. M., and Stenger, D. C. 1999. Biotic, molecular, and phylogenetic characterization of bean calico mosaic virus, a distinct Begomovirus species with affiliation in the squash leaf curl virus cluster. *Phytopathology* 89:273-280.

Cancino, M., Abouzid, A. M., Morales, F. J., Purcifull, D. E., Polston, J. E., and Hiebert, E. 1995. Generation and characterization of three monoclonal antibodies useful in detecting and distinguishing bean golden mosaic virus isolates. *Phytopathology* 85:484-490.

Costa, A. S. 1965. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. *FAO Plant Prot. Bull.* 13:121-130.

Faria, J.C., and Maxwell, D.P., 1999 variability in Geminivirus Isolates Associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology* 89:262-268.

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* 84:321-329.

Gálvez, G. E. and Castaño, M. J. 1976. Purification of the whitefly-transmitted bean golden mosaic virus. *Turrialba* 26:205-207.

Gálvez, G. E., and Morales, F. J. 1989. Whitefly-transmitted viruses. Pages 379-390 in "Bean Production in the Tropics" (H. F. Schwartz and M. A. Pastor-Corrales, Eds.), *Cent. Int. Agr. Trop.*, Cali, Colombia, 654 pp.

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., Faria, J. C., Hanson, S. F., Morales, F. J., Ahlquist, P., Maxwell, D. P., and Russell, D. R. 1991a. 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., Morales, F., Leong, S. A., Maxwell, D. P., and Ahlquist, P. G. 1988. Molecular characterization of geminiviruses causing bean golden mosaic. *Phytopathology* 78:1568.
- Gilbertson, R. L., Hidayat, S. H., Martinez, R. T., Leong, S. A., Faria, J. C., Morales, F., and Maxwell, D. P. 1991b. Differentiation of bean-infecting geminiviruses by nucleic acid hybridization probes and aspects of bean golden mosaic in Brazil. *Plant Dis.* 75:336-342.
- Gilbertson, R. L., Hidayat, S. H., Paplomatas, E. J., Rojas, M. R., Hou, Y.-M., and Maxwell, D. P. Pseudorecombination between the infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses. *J. Gen. Virol.* 74:23-31.
- Gilbertson, R. L., Rojas, M. R., Russell, D. R., and Maxwell, D. P. 1991c. Use of the asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability of bean golden mosaic geminivirus in the Dominican Republic. *J. Gen. Virol.* 72:2843-2848.
- Goodman, R. M. 1977. Single-stranded DNA genome in a whitefly-transmitted plant virus. *Virology* 83:171-179.
- Goodman, R. M., Bird, J., and Thongmeearkom, P. 1977. An unusual viruslike particle associated with golden yellow mosaic of beans. *Phytopathology* 67:37-42.
- Haber, S., Ikegami, M., Bajet, N., and Goodman, R. M. 1981. Evidence for a divided genome in bean golden mosaic virus, a geminivirus. *Nature (London)* 289:324-326.
- Hanley-Bowdoin L., Settlege S.B., Orozco B.M., Nagar S., and Robertson D. 1999. Geminiviruses: Models for Plant DNA Replication, Transcription, and Cell Cycle Regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 18:71-106.
- Hanson, S. F., Gilbertson, R. L., Ahlquist, P. G., Russell, D. R., and Maxwell, D. P. 1991. Site-specific mutations in codons of the putative NTP-binding motif of the AL1 gene of bean goldenmosaic geminivirus abolish infectivity. *Phytopathology* 81:1247.
- Hanson, S. F., Hoogstraten, R. A., Ahlquist, P., Gilbertson, R. L., Russell, D. R., and Maxwell, D. 1995. Mutational analysis of a putative NTP-binding domain in the replication-associated protein (AC1) of bean golden mosaic geminivirus. *Virology* 211:1-9.
- Hanson, S. F., and Maxwell, D. P. 1999. Trans-dominant inhibition of geminiviral DNA replication by bean golden mosaic geminivirus *rep* gene mutants. *Phytopathology* 89:480-486.
- Hiebert, E., Wisler, G. C., Purcifull, D. E., Sanchez, G., and Morales, F. J. Characterization of a Florida bean golden mosaic virus (BGMV-F) isolate. *Phytopathology* 81:1242-1243.

Hiebert, E., Abouzid, A. M., and Polston, J. E. 1996. Whitefly-transmitted geminiviruses. In *Bemisia* 1995: Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management, ed. by D. Gerling and R.T. Mayer, Intercept Ltd., pp. 277-288.

Hoogstraten, R. A., Hanson, S. F., and Maxwell, D. P. 1996. Mutational analysis of the putative nicking motif in the replication-associated protein (AC1) of bean golden mosaic geminivirus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:594-599.

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.

Karashian, J. P. 1998. Molecular analysis of the coat protein gene promoter of bean golden mosaic geminivirus. Ph. D. thesis, University of Wisconsin-Madison. Pp. 121.

Loniello, A. O., R. T. Martinez, M. R. Rojas, R. L. Gilbertson, J. K. Brown, and D. P. Maxwell. 1992. Molecular characterization of bean calico mosaic geminivirus. (Abstr.) *Phytopathology* 82:1149.

McLaughlin, W., Rojas, M. R., Nakhla, Hidayat, S. H., and Maxwell, D. P. 1994. Partial molecular characterization of bean golden mosaic virus isolates from Jamaica and Central America. *Plant Dis.* 78:1220.

Morales, F. J. (ed.) 1994. *Bean Golden Mosaic: 1994 Research Advances*. CIAT, pp. 1-193

Nakhla, M. K., Maxwell, D. P., Martinez, R. T., Carvalho, M. G., and Gilbertson, R. L. 1994. Widespread occurrence of the Eastern Mediterranean strain of tomato yellow leaf curl geminivirus in tomatoes in the Dominican Republic. *Plant Dis.* 78:926.

Noueiry, A.O., Lucas, W.J., and Gilbertson, R.L. 1994. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* 76:925-932.

Polston, J. E. 1998. The appearance of tomato yellow leaf curl virus in Florida and implications for the movement of this and other tomato geminiviruses. The 2nd International Workshop on *Bemisia* and Geminiviruses. June 1998, Puerto Rico, pg. L40.

Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russell, D. R., and Maxwell, D. P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis.* 77:340-347.

Russell, D. R., Wallace, K. M., Bathe, J. H., Martinell, B. J., and McCabe, D. E. 1993. Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric-discharge mediated particle acceleration. *Plant Cell Repts.* 12:165-169.

Stanley, J., and Gay, M. 1983. Nucleotide sequence of cassava latent virus DNA. *Nature (London)* 301:260-262.

Stout, J. T., Liu, H. T., Polston, J. E., Gilbertson, R. L., Nakhla, M. K., Hanson, S. F., and Maxwell, D. P. 1997. Engineered *rep* gene-mediated resistance to tomato mottle geminivirus in tomato. *Phytopathology* 87:S94.

Timmermans, M. C. P., Das, O. P., and Messing, J. 1994. Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:79-112.

Wyatt, S. D., and Brown, J. K. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86:1288-1293.