

INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Desarrollo de un método molecular para la caracterización
funcional rápida de promotores de geminivirus**

Tesis que presenta

Astrid García Moreno Rubli

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular

San Luis Potosí, S.L.P., Diciembre de 2005

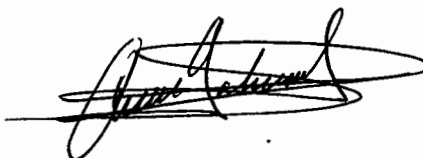
La presente tesis de maestría en Ciencias en la opción de Biología Molecular fue elaborada por Astrid García Moreno Rubli y aprobada el 14 de diciembre de 2005 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga



Dr. Sergio Casas Flores

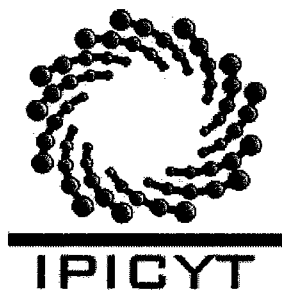


Dr. Angel Gabriel Alpuche Solís

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, bajo la dirección del Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga y el Dr. Sergio Casas Flores.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

El proyecto de investigación realizado fue financiado con recursos otorgados al Dr. Gerardo Argüello Astorga por el CONACYT (proyecto SEP-2003-C02-42639).



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 017 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 16 días del mes de diciembre del año 2005, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Presidente	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Secretario	IPICYT
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Astrid García Moreno Rubli

sobre la Tesis intitulada:

Desarrollo de un método molecular para la caracterización funcional rápida de promotores de geminivirus

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Dr. J. Sergio Casas Flores

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:05 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 16 días del mes de diciembre de 2005.


Dr. Marcial Bohilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ma. Elisa Lucio Aguilar
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



Dedicatoria

A Pedro por lo que hemos vivido y por lo que viene

Agradecimientos

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo financiero para poder llevar a cabo este trabajo.

Al Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga y al Dr. Sergio Casas Flores por la dirección de esta tesis, por haber compartido sus conocimientos y por su apoyo.

Al Dr. Angel Gabriel Alpuche Solís por sus enseñanzas.

A Salvador Ambriz, Verónica Zárate y Rosy Castillo por su apoyo en el trabajo de laboratorio.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas por su ayuda en el laboratorio.

A mis amigos de la maestría por su amistad y por los momentos que compartimos

A mis padres e Ingrid por su apoyo y por estar presentes aún en la distancia

A Pedro por su comprensión y apoyo incondicional

Índice	Página no.
I. Resumen	8
II. Abstract	9
III. Introducción	11
III.i Clasificación de los geminivirus	12
III.ii Organización genómica	14
III.iii Proteínas virales	15
III.iv Ciclo de replicación	17
III.v Proceso de infección	18
III.vi Promotores y región intergénica (RI)	19
IV. Justificación	25
V. Objetivos	26
VI. Materiales y Métodos	27
VI.i Material biológico y medios de cultivo	27
VI.ii Plasmidos.....	27
VI.iii Plantas.....	27
VI.iv Preparación de la mezcla de reacción para en ensayo histológico de la β -glucoronidasa.....	28
VI.v Extracción y manipulación de ácidos nucleicos	28
VI.v.1 Preparación del vector pBS-X-GUS para la clonación de los productos de PCR	29
VI.v.2 Ligación de los productos de PCR.....	29

VI.v.3 Amplificación de la RI de geminivirus a partir de DNA de plantas y de DNA plasmidico.....	29
VI.v Preparación de células competentes por el método de CaCl ₂ .	30
VI.vi Transformación de <i>E. coli</i>	31
VI.vii Secuenciación de DNA.....	31
VI.viii Ensayo de biobalística.....	32
VI.viii.1.1 Preparación de los microproyectiles de oro	32
VI.viii.2 Recubrimiento de microproyectiles de oro con el DNA de interés	32
VI.viii.3 Condiciones para el bombardeo de de micropartículas	33
VI.viii.4 Bombardeo de las hojas de tabaco.....	33
VI.viii.5 Regeneración de las hojas bombardeadas y expresión transitoria.....	34
VII. Resultados	35
VII.i Construcción del vector pBS-X-GUS	35
VII.ii .1 Diseño de iniciadores para la amplificación de la RI	35
VII.iii.2 Diseño de iniciadores de los genomas A y B.....	35
VII.iii.3 Amplificación por PCR de la región intergénica de begomovirus	38
VII.iv. Generación de vectores de expresión con promotores Begomovirales.....	42
VII.v. Determinación de la orientación del fragmento clonado (RI)....	44.
VII.v Secuenciación	46

VII.vi	Evaluación funcional de los vectores de expresión generados	.52
VIII.	Discusión	58
IX.	Bibliografía.....	59

I. Resumen

Los geminivirus son un grupo muy diversificado de fitopatógenos que, además de ser excelentes modelos para estudiar la replicación del DNA en plantas, han sido utilizados como fuente de secuencias reguladoras para la ingeniería genética de plantas, y como vectores de expresión para la producción de vacunas en células vegetales. El reciente hallazgo de un promotor geminiviral que es 5 veces más potente que el DNA regulador más ampliamente utilizado en la biotecnología de plantas, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV, un caulimovirus), ha estimulado el interés por conocer las propiedades funcionales de otros promotores de geminivirus con miras a su eventual uso tecnológico. En el presente trabajo hemos desarrollado una sencilla pero poderosa metodología basada en la técnica de la PCR, que permite amplificar de manera específica a la Región Intergénica (RI) de prácticamente cualquier geminivirus de dicotiledóneas conocido. Esta región viral contiene dos promotores divergentes con propiedades funcionales muy diferentes, *pRep* y *pCP* en el genoma A, y *pBC1*- *pBV1* en el genoma B. El método desarrollado involucra el uso de tres pares de iniciadores universales: uno que hace posible la amplificación de la RI del genoma A de los begomovirus del Nuevo Mundo, de cerca de 400 pb; otro que amplifica la región análoga de los begomovirus del Viejo Mundo (Asia, Europa, Africa y Australia), tanto monopartitas como bipartitas; y un tercer par que amplifica la RI del componente genómico B de los begomovirus del continente americano, generando un producto de PCR de cerca de 900 pb. Los iniciadores están diseñados con un sitio de restricción común, el cual permite la clonación del producto de PCR en un vector que contiene un gen reportero sin promotor (*pBS-X-Gus*), especialmente construido para hacer factible, en un solo paso de clonación molecular, la generación de dos cartuchos de expresión alternativos, *Rep-GUS* y *CP-GUS* en el caso del genoma A, o *BC1-GUS* y *BV1-GUS* en el caso del genoma B. Mediante este nuevo procedimiento logramos generar 22 vectores de expresión, 16 de los cuales se derivaron de los genomas A de 8 begomovirus de América (algunos de ellos recientemente descubiertos), otros 2 del genoma A de un begomovirus bipartita de Africa, 2 más del genoma de un begomovirus monopartita originario del Medio Oriente, y finalmente, 2 del genoma B de un begomovirus de América. La funcionalidad de 10 de estos vectores de expresión se estableció de manera preliminar por medio de ensayos de expresión transitoria, utilizando el método de bombardeo con micropartículas. Estos

ensayos llevaron al hallazgo de 2 promotores Rep excepcionalmente fuertes, derivados de begomovirus que han sido solo parcialmente caracterizados al presente. La actividad de estos promotores mostró ser de 3 a 4 veces superior a la de los promotores homólogos de otros begomovirus mejor caracterizados, lo que sugiere que esas secuencias virales pueden tener un uso amplio en la ingeniería genética de plantas. El método desarrollado en el presente trabajo será de gran utilidad para la exploración del potencial biotecnológico de geminivirus de cuatro continentes, y facilitará de modo notable el estudio de los procesos de control transcripcional en virus pertenecientes a esta gran familia viral.

II. Abstract

The Geminiviridae is a diverse family of plant viruses that are an excellent model to study the DNA replication process in plants. Moreover it has been used as a source of regulatory sequences in plant genetic engineering and as expression vectors for the production of vaccines in vegetable cells. The recent discovery of a geminiviral promoter 5-fold stronger than that of the 35S promoter of the cauliflower mosaic virus (CaMV 35S), the most used in plant biotechnology, has stimulated the interest to know the functional properties of other geminiviral promoters to use them in biotechnology. In this work we have developed a simple but powerful methodology based on PCR, that allow to amplify in a specific way the intergenic region (IR) of almost every known begomovirus. This viral region contains two divergent promoters with very different functional properties, *pRep* and *pCP* in genome A, and *pBC1*- *pBV1* in genome B. This method includes the use of three pairs of universal primers: one amplifies the IR of genome A of Begomovirus of the New World, from about 400 pb, another one amplifies the analogue region of begomovirus from the Old World (Asia, Europe, Africa and Australia), both monopartites as bipartites; and a third pair that amplifies the IR of genome B of American begomovirus from about 900 pb. Primers were designed with a common restriction site that allow cloning the PCR product in a vector with a reporter gene without promoter (*pBS-X-GUS*), specially constructed to make feasible two alternatives expression cassettes in just one step of molecular cloning, *Rep-GUS* and *CP-GUS* for genome A, or *BC1-GUS* and *BV1-GUS* for genome B. With this new procedure we got to generate 22 expression vectors, 16 of genome A from 8 American begomovirus (some of them recently discovered), 2 of genome A from a bipartite African begomovirus, 2 of the unique genome from a monopartite begomovirus from Middle

East, and finally, 2 of genome B from an American begomovirus. The functionality of these expression vectors was established in a preliminary way by transient expression assays using the particle bombardment method. The methodology that is described here will be of great utility to explore the biotechnological potential of begomovirus from four continents, and will facilitate the study of the process of transcriptional control in viruses from diverse lineages of this large viral family.

III. Introducción

Entre los factores que alteran significativa y frecuentemente el rendimiento de un cultivo se encuentran las enfermedades de las plantas, las cuales provocan cambios drásticos en el funcionamiento de sus raíces, tallos, hojas, flores y frutos. Las enfermedades generan cambios en la capacidad de las células y los tejidos vegetales para realizar sus procesos fisiológicos normales. Los cambios pueden ser inducidos por agentes infecciosos o por factores ambientales que afectan determinados tipos celulares y tejidos, la índole de los cuales determina las funciones que se verán modificadas. Así, las patologías de las raíces pueden inhibir la absorción de agua y nutrientes; las que afectan a las hojas alteran la fotosíntesis, y los procesos patogénicos de flores y frutos modifican las funciones reproductivas y la producción de granos o semillas. En términos generales, las enfermedades causan pérdidas económicas por disminución de la cantidad y calidad de los productos a cosechar (biomasa, flores, semillas o frutos), además de los inevitables incrementos en los costos de producción asociados a la necesidad de utilizar productos agroquímicos o semillas más resistentes a ciertos agentes patógenos (que suelen ser más costosas). La mayoría de las enfermedades de las plantas son de tipo infeccioso, es decir, se deben a la acción de otros seres vivos, como hongos, bacterias y virus, que adoptan una relación de parasitismo con la planta provocándole enfermedad.

Las plantas son infectadas por una enorme variedad de virus que causan grandes daños a los cultivos agrícolas a escala mundial. Se pueden transmitir por diferentes vías, pero la transmisión por insectos es la que tiene mayor repercusión por ser extraordinariamente eficiente, lo que hace necesario aplicar grandes cantidades de insecticidas químicos para controlar a dichos vectores. Los geminivirus son responsables de enfermedades devastadoras en una amplia variedad de cultivos agrícolas como hortalizas, leguminosas, plantas productoras de fibras, y cereales; destacan entre los huéspedes de esos virus el maíz, trigo, caña de azúcar, tomate, chile, tabaco, frijol, soya, algodón, calabacita y betabel. En México y en muchos países tropicales los problemas por geminivirus se deben más a un complejo provocado por la presencia de varias especies virales que a un solo agente, y esto genera síntomas que pueden confundirse entre sí. La sintomatología que se observa por las infecciones de geminivirus se asemeja y aún llega a

confundirse con los síntomas provocados por deficiencias nutrimentales e infecciones por otros virus. Los síntomas dependen del hospedero, de la etapa de la infección, del geminivirus en cuestión, y de las condiciones climáticas. En general, durante la infección se pueden observar, alternativa o simultáneamente, un mosaico amarillo, clorosis foliar marginal, moteados cloróticos, enrollamiento foliar, deformaciones de las hojas como abultamientos o ámpulas, reducción del área foliar, enanismo, abscisión floral, amarotamiento foliar, reducción de tamaño de los frutos, entre otros síntomas (Polston y Anderson, 1997).

La familia Geminiviridae es una de las dos familias de virus de plantas que poseen genomas circulares de ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla (ssDNA), que en el caso de los geminivirus tiene un tamaño que oscila entre 2.5 y 3 kb. La característica más distintiva de estos virus es la estructura “geminada” de la cápside que encierra y protege al genoma viral, la cual adopta la forma de dos poliedros regulares idénticos fusionados por una de sus caras, lo que le da a los viriones, vistos al microscopio electrónico, una apariencia de cápsides “gemelas”, característica de la que se deriva el nombre de esta familia viral (Stanley, 1991; Lazarowitz, 1992).

III.a Clasificación de los geminivirus

La familia Geminiviridae se divide en cuatro géneros, los cuales se han establecido sobre la base de diferencias en su organización genómica (Figura 1), la naturaleza de las plantas que infectan, y los insectos que los transmiten en la naturaleza (van Regenmortel y col., 2000; Fauquet y Stanley, 2003).

Mastrevirus

Tienen un genoma monopartita (no segmentado), son transmitidos por chicharritas (“leafhoppers”) y la mayoría de sus miembros infectan plantas monocotiledóneas. Ejemplos de virus pertenecientes a este género son el virus del estriado del maíz, (MSV), el virus del estriado de la caña de azúcar (SSV), y el virus del enanismo del trigo (WDV). Algunos miembros del grupo, como el virus del enanismo amarillo del tabaco (TYDV) y el virus del enanismo amarillo del frijol (BeYDV), son atípicos por infectar primariamente a plantas dicotiledóneas (Palmer y Rybicki, 1998; Gutiérrez, 2002).

Curtovirus

Estos virus tienen un genoma monopartita pero su organización génica difiere de la observada en los Mastrevirus. Por ejemplo, el gen que codifica a la proteína iniciadora de la replicación (Rep) carece de intrones, a diferencia del gen homólogo de Mastrevirus; además, infectan solamente a plantas dicotiledóneas y son transmitidos por varias especies de chicharritas. Dentro de este género se encuentran los virus del enrollamiento de la punta del betabel (Beet curly top virus, BCTV) y de la espinaca (SpCTV) (Palmer y Rybicki, 1998; Fauquet et al., 2000).

Topocuvirus

Este género monotípico se estableció recientemente. El virus del pseudo-enrollamiento de la punta del tomate (TPCTV) es su único miembro conocido, y se caracteriza por un genoma monopartita cuya organización génica es análoga pero algo distinta a la que poseen los curtovirus, de los que difieren marcadamente por la secuencia de aminoácidos de su proteína de la cápside, y por el insecto vector, que en este caso es un miembro del grupo de las chicharritas saltadoras o “treehoppers”. (Hanley-Bowdoin y col., 1999; Gutiérrez, 2002).

Begomovirus

Los virus de este género, el más diversificado y de más amplia distribución geográfica de la familia Geminiviridae, infectan a una gran variedad de plantas dicotiledóneas, son transmitidos por la llamada “mosquita blanca” (*Bemisia tabaci*) y poseen por lo general genomas bipartitas, integrados por dos moléculas de DNA diferentes, DNA A y DNA B, aunque existen algunos como el virus del enchinamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) que tienen genomas monopartitas. El virus del mosaico dorado del frijol (BGMV), el virus Huasteco del amarillamiento de las venas del chile (PHYVV), el virus africano de la yuca (ACMV), y el virus del enchinamiento de la hoja de la calabaza (SLCV) son algunos ejemplos de este amplio subgrupo de los geminivirus (Palmer y Rybicki, 1998; Hanley-Bowdoin y col., 1999).

III.b Organización genómica

Los genomas de los geminivirus están conformados por uno o dos componentes de DNA circular de cadena sencilla, de un tamaño comparativamente pequeño, que oscila entre 2.5 y 3.0 kb (Fig. 1B). En los geminivirus bipartitas, entre los que se incluyen todos los begomovirus del Nuevo Mundo y una parte importante de los originarios de Asia y Africa, los dos componentes genómicos son necesarios para que la infección sistémica de la planta pueda ocurrir. Los productos de los genes que porta el DNA A llevan a cabo las funciones necesarias para la replicación del virus, la transcripción de los genes virales tardíos, y la encapsidación del dsDNA. Los genes localizados en el DNA B codifican para proteínas involucradas tanto en el movimiento del virus de célula a célula, como en el transporte del DNA viral del núcleo al citoplasma y viceversa (Noueiry y col., 1994; Lazarowitz y Beachy, 1999; Gafni y Epel, 2002). Consecuentemente, en los begomovirus bipartitas el genoma A es capaz de llevar a cabo la replicación y la encapsidación de forma autónoma, pero es incapaz de infectar plantas sistémicamente (Townsend y col., 1986).

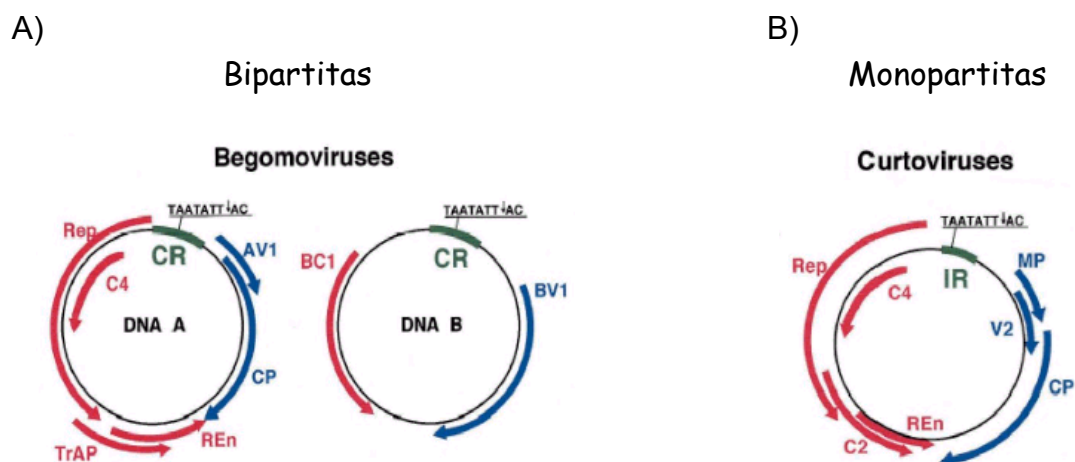


Figura. 1 Organización genómica de los geminivirus. A) Los geminivirus bipartitas, presentan sus genes organizados en dos moléculas de DNA, como es el caso de la mayor parte de los begomovirus. B) Los geminivirus monopartitas tienen todos sus genes contenidos en una sola molécula de DNA, como en los curtovirus (Reproducido de Gutiérrez, 2002).

Los genomas virales se representan convencionalmente de forma que los genes en el lado derecho corresponden a los que se encuentran en la cadena del virión, es decir, los que se transcriben a partir de la hebra del DNA que posee la misma polaridad que el DNA

encapsidado (hebra positiva). Estos genes codifican la proteína de la cápside (CP) y la proteína de transporte nuclear (NSP o BV1), en los genomas A y B, respectivamente. Los genes del lado izquierdo son los que se ubican en la hebra complementaria, ya que se transcriben de una cadena de DNA complementaria a la del DNA que es encapsidado (hebra negativa). Estos genes son Rep (previamente denominado AL1 o C1), TrAP (AL2, C2), y REn (AL3, C3), correspondientes al genoma A de bipartitas y al genoma único de los monopartitas, y BC1 (o BL1) que codifica la proteína de movimiento, en el caso del genoma B.

Cada componente genómico contiene unidades de transcripción divergentes, separadas por una región intergénica (RI) que mide aproximadamente 350 nt en el componente A, y cerca de 900 nt en el componente B. Dentro de la IR se encuentra la llamada "Región Común" (RC), una secuencia de unos 200 nt que está altamente conservada en ambos componentes de un mismo virus, pero que es muy divergente entre geminivirus diferentes (Lazarowitz y col., 1992). La RC contiene una secuencia de 30 nucleótidos capaz de formar una estructura de tipo tallo-asa (horquilla): el tallo es rico en G-C y en el asa se encuentra una secuencia conservada rica en A/T (5'-TAATATTAC-3') la cual es esencial para la replicación viral, y está universalmente conservada entre los geminivirus (Revington y col., 1989). Los genomas circulares ssDNA de los geminivirus contienen marcos de lectura abiertos (ORF's) tanto en la hebra positiva como en la hebra complementaria. Todos los geminivirus transcriben sus genomas de modo similar, aunque no idéntico, esto es, generando los mensajeros en direcciones opuestas a partir de la región intergénica o cerca de ella, de tal forma que los transcritos terminan en una misma región no codificante ubicada en el polo opuesto a la IR, la cual contiene señales de terminación y poliadenilación bidireccionales (Timmerman y col., 1995).

III.c- Proteínas virales

Los begomovirus bipartitas codifican típicamente de 6 a 7 proteínas, involucradas en funciones muy diversas, y que de manera esquemática pueden describirse como sigue:

Rep. Originalmente denominada AL1 o C1, la proteína Rep es la única proteína viral esencial para la replicación del virus, y está involucrada en el inicio de la replicación del DNA viral por un mecanismo de círculo rodante. Rep es una proteína multifuncional que se

une al DNA de modo específico-de-secuencia (Fontes y col., 1992; 1994), y posee actividad de endonucleasa sitio-específica (Heyraud y col., 1995; Laufs y col., 1995); Rep actúa además como un factor transcripcional, reprimiendo su propia expresión e incrementando la transcripción de los genes tardíos en algunos geminivirus, como los mastrevirus (Haley y col., 1992; Eagle y col., 1994, 1997).

CP. Es la proteína de la cápside y está codificada por un marco de lectura abierto (AR1 o AV1) que discurre en el sentido del virión. Es la proteína viral que se acumula en mayor abundancia en el curso de una infección viral, y entre sus funciones se incluye la de proteger al DNA viral a lo largo de su tránsito por el insecto vector. La CP está involucrada en el movimiento del virus dentro de la planta en los geminivirus monopartitas, pero no en los bipartitas, en los que esa función es desempeñada por BV1 (Boulton y col., 1989). Se ha sugerido que la CP en complejo con dsDNA o ssDNA viral puede interactuar con la proteína del movimiento para llevar a cabo los movimientos intra- e intercelulares del virus (Liu y col., 1997).

TrAP. El gen *TrAP* (*AL2* o *C2*) codifica para una pequeña proteína de alrededor de 130 aminoácidos, que transactiva la expresión de los genes tardíos, *CP* y *BR1* (Sunter y Bisaro, 1991; Sunter y Bisaro, 1992). Esta proteína solo se encuentra en los miembros de tres de los cuatro géneros de geminivirus, y su alto grado de conservación sugiere que la misma desempeña funciones críticas en el proceso infeccioso. En los mastrevirus, que carecen de un gen homólogo a TrAP, Rep cumple las funciones del transactivador.

REn. La proteína REn (*AL3* o *C3*) participa en el proceso de replicación viral, potenciando por un mecanismo todavía no bien comprendido la acción de Rep, y con esto la infección viral. REn interactúa con Rep y con la proteína pRBR, el homólogo de Retinoblastoma en plantas (Settlage y col., 2001).

BV1 y BC1. Estas dos proteínas son exclusivas de begomovirus bipartitas y están involucradas en el movimiento viral dentro de la planta infectada y, por lo tanto, en el desarrollo de la infección sistémica. BC1 es la responsable del movimiento célula a célula del virus y BV1 transporta el genoma del virus desde el núcleo al citoplasma y viceversa

(Gutiérrez, 2002), para que posteriormente BC1 lo transporte a una nueva célula a través de los plasmodesmos (Timmermans y col., 1994).

III.d- Ciclo de replicación de los geminivirus

La replicación de los geminivirus se lleva a cabo en el núcleo celular por el mecanismo del círculo rodante, a partir de una forma intermediaria de cadena doble (dsDNA) (Stenger y col., 1991; Saunders et al., 1991; Jeske et al., 2001) (Fig. 2).

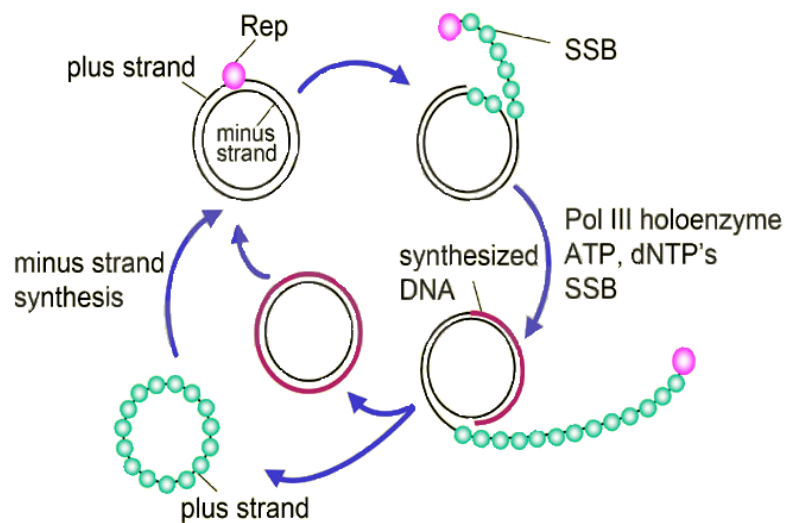


Figura. 2. Esquema simplificado de la replicación de geminivirus. El proceso se lleva a cabo en dos pasos. Primero el ssDNA se convierte a dsDNA, que sirve como templado para la expresión de genes virales. Posteriormente el dsDNA inicia la fase del círculo rodante para producir nuevas moléculas de ssDNA.

La etapa inicial comprende la conversión del DNA genómico de cadena sencilla (ssDNA) en un intermediario de dsDNA, circular y superenrollado, poco después de que el genoma viral llega al núcleo de la célula huésped. Este proceso se lleva a cabo con la participación exclusiva de enzimas celulares, aunque no se conocen en detalle los factores involucrados ni el mecanismo molecular del mismo. En la segunda etapa, la fase de la replicación por círculo rodante, participa la proteína Rep y numerosos factores celulares; Rep, que tiene actividad de endonucleasa, introduce un corte ("nick") en la cadena positiva del DNA viral, dentro de la secuencia noamérica TAATATT*AC conservada en todos los geminivirus conocidos, dentro de un elemento tallo-asa de la región intergénica (Heyraud y

col. 1995; Laufs y col., 1995). El extremo 3' de la cadena escindida sirve entonces como iniciador para que enzimas del huésped, incluyendo una DNA polimerasa, extiendan la cadena escindida utilizando como molde a la hebra complementaria. Este proceso continúa hasta que un nuevo origen de replicación de doble cadena es regenerado, y la proteína Rep, que permanece unida covalentemente al extremo 5' de la hebra positiva, vuelve a realizar un corte ("nick") en la nueva cadena, al tiempo que liga los extremos 5' y 3' de la cadena positiva original, generando así una molécula circular de ssDNA que se separa del intermediario de DNA dúplex, que de esa manera es regenerado completamente en el proceso. Se producen así nuevas formas virales de ssDNA y dsDNA (Stenger y col., 1991; Heyraud y col., 1993, 1995; Stanley, 1995). Finalmente el ssDNA genómico es transportado a las células vecinas a través de la acción combinada de las proteínas BR1 y BC1, y se lleva a cabo la encapsidación del mismo para formar las partículas infecciosas o viriones.

III.e- Proceso de infección.

La infección por geminivirus tiene un impacto significativo en varios procesos celulares de las plantas (Gutiérrez, 2000; 2002). Por lo general, estos virus infectan células diferenciadas, que no presentan ya niveles detectables de DNA polimerasas y otros factores involucrados en la síntesis de DNA; sin embargo, para replicarse eficientemente los virus requieren de células capaces de sintetizar DNA, hecho que el trabajo de Accotto y col. (1993) puso en evidencia, demostrando que los intermediarios de dsDNA del begomovirus TYLCV son más abundantes en células que se encuentran en la fase S que en cualquier otro estado del ciclo celular. Por lo tanto, los geminivirus deben crear de algún modo las condiciones propicias para la replicación de su DNA, lo que aparentemente logran interfiriendo el ciclo celular del huésped a través de la interacción de Rep con la proteína pRBR ("proteína relacionada a retinoblastoma"). Esta interacción altera la regulación transcripcional del huésped para inducir la síntesis de la maquinaria de replicación del DNA de la planta (Kong y col., 2000, Egelkrout y Hanley-Bowdoin, 2001; Egelkrout y col., 2002). El Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA), es una proteína que actúa como un factor accesorio de la DNA polimerasa δ durante la fase S del ciclo celular, la cual normalmente no se expresa en células diferenciadas; Rep es capaz de inducir la producción del PCNA, y probablemente la de otros factores celulares del

metabolismo de los ácidos nucleicos, favoreciendo así la síntesis de nuevo DNA viral (Nagar y col., 1995; Egelkroun y col., 2002).

III.f- La región intergénica (RI) y promotores virales.

La RI contiene dos promotores divergentes y parcialmente sobrelapados que regulan diferencialmente la expresión temporal de los genes virales (Haley y col., 1992; Sunter y Bisaro, 1992). Aún cuando no se han establecido todavía los límites precisos de estos promotores, se ha podido demostrar de manera clara que la mayoría de las secuencias de DNA que son importantes para la replicación viral y la regulación transcripcional de los genes se encuentran en esa región del genoma.

Los experimentos necesarios para realizar el análisis de la relación entre la función y la estructura de los promotores virales involucra la generación de mutaciones puntuales o por delección de las secuencias corriente arriba de los genes (Potenza y col., 2004) y la fusión de estas secuencias a genes reporteros que hacen posible medir su actividad.

En muchos de estos estudios se ha utilizado al gen *uidA* (GUS) de *E. coli* como gen reportero. Este gen codifica para la proteína β -glucuronidasa, la cual al hidrolizar el reactivo sintético X-Gluc precipita un producto de color azul índigo que se detecta en los sitios donde se lleva a cabo la síntesis de la enzima. La actividad de GUS es muy estable y los tejidos muestran actividad aún después de largos períodos de almacenamiento. Por otro lado, los análisis histoquímicos se han utilizado para localizar la actividad de los genes reporteros en células y tejidos de plantas transformadas (Jefferson y col., 1987). Por ejemplo, se ha demostrado que Rep funciona como un regulador de la transcripción al reprimir su propia transcripción. Esto se demostró generando mutaciones en el sitio de unión de Rep, observándose una gran reducción de los niveles de autorrepresión. Es interesante señalar que la mutación de este sitio no produjo una desrepresión completa, lo que sugiere que existe un segundo elemento en *cis*, además del sitio de unión de Rep, que se requiere para la represión total (Eagle y col., 1994).

Un análisis filogenético-estructural de la RI de 30 geminivirus permitió la identificación de secuencias que podrían estar involucradas en la replicación y la regulación de los genes virales (Argüello-Astorga y col., 1994). El análisis comparado de las RI's de geminivirus de dicotiledóneas reveló semejanzas significativas en las secuencias que preceden a la caja TATA del gen Rep, y la presencia de elementos de secuencia repetidos de 8-12 nt, que

son específicos para cada geminivirus, y presentan un arreglo similar dentro de grupos filogenéticamente definidos. Se identificó además a un elemento conservado de 10 nt denominado CLE (“Conserved Late Element”) que se asocia con los promotores de los genes “tardíos” CP y BR1, el cual fue postulado, sobre bases puramente teóricas, como un probable blanco funcional del transactivador viral TrAP (Arguello-Astorga y col., 1994). En general, y debido a la gran divergencia en secuencia que ha tenido lugar a lo largo de la extensa historia evolutiva de los geminivirus (estimada en más de 100 millones de años), los análisis comparativos de la RI de geminivirus han revelado pocos elementos conservados, como una caja rica en GC en los mastrevirus (Fenoll y col., 1988), una caja G (CACGTG) asociada al elemento tallo-asa conservado en la mayor parte de los begomovirus de América, y un elemento AATTCAAA presente en varias copias en la región adyacente al mismo elemento tallo-asa donde se inicia la replicación por círculo rodante, en los begomovirus del Viejo Mundo (Arguello-Astorga y col., 1994; Monzalve y col., 2002).

En un reciente análisis de la RI de un gran número de geminivirus y nanovirus, Velten y col. (2005) identificaron una variedad de elementos repetidos presentes en esa región viral. Razonando que los elementos que son importantes para la regulación de genes se encuentran generalmente duplicados en los promotores, ya sea como repetidos directos o invertidos (v.gr: palíndromes), ellos examinaron 115 secuencias virales repetidas, fusionadas a un promotor mínimo y el gen reportero de luciferasa, en experimentos de expresión transitoria, y como resultado encontraron que menos del 10% (sólo 9) de las mismas actúan como elementos activadores de la transcripción. Cuatro de estos nueve elementos corresponden al CLE y sus variantes (Velten y col., 2005).

Promotores de genes tardíos: CP y BRI

Entre los primeros estudios que se realizaron para conocer el modo de regulación de los genes de geminivirus, destaca el trabajo de Brough y col. (1992), quienes analizaron la cinética de la actividad del promotor CP de TGMV en protoplastos de *Nicotiana tabacum* utilizando el gen reportero GUS. Se observó que la expresión de GUS no dependía de la replicación del DNA viral ni de la expresión de Rep; sin embargo, la expresión máxima se llevó a cabo con la replicación del DNA A, siendo de 60 a 90 veces mayor en vectores replicativos que en vectores análogos que no podían replicarse.

En 1993 Zhan y colaboradores demostraron que la actividad del promotor de CP del mastrevirus CSMV es transactivado por los genes C1 y C2. Este experimento se llevó a cabo en protoplastos de maíz y con el gen GUS como reportero. Al año siguiente, Groning y col. (1994) demostraron en *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) que la transactivación del gen CP por TrAP y la supresión del gen Rep por su propio producto, la proteína Rep, pueden ocurrir simultáneamente. Este estudio se llevó a cabo en protoplastos de *N. benthamiana* utilizando el gen GUS como reportero para observar la expresión del promotor Rep, y para la expresión del promotor CP se utilizó el gen de la neomicín-fosfotransferasa como reportero.

En un trabajo orientado a establecer si la actividad de los promotores del mastrevirus *Maize streak virus* (MSV) varía con el ciclo celular, Nikovics y col. (2001) realizaron experimentos para analizar la expresión de los promotores de ese virus en plantas y células de maíz transgénico. Se observó que la actividad de todos los promotores variaba consistentemente con las fases del ciclo celular. El promotor CP mostró la actividad más elevada en la fase temprana G2, en tanto que el promotor Rep produjo dos picos de actividad, uno en la fase S y otra en la fase G2 del ciclo.

El estudio del proceso de transactivación de los promotores tardíos CP y BV1 por la proteína viral TrAP inició con los trabajos de Sunter y Bisaro en 1993. En 1997 estos autores demostraron que TrAP se requiere para la expresión del gen CP del virus del mosaico dorado del tomate (TGMV) tanto en tejidos del floema como en el mesófilo. Sin embargo, esa proteína parece inducir la expresión de CP por diferentes mecanismos de acuerdo al tipo de célula, activando al promotor CP en células del mesófilo, y desreprimiéndolo en tejido vascular. Esto sugiere que TrAP interactúa con diferentes componentes de la maquinaria de transcripción celular, en los distintos tipos celulares que infecta el virus. En este mismo estudio se demostró la existencia de un elemento silenciador que reprime la actividad del promotor CP en ausencia del transactivador. Este elemento de regulación negativa, que fue delimitado en una región de 300 pb. dentro de la región codificante del propio gen *TrAP* (AL2), ejerce su actividad represora en forma independiente del espaciamiento y de su orientación con respecto al promotor, como los silenciadores clásicos, pero a diferencia de estos solo actúa sobre el promotor CP y no el resto de los promotores localizados en su proximidad (Sunter y Bisaro, 1997).

Evidencia de la existencia de un silenciador análogo en un begomovirus diferente, PHV, fue obtenida por Ruiz-Medrano y col. (1999), quienes además identificaron un elemento aparentemente involucrado en la transactivación por TrAP del promotor CP de ese virus. Examinando tres versiones truncadas de este promotor (-690, -238 y -115) fusionadas al gen GUS, y por medio tanto de ensayos de expresión transitoria como de plantas transgénicas de tabaco, esos autores demostraron que el promotor CP truncado en la posición -115 pb respondía todavía a la acción de TrAP. Dicho promotor truncado incluye a un CLE canónico y dos elementos relacionados, y la mutación de los tres elementos eliminó por completo la capacidad de *pCP* de ser transactivado. Experimentos de expresión transitoria con vectores de expresión que incluían oligonucleótidos sintéticos con uno o dos CLEs, fusionados al promotor mínimo 35S, demostraron que este elemento es, efectivamente, un blanco funcional de TrAP (Ruiz-Medrano et al., 1999).

Un estudio posterior de Sunter y Bisaro (2003) no apoyó la noción de que el CLE constituye un elemento de respuesta a TrAP, aunque sus conclusiones se basan en parte en un error metodológico (ver más adelante). Utilizando un sistema de expresión transitoria en protoplastos de *N. benthamiana*, estos investigadores delimitaron la secuencia mínima necesaria para la activación del promotor CP de TGMV por TrAP dentro de la región -125/-107 del mismo. Este segmento de sólo 18 pares de bases (5'-CGTCTAAGTGGTCCCGCA-3') incluye al único CLE presente en este promotor viral. Los autores realizaron luego una delección de los últimos 7 nucleótidos de esa secuencia, eliminando parte del CLE, y examinaron el efecto de esa mutación en el contexto del promotor completo (la región intergénica entera). Esta construcción fue transactivable por TrAP, y Sunter y Bisaro derivaron de ese resultado la conclusión de que el CLE no es un elemento de respuesta a TrAP. Puesto que dicho elemento comprende la mitad de la región de 18 pb donde sus propios experimentos ubicaron al elemento de respuesta a TrAP, la inferencia natural es que la secuencia de 7 pb. (CGTCTAA) adyacente 5' al CLE debe ser, entonces, el blanco funcional del transactivador viral. Sin embargo, como los mismos autores lo reconocen, esa secuencia no se encuentra conservada en los promotores de otros begomovirus, lo que torna paradójicos los hallazgos de su trabajo. Una interpretación alternativa, que elimina la paradoja, es que el promotor CP contiene más de un elemento de respuesta a TrAP, siendo el CLE uno de ellos, pero no el único (Arguello-Astorga, comunicación personal). Por lo tanto, el experimento apropiado para

definir si el CLE es o no relevante para la transactivación del pCP de TGMV es examinar el efecto de su mutación en la función del promotor truncado -125/+1 (el más corto que responde a TrAP) y no en el contexto del promotor completo, como se hizo en ese estudio.

Análisis funcional de promotores Rep.

Varios trabajos al inicio de los 90's mostraron que Rep funciona como un regulador negativo de la transcripción de su propio gen, Eagle y cols. (1994, 1997) demostraron que esa represión es mediada por los mismos elementos repetidos (iterones) que son esenciales para el reconocimiento del origen de replicación viral por la proteína Rep, ya que la mutación de esos elementos en el promotor Rep de TGMV y BGMV resultó en una drástica reducción del nivel de autorrepresión. Observaciones similares fueron realizadas por Brunetti y cols. (2001) en un estudio de los begomovirus monopartitas TYLCSV-Sar y TyLCSV-Esp.

Ramos y col. (2004) analizaron la actividad promotora del gen Rep del Virus Taino del Moteado del Tomate (ToMoTV) en plantas transgénicas de tomate y tabaco, utilizando al gen GUS como reportero. Se observó una actividad relativamente débil, de 10 a 40 veces menor que la del promotor 35S de CaMV, y se identificó la secuencia mínima necesaria para esa actividad en un segmento de 132 nucleótidos, que incluye a la caja G asociada al elemento tallo-asa involucrado en la replicación viral, la cual fue previamente identificada por mutaénesis como el elemento activador más importante en el promotor homólogo de TGMV (Orozco y col., 1998).

En un análisis de los promotores *Rep* y *CP* del virus *Multan* del enchinamiento de la hoja del algodón (CLCuMV), de la India, utilizando plantas transgénicas de tabaco, se observó que la actividad del promotor del gen *Rep* fue muy superior a la del promotor CP del propio CLCuMV (en ausencia de transactivador) y, sorprendentemente, de 3 a 5 veces mayor que la del promotor CaMV 35S (Xie y col., 2003). La actividad del p*Rep* en las plantas transformadas fue constitutiva, expresándose el gen reportero con fuerza similar en diversos tejidos (hoja, tallo, raíces y flores) y sin modulación evidente por las condiciones ambientales. El análisis de variantes progresivamente más cortas del promotor Rep delimitó una región de 36 pb. que afecta significativamente la potencia del promotor. Esta región incluye una parte del elemento tallo-asa del origen de replicación y un CLE (Xie et al., 2003).

Trabajos realizados sobre promotores BV1 y BC1

Se han examinado regiones de los promotores de CP y BV1 del virus huasteco del chile (PHV) para definir las secuencias involucradas en la regulación mediada por AC2. En un trabajo realizado por Frey y colaboradores en el 2000 se demostró que TrAP activa fuertemente al promotor de CP de ACMV en protoplastos de tabaco y yuca. Las proteínas codificadas por el DNA A activan también al promotor CP en protoplastos pero también en plantas transgénicas. Estas proteínas reducen la expresión del gen Rep al mismo tiempo que activan la expresión de la proteína de movimiento BC1 en el DNA B. Este experimento se realizó utilizando dos genes diferentes de la luciferasa.

IV. Justificación.

El reciente hallazgo (Xie y col., 2003) de un promotor geminiviral cuya actividad es de 4 a 5 veces mayor que el promotor 35S de CaMV, uno de los más utilizados en la biotecnología vegetal moderna, ha generado gran interés por conocer las propiedades funcionales de otros promotores de este grupo viral. Dado que se conocen ya más de 100 especies de begomovirus, distribuídas en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo, y se estima que la diversidad real de los mismos puede superar el millar de especies, las posibilidades de encontrar entre esos virus algunos promotores con propiedades funcionales diferentes a los ya conocidos, y muy interesantes desde el punto de vista biotecnológico, son elevadas. Además de esto, la diversidad de elementos *cis*-reguladores que se encuentran compactamente organizados en la región intergénica, junto con la gran divergencia en secuencia que se observa en esta región genómica entre los miembros de diferentes linajes de esta familia viral, proporcionan material excepcional para el estudio de ciertos mecanismos de control transcripcional en sistemas vegetales, incluyendo la actividad de silenciadores específicos de promotor, de activadores con acción direccional, y de factores remodeladores de cromatina, al tiempo que se obtienen datos valiosos sobre la evolución de promotores homólogos en un período temporal que abarca varias decenas de millones de años. Por todo esto, resulta importante desarrollar nuevas metodologías que simplifiquen y hagan más rápida la generación de construcciones para analizar funcionalmente a un gran número de promotores de begomovirus. El presente trabajo se orienta en esa dirección.

V. Objetivo general

Desarrollar una metodología molecular que haga factible la rápida caracterización funcional de promotores divergentes de los Begomovirus, a fin de identificar aquellos con elevada actividad y propiedades funcionales útiles para la ingeniería genética de plantas.

Objetivos específicos

- Diseñar iniciadores universales para amplificar selectivamente la Región Intergénica de los componentes A y B de begomovirus, tanto los del continente Americano como los del Viejo Mundo.
- Construir un vector con un gen reportero sin promotor para insertar corriente arriba del mismo a los promotores virales que se desea examinar.
- Generar vectores de expresión con los promotores Rep, CP, BV1 y BC1 de múltiples geminivirus.
- Realizar la evaluación preliminar de la actividad de las construcciones generadas por medio de un sistema de expresión transitoria.

VI. Materiales y métodos

VI.1 Material biológico y medios de cultivo

VI.1.1. Medio MS-Agar (Murashige-Skoog) (Para 1 litro de medio se agregan: 1.650 mg de NH_4NO_3 , 440 mg de CaCl_2 , 370 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 170 mg de KH_2PO_4 , 1.9 g de KNO_3 , 6.2 mg de H_3BO_3 , 0.025 mg de CoCl_2 , 0.025 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 27.8 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 22.3 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.83 mg de KI, 8.6 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 37.2 mg de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de i-inositol, 0.5 mg de piridoxina HCl, 1-30 mg de IAA, 2 g de glicina, 20 g de sacarosa, 0.5 mg de ácido nicotínico, 0.1 mg de tiamina. HCl, 0.05-10 mg de cinetina, 1 g de edamina, 15 g de agar).

Para la manipulación y amplificación de plásmidos se utilizó la cepa TOP10F' de *Escherichia coli*. Esta cepa fue crecida y mantenida en medio LB (1% de Triptona, DIFCO™, 0.5% de extracto de levadura, DIFCO y 1% de NaCl). El medio LB sólido se preparó agregando 15 g/l de agar bacteriológico. Cuando fue necesario se agregó carbenicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) o Kanamicina (100 mg/ml).

VI.1.2. Plásmidos. Los plásmidos utilizados fueron: pBluescript SK (Stratagene™), pGEM-T easy (Promega™), pBI121, PK19.

VI.1.3. Plantas. Durante ensayos de biobalística se utilizaron plantas de *Nicotiana tabacum*, estas se sembraron en frascos de vidrio con medio MS y crecieron en cámaras de incubación a 25 C, con una humedad relativa del 60% y con un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad por 6 semanas.

VI.2 Preparación de la mezcla de reacción para el ensayo histológico de la β -glucuronidasa.

Tabla 1. El reactivo para el ensayo histológico de la β -glucuronidasa se prepara de la siguiente manera: (R. Ruiz Medrano y col. 1998).

Para 200 ml:

	Requerido	Stock	V de Stock
Buffer de fosfatos de sodio	100 mM	1 M	20 ml
EDTA	10 mM	0.5 M	4 ml
Tritón X-100	0.2%	Puro	200 μ l
$K_4(Fe(CN)_6) \cdot 3H_2O$	0.05mM	0.042g	
MQH_2O			Aforar a 100 ml
Ajustar a pH 7.0 con NaOH			
Pesar 100 mg de X-gluc y disolverlos en 2 ml de DMSO y agregarlos al buffer			

VI.3 Extracción y manipulación de ácidos nucleicos

VI.3.1. Extracción de DNA de plantas. El método de extracción de DNA de plantas utilizado fue el establecido por Green y Thompson (1999), en el cual no se utiliza nitrógeno líquido y consiste en moler el tejido vegetal, con buffer de extracción CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) (100 mM de Tris-HCl a pH 8.0, 1.4M de NaCl, 50mM de EDTA a pH 8.0, 2.5% de CTAB, 1% polivinilpirrolidona y 0.2% β -mercaptoetanol). Se pesaron 0.5 g de tejido infectado y se agregaron 500 μ l de buffer de extracción, para posteriormente triturar por maceración en un mortero. El homogeneizado se incubó a 65°C por 30 min, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min y se pasó el sobrenadante a un tubo eppendorff limpio, se adicionó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. La fase acuosa se separó y se adicionó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. Se pasó la fase acuosa a un tubo eppendorff limpio y se agregaron 2 μ l de RNAasa 10

mg/ml y se incubó a 37°C por 30 min. El DNA se precipitó con un volumen igual de alcohol isoamílico y se incubó en hielo por 5 min. Se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 450 µl de etanol al 70%, se centrifugó a 13,000 rpm 2 min y se eliminó el sobrenadante. Finalmente se secó al aire y se resuspendió en 40 µl de TE (Tris.HCl 10 mM y EDTA 1 mM) pH 8.0.

VI.3.2. Preparación del vector pBSGUS para la clonación de los productos de PCR. Debido a que un vector cortado con una sola enzima de restricción tiende a religarse, se procedió a digerir el vector pBS-X-Gus con la enzima de restricción *Xba*I, se purificó por columna de afinidad y se defosforiló con la fosfatasa alcalina de camarón SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) para evitar la religación del mismo y obtener una mayor eficiencia en la clonación de los productos de PCR.

VI.3.3. Ligación de los productos de PCR. Una vez obtenidos los productos de PCR, estos fueron purificados en columnas de afinidad (Quiagen™), para posteriormente someterlos a digestión con la enzima de restricción *Xba*I (New England BioLabs™), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Los productos de restricción fueron purificados utilizando las columnas de afinidad antes mencionadas y se procedió a realizar la ligación de los productos al el vector de clonación pBSGUS por métodos convencionales (Sambrook *et al.*, 2001)

VI.3.4. Amplificación de la RI de geminivirus a partir de DNA total de plantas y de DNA plasmídico. Se prepararon mezclas de reacción de 50 µl con la siguiente composición: 50-200 ng de ADN, 3 mM MgCl₂, 20 pmol de iniciador, 5 µl de *Taq* polimerasa (casera) y 200 µM de cada dNTP en 50 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Para el caso de la RI del componente A de los begomovirus:

Desnaturalización inicial: 94°C, 2 min
94°C 30 s desnaturalización
55°C 30 s alineamiento
72°C 30 s amplificación
Extensión final : 72°C 5 min

} 35 ciclos

Para el componente B y para los geminivirus del Viejo Mundo

Desnaturalización inicial: 94°C, 2 min
94°C 1 min desnaturalización
55°C 1 min alineamiento
72°C 1 min amplificación
Extensión final : 72°C 5 min

} 35 ciclos

Posteriormente, se tomaron alícuotas de 6 μ l y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% y se tiñeron en bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) por 15 min, finalmenete los geles fueron fotografiados.

VI.4. Preparación de células competentes de *Escherichia coli* Top 10 F' por el método de CaCl₂.

Se creció un precultivo de la bacteria toda la noche para posteriormente inocular 100 ml de caldo Luria Bertani (LB) y se incubó hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600nm. El cultivo se distribuyó en alícuotas de 25 ml en tubos para centrifuga estériles. Se centrifugó a 3000 rpm por 10 min, y el paquete bacteriano se resuspendió en 12 ml de MgCl₂ 0.1M. Se volvió a centrifugar con las mismas condiciones y el paquete bacteriano se resuspendió nuevamente en 12 ml CaCl₂ 0.1M. Finalmente se repitió el procedimiento del paso anterior, pero esta vez las bacterias se suspendieron en 5 ml de CaCl₂ 0.1 M más 70 ml de dimetilsulfóxido. Todo el proceso se realizó a baja temperatura (en hielo). Se distribuyeron alícuotas de 50 μ l en tubos Eppendorff estériles y se congelaron de inmediato con nitrógeno liquido, almacenándose a -70°C.

VI.5 Transformación de *E. coli*

Se descongelaron las células competentes en hielo y se les adicionó 1-4 μl de la reacción de ligación, mezclando rápidamente e incubando en hielo por 10-15 min. Posteriormente se dio a las bacterias un choque térmico a 42°C por 1.5 min, seguido de incubación en hielo por 5 a 10 min. Se les adicionó 500 μl de medio LB y se incubaron a 37°C por 45 min. Posteriormente se obtuvo el paquete bacteriano por centrifugación a 8000 rpm por 2 min. Este se resuspendió con vortex en 100 μl de LB. Alícuotas de 20 a 50 μl se sembraron en medio LB con ampicilina.

Para verificar la presencia del inserto primeramente se llevó a cabo la extracción de ADN plasmídico (miniprep) de acuerdo a un procedimiento modificado de Birnboim y Dolly (Sambrook y Russell, 2001) y posteriormente se confirmó la clonación del inserto mediante la digestión de los plásmidos obtenidos con las enzimas de restricción *Xba* I, y subsecuente electroforesis en gel. De las clonas positivas se realizó una maxiprep de acuerdo a protocolos estándar (Sambrook y Russell, 2001) para obtener el ADN plasmídico en suficiente cantidad para la secuenciación y los estudios de expresión transitoria.

VI.6. Secuenciación de DNA.

Los productos clonados fueron secuenciados por el método enzimático (Sanger *et al.*, 1987), en la Unidad de Secuenciación del CINVESTAV, Irapuato, y la secuencia nucleotídica obtenida en cada caso se comparó con secuencias disponibles en la base de datos del GenBank, utilizando el programa BLAST, adicionalmente se obtuvieron los tres marcos de lectura utilizando el programa MegAlign de DNA Star, que utiliza los métodos alternativos Jotun Hein y Clustal (referencia).

VI.7. Ensayo de Biobalística

VI.7.1. Preparación de las partículas de oro (Ruíz-Medrano *et al.*, 1999). Se pesaron 60 mg de partículas de oro (0.6 μ m) en un tubo eppendorff de 1.5 ml y se resuspendieron en 2 ml de HNO₃ 0.1 N y se sonicaron por 20 min en hielo, posteriormente se centrifugaron 2 min a 10,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 2 ml de etanol al 100% (grado de biología molecular) y se sonicaron por 3-5 segundos. El tubo se centrifugó 2 min a 10,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de agua destilada esteril y se separó en 4 tubos eppendorff de 1.5 ml con 250 μ l cada uno y se les agregaron 750 μ l de agua bidestilada esteril a cada tubo.

VI.7.2. Recubrimiento de microprojectiles de oro con el DNA de interés (Ruíz-Medrano *et al.*, 1999). En un tubo Eppendorff agregar uno a uno en el orden indicado los reactivos, mezclando a homogeneidad la suspensión entre las adiciones. Se agregaron a un tubo eppendorff 10 μ l de DNA plasmídico (1 μ g/ μ l) de la muestra problema, posteriormente se agregaron 50 μ l de la suspensión de partículas de oro, 50 μ l de CaCl₂ 2.5 M, 20 μ l de espermidina base libre 0.1 M y se centrifugaron de 5-10 s y se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 140 μ l al 70%, se centrifugó 5-10 s a 10,000 rpm y se eliminó el sobrenadante y repetir el paso anterior. La mezcla se resuspendió en 60 μ l de etanol absoluto y se resuspendió con ayuda de la micropipeta y se sonicó de 2-5 s dos veces. Aplicar 10 μ l de la suspensión de micropartículas a cada disco acarreador de Kaptón y secarlas al aire.

VI.7.3. Preparación de las hojas de tabaco para el bombardeo (Ruiz Medrano y col., 1999). Los análisis de expresión transitoria se llevó a cabo por el método de bombardeo de micropartículas en hojas de tabaco. Las semillas de tabaco se sembraron en frascos con medio MS y se mantuvieron durante 15 días a una temperatura de 25°C, humedad de 65% con un fotoperiodo de 16 horas luz vs 8 de oscuridad (Ruíz y col., 1998).

Las hojas de tabaco y colocaron en una caja de Petri con agua bidestilada esteril y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 0.3 cm² con ayuda de unas pinzas de disección y un bisturí flameados previamente para su esterilización. Después, se colocaron aproximadamente 10 fragmentos de las hojas en forma circular en cajas de Petri con medio sólido de MS.

VI.7.4. Condiciones para el bombardeo de micropartículas

Tabla 2. Los parámetros utilizados en este trabajo para el bombardeo de micropartículas de oro son los siguientes:

Presión de bombardeo	1800 psi
Número de disparos por placa	1
Tamaño de partículas	0.6 μm
Concentración de partículas	60 mg/ml
Concentración de DNA	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Distancia recorrida por el DNA/oro	10 cm
Resistencia del disco de ruptura	800 psi

VI.7.5. Bombardeo de las hojas de tabaco (Pistola Biorad). Se abrió la válvula del tanque de helio y se ajustó la presión del manómetro de salida a 1400 psi (libras por pulgada cuadrada). Es importante que la presión de salida sea superior a la resistencia del disco de ruptura. Posteriormente se encendió la bomba de vacío y la cámara de vacío para realizar los disparos. Se colocaron los discos de ruptura de 800 psi. La suspensión de micropartículas de DNA se sónico de 2-5 s dos veces antes de colocarla en los discos macrocarriadores y se resuspendieron las partículas de oro completamente pipeteando para eliminar cualquier aglomeración. Se tomaron 10 μl de las partículas de oro cubiertas con el DNA plasmídico (microacarreador) y se distribuyeron en el centro de los macroacarreadores. Se colocó la caja de Petri con medio MS y los fragmentos de hoja de tabaco a 9-10 cm de distancia (segundo carril). Se cerró la cámara y se generó vacío hasta que el indicador marcó 25-28 Hg (mm de mercurio). Se mantuvo el vacío cerrando el paso de este y se realizó el disparo de micropartículas con el DNA. Se retiró la muestra y se cerró.

VI.7.6. Regeneración de las hojas bombardeadas y expresión transitoria. Las hojas bombardeadas se incuban en la oscuridad a 25°C por 48h en medio MS, posteriormente se colocan en cajas de microtitulo de 26 pozos con 1 ml de solución de tinción de GUS y se incuban toda la noche a 37°C en oscuridad. Las hojas bombardeadas ya teñidas se lavaron con una solución de metanol/acetona (3:1) hasta que las hojas quedaron lo suficientemente claras para poder observar los puntos azules, para poder contarlos y fotografiarlas. Finalmente las muestras se almacenaron en una solución de glicerol al 50% a 4°C.

VII. Resultados

VII.i- Construcción del vector pBS-X-GUS.

Para evaluar la actividad reguladora de la transcripción de los promotores begomovirales, fue necesario primero construir un vector de expresión carente de promotor propio, pero dotado de un adaptador múltiple corriente arriba del gen reportero, a fin de hacer factible la subclonación de la región intergénica de cualquier begomovirus en esa posición. Para ello, se subclonó el fragmento *Xba*I/ *Eco*RI de 2.1 Kb del vector binario pBI121, en los sitios correspondientes del vector pBlueScript-SK+ (Fig. 3). Ese fragmento incluye a la región codificante del gen *uidA* (*GUS*) y el terminador de la transcripción del gen de la nopalina sintetasa (3' nos).

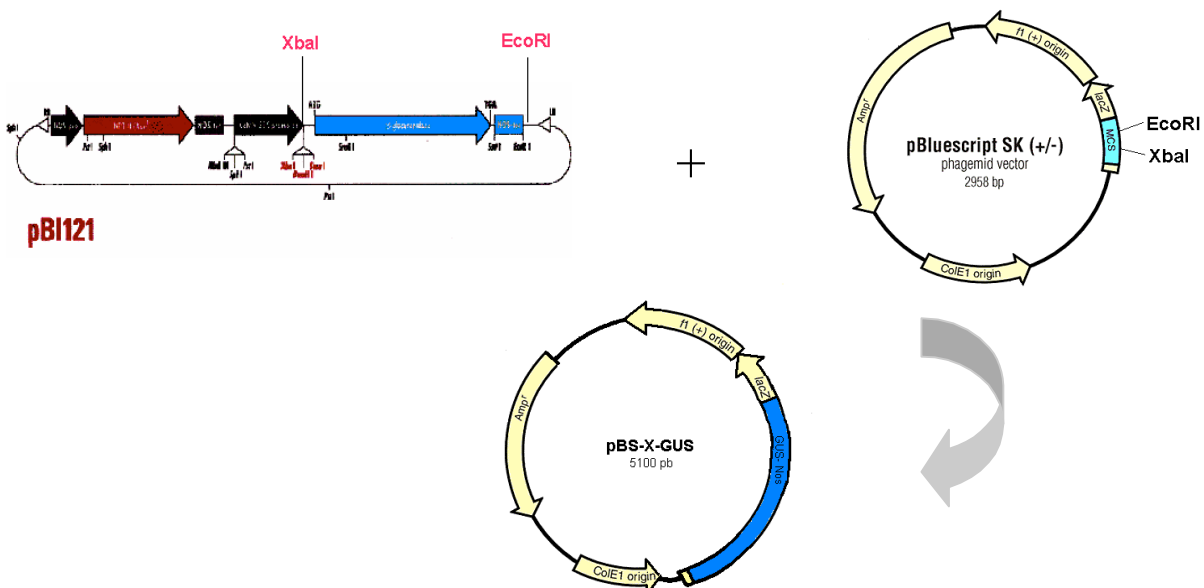


Figura 3: Construcción del vector pBS-X-Gus. Se clonó el fragmento *Xba*I-*Eco*RI de 2100 pb. del vector pBI121 que contiene la región codificante del gen *GUS* y la secuencia 3' del gen *nos* que actúa como terminador de la transcripción, en el vector pBS-SK+.

VII.ii Diseño de iniciadores para amplificar la RI de los genomas A y B.

Para diseñar los oligonucleótidos sintéticos que serían utilizados para amplificar la región intergénica de los genomas A y B de los begomovirus, se realizó una serie de alineamientos de las secuencias correspondientes utilizando el programa MegAlign del paquete computacional DNA Laser Gene (DNASTAR, Inc). La comparación de la RI de 40 begomovirus del continente americano (Nuevo Mundo o NM) mostró que no existen en

esta región secuencias universalmente conservadas (además del elemento tallo-asa del origen de replicación), y por lo tanto, fue necesario identificar, en las secuencias codificantes adyacentes, segmentos altamente conservados que pudiesen constituir los “blancos” de los iniciadores universales requeridos para nuestro propósito. La región del llamado “Motif 1” característico de las proteínas iniciadoras de la replicación por círculo rodante (RCR) como Rep (Argüello-Astorga y Ruiz-Medrano, 2001), es el bloque de secuencia conservada más cercano al codón de inicio del gen *Rep*, y fue elegido por ello como el “blanco” de un iniciador degenerado, Rep-MotGUS (Tabla 3). Por la parte del gen CP, los primeros 8 codones del mismo están razonablemente bien conservados en todos los begomovirus NM, y se eligieron para diseñar el iniciador degenerado complementario, CP-MotGUS (Tabla 3). Dado que los iniciadores anteriores se ubican en regiones codificantes, fue indispensable diseñarlos de tal manera que al ser subclonados en el sitio único XbaI de pBS-X-GUS, los genes virales quedasen en fase con el gen reportero. Eso se hizo introduciendo un sitio XbaI, colocado convenientemente, en ambos iniciadores.



Figura 4: Esquema de la RI del componente A con la región 5´ de los genes Rep y CP. Se muestra la posición relativa de las secuencias conservadas a partir de las que fueron diseñados los iniciadores sintéticos para amplificar por PCR la región intergénica del componente A de los begomovirus del Nuevo Mundo.

Para diseñar iniciadores útiles en la amplificación de la región intergénica de los begomovirus del Viejo Mundo (VM) fue necesario realizar comparaciones más exhaustivas de la RI y las regiones codificantes adyacentes. Se compararon 15 begomovirus de los continentes Africano y Europeo, y 30 begomovirus de diferentes regiones de Asia (India, Pakistán, China, Japón, etc.) y se llegó a la conclusión de que el iniciador Rep-MotGUS utilizado para amplificar la RI de los virus NM es también apropiado para los virus OW, pero ese no era el caso del iniciador CP-MotGUS. Esto se debe a la considerable

divergencia de los genes CP de estos linajes. Se diseñó, por lo tanto, un nuevo iniciador degenerado, OW-CP-C19 GUS, que está dirigido a un bloque de secuencia conservada que incluye los codones 12-19 del gen CP (Tabla 3). La región amplificada es de mayor tamaño que la de los begomovirus americanos, pues en los virus VM existe un gen adicional, V2, parcialmente sobrelapado con CP, y que se localiza entre este último gen y la RI (ver Figura 5).



Figura 5: Esquema de la RI de begomovirus del Viejo Mundo con la región 5' de los genes Rep y CP. Con una flecha roja se indica la posición relativa de las secuencias sobre las cuales se diseñaron los iniciadores para amplificar la región intergénica del componente A de los begomovirus del VM. El gen representado en azul es V2, universalmente presente en los virus VM, cuyo producto participa en el movimiento viral.

En el caso del genoma B, que presentan una mayor divergencia global en secuencia aún entre begomovirus de un mismo continente, se identificó un segmento razonablemente bien conservado de 21 pb cercano al codón de inicio del gen BC1, pero solo se encontraron bloques de secuencia conservados en el caso del gen BV1 a una distancia considerable del inicio de la traducción del mismo, en una región que incluye a los codones 63-70. Los iniciadores universales que se sintetizaron para amplificar la RI del genoma B están optimizados para begomovirus NM, y se designaron BC1-PrCo3-GUS y BV1-Pr210GUS (Tabla 3), a los cuales se les introdujo un sitio de restricción *Xba*I para permitir la subclonación del producto de PCR en el vector pBS-X-GUS, de modo que los genes virales queden en fase con el gen reportero.



Figura 6: Esquema de la RI del componente B con fragmentos de los genes BC1 y BV1. Se muestra la posición relativa de los sitios sobre los cuales se diseñaron los oligonucleótidos utilizados para amplificar la región intergénica del componente B de begomovirus del Nuevo Mundo.

Tabla 3- Iniciadores universales para la amplificación de la región intergénica de begomovirus.

Rep-Mot-GUS	GAGTCTAGATGGATANGTDAGGAAATARTTYTTRGC
CP-MotGUS	GCGTCTAGATCGCCANGGRGCRTCACGCTTAGGCATT
OW-CP-Co8-GUS	GAGTCTAGAAATATCKSCKGGWCGCTTCGRCAT
OW-CP-C19-GUS	GAGTCTAGATTTCGRCGWACCTTSGAKRCGGGMGTGG
BC1-PromCo3-GUS	GAGTCTAGATGGAGGATTNRCYARYTGAGA
BC1-PromCo20-GUS	GAGTCTAGAGTCATGRGAHARYTGATAYTCRTC
BV1-Prom210-GUS	GAGTCTAGAATTATGRGCCAWDACAAAWTCWGGNCC

VII.iii Amplificación por PCR de la región intergénica de begomovirus.

Para la amplificación de la RI del componente A de begomovirus se utilizaron dos tipos de templados o “moldes”. Unos fueron clonas infecciosas de virus bien caracterizados, como el virus Huasteco del chile (PHV), el virus del mosaico amarillo de la papa (PYMV), el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV), el virus del enrollamiento amarillo de la hoja del tomate TYLCV), y el virus africano de la yuca (ACMV) (ver Tabla 4).

El segundo tipo de moldes o “plantillas” de DNA fueron plásmidos con productos de PCR como insertos, los cuales incluyen a la IR y parte de los genes Rep y CP de begomovirus que, en algunos casos, solo han sido parcialmente caracterizados al presente. Estas clonas parciales de begomovirus tanto conocidos como aún sin denominar, incluyen a los siguientes: 1) el virus del mosaico dorado de *Rhynchosia*, cepa Sinaloa (RhGMV-Sinaloa); 2) una clona con un fragmento genómico de lo que parece ser una variante del virus Iguala del mosaico amarillo de la okra (OkYMIgV), aislado de una planta de *Datura stramonium* (aquí designado simplemente “virus de Datura”; 3) una clona de PCR aislada de una planta de tomate sintomática, colectada en Sinaloa por el Dr. Jesús Méndez, y que por no tener identidad con virus conocidos denominamos aquí virus “Sinaloa 22”; 4) una clona de PCR aislada de una planta de soya, y que está relacionada con una nueva especie de begomovirus provisionalmente denominado virus Sinaloa del mosaico amarillo de *Rhynchosia minima*, RhYMSinV (Mauricio-Castillo, com. personal); 5) una clona de PCR derivada de una planta de *Ipomoea sp.* (una maleza) colectada en Yucatán, en 1999, y de la cual solo se conoce (y se conserva) un fragmento genómico de 600 pb (Rivera-Bustamante, com. personal).

En la figura 7a se observan los productos de amplificación en experimentos en los que se utilizaron genomas virales completos como plantillas. En estas reacciones de amplificación se obtuvieron, además del producto del tamaño esperado (aprox. 400 pb) otras bandas inespecíficas, que fueron notablemente más numerosas en comparación con las derivadas de clonas de genomas parciales como molde (figura 7c).

Virus	Genoma	Origen
<i>African cassava mosaic virus</i> (ACMV)	A	Nigeria
<i>Pepper golden mosaic virus</i> PepGMV	A y B	Tamaulipas
<i>Pepper Huasteco yellow vein virus</i> PHYVV (PHV)	A y B	Tamaulipas
<i>Potato yellow mosaic virus</i> PYMV-Gpe	A y B	Isla de Guadalupe
<i>Rhynchosia golden mosaic virus</i> RhGMV-Sinaloa	A y B	Sinaloa (Dr. Mendez)
<i>Tomato taino mottle virus</i> ToMoTV	A y B	Cuba
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> TYLCV	Unico	Israel
Secuencias parciales de Begomovirus		
Virus de <i>Datura stramonium</i>	A	Morelos
Virus de <i>Ipomoea sp.</i> (Ipomoea 600)	A	Yucatán
Virus del tomate Sinaloa 22	A	Sinaloa (Dr. Mendez)
Virus de Soya 5	A	Sinaloa (Dr. Mendez)
Virus del frijol 1-11	A	Sinaloa (Dr. Mendez)

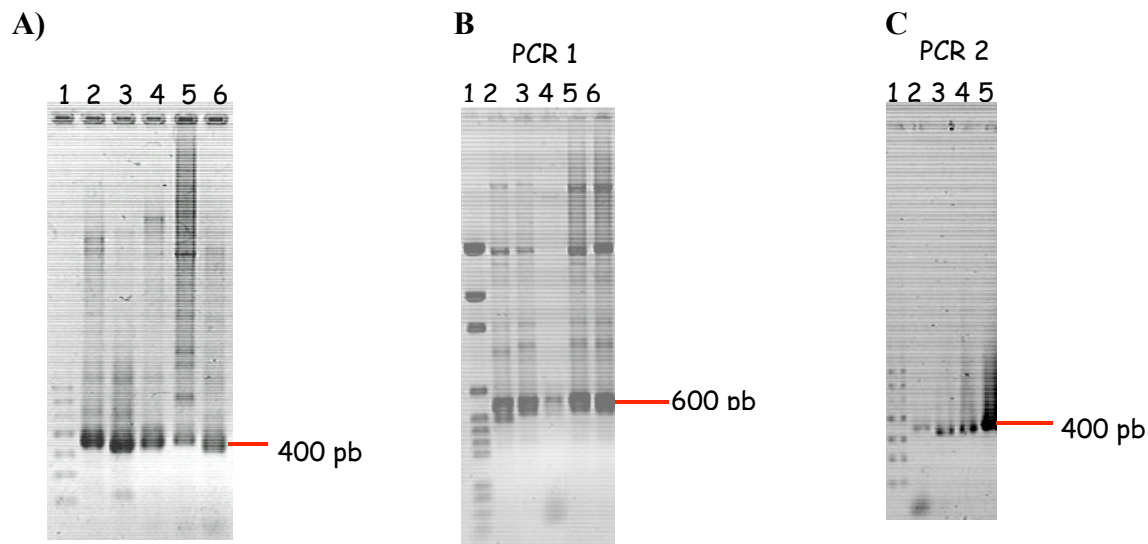


Figura 7: A. Amplificación de la RI a partir de genomas completos o parciales de begomovirus clonados. A.- Utilizando los oligonucleótidos Rep-MotGUS y CP-MotGUS. 1) Marcador de PM, 2) PYMV 3) Ipomoea-600, 4) TYLCV, 5) ToMoV, 6) PepGMV. B: Productos de PCR de 600 pb, obtenidos con los iniciadores Rep-MotGUS y CP-c70. 1) MPM, 2) PYMV, 3) virus de Datura, 4) TGMV, 5) PHV, 6)ToMoTV; C: Amplificaciones por PCR anidado con el par de oligos Rep-MotGUS y CP-MotGUS a partir de los productos de PCR de 600 pb: 1) Marcador de PM, 2) virus de Datura, 3) PHV, 4) TGMV. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% y a un voltaje de 70 V.

La amplificación de la RI del genoma A de los begomovirus, tanto los del Nuevo y el Viejo Mundo, se llevó a cabo por un procedimiento estándar que se describe en el apartado de “Materiales y Métodos”. Se utilizó la misma estrategia para amplificar el componente B de PepGMV y PHV, que fueron los únicos genomas B que se probaron en el presente trabajo.

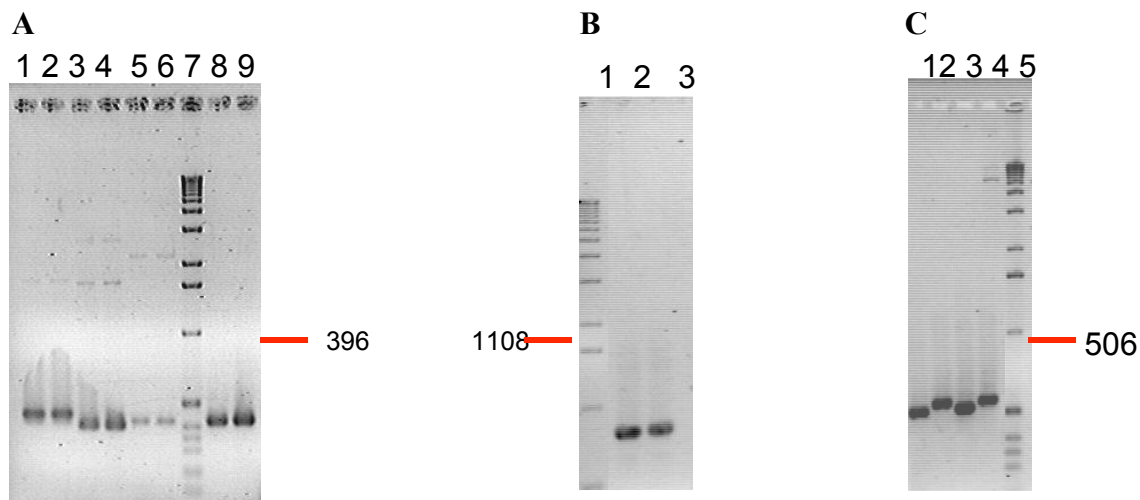


Figura 8: Amplificación por PCR de la RI de diversos begomovirus utilizando los iniciadores desarrollados en este trabajo. A. Oligonucleótidos Rep-MotGUS y CP-GUS. 1) y 2) Clona de PCR de virus de calabaza, 3) y 4) Clona de PCR de virus de Soya, 5) y 6) Clona de PCR de virus de frijol, 7) marcador de PM, 8) y 9) Clona de PCR de virus de Frijolillo (Rhynchosia). **B. Oligonucleótidos BV1-Pr210GUS y BC1-PrCo3GUS,** 1) Marcador de PM, 2) PHV, 3) PepGMV. **C. Oligonucleótidos Rep-MotGUS y OW-CP-C19GUS,** 1) ACMV, 2) TYLCV, 3) ACMV-2, 4) TYLCV-2, 5) Marcador de PM. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%.

VII.iv Generación de vectores de expresión con promotores begomovirales.

Si bien los productos de PCR obtenidos con los diferentes juegos de iniciadores que se crearon pueden, en principio, ser clonados directamente en el vector pBS-X-GUS, previa digestión con XbaI, encontramos muy problemático este proceso directo, debido a la inevitable contaminación de los productos de PCR con los plásmidos utilizados como plantillas para la reacción de PCR. Dado que estos últimos portan un gen de resistencia a ampicilina, similar al que está presente en pBS-X-GUS, con frecuencia se recuperaban solo plásmidos contaminantes, haciendo lenta e ineficaz la labor de búsqueda de las recombinantes deseadas. Para evitar este “fondo” de plásmidos contaminantes, decidimos clonar primero los productos de amplificación en un plásmido con un marcador de selección diferente, pKS19, que tiene un gen de resistencia a kanamicina. Una vez clonados los productos de PCR en este plásmido, pudieron ser escindidos digiriendo con

XbaI, para posteriormente ligarlos a pBS-X-GUS, sin necesidad incluso de aislar el inserto de un gel (ver Figura 11). Adicionalmente, este procedimiento se beneficia del sistema de escrutinio basado en la α -complementación que posee pK19, pero no pBS-X-GUS, lo que facilita mucho la identificación de clones recombinantes (colonias blancas vs. azules en un medio suplementado con IPTG/ X-Gal). Siguiendo este procedimiento con un paso intermedio de clonación en pKS19, se aumentó significativamente la eficiencia global del proceso de generación de vectores de expresión.

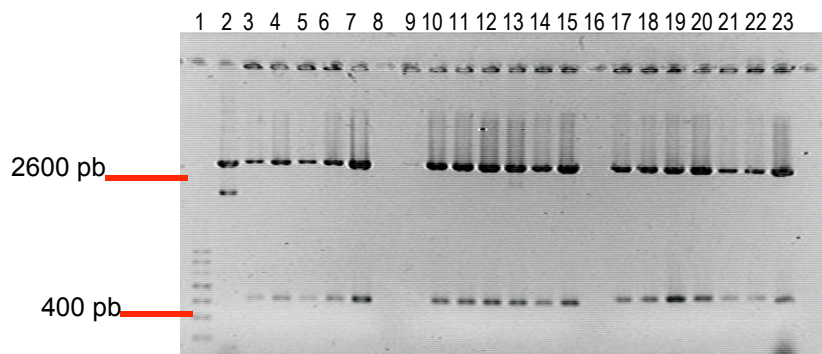


Figura 9: Plásmidos pKS19 recombinantes con productos de PCR (RI) derivados del componente A de diversos begomovirus de América. 1) Marcador de PM, 2) Vector pK19/*Xba*I (digestión parcial), 3 a 7) PCR derivados de Okra, 8) vacío, 9 a 15) PCRs derivados de Ipomoea-600, 16) vacío, 17 a 23) PCRs derivados de PHV.

En las figuras 10A-B se pueden observar las bandas amplificadas de modo característico en el caso del genoma A de los begomovirus del NM (tamaño de la RI: aprox. 400 pb), del genoma B de los mismos (aprox. 850 pb), y la RI del genoma A de los begomovirus del VM (aprox. 500 pb).

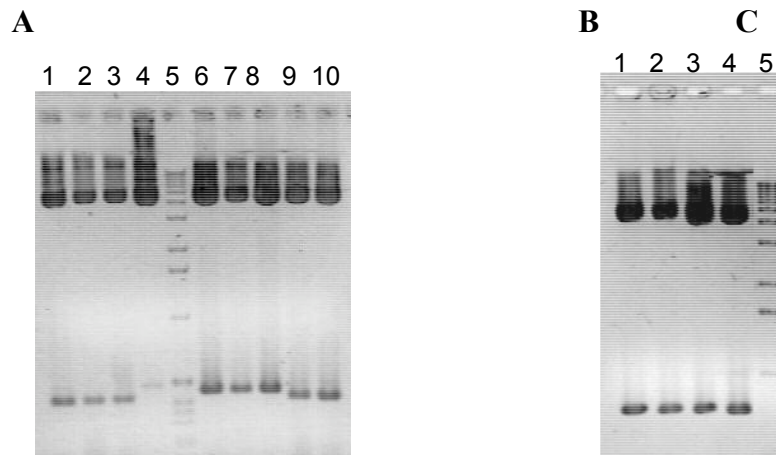


Figura 10: Productos de digestión con XbaI de las clonas que contienen la RI de begomovirus inserta en el vector pBS-X-Gus. **A.- RI del componente A, begomovirus NM.** 1 a 3) virus de soya, 4) virus de calabaza, 5) Marcador de PM, 6 a 8) virus de calabaza, 9 y 10) RhGMV; **B.- RI del genoma B,** 1 y 2) PHV, 3 y 4) PepGMV, 5) Marcador de PM.

VII.v Determinación de la orientación del fragmento clonado (RI)

En algunos iniciadores diseñados para la amplificación de la RI de genomas A de begomovirus se introdujo un sitio de corte para la enzima de restricción *Styl* con el propósito de determinar fácilmente la orientación en la que las secuencias virales se han insertado en el vector pBS-X-GUS. Esta determinación es clave, pues de esa manera puede saberse con certeza cual de los dos promotores virales, CP o Rep, es el que dirige la expresión del gen reportero en un vector dado. La digestión con *Styl* y *EcoRI* de los vectores de expresión obtenidos en el proceso de clonación de los productos amplificados, genera productos de digestión característicos. El sitio *Styl* se encuentra en el iniciador cercano al promotor CP, en tanto que el sitio *EcoRI* se ubica al final del terminador *Nos* que forma parte de pBS-X-GUS. Si el gen reportero se encuentra bajo el control del promotor pCP, la digestión del vector generará fragmentos de 2160 pb y 3400 pb. Si, por el contrario, el gen *GUS* se encuentra bajo la dirección del promotor pRep, los fragmentos

que se producirán serán de 2560 pb y 3000 pb (los tamaños se refieren al caso de la RI de begomovirus del NM).

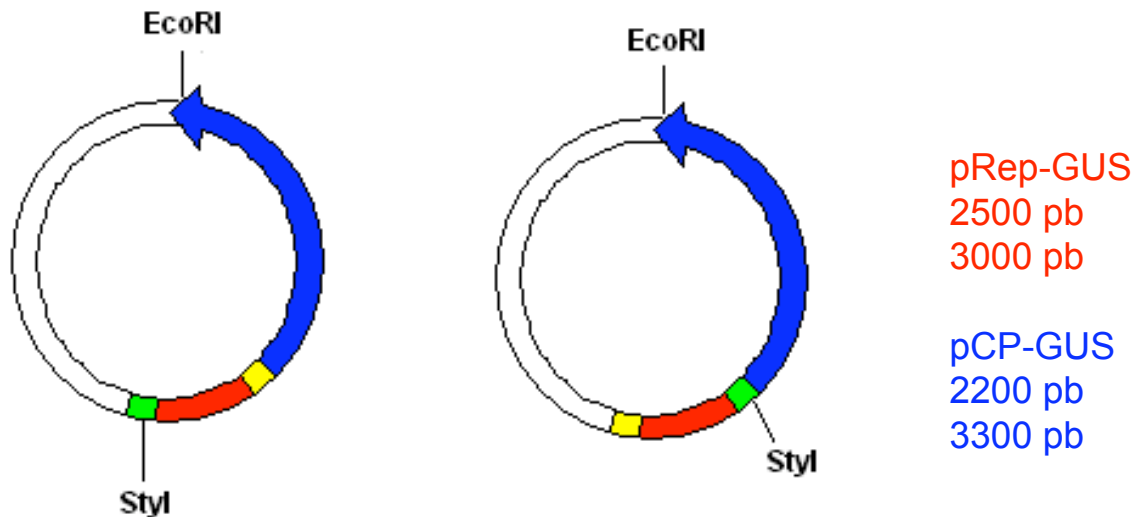


Figura. 11: Determinación de la orientación de las RI clonadas en el vector pBS-X-GUS. La figura muestra los fragmentos esperados para las dos posibles orientaciones de las RI. En azul se muestra el gen *GUS*, en blanco el vector pBS y en rojo la RI clonada. La parte amarilla pertenece al promotor Rep y la verde al promotor CP.

En la figura 12 se puede observar el patrón de restricción de algunas clonas tratadas con las enzimas de restricción *Styl* y *EcoRI*. Las clonas en las que se observan las bandas de 3000 y 2560 (carriles 2 y 3 de la figura 13a) contienen el gen *GUS* bajo el control del promotor Rep, mientras que las clonas que presentaron las bandas de 3400 y 2160 (carriles 1,4, 6 y 7 de la figura 12a) tienen al gen reportero bajo la influencia del promotor CP. El mismo patrón se observa en la figura 12c.

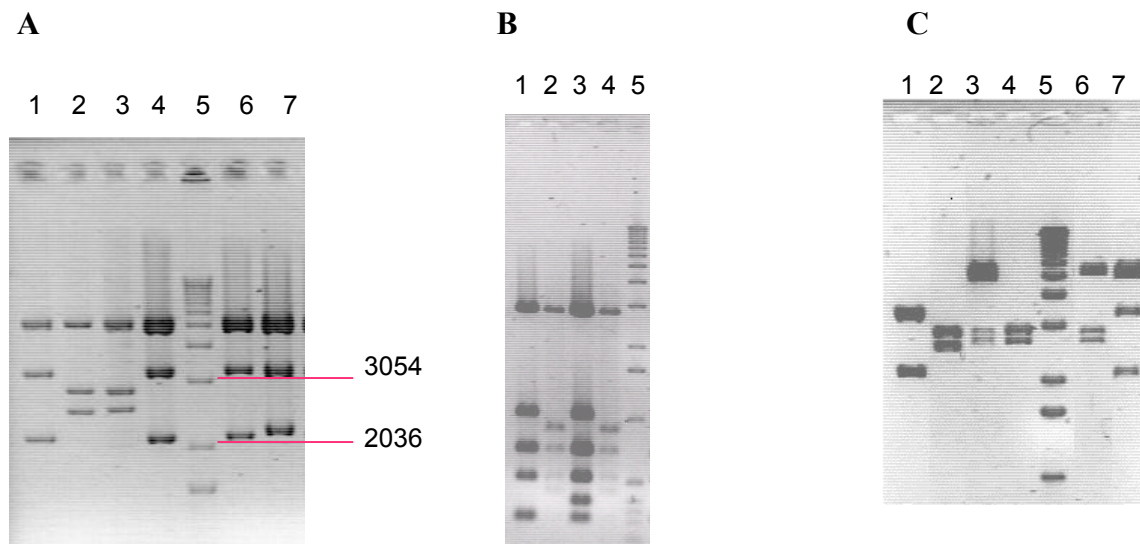


Figura. 12: Determinación de la orientación de la RI por digestión con las enzimas *StyI* y *EcoRI*. A.- clonas del componente A de begomovirus del NM, 1 y 2) virus de calabaza, 3 y 4) virus de soya, 5) Marcador de PM, 6 y 7) virus del frijol. B. Clonas del componente B. 1 a 4) PepGMV, 5) Marcador de PM, y C) de begomovirus del Viejo Mundo. 1 a 4) ACMV, 5) Marcador de PM, 6 y 7) ACMV. Las clonas del genoma A fueron digeridas con las enzimas *StyI* y *EcoRI*, las del genoma B con *Hinc II* y *SacI*.

En el caso del componente B las enzimas que se utilizaron para definir la orientación de la RI clonada fueron *Sac I* y *Hinc II*, y el patrón de restricción es distinto, como se muestra en la figura 12b.

VII.vi Secuenciación de los vectores de expresión generados.

Las clonas con la RI de 10 genomas A de begomovirus, en ambas orientaciones, “pRep” y “pCP” (un total de 20 vectores de expresión), así como dos clonas con los promotores BC1 y BV1, respectivamente, de PepGMV, se enviaron a la Unidad de Secuenciación del CINVESTAV, Unidad Irapuato, para determinar si o no las secuencias virales habían quedado, efectivamente, en fase con el gen *GUS*, y para confirmar la correcta identidad de cada clona.

En la tabla X se presentan las secuencias de DNA de los 22 vectores de expresión producidos en este trabajo, y se señalan el codón de inicio (ATG) de los

genes que codifican las proteínas Rep (negro) y CP (rojo), o bien las proteínas BC1 (verde) y BV1 (violeta), respectivamente. La secuencia del gen *GUS* se presenta en azul, y la que corresponde al adaptador múltiple de clonación en color amarillo.

VIRUS	Secuencia de DNA (Rep-GUS)	Secuencia de DNA (CP-GUS)
PHYVV	<u>ATGCCATTACCTAAACGATTTCCG</u> TTTAAACGCTAAGAACTATTTCC TTACGTATCCATCTAGAGGATC CCCGGGTGGTCAGTCCCTTATG TTACGTCCTGTAGAAACCC...	<u>ATGCCTAAGCGCGATGCTCCATGGCGT</u> TCTAGAGGATCCCCGGGTGGTCAGTCC CTTATGTTACGTCCTGTAGAAACCC...
Datura- OkYMoIV	<u>ATGCCATCGGTTAGTCGTTTCAA</u> AGTTTCAGCCAAGAAGCTATTTCC TTACCTATCCATCTAGAGGATCC CCGGGTGGTCAGTCCCTTATGT TACGTCCTGTAGAAACCC...	<u>ATGCCTAAGCGCGATGCCCATGGCGT</u> TCTAGAGGATCCCCGGGTGGTCAGTCC CTTATGTTACGTCCTGTAGAAACCC...
Ipomoea- Yucatan	<u>ATGCCACGCTTAGGTCGTTTCA</u> AGATAAATGCTAAGAAGCTATTTCC CTCACTTATCCATCTAGAGGATC CCCGGGTGGTCAGTCCCTTATG TTACGTCCTGTAGAAACCC...	<u>ATGCCTAAGCGAGATCCCCCAT</u> GGCGTTCTAGAGGATCCCCGGGTGGTC AGTCCCTT ATGTTACGTCCTGTAGAAACCC...
PYMV	<u>ATGCCCGAAAAGGCTCCTTCT</u> CTATAAAGCTAAGAAGCTATTTCC CTCACGTATCCA TCTAGAGGAT CCCCGGGTGGTCAGTCCCTTAT GTTACGTCCTGTAGAAACCC...	<u>ATGGCTAAGCGGGATGCCCATGGCG</u> TTCTAGAGGATCCCCGGGTGGTCAGTC CCTTATGTTACGTCCTGTAGAAACCC...
RhGMV- Sinaloa	<u>ATGCCACTCCAAAGCGCTTTC</u> GCTTAAATGCTAAGAAGCTATTTCC CTAACATATCCA TCTAGAGGAT CCCCGGGTGGTCAGTCCCTTAT GTTACGTCCTGTAGAAACCC...	<u>ATGCCTAAGCGAGATGCCCATGGCGT</u> TCTAGAGGATCCCCGGGTGGTCAGTCC CTTATGTTACGTCCTGTAGAAACCC...
Tomate- Sinaloa22	<u>ATGCCACCGCCTAAACGTTTTCC</u> GCCTTCAAGCTAAGAAGCTATTTCC CTCACGTATCCA TCTAGAGGAT CCCCGGGTGGTCAGTCCCTTAT GTTACGTCCTGTAGAAACCC...	(en secuenciación)
Frijol-	<u>ATGCCATTGCCTAAACGTTTTCC</u> GTCTAAATGCCAAGAATTATTTCC	<u>ATGCCTAAGCGTGATGCTCCATGGCGT</u> TCTAGAGGATCCCCGGGTGGTCAGTCC

Sinaloa11	CTTACCTATCCATCTAGAGGATC CCCGGGTGGTCAGTCCCTTATG TTACGTCCTGTAGAAACCC...	CTTATGTTACGTCCTGTAGAAACCC...
Soya 5- Sinaloa	ATGCCACGCAACCCTAATTCCT TTCGTTTACAATCCAAGAACTAT TTCCTAACCTATCCATCTAGAGG ATCCCCGGGTGGTCAGTCCCTT ATGTTACGTCCTGTAGAAACCC ...	ATGCCTAAGCGGATGCTCCATGGCGT TCTAGAGGATCCCCGGGTGGTCAGTCC CTTATGTTACGTCCTGTAGAAACCC...
TYLCV	ATGCCTCGTTTATTTAAAATATA TGCCAAGAACTATTTCTCACCT ATCCA TCTAGAGGATCCCCGGG TGGTCAGTCCCTTATGTTACGTC CTGTAGAAACCC...	ATGTCGAAGCGACCAGGCGATATAATC ATTTCCACGCCCGTCTCGAAGGTTGCG CGATCTAGAGGATCCCCGGGTGGTCA GTCCCTTATGTTACGTCCTGTAGAAAC CC...
ACMV	ATGAGA ACTCCTCGTTTTCGAAT TCAAGCCAAGAAATATTTCTTA CATATCCATCTAGAGGATCCCC GGGTGGTCAGTCCCTTATGTTA CGTCCTGTAGAAACCC...	ATGTCGAAGCGACCCGGAGATATATCT AGAGGATCCCCGGGTGGTCAGTCCCTT ATGTTACGTCCTGTAGAAACCC...
	Secuencia DNA (BC1-GUS)	Secuencia DNA (BV1-GUS)
PepGMV- Genoma B	ATGTATATAAGGGACTCCAGGA CTCCACAATATATGACAGGAGT TGAGGGACTCCGCTGGAGTCCT ATACCATATTTACATATTTGCCA TTCTTCTCAACTGGCCAATCCTC CATCTAGAGGATCCCCGGGTGG TCAGTCCCTTATGTTACGTCCTG TAGAAACCC...	ATGTATCAGTCAAGGTATACACGTGTG GCACCCTATGTGCAGAGACGATTTCAA CGACGTAATCAAGTGTTTAAGCGCAC AGTATCAGGGAGACGTAATGACGTAA ACGTCGATCAAGTCAATTAATTAAGAG TAATGAGGAACCTAAGATTACGTCGC AGCGCATACATGAAAACCAATATGGCC CAGAATTTGTCATGGCCATAATTCTA GAGGATCCCCGGGTGGTCAGTCCCTTA TGTTACGTCCTGTAGAAACCC...

Tabla 5. Secuencia nucleotídica de la región codificante de las proteínas de fusión Rep-GUS, CP-GUS, BC1-GUS y BV1-GUS de los vectores generados en el presente trabajo. El codón de inicio del gen viral y del gen *uidA* (GUS) están subrayados. Amarillo, adaptador del vector pBS-X-GUS; azul, gen reportero; negro: gen Rep; rojo, gen CP; verde, gen BC1; violeta, gen BV1.

En la tabla 6 se presentan las secuencias de las proteínas de fusión, en las que se observa la región amino-terminal de la proteína Rep de cada geminivirus (negro) y de las proteínas CP (rojo). El azul corresponde a la proteína GUS y el amarillo corresponde a la secuencia de aminoácidos “codificada” por el adaptador múltiple de clonación. En el caso de las construcciones con la RI del componente B, la proteína BC1 se muestra en verde, y la proteína BV1 en violeta.

Virus	Rep-Gus	CP-Gus
PHV	MPLPKRFRLNAKNYFLTYP SRGSPGGQSLMLRP VET...	MPKRDAPWRSRGSPGGQSLMLRPVET...
Datura- OkYMoIV	MPSVSRFKVSAKNYFLTYP SRGSPGGQSLMLRP VET...	MPKRDAPWRSRGSPGGQSLMLRPVET...
Ipomoea- Yucatán	MPRLGRFKINAKNYFLTYP SRGSPGGQSLMLRP VET...	MPKRDPPWRSRGSPGGQSLMLRPVET...
PYMV	MPRKGSFSIKAKNYFLTYP SRGSPGGQSLMLRP VET...	MAKRDAPWRSRGSPGGQSLMLRPVET...
RhGMV- Sinaloa	MPLPKRFRLNAKNYFLTYP SRGSPGGQSLMLRP VET...	MPKRDAPWRSRGSPGGQSLMLRPVET...
Tomate- Sinaloa22	MPPPKRFRLQAKNYFLTYP SRGSPGGQSLMLRP VET...	(en secuenciación)
Frijol- Sinaloa11	MPLPKRFRLNAKNYFLTYP SRGSPGGQSLMLRP VET...	MPKRDAPWRSRGSPGGQSLMLRPVET...
Virus Soya 5	MPRNPNSFRLQSKNYFLTYP SRGSPGGQSLMLR PVET...	MPKRDAPWRSRGSPGGQSLMLRPVET...
TYLCV	MPRLFKIYAKNYFLTYP SRGSPGGQSLMLRPVET ...	MSKRPGDIIISTPVSKVRRSRGSPGGQSLML RPVET...
ACMV	MRTPRFRIQAKNYFLTYP SRGSPGGQSLMLRPV ET...	MSKRPGDISRGSPGGQSLMLRPVET...
	BC1- GUS	BV1-GUS
PepGMV- GenomaB	MTGVEGLRWSPiPYLHICHSSQLANPP SRGSPGG QSLMLRPVET...	MYQSRYTRVAPYVQRRFQRRNQVFKRTVSG RRNDVKRRSSQLIKSNEEPKITSQRIHENQY GPEFVMAHNSRGSPGGQSLMLRPVET...

Tabla 6. Secuencia del extremo aminoterminal de las proteínas de fusión correspondientes a los vectores derivados de pBS-X-Gus. Se indica en amarillo a los residuos aa codificados por el polilinker del vector anterior, en azul los primeros residuos de la proteína β -glucuronidasa, y en diferentes colores los residuos correspondientes a las proteínas virales. Negro, proteína Rep; rojo, proteína CP; verde, proteína BCI; violeta, proteína BR1.

VII.vii- Evaluación funcional de los vectores de expresión generados.

Una parte de los vectores de expresión construidos en la etapa previa fueron examinados en experimentos de expresión transitoria, utilizando el sistema de bombardeo de tejidos vegetales con micropartículas. Los experimentos se realizaron bombardeando hojas jóvenes de plantas de chícharo (*Pisum sativum*) y de tabaco cultivadas en cámaras de ambiente controlado. Luego de varios intentos, sólo logró observarse actividad de GUS (puntos azules) en el caso de un vector con el promotor Rep del virus de *Datura* controlando al gen reportero (Figura 13), pero el resto de las construcciones examinadas, incluyendo un control 35S-GUS, no produjeron ningún punto azul en varios ensayos. Aunque la explicación más plausible de estos resultados era un funcionamiento deficiente del equipo de bombardeo utilizado (de reciente adquisición, y en el que existe un problema en el sistema de vacío) y/o falta de experiencia en los experimentos de biobalística, otra posibilidad era que, no obstante que los datos de secuenciación mostraban que los genes CP, Rep, BC1 y BV1 estaban en fase con GUS en todos los vectores, esto no fuese realmente así.

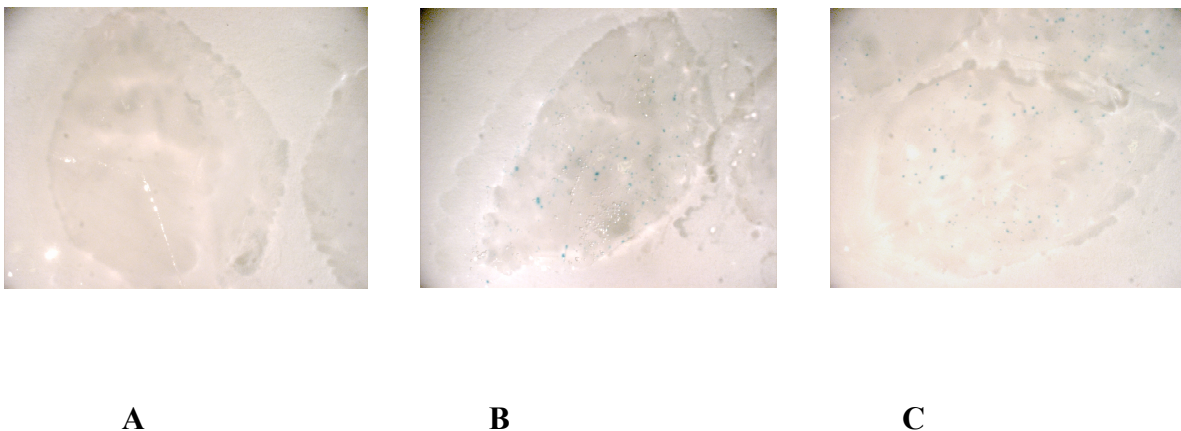


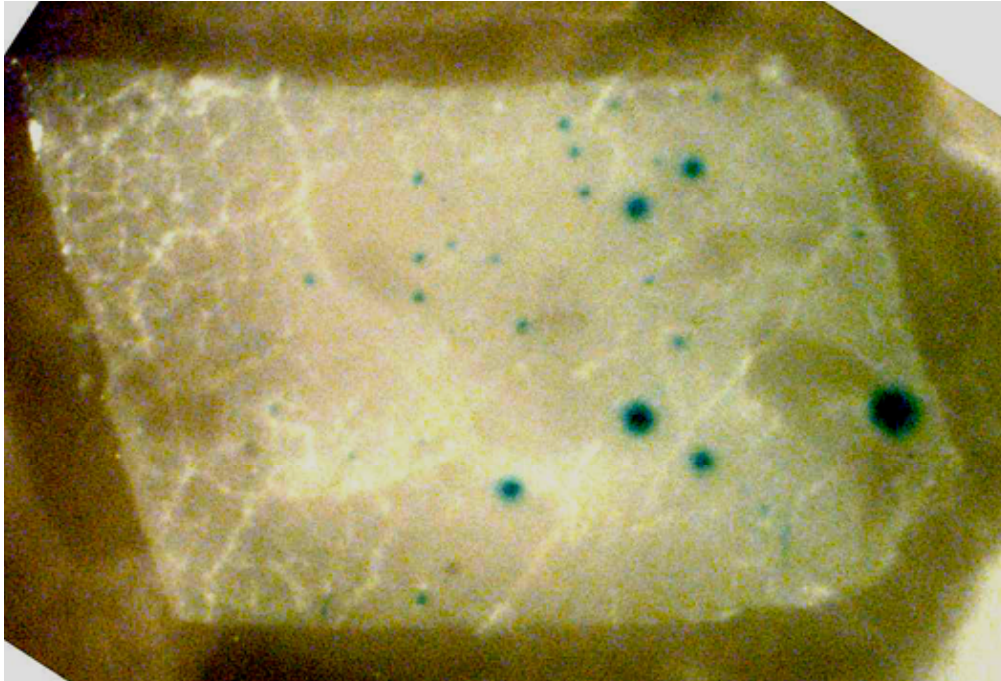
Figura. 13. Tinción histoquímica para la expresión de β -glucoronidasa en hojas de tabaco. A control negativo, B y C bombardeo con el vector Rep-Datura.

A fin de superar estos problemas, se realizó un experimento de biobalística en otra institución (CINVESTAV, Unidad de Biotecnología de Plantas, en Irapuato, Gto.) con la

asesoría técnica de la I.A. Rosa María Adame. Esta vez los resultados fueron como se esperaban: los vectores con promotores Rep y CP dieron actividad de GUS en un rango de niveles que iban de lo apenas detectable a muy fuerte. Destacaron por su fuerte actividad los vectores con promotores Rep derivados de los virus de *Ipomoea* y de *Datura*, ambos solo parcialmente caracterizados al presente. Los promotores Rep del virus del Frijol 1-11, que es una variante de PHV adaptada a leguminosas, del virus del tomate Sinaloa 22, y del virus africano del mosaico de la yuca (ACMV), dieron una actividad significativa que fue sin embargo de 4 a 6 veces menor que la exhibida por los promotores homólogos de los virus de *Datura* e *Ipomoea*. Por otra parte, los promotores CP de diferentes virus mostraron actividades de moderadas a muy débiles (en ausencia de TrAP), lo que es consistente con lo reportado para otros begomovirus del NM. La asimetría en la actividad de los promotores Rep y CP de un mismo virus es muy notoria en el caso del virus de *Datura*, y aún más en el caso del virus de *Ipomoea*, lo cual resulta sorprendente tomando en cuenta que los vectores de expresión correspondientes contienen exactamente la misma secuencia viral, pero en orientaciones opuestas. Eso pone en evidencia que muchos de los elementos reguladores presentes en la RI de los begomovirus poseen actividad dependiente de la orientación.

Como era de esperarse, el vector pBS-X-GUS, carente de promotor, no mostró actividad alguna del gen reportero en este experimento. Por omisión involuntaria, no se incluyó un control positivo tal como podría serlo un vector de expresión 35S-GUS, lo que permitiría establecer una escala relativa de actividad promotora con un referente bien caracterizado. Sin embargo, eso podrá subsanarse fácilmente en experimentos futuros.

A)



B)

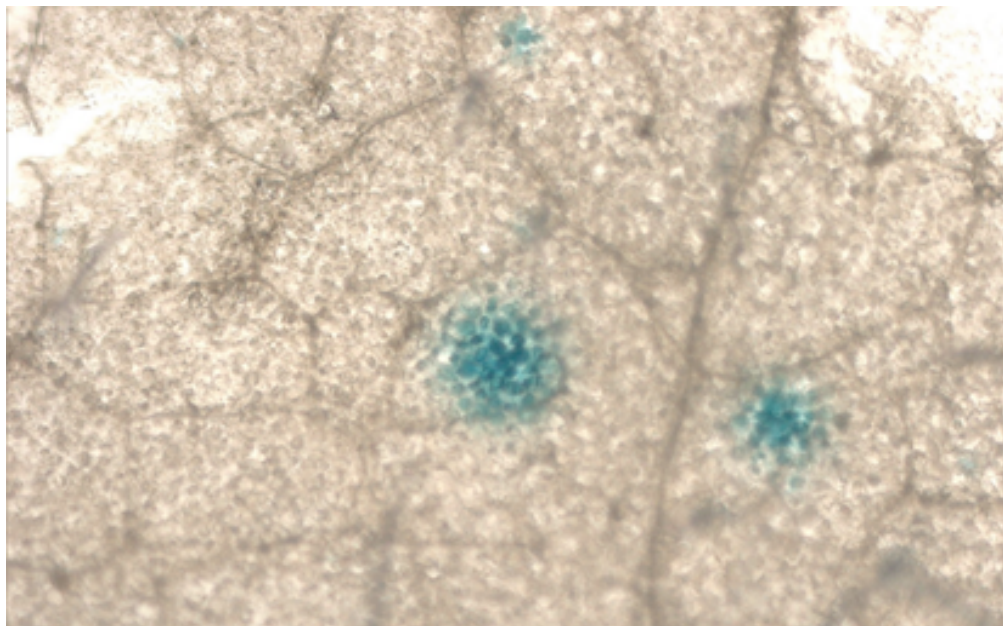


Figura 14. Actividad de GUS bajo el promotor del geminivirus Ipomoea. A) Fragmentos de hojas de plantas de tabaco fueron bombardeadas con DNA de promotores del geminivirus Ipomoea. B) Detalle de los puntos de actividad de GUS en las hojas de tabaco.

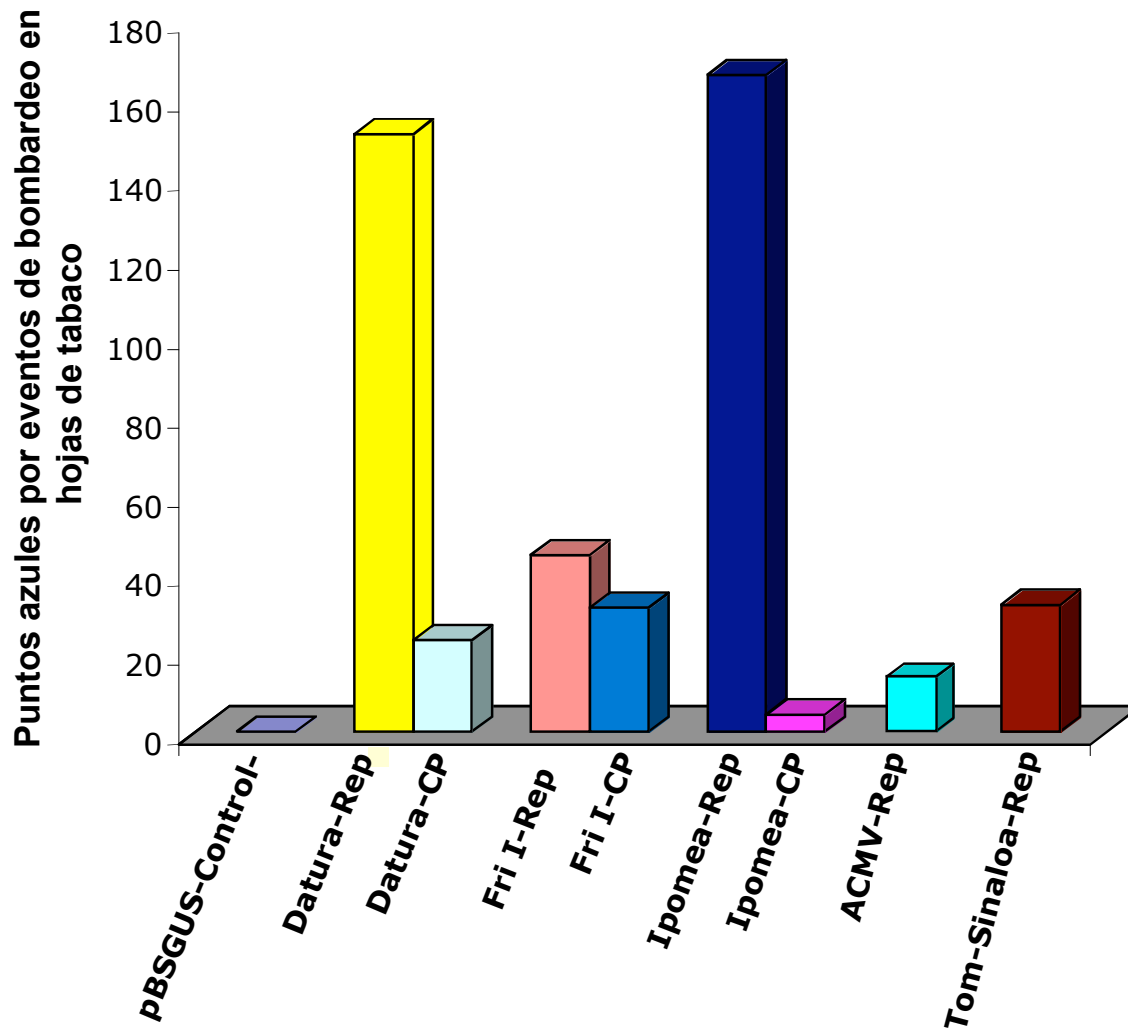


Figura 15. Análisis de la actividad de promotores de begomovirus. Los promotores de varios geminivirus fusionados al gen que codifica para la β -glucoronidasa fueron bombardeados a hojas de tabaco. Se contaron los puntos azules generados por la actividad de la β -glucoronidasa para determinar de la actividad de los diferentes promotores.

VIII. Discusión

Los geminivirus han despertado gran interés entre los biotecnólogos de plantas por constituir una fuente potencial muy rica de secuencias reguladoras (promotores divergentes, terminadores bidireccionales, silenciadores, etc.) para la ingeniería genética de plantas (Timmermans y cols., 1994). El interés ha crecido a raíz del descubrimiento de un promotor geminiviral que es 3 a 5 veces más potente que el promotor 35S de CaMV (Xie y col., 2003), el cual ha sido por casi dos décadas el promotor constitutivo por excelencia en la biotecnología vegetal. Por esas y otras razones, el desarrollo de métodos moleculares para la generación y evaluación rápida de promotores derivados de este extenso grupo de virus constituye una interesante e importante área de investigación.

En el presente trabajo nosotros desarrollamos con éxito un nuevo procedimiento para construir vectores de expresión con promotores derivados de begomovirus (geminivirus transmitidos por la mosquita blanca) que utiliza muy pocos elementos y consume un mínimo de tiempo y trabajo técnico, en comparación a los procedimientos utilizados convencionalmente. Diseñamos cinco nuevos iniciadores degenerados cuyas combinaciones hacen factible la amplificación de la región intergénica de los genomas A y B de la mayoría de las más de 100 especies de begomovirus conocidas al presente. Nosotros hemos probado la funcionalidad de los iniciadores para la RI del genoma A con cerca de 20 especies virales de las que tenemos genomas completos o parciales en nuestro laboratorio, incluídos dos virus del Viejo Mundo, TYLCV (Israel) y ACMV (Nigeria). Los iniciadores para amplificar la RI de genomas B no han sido hasta ahora probados en gran extensión, pero es previsible que funcionarán eficientemente, al menos para amplificar los DNAs B de los begomovirus del continente americano. En el laboratorio de Biología Molecular de Plantas del IPICYT se ha reunido una colección de genomas B completos o parciales correspondientes a cerca de una docena de begomovirus, lo que constituye material suficiente para examinar la idoneidad de los iniciadores diseñados en este estudio, para la generación de vectores de expresión con promotores BC1 y BV1.

El método desarrollado nos permitió generar 22 vectores de expresión con promotores begomovirales, lo cual es una evidencia muy clara de que funciona mejor que los procedimientos usualmente seguidos para construir vectores análogos, que se basan en el uso de sitios de restricción naturales o artificialmente creados, o bien en el diseño y uso de

iniciadores específicos. Sin embargo, en el curso de nuestro trabajo enfrentamos ciertas dificultades que nos permiten visualizar algunas mejoras al método. Por ejemplo, se podría sustituir el vector pBS-X-GUS con un vector pKS19-X-GUS, muy fácil de construir, a fin de evitar el paso intermedio de subclonación de los productos de PCR en pKS-19, que se llevó a cabo en vista de los problemas planteados por la contaminación del DNA viral amplificado con los plásmidos utilizados como plantillas en la reacción de PCR. Otras posibles mejoras al método incluyen el uso de vectores con el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) como reportero, y la generación de vectores binarios en los que sea factible la clonación directa de los PCRs derivados de virus para crear vectores de expresión que pueden ser utilizados en la evaluación funcional rápida de los promotores virales por el método de Agroinfiltración, más económico que el método biolístico, y que pueden ser utilizados también, en el caso de que el promotor muestre propiedades interesantes en la primera evaluación, para generar plantas transgénicas en las que pueda realizarse una evaluación más completa de las propiedades reguladoras de las secuencias virales.

La evaluación funcional de los vectores de expresión generados no pudo realizarse en la extensión y el nivel de detalle que era posible y deseable hacer, por obstáculos técnicos que pudieron resolverse apenas recientemente. Sin embargo, esos experimentos podrán efectuarse de aquí en adelante de una manera sencilla y rápida, pues se lograron ya establecer las condiciones experimentales y los protocolos apropiados. No obstante lo limitado de los datos funcionales recabados hasta el momento, nuestro estudio llevó al hallazgo de dos promotores especialmente potentes, que provienen de dos begomovirus cuya secuencia completa no se conoce todavía. Uno de ellos, aislado originalmente de okra (una planta comestible de origen africano y cultivada en nuestro país desde hace algunas décadas) y transferida experimentalmente a *Datura stramonium*, de la que se amplificó la secuencia viral utilizada en este estudio, parece corresponder a una nueva especie aislada en el Estado de Guerrero y cuya secuencia ha sido depositada recientemente en el GenBank, denominada de modo provisional *Okra yellow mosaic Iguala virus* (Valadez-Moctezuma y col., 2005, sin publicar). El otro begomovirus proviene de un extracto de una maleza identificada sólo al nivel de género, *Ipomoea sp.*, colectada en Yucatán en 1999, y de la cual se amplificó y clonó un fragmento de 600 pb, que incluye a la RI del virus (Rivera-Bustamante, com. personal). El extracto se perdió luego, de tal

modo que no fue posible caracterizar otras regiones genómicas del virus, que parece sin embargo representar una especie diferente a todas las conocidas al presente, según se infiere de ciertas características únicas de su RI (secuencia peculiar de sus iterones, presencia de elementos CLE/ cajaG sobrelapantes, no encontrados en otros virus, etc.) y los 70 codones del gen CP que están secuenciados. Aunque no fue posible en esta ocasión establecer una comparación directa de la actividad de estos promotores con el promotor 35S de CaMV, es posible no obstante compararle con otros promotores begomovirales bien caracterizados, como los de PHV. Desde esta perspectiva, se puede establecer la conclusión provisional de que los promotores *Rep* de los virus de *Ipomoea* y *Datura* son, al menos, 4 veces más potentes que los de un begomovirus como PHV, en este tipo de ensayos funcionales. Por lo tanto, está plenamente justificado recomendar la exploración en mayor extensión y profundidad del potencial biotecnológico de estos dos nuevos promotores, para lo cual resulta pertinente generar plantas transgénicas con los cartuchos de expresión que hemos obtenido. Este proceso se iniciará pronto en colaboración con el laboratorio del Dr. Rafael Rivera-Bustamante, del CINVESTAV.

En resumen, en este trabajo se desarrolló un método sencillo y poderoso para examinar las propiedades reguladoras de promotores de begomovirus, que puede utilizarse incluso con virus cuya secuencia genómica completa no se conoce, y que es aplicable a todos los miembros de este grupo viral sin importar su origen geográfico y las plantas que infectan.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Accotto, G.P., Mullineaux, P.M., Brown, S.C., Marie, D. (1993). Digitaria streak geminivirus replicative forms are abundant in S-phase nuclei of infected cells. *Virology* **195**, 257-259.
2. Argüello-Astorga, G.R., Guevara-González, R.G., Herrera-Estrella, L.R. and Rivera-Bustamante, R.F. (1994). Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology Journal* **203**, 90-100.
3. Biorad (1991). Instruction manual for biolistic pds-1000/he microprojectile delivery system. Biorad, Richmond, CA.
4. Birnboim, H.C. y Doli, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513.
5. Boulton, M.I., Steinkellner, H., Donson, J., Markham, P.G., King D.I. and Davis, J.W. (1989). Mutational analysis of the virion sense of maize streak virus. *Journal of General Virology* **70**, 2309-2323.
6. Brough, C.L., Hayes, R.J., Morgan, A.J., Coutts, R.H.A. and Buck, K.W. (1988). Effects of mutagenesis in vitro on the ability of cloned tomato golden mosaic virus DNA to infect *Nicotiana benthamiana* plants. *Journal of Gen. Virology* **69(3)**, 503-514.
7. Brunetti, A., Tavazza, R., Noris, E., Lucioli, A., Accotto, G.P., Tavazza, M. (2001). Transgenically expressed T-Rep of tomato yellow leaf curl Sardinia virus acts as a trans-dominant-negative mutant, inhibiting viral transcription and replication. *Journal Virology* **75(22)**, 10573-81.
8. Cabrera-Ponce, J.L., López, L., Assad-García, N., Medina-Arevalo, C., Bailey-Moreno A.M. y Herrera-Estrella, L. (1997). An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Cell Rep* **16**, 255-260.
9. Crisanto Gutierrez. (2000). DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminivirus. *The EMBO Journal* **19-5**, 792-799.
10. Crisanto Gutierrez. (2002). Strategies for geminivirus replication and cell cycle interference. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **60**, 219-230.
11. Daniell, Oscar N. Ruiz and Amit Dhingra. *Methods in Molecular Biology* **286**: Transgenic Plants: Methods and Protocols.

12. Davis, J.W. y Stanley, J. (1989). Geminivirus genes and vectors. *Trends in Genetics* **5**, 77-81.
13. Eagle, P.A., Orozco, B.M. y Hanley-Bowdoin, L. (1994). A DNA sequence required for Geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. *The Plant Cell* **6**, 1157-1170.
14. Eagle, P.A. y Hanley-Bowdoin, L. (1997). *cis* Elements that contribute to Geminivirus transcriptional regulation and the efficiency of DNA replication. *Journal of Virology* **Sept.** 6947-6955.
15. Egelkrout, E., L. Mariconti, R. Cella, D. Robertson, and L. Hanley-Bowdoin. 2002. The activity of the proliferating cell nuclear antigen promoter is differentially regulated by two E2F elements during plant development. *Plant Cell* **14**, 3225-3236.
16. Egelkrout, E., M., Robertson, D. and Hanley-Bowdoin, L. 2001. Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. *Plant Cell* **13**, 1437-1452.
17. Elmer J.S., Brand, L., Sunter, G., Gardiner, W.E., Bizarro, D.M. and Rogers, S.G. (1988). Genetic analysis of tomato golden mosaic virus. II. Requirement for the product of the highly conserved AL1 coding sequence for replication. *Nucleic Acids Research* **16**, 7043-7060.
18. Fenoll, C., Black, D.M. and Howell, S.H. (1998). The intergenic region of maize streak virus contains promoter elements involved in rightward transcription of the viral genome. *EMBO Journal* **7**, 1589
19. Fontes E.P.B., Luckow V.A., Hanley-Bowdoin, L. 1992. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell* **4**, 597-608
20. Frey, P.M., Schärer, N.G., Fütterer, J., Potrykus, I., y Puonti, J. 2001. Simultaneous analysis of the bidirectional African Cassava Mosaic Virus promoter activity using two different luciferase genes. *Virus Genes* **22:2**, 231-242
21. Gary Sunter and David M. Bisaro. (2003). Identification of a minimal sequence required for activation of the tomato golden mosaic virus coat protein promoter in protoplasts. *Virology* **305**, 452-462.
22. Gröning, B.R., Hayes, R.J., and Buck, K.W. (1994). Simultaneous regulation of tomato golden mosaic virus coat protein and AL1 gene expression: Expression of the AL4 gene may contribute to suppression of the AL1 gene. *Journal of Gen. Virology* **75**, 721-726.
23. Haley, A., Zhan, X., Richardson, K., Head, K., and Morris, B. (1992). Regulation of the activities of african cassava mosaic virus promoters by the AC1, AC2, and AC3 gene products. *Virology* **18**, 905-909.

24. Hanley Bowdoin, L., Settlege, S.B., Orozco, B.M. Nagar, S., and Robertson, D. (1999). Geminivirus: Models of plant replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Plant Science* **18(1)**, 71-106.
25. Heyraud, F., Schumacher, S., Laufs, J., Schaefer, S., Schell, J., and Gronenborn, B.(1995). Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. *Nucleic Acids Research* **23**, 910-916.
26. Heyraud, F., Matzeit, V., Kammann, M., Schaefer, S., Schell, J. and Gronenborn, B. (1993). Identification of the initiation sequence for viral-strand DNA synthesis of wheat dwarf virus. *EMBO Journal* **12**, 4445-4452.
27. Jeff Velten, Kevin, J. Morey, Christopher I. Cazonelli. (2005). Plant viral intergenic DNA sequence repeats with transcription enhancing activity. *Virology Journal* **2**, 16-26.
28. Jefferson, R.A., Kavanagh, T. A. y Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* **6**, 3901-3907.
29. Kong, L.J., Orozco, B.M., Roe, J.L., Nagar, S., Ou, S., Feiler, H.S., Durfee, T., Millar, A.B., Gruissem, W., Robertson, D. y Hanley-Bowdoin, L. 2000. A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *EMBO Journal* **19**, 3485-3495.
30. Lazarowitz, S. (1992). Geminiviruses: genome structure and gene function. Critical Review. *Plant Science* **11**, 327-349.
31. Lazarowitz, S.G., Wu, L.C., Rogers, S.G., and Elmer, J.S. (1992). Sequence-specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. *Plant Cell* **4**, 799-809.
32. Laufs J., Schumacher S., Geisler N., Jupin I., Gronenborn, B. (1995). Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. *FEBS Letters* **377**, 258-262.
33. Liu, S., Bedford, I. D., Briddon, R.W. and Markham, P.G. (1997). Efficient whitefly transmission of African cassava mosaic Geminivirus requires sequences from both genomic components. *Journal of General Virology* **78**, 1791-1794.
34. Monsalve-Fonnegra Z., Argüello-Astorga G., and Rivera Bustamante R. (2002). Geminivirus replication and gene expression. *Plant viruses as molecular pathogens*, 257-277.

35. Nagar, S., Pedersen, T.J., Carrick, K.M., Hanley-Bowodin, L., and Robertson, D. (1995). A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *The Plant Cell* **7**, 705-719.
36. Nikovics K., Simidjjeva, J., Peres A., Ayaydin, F., Pasternack, T., Davies, J.W., Boulton, M.I., Dudits, D., Horvath, G.V. (2001). Cell-cycle, phase-specific activation of Maize streak virus promoters. *Molecular Plant Microbe Interaction* **5**, 609-17.
37. Noueiry, A.O., Lucas, W.J., and Gilbertson, B. (1994). Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* **76**, 925-612.
38. Padidam, M., Maxwell, D.P., and Fauquet, C.M. (1997). A proposal for naming geminiviruses. *Virology Division News* **142(12)**, 2553-2562.
39. Palmer, K.E. and Rybicki, E.P. (1998). The Molecular Biology of Mastrevirus. *Advances in Virus Research* **50**, 183-233.
40. Polston, J.E. and Anderson, P.K. (1997). The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease* **81 (12)**, 1358-1369.
41. Potenza, C., Aleman, L., Sengupta-Gopalan, C. (2004). Targeting transgene expresión in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* **40**, 1-22.
42. Pridmore, R.D., 1987. New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* **56**, 309-312.
43. Ramos, P.L., Fuentes, A.D., Quintana, Q., Castrillo, G., Guevara-González, R.G., Peral, R., Rivera-Bustamante, R. F. and Pujol, M. (2004). Identification of a sequence required for vascular-specific activity of Tomato Mottle Taino Virus replication-associated protein promoter in transgenic plants. *Virus Research* **102**, 125-132.
44. Revington, G.N., Sunter, G. and Bisaro, D.M. (1989). DNA sequences essential for replication of the B genome component of Tomato Golden Mosaic Virus. *Plant Cell* **1**, 985-992.
45. Ruiz Mendrano, R., Guevara González, R.G., Argüello Astorga, G.R., Monsalve Fonnegra, Z., Herrera Estrella, L.R. and Rivera Bustamante, R.F. (1999). Identification of a sequence element involved in AC2-mediated transactivation of the Pepper Huasteco Virus coat protein gene. *Virology* **253**, 162-169.

46. Sanford, J.C., DeVit, M.J., Russell, J.A., Smith, F.D., Harpending, P.R., Roy, M.K. and Johnston, S.A. (1991). An improved helium-driven biolistic device. *Technique* **3**, 3-16.
47. Saunders, K., Lucy, A., and Stanley, J. (1992). RNA-primed complementary-sense DNA synthesis of the geminivirus African cassava mosaic virus. *Nucleic Acids Research* **20**, 6311-6315.
48. Settlage, S.B., Miller, A.B., Gruissem, W. and Hanley-Bowdoin, L. (2001). Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. *Virology* **279**, 570-576.
49. Stanley, J. (1991). The Molecular determinants of Geminivirus pathogenesis. *Semin. Virology* **2**, 139-149.
50. Stanley, J. and Gay, M.R. (1983). Nucleotide sequence of cassava latent virus DNA. *Nature* **301**, 260-262.
51. Stanley, J. (1995). Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology* **206**, 707-712.
52. Stenger, D.C., Revington, G.N., Stevenson, M.C. and Bisaro, D.M. (1991). Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: Evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **88**, 8029-8033.
53. Sunter, G. and Bisaro, D.M. (1991). Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. *Virology* **180**, 416-419.
54. Sunter, G. and Bisaro, D.M. (1992). Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell* **4**, 1321-1331.
55. Sunter, G. and Bisaro, D.M. (1997). Regulation of a geminivirus coat protein promoter by AL2 protein (TrAP): evidence for activation and derepression mechanisms. *Virology* **232**, 269-280.
56. Sunter, G. y Bisaro, D. M. (2003). Identification of a minimal sequence required for activation of the Tomato Golden Mosaic Virus coat protein promoter in protoplasts. *Virology* **305**, 452-462.
57. Timmermans, M.C.P., Das, O.P. and Messing, J. (1994). Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. *Annual Review of Plant Physiology* **45**, 79-112.
58. Townsend, R., Watts, J., and Stanley, J. (1986). *Nucleic Acids Research* **14**, 1253-1265.

59. Van Regenmortel, M.H., Mayo, M.A., Fauquet, C.M. and Maniloff, J. (2000). Virus nomenclature: Consensus versus chaos. *Archives of Virology* **145**, 2227-2232.
60. Velten, J., Morey K.J. and Cazzonelli C.I. (2005). Plant viral intergenic DNA sequence repeats with transcription enhancing activity. *Virology Journal*. **2:16**
61. Yingqiu Xie, Yule Liu, Meng Meng, Lei Chen and Zhen Zhu. (2003). Isolation and identification of a super plant promoter from Cotton Leaf Curl Multan Virus. *Plant Molecular Biology* **53**, 1-14.
62. Zhan, X., Richardson, K.A., Haley, A., and Morris, B.A. (1993). The activity of the coat protein promoter of chlorosis striate mosaic virus is enhanced by its own and C1-C2 gene products. *Virology* **193**, 498-500.