

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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

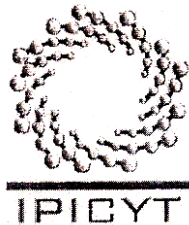
**Evolución forzada de geminivirus: inestabilidad  
de mutaciones en la hélice-4 del dominio de  
unión a Retinoblastoma de la proteína Rep**

Tesis que presenta  
**Josefat Gregorio Jorge**

Para obtener el grado de  
**Doctor en Ciencias en Biología Molecular**

Director de la Tesis:  
**Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga**

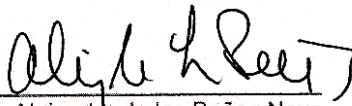
San Luis Potosí, S.L.P., 21 de enero de 2011

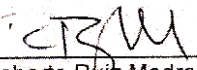


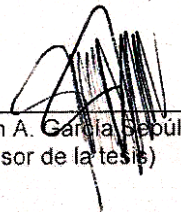
### Constancia de aprobación de la tesis

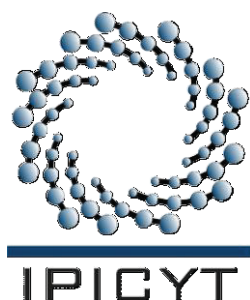
La tesis "Evolución forzada de geminivirus: inestabilidad de mutaciones en la hélice-4 del dominio de unión a Retinoblastoma de la proteína Rep" presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Josefat Gregorio Jorge** y aprobada el **11 de enero de 2011** 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  
(Director de la tesis)

  
Dr. Alejandro de las Peñas Nava  
(Asesor de la tesis)

  
Dr. Roberto Ruiz Medrano  
(Asesor de la tesis)

  
Dr. Christian A. García Sepúlveda  
(Asesor de la tesis)

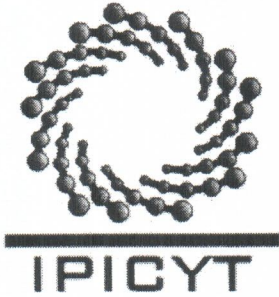


## **Créditos Institucionales**

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

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 192571) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Los proyectos de investigación descritos en esta Tesis fueron financiados con recursos otorgados al Dr. Gerardo Argüello Astorga por el CONACYT (Proyectos SEP 42639-Q y 84004).



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

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 030 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 21 días del mes de enero del año 2011, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Christian Alberto García Sepúlveda</b>	<b>Presidente</b>	<b>UASLP</b>
<b>Dr. Alejandro De Las Peñas Nava</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Roberto Ruiz Medrano</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>CINVESTAV</b>

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

**DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó el C.

**Josefat Gregorio Jorge**

sobre la Tesis intitulada:

*Evolución forzada de geminivirus: inestabilidad de mutaciones en la hélice- 4 del dominio de unión a Retinoblastoma de la proteína Rep*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 14:15 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 21 días del mes de enero de 2011.

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares





## Dedicatorias

A las personas más importantes de mi vida:

- A Candy Yuriria Ramírez Zavaleta, una persona especial (mi soporte y mi fuerza) que me ha brindado su confianza infinita y me ha enseñado a ver el mundo de una forma diferente.
- A mi familia que tuve que dejar (tan sólo en la distancia, nunca en mi corazón y mis pensamientos), para perseguir un sueño.

A ellos les dedico este pequeño triunfo efímero.

## Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento:

- A mi Director de Tesis, Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga, por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación y quien despertó en mí, el arte de la reflexión y el porqué de las cosas.
- Al Dr. Rafael Rivera Bustamante y la Dra. Jimena Carrillo Tripp, por colaborar tan estrechamente con el desarrollo de esta Tesis y también por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo.
- De igual manera mi más sincero agradecimiento a los Dres. Alejandro De las Peñas Nava, Christian García Sepúlveda y Roberto Ruiz Medrano, por sus apreciados y relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias para la mejora del presente escrito.
- Al Dr. Alejandro De Las Peñas Nava y a la Dra. Irene Castaño Navarro, les agradezco por su permanente disposición y ayuda desinteresada que me brindaron.
- También quisiera hacer patente mi agradecimiento al Dr. Sergio Casas Flores y la Dra. Lina Raquel Riego Ruiz, por el apoyo proporcionado desde siempre y sobre todo por la gran amistad que me ofrecieron.
- Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís, por su colaboración y su generosidad científica.
- A Bernardo Bañuelos Hernández y Artemiza Bernal Alcocer, por su invaluable apoyo en la sección experimental.
- A Mariana Cantú Iris y Aurora Londoño, por su calidez, compañerismo y por compartir inquietudes, éxitos y fracasos. En general, a mis amigos del IPICYT (Mayté, Alex, Edith, Yair, etc.), por su continuo y afectuoso aliento.
- Al Biol. Salvador Ambríz Granados y la Sra. Rosy, por todos los servicios técnicos prestados durante la realización de los experimentos.
- En especial a Candy Yuriria Ramírez Zavaleta, por su presencia incondicional y por enseñarme a enfrentar los obstáculos con alegría.

*Evolution proceeds like a tinkerer who, during millions of years, has slowly modified his products, retouching, cutting, lengthening, using all opportunities to transform and create.*

F. Jacob, *"The Possible and the Actual"*

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Contenido	viii
Lista de tablas	xii
Lista de figuras	xiii
Abreviaturas	xv
Prefacio	xvii
Resumen	xviii
Abstract	xx

## **PARTE I.- Evolución forzada de geminivirus: inestabilidad de mutaciones en la hélice 4 del dominio de unión a Retinoblastoma de la proteína Rep.**

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
El descubrimiento de los virus: un poco de historia	1
La importancia de los virus y el papel de la evolución	1
Los virus de plantas	3
La familia <i>Geminiviridae</i> y su clasificación	4
Organización genómica de los begomovirus bipartitas	6
La replicación de los geminivirus: el papel de la proteína de replicación (Rep)	8
Participación de Rep en la interferencia del Ciclo Celular de la planta	10
El impacto de los begomovirus en la agricultura: la recombinación y la pseudorecombinación como motores de la evolución	12
Begomovirus de importancia económica en México	13
Antecedentes directos del trabajo	15

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	18
MATERIALES Y REACTIVOS	18
Begomovirus utilizados	18
Especies vegetales utilizadas	18
Cepas bacterianas y plásmidos	19
Enzimas y kits comerciales: generalidades	19
Reactivos	19
<b>MÉTODOS</b>	19
Clonación y manipulación genética: generalidades	19
Obtención de DNA plasmídico	20
Construcción de vectores virales: estrategia general	20
Mutagénesis del residuo conservado de la hélice 4 de Rep	22
Mutagénesis del residuo L145 de PepGMV	24
Mutagénesis del residuo L147 de PHYVV	25
Mutagénesis del residuo M147 de ToMoTV	25
Ensayos de infectividad con los vectores virales silvestres y mutantes	26
Extracción de DNA total de plantas	27
Amplificación por PCR y secuenciación	27
Southern blot	28
<b>RESULTADOS</b>	29
Infección de Chile y <i>N. benthamiana</i> con PepGMV	30
El efecto de las mutaciones en la infectividad de PepGMV	32
A. La mutación L145V no afecta dramáticamente la infectividad de PepGMV	32
B. La mutación L145A no causa síntomas visibles, pero hay replicación viral	34
C. La mutación L145T en PeGMV es inestable y revierte durante el curso de la infección	36
D. El efecto deletéreo de L145T es suprimido por mutaciones	



compensatorias	39
PHYVV causa síntomas característicos en ambas especies de plantas	41
El efecto de las mutaciones L147V, L147A y L147T en PHYVV	42
A. PHYVV L147V causa síntomas similares al virus silvestre	43
B. La mutación L147A afecta la replicación de PHYVV	44
C. Reversión fenotípica de las plantas inoculadas con PHYVV L147T	44
El virus ToMoTV solo infecta <i>N. benthamiana</i>	48
A. Las mutaciones M147A y M147T no causan síntomas visibles en <i>N. benthamiana</i>	49
B. La mutación M147V de ToMoTV es inestable y revierte a la secuencia silvestre	51
<b>DISCUSIÓN</b>	52
La inestabilidad de mutaciones en el residuo conservado (Leu/Met) de la hélice-4 de Rep y el papel del contexto genético	52
El potencial evolutivo de los geminivirus y los probables factores que lo causan	57
Las mutaciones deletéreas y el probable papel del tamaño de la población viral	60
Las mutaciones compensatorias: ¿Delimitación de un dominio funcional?	63
La co-evolución de aminoácidos en la proteína Rep: Implicaciones en la evolución de proteínas	66
<b>CONCLUSIONES</b>	70
<b>REFERENCIAS I</b>	71
<b>ANEXOS</b>	83
<b>APÉNDICES</b>	95

<b>PARTE II.- Caracterización de una nueva cepa de <i>Euphorbia mosaic virus</i> y descubrimiento de un linaje viral que contiene un presunto microRNA para regular al gen <i>Rep</i>.</b>	101
<b>RESUMEN</b>	101
<b>INTRODUCCIÓN</b>	102
<b>ARTÍCULO</b>	105
<b>DATOS ADICIONALES</b>	119
<b>REFERENCIAS II</b>	121

## Lista de tablas

Tabla 1. Genes codificados por los begomovirus bipartitas	8
Tabla 2. Begomovirus bipartitas utilizados	18
Tabla 3. Vectores virales silvestres	22
<b>Tablas en Anexos</b>	
Tabla M1. Oligonucleótidos mutagénicos	83
Tabla M2. Vectores virales mutantes	84
Tabla M3. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen <i>Rep</i>	84
Tabla R1: Resumen de genotipos aislados en plantas de <i>C. annuum</i> inoculadas con PepGMV-L145T	88
Tabla R2: Genotipos identificados en cada planta de <i>C. annuum</i> inoculada con PepGMV-L145T	89
Tabla R3: Resumen de genotipos aislados en plantas de <i>N. benthamiana</i> inoculadas con PepGMV-L145T	90
Tabla R4: Genotipos identificados en cada planta de <i>N. benthamiana</i> inoculada con PepGMV-L145T	91
Tabla R5: Genotipos identificados en plantas de <i>C. annuum</i> inoculadas con PHYVV-L147T	92
Tabla R6: Genotipos identificados en cada planta de <i>C. annuum</i> inoculada con PHYVV-L147T	92
Tabla R7: Genotipos identificados en plantas de <i>N. benthamiana</i> inoculadas con PHYVV-L147T	93
Tabla R8: Genotipos identificados en cada planta de <i>N. benthamiana</i> inoculada con PHYVV-L147T	93
Tabla R9. Inoculación de plantas de <i>C. annuum</i> y <i>N. benthamiana</i> con los virus revertantes de PepGMV ([T145I], [V136I:L145T], [V136L:L145T], [I167L:L145T] y [K125E:V136I:L145T])	94

## Lista de figuras

Figura 1. Clasificación de la familia <i>Geminiviridae</i>	5
Figura 2. Begomovirus bipartitas	7
Figura 3. Replicación de los geminivirus por RCR y modulación del Ciclo Celular	11
Figura 4. Inestabilidad de mutaciones en el residuo L148 de la proteína Rep de TGMV	16
Figura 5. Vector viral del componente A de PepGMV	21
Figura 6. Estrategia general de la mutagénesis dirigida	23
Figura 7. Mutaciones de la proteína Rep	26
Figura 8. Estructura de los vectores virales infecciosos de PepGMV, PHYVV y ToMoTV	29
Figura 9. Infectividad de PepGMV-WT (pPep1.19A y pPep1.32B)	31
Figura 10. Síntomas causados por PepGMV-L145V	33
Figura 11. Diferencias en la severidad de los síntomas causados por PepGMV-WT, PepGMV-L145A y PepGMV-L145T a los 37-dpi	35
Figura 12. La cinética de aparición de síntomas en plantas inoculadas con PepGMV-L145T es diferente a la del virus silvestre	37
Figura 13. La acumulación viral de PepGMV-L145T inicia en etapas tardías	39
Figura 14. Infectividad de los virus revertantes de PepGMV con mutaciones compensatorias	40
Figura 15. Infectividad de PHYVV-WT (pPHY1.38A y pPHY1.42B)	42
Figura 16. La sintomatología causada por PHYVV-L147V es similar a la de PHYVV-WT	43
Figura 17. Fenotipo de plantas de <i>C. annuum</i> inoculadas con PHYVV-L147A y PHYVV-L147T	45
Figura 18. PHYVV-L147T revierte fenotípicamente	46
Figura 19. La acumulación de DNA viral de PHYVV-L147T correlaciona con la reversión fenotípica	48

Figura 20. ToMoTV-WT solo infecta plantas de <i>N. benthamiana</i> .	49
Figura 21. La mutación M147V es inestable en plantas de <i>N. benthamiana</i> .	50
Figura 22. Efecto de las mutaciones equivalentes a L148 de TGMV en PepGMV, PHYVV y ToMoTV	54
Figura 23. Genotipos recuperados en los experimentos de evolución forzada con las mutaciones inestables	56
Figura 24. Cambios en los relieves de adaptación causados por mutaciones deletéreas	62
Figura 25. Reversiones verdaderas, reversiones funcionales y mutaciones compensatorias	65
Figura 26. Las mutaciones deletéreas afectan las propiedades intrínsecas de las proteínas	68

### **Figuras de Anexos**

Figura R1. Efecto de las mutaciones en el residuo L145 de Rep de PepGMV	85
Figura R2. Efecto de las mutaciones en el residuo L147 de Rep de PHYVV	86
Figura R3. La infección mixta entre PepGMV y PHYVV es sinérgica	87



## Abreviaturas

AbMV	Virus del mosaico del Abutilon
BDMV	Virus del mosaico y enanismo del frijol
BGVs	Begomovirus
CaLCuV	Virus del enchinamiento de la hoja de la col
CoGMV	Virus del mosaico dorado del Corchorus
CoYVV	Virus del amarillamiento de las venas del Corchorus
CP	Proteína de la cápside
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	DNA de cadena doble
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HCl	Ácido clorhídrico
HTV	Virus Habana del tomate
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Luria-Bertani
mg	Miligramos
mL	Mililitros
NaOH	Hidróxido de sodio
NbSCE1	Enzima de conjugación a SUMO de <i>Nicotiana benthamiana</i>
NM	Nuevo Mundo
nt	Nucleótido
pb	Pares de bases
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pDdD	Polimerasa dependiente de DNA
PepGMV	Virus del mosaico dorado del chile
PHYVV	Virus Huasteco del amarillamiento de las venas del chile
pRBR	Proteína relacionada a retinoblastoma
pRdR	Polimerasa dependiente de RNA
PYMV	Virus del mosaico amarillo de la papa

RCR	Replicación por círculo rodante
RDR	Replicación dependiente de recombinación
REn	Proteína potenciadora de la replicación
Rep	Proteína de replicación
RF-C	Factor de replicación C
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SiGMV	Virus del mosaico dorado del Sida
SLCV	Virus del enchinamiento de las hojas de la calabaza
SSC	Buffer salino de cloruro de sodio y citrato de sodio
ssDNA	DNA de cadena sencilla
TGMV	Virus del mosaico dorado del tomate
ToMoTV	Virus Taino del moteado del tomate
ToMoV	Virus del moteado del tomate
TPV	Virus Texano del chile
TrAP	Proteína transactivadora
TYLCSV	Virus Sardinia del enchinamiento amarillo de las hojas del tomate
TYLCV	Virus del enchinamiento amarillo de las hojas del tomate
μL	Microlitros
μg	Microgramos
VM	Viejo Mundo
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

## Prefacio

El presente trabajo de Tesis consta de dos partes que en apariencia no están relacionadas, pero que tienen en común el ser importantes para el amplio tema de la evolución de geminivirus, que constituye un campo de investigación de gran interés para nuestro laboratorio.

En la primera parte de este trabajo se describen los experimentos mediante los cuales examinamos el potencial evolutivo de tres geminivirus, utilizando la estrategia de “forzar” cambios genéticos en la progenie viral mediante la sustitución de un residuo altamente conservado en la proteína iniciadora de la replicación viral (Rep). Nuestros experimentos revelaron que estos virus con genomas de ssDNA poseen una extraordinaria capacidad para generar rápidamente cambios genéticos en la progenie, los cuales restablecen la habilidad para replicarse en la planta huésped y producir, consecuentemente, una infección indistinguible de la producida por los virus silvestres.

En la segunda parte de la Tesis se describe la caracterización de un nuevo geminivirus aislado de plantas de Chile, el cual mostró ser incompatible en replicación con otro virus que presumiblemente pertenece a la misma especie viral, lo que pone en cuestión el valor de ciertos criterios utilizados por los taxónomos para definir “especies” en esta gran familia de virus vegetales. Más interesante todavía fue el descubrimiento de un pequeño linaje de virus del Nuevo Mundo con características presumiblemente “ancestrales”, hallazgo que se derivó del análisis del nuevo geminivirus. Los geminivirus de ese linaje contienen, en uno de sus dos componentes genómicos, secuencias cortas que son idénticas a segmentos del gen que codifica a la proteína de replicación, el cual se localiza en el otro componente genómico viral. La evidencia sugiere que esas secuencias podrían formar parte de un sistema de microRNAs que regularía post-transcripcionalmente al gen *Rep* del virus, suposición que de ser correcta, constituiría el primer hallazgo de un mecanismo de regulación génica mediado por RNAs pequeños en virus con genomas de ssDNA.

# **PARTE I.- Evolución forzada de geminivirus: inestabilidad de mutaciones en la hélice-4 del dominio de unión a Retinoblastoma de la proteína Rep.**

## **Resumen**

En la última década varios estudios del potencial evolutivo de virus con genomas de DNA de cadena sencilla (ssDNA), como parvovirus y circovirus, han mostrado que las tasas de sustitución nucleotídica son más altas que las de virus con genomas de DNA de doble cadena (dsDNA), y en algunos casos se asemejan a las tasas de mutación observadas en virus de RNA. Los geminivirus son fitopatógenos que se encuentran distribuidos en todo el mundo y son responsables de grandes pérdidas en la agricultura. Poseen genomas de ssDNA, y al igual que los nanovirus y los circovirus, se replican por el mecanismo de Círculo Rodante (RCR). La proteína Rep de geminivirus es multifuncional y esencial para la replicación viral. En los virus TGMV y CaLCuV se ha demostrado que Rep interactúa con la proteína Retinoblastoma (pRBR), un regulador del ciclo celular en plantas, mediante un motivo de 11 aminoácidos, denominado “hélice-4”. Ciertas sustituciones en un residuo conservado (Leu), ubicado en la parte central de la hélice-4, ocasionaron un retraso en la aparición de síntomas con una frecuencia muy alta, aunque los síntomas fueron similares a los causados por el virus silvestre. El análisis de la progenie viral recuperada de esas plantas reveló la aparición de nuevos genotipos virales en el curso de la infección. La mayoría de ellos mostraron cambios en la mutación original, dando lugar a codones para Leucina (reversión directa), Metionina e Isoleucina (reversión funcional). En este trabajo hemos examinado el efecto de sustituciones equivalentes en la proteína Rep de tres begomovirus filogenéticamente distantes: el *virus del mosaico dorado del chile* (PepGMV), el *virus huasteco del amarillamiento de las venas del chile* (PHYVV) y el *virus Taino del moteado del tomate* (ToMoTV). Los ensayos de infectividad de los virus mutantes en plantas de *Capsicum annum* y *Nicotiana benthamiana* condujeron a varias conclusiones interesantes: a) el efecto de las

mutaciones en el residuo conservado de la hélice-4 depende del fondo genético viral, b) algunas mutaciones son estables y otras revierten con frecuencia inusualmente alta mediante cambios en el sitio de la mutación original, o por medio de mutaciones compensatorias en codones diferentes (mutaciones supresoras); c) las alteraciones genéticas que restauran la función de las proteínas Rep mutantes involucran solo a tres codones del gen *Rep*, y son básicamente las mismas en infecciones de chile y *N. benthamiana*, aunque su frecuencia relativa parece ser dependiente del huésped; d) las poblaciones de geminivirus presentan características de cuasi-especies, por la existencia de varios genotipos en una misma planta. En conjunto, nuestros resultados hicieron posible la delimitación de un dominio funcional de la proteína Rep que incluye a la hélice-4 y que comprende residuos entre las posiciones 125 y 167 de esa proteína, el cual parece ser crítico para preservar su función en replicación. Adicionalmente, nuestros datos sugieren que los geminivirus tienen un potencial evolutivo similar al de los virus de RNA. Este fenómeno biológico de reversión rápida de mutaciones deletéreas tiene importantes implicaciones en las estrategias de control que se utilizan actualmente para combatir a los geminivirus.



# **PART I.- Geminivirus forced evolution: instability of mutations within the helix-4 of the Retinoblastoma-binding domain of Rep**

## **Abstract**

In the last decade, several studies of the evolutionary potential of viruses with single-stranded DNA genomes (ssDNA), such as parvoviruses and circoviruses, have shown that nucleotide substitution rates are higher than those of viruses with double-stranded DNA genomes (dsDNA), and in some cases resemble the observed mutation rates in RNA viruses. Geminiviruses are plant pathogens distributed worldwide and are responsible for major losses in agriculture. They have ssDNA genomes and replicate by the rolling circle mechanism (RCR), like nanoviruses and circoviruses. The geminivirus Rep protein is a multifunctional protein which is essential for viral replication. It has been shown that Rep proteins of TGMV and CaLCuV interact with retinoblastoma protein (pRBR), a regulator of cell cycle in plants, through a motif of 11 amino acids, called “helix-4”. Certain substitutions in the conserved residue (Leu) located in the center of the helix-4, caused a delayed onset of symptoms with a very high frequency, although the symptoms were similar to those caused by the wild type virus. The analysis of the viral progeny recovered from these plants revealed the emergence of new viral genotypes in the course of infection. Most of them showed changes in the original mutation, resulting in codons for Leucine (direct reversion), Methionine and Isoleucine (functional reversion). In this study we have examined the effect of equivalent substitutions in the Rep proteins of three begomoviruses with a distant phylogenetic relationship: *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), *Pepper huasteco yellows vein virus* (PHYVV) and *Tomato mottle Taino virus* (ToMoTV). The infectivity assays with mutant viruses in *Capsicum annuum* and *Nicotiana benthamiana* plants led to several interesting conclusions: a) the effect of mutations in the conserved residue of the helix-4 depends on the viral genetic background, b) some mutations are stable whereas others are reversed with a

unusual high frequency by changing the site of the original mutation, or through compensatory mutations in different codons (suppressor mutations), c) genetic alterations that restore the function of mutant Rep proteins involved only three codons of the *Rep* gene, and are basically the same in pepper and *N. benthamiana* infections, although their relative frequency appears to be dependent on the host, d) geminiviruses populations exhibit characteristics of quasi-species nature, due to the existence of various genotypes in a single plant. Taken together, our results made possible the delineation of a functional domain of the Rep protein which includes the helix-4 and comprise residues between positions 125 and 167 of this protein, which appears to be critical to preserve its role in replication. Additionally, our data suggest that geminiviruses have a similar evolutionary potential akin to those of RNA viruses. This biological phenomenon of rapid reversion of deleterious mutations has important implications for control strategies currently used to fight geminiviruses.

## INTRODUCCIÓN

### **El descubrimiento de los virus: un poco de historia**

Los estudios de Adolf Mayer, Dimitri Iwanowski y Martinus Beijerinck a finales del siglo XIX (1879-1898) establecieron que la enfermedad del mosaico del tabaco era causada por un nuevo agente etiológico. Con las técnicas de la época, este nuevo agente infeccioso era filtrable y no correspondía a la dimensión de las bacterias (*contagium vivum fixum*), por lo que Beijerinck denominó a este nuevo agente causal como "*contagium vivum fluidum*"; acontecimiento que marcó el inicio de la virología (Bos, 1995; Zaitlin, 1998). En los siguientes 50 años no se tendría una definición precisa de estos patógenos submicroscópicos, ya que se les conocía simplemente como "agentes infecciosos filtrables". No obstante, los trabajos de Stanley, Luria, Delbrück, Lwoff, entre otros, establecerían la naturaleza de estos agentes infecciosos y sentarían las bases de la virología moderna a mediados del siglo XX.

Para los propósitos de esta Tesis, la definición dada por Hull (2002) parece ser la más adecuada: "*un virus está compuesto de una o más moléculas de ácidos nucleicos (DNA o RNA) que son encapsidados por proteínas o lipoproteínas y que son capaces de replicarse en células huésped permisibles*".

Actualmente, de acuerdo al Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), los virus conocidos se clasifican en 6 órdenes, 87 familias, 348 géneros y 2288 especies (<http://www.ictvonline.org/virusTaxInfo.asp>). Esta clasificación obedece a diversos criterios como el tipo y la naturaleza del genoma, la morfología de la partícula viral o el huésped que infectan. La clasificación también refleja las relaciones evolutivas que existen entre ellos.

### **La importancia de los virus y el papel de la evolución**

Aunque la virología se originó como una ramificación de la patología animal y vegetal, su emergencia como una ciencia biológica independiente se debe en gran parte a su importancia clínica y socio-económica. Se pueden citar al virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (HIV-1), el virus de la hepatitis C (HCV), el coronavirus responsable del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS) y el virus de la gripe aviar (IAV-H5N1) como ejemplos que preocupan actualmente a la sociedad.

Además de la importancia socio-económica, los virus son interesantes desde el punto de vista molecular, ya que tienen la capacidad para evolucionar a través de varios mecanismos como la mutación, la recombinación y el intercambio de segmentos genómicos completos. También los tiempos de generación cortos y el gran tamaño de sus poblaciones, los convierten en sistemas muy atractivos para abordarlos de manera teórica y experimental desde el punto de vista evolutivo (Holmes y Drummond, 2007).

De los mecanismos mencionados anteriormente, la recombinación y la mutación son los responsables de la elevada variabilidad genética de los virus. La recombinación es el proceso por el cual segmentos de información genética son intercambiados entre hebras de DNA de diferentes variantes genéticas durante el proceso de replicación. La recombinación tiene dos consecuencias importantes: 1) Genera combinaciones inéditas de regiones genómicas de distinto origen, y 2) Recupera genomas virales viables a partir de genomas parentales debilitados por las mutaciones puntuales (Hahn *et al.*, 1988). Por otra parte, las mutaciones surgen durante la replicación de los ácidos nucleicos; es decir, la replicación no es por completo fiel y ocasionalmente se incorpora un nucleótido (nt) incorrecto en la síntesis de la cadena nueva. En la mayoría de los casos, las mutaciones tienen un efecto deletéreo, pero permiten a nivel de especie o a nivel poblacional superar los cambios en el ambiente (Manrubia *et al.*, 2006).

Desde 1920 se habían obtenido indicios de la naturaleza heterogénea de las poblaciones virales, pero no fue sino hasta hace unos 30 años que se le dio importancia por sus implicaciones clínicas (Domingo, 2003). El fenómeno de alta heterogeneidad genómica se ha descrito principalmente para los virus de RNA, y se debe principalmente al modo de replicación; es decir, el uso de polimerasas propensas a cometer errores (RNA-polimerasas dependientes de RNA codificadas por el virus; pRdR). Se ha estimado que la tasa de mutación de los virus de RNA es del orden de  $1.5 \times 10^{-3}$  mutaciones por nucleótido, por replicación genómica (mut/nt/rep) (Drake, 1993; García-Arenal *et al.*, 2001). Algo muy diferente sucede con los virus de DNA, los cuales se replican por medio de las polimerasas de DNA dependientes de DNA (pDdD) codificadas por el hospedero. Consecuentemente, los virus de DNA muestran una alta estabilidad, ya que sus tasas de mutación son similares a las de sus

huéspedes ( $1.8 \times 10^{-8}$  mut/nt/rep) (Bernard, 1994; Drake, 1991; Drake y Hwang, 2005; Hartwell y Sharp, 2000).

El gran potencial evolutivo de los virus de RNA se debe principalmente a los eventos de mutación y selección rápida, ya que conlleva a la co-existencia de múltiples variantes en una población, es decir, un conjunto de individuos muy relacionados entre sí, pero no idénticos. A esta población viral heterogénea, se conoce con el término de *cuasi-especie* (Eigen, 1971). Así, la teoría de las cuasi-especies virales predice que un aislado viral no está constituido por una única secuencia genómica, sino que existe una nube de secuencias mutantes alrededor de una más abundante llamada secuencia maestra y que la eficacia biológica del virus (*fitness*: capacidad para generar progenie) depende de la población de mutantes o cuasi-especies, ya que ésta es la unidad sobre la que actúa la selección (Domingo y Holland 1997).

El poder evolutivo de los virus ha costado vidas humanas a lo largo de la historia. La pandemia de influenza española en 1918 (Taubenberger y Morens, 2006), así como la pandemia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Buonaguro *et al.*, 2007) y la reciente pandemia del virus A (H1N1) 2009 (Dawood *et al.*, 2009), son ejemplos claros de los alcances y las consecuencias que puede provocar la emergencia de nuevas cepas virales por los mecanismos descritos anteriormente.

### **Los virus de plantas**

Las plantas constituyen el grupo más importante de organismos autótrofos terrestres y son una fuente importante de nutrientes y de productos medicinales. Desafortunadamente, las plantas son constantemente atacadas por una variedad de patógenos, entre ellos, los virus.

Las enfermedades de plantas que ahora se sabe son causadas por virus se conocen desde tiempos tan lejanos como el año 752 DC. El poema de la emperatriz japonesa KoKen, en el que se describe el amarillamiento de las hojas de la planta *Eupatorium chilensis*, se considera una de las primeras descripciones en la literatura que documenta una enfermedad con una etiología viral (Saunders *et al.*, 2003).

Los virus de plantas presentan, en general, una alta variabilidad en su rango de huéspedes. Algunos infectan sólo una o muy pocas especies afines



(especialistas), mientras que otros virus pueden infectar a un amplio rango de huéspedes, incluso pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos (generalistas) (Futuyma *et al.*, 1988; Whithlock *et al.*, 1996). El impacto de los virus en la agricultura y la horticultura se encuentra extensamente documentado en la literatura científica, por lo que el estudio de los virus de plantas es de gran importancia para prevenir las enfermedades virales y evitar así pérdidas en la producción.

Los efectos de una infección viral en plantas van desde la ausencia aparente de síntomas hasta el deterioro severo y la muerte de la planta. Estas interacciones (compatible o incompatible) entre el virus y el huésped están gobernados por eventos moleculares (Culver y Padmanabhan, 2007). Los síntomas causados por los virus pueden apreciarse en cualquier tejido u órgano, como hojas, tallos, flores, frutos o raíces. De hecho, los nombres de los fitovirus se derivan usualmente de la sintomatología que causan en un huésped particular (Stevens *et al.*, 1983).

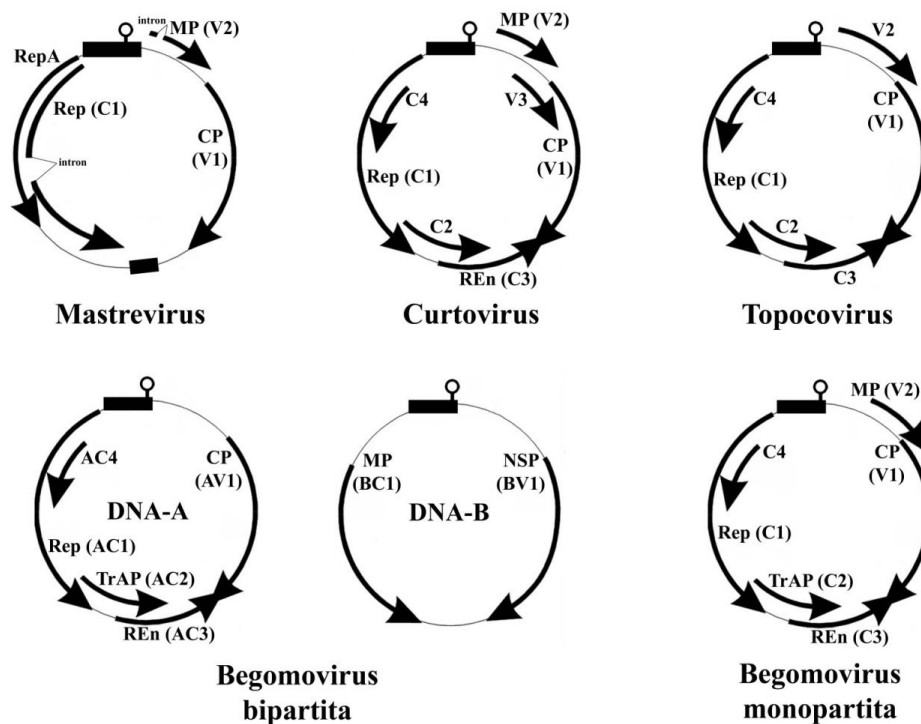
A diferencia de los virus que infectan procariotes y animales, la gran mayoría de las familias de virus que infectan plantas poseen genomas de RNA, y solo unas pocas tienen genomas de DNA. Esto sugiere la existencia de restricciones en el huésped para ser colonizados por virus con genomas de DNA. A pesar de ello, los virus de las familias *Caulimoviridae*, *Nanoviridae* y *Geminiviridae* han sido capaces de superar esas restricciones y han convivido con sus huéspedes durante millones de años (Gilbertson y Rojas, 2004). Los virus de la familia *Caulimoviridae* tienen genomas de DNA de cadena doble (dsDNA), pero se replican por intermediarios de RNA. Por otro lado, los virus de las familias *Nanoviridae* y *Geminiviridae* poseen genomas circulares pequeños de DNA de cadena sencilla (ssDNA) y se replican por un mecanismo similar al que utilizan los bacteriófagos con genomas de ssDNA.

### **La familia *Geminiviridae* y su clasificación**

Los geminivirus son fitopatógenos caracterizados por poseer genomas circulares de ssDNA de aproximadamente 2.6 a 2.8-kb, los cuales pueden ser monopartitas o bipartitas y se encuentran encapsidados en partículas virales con forma geminada (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Harrison, 1985; Stanley *et al.*, 2005). Estos virus son transmitidos por insectos vectores e infectan plantas

mono- y dicotiledóneas. Los geminivirus son responsables de enfermedades devastadoras en una gran variedad de cultivos a nivel mundial, incluyendo maíz, trigo, caña de azúcar, tomate, chile, tabaco, frijol, algodón, calabaza, betabel y yuca (Moffat *et al.*, 1999; Morales y Anderson, 2001; Varma y Malathi, 2003).

La familia *Geminiviridae* se divide actualmente en cuatro géneros: *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Topocovirus* y *Mastrevirus* (Figura 1) (Fauquet *et al.*, 2003; Fauquet y Stanley, 2005). Esta clasificación se basa en el tipo de organización genómica (mono- o bipartita, arreglo de genes, etc.), el insecto vector que los transmite y las plantas que infectan. La vasta mayoría de los geminivirus conocidos pertenecen al género *Begomovirus*, los cuales solo infectan a plantas dicotiledóneas y son transmitidos por la mosquita blanca *Bemisia tabaci* (Harrison y Robinson, 2002).



**Figura 1. Clasificación de la familia *Geminiviridae*.** Los cuatro géneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocovirus* y *Begomovirus*) en los que se clasifica la familia *Geminiviridae* son en base a la organización genómica (mono- o bipartita), así como de los vectores transmisores (*Cicadulina mbila*, *Circulifer tenellus*, *Micrutalis malleifera* y *Bemisia tabaci*) y los hospederos que infectan (mono- o dicotiledóneas). En el esquema se muestra la organización genómica de cada género. Los marcos de lectura se muestran como flechas, mientras que la región común se simboliza con un rectángulo negro. Dentro la región común se señala el origen de replicación como una estructura tallo-asa, conservada en todos los geminivirus. La nomenclatura más usada para los genes se muestra en cada marco de lectura (Rep, CP, etc.). Los nombres menos comunes en la literatura son indicados entre paréntesis.

## **Organización genómica de los begomovirus bipartitas**

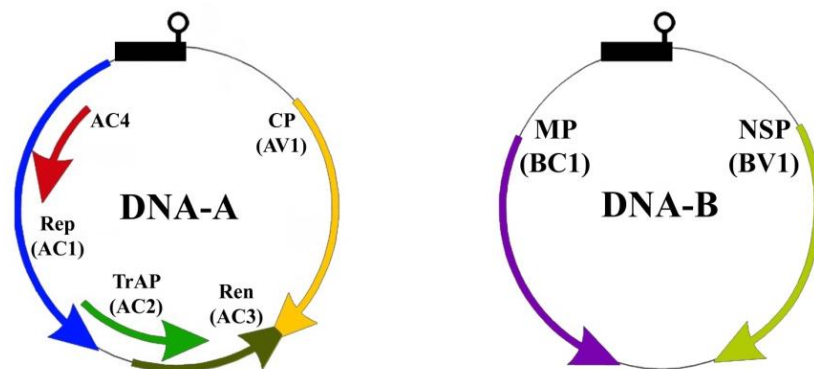
De acuerdo a la distribución geográfica y la organización genómica, los begomovirus (por simplicidad, BGVs) se clasifican en dos grandes grupos: BGVs del Viejo Mundo (Europa, África, Asia y Oceanía) y BGVs del Nuevo Mundo (América) (Padidam *et al.*, 1999; Paximadis *et al.*, 1999; Briddon *et al.*, 2010). Todos los BGVs del Nuevo Mundo (NM) tienen un genoma bipartita, mientras que los BGVs del Viejo Mundo (VM) son mono- o bipartitas (Figura 1) (Stanley *et al.*, 2005; Rojas *et al.*, 2005). Ambos componentes genómicos de los BGVs del NM (DNA-A y DNA-B) son esenciales para una infección sistémica exitosa. En contraste, se ha observado en algunos BGVs bipartitas del VM que el componente A por si solo es suficiente para producir una infección sistémica (Galvão *et al.*, 2003; Chakraborty *et al.*, 2003; Saunders *et al.*, 2002).

Los componentes genómicos de los begomovirus bipartitas tienen un tamaño de 2.6 a 2.8-kb (Figura 2A). Los genes en el componente A codifican proteínas que están involucradas en la replicación y la encapsidación, mientras que el componente B codifica para proteínas involucradas en el movimiento del virus a través de la planta y en la expresión de síntomas (Gafni y Kunik, 1997; Gafni y Epel, 2002; Lazarowitz, 1992).

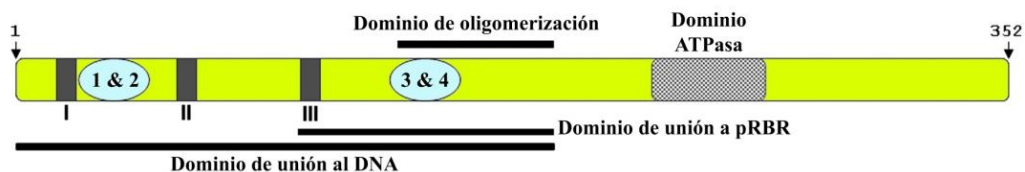
De los 5 genes presentes en el componente A, el gen que codifica la proteína de la cápside (CP) es el único transcrito en el sentido del virión. Los cuatro genes restantes (que codifican a la proteína asociada a la replicación, Rep; el transactivador viral, TrAP; la proteína potenciadora de la replicación, REn; y AC4) son transcritos en el sentido complementario (Lazarowitz, 1992; Shivaprasad *et al.*, 2005). En ambos componentes existe una región intergénica (RI) que separa a los dos grupos de genes divergentes. En esta región se encuentran los elementos importantes para la replicación y la transcripción (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Esta RI empieza en el codón de inicio del gen *Rep* y termina en el codón de inicio del gen CP. La RI no codifica ninguna proteína y su secuencia es altamente variable entre los begomovirus, a excepción de un repetido invertido conservado (rico en GC) que tiene el potencial de formar una estructura “tallo-asa” de aproximadamente 30-nt. Este elemento de horquilla presenta en su “asa” un nonanucleótido invariante (TAATATTAC) que incluye el sitio de inicio de la replicación por círculo rodante

(RCR) (Gutiérrez, 2000; Laufs *et al.*, 1995). En los begomovirus bipartitas, la RI también contiene una región casi idéntica entre los componente A y B de aproximadamente 200-nt, denominada Región Común (RC) (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Lazarowitz, 1992) La secuencia de la RC es diferente entre los distintos begomovirus y es utilizada para identificar a los componentes A y B de una misma especie. Por otra parte, el componente B codifica dos genes. El primero, denominado BV1 (o NSP, “nuclear-shuttle protein”) es transcrito en el sentido del virión; y el segundo, llamado BC1 (o MP, “movement protein”), es transcrito en el sentido complementario. La proteína NSP esta implicada en el transporte de las moléculas virales del núcleo hacia el citoplasma, mientras que la proteína MP esta involucrada en el movimiento del virus célula-célula vía plasmodesmos, y también en su movimiento sistémico (Gafni y Epel, 2002; Seal *et al.*, 2006). En la Tabla 1 se resumen las funciones de las proteínas codificadas por los begomovirus bipartitas.

A



B



**Figura 2. Begomovirus bipartitas.** A) Los componentes A y B, codifican 7 proteínas que participan en diferentes etapas del ciclo viral (temprana, intermedia y tardía). El componente A (DNA-A) codifica las proteínas implicadas en la replicación (Rep y REn), el control de la transcripción génica (Rep y TrAP) y la encapsidación (CP). En el componente B (DNA-B), las dos proteínas codificadas están involucradas en el movimiento célula-célula (NSP) y sistémico (MP). Los marcos de lectura en ambos componentes son simbolizados con flechas. La región común (rectángulo negro) y la secuencia nonanucleotídica (tallo-asa) son indicados. B) La proteína de replicación (Rep) es multifuncional y es esencial para la replicación de los geminivirus. En el esquema se muestran los dominios funcionales más importantes de la proteína. Los motivos I, II y III se señalan en rectángulos verticales, mientras que las alfas hélices predichas están representadas como óvalos. El dominio de ATPasa en la región C-terminal de la proteína se representa con un rectángulo punteado.

**Tabla 1.** Genes y proteínas codificados por los begomovirus bipartitas.

Componente	Gen	Proteína	Funciones	Referencias <sup>a</sup>
A	AV1 (AR1)	CP	Encapsida el genoma viral, participa en el importe del DNA viral al núcleo, CP participa en la acumulación de ssDNA y es responsable de la transmisión del virus que es mediada por el insecto.	2, 8
	AC1 (AL1)	Rep	Se une al DNA; posee actividad endonucleasa, ligasa, helicasa y ATPasa. Interacciona con proteínas virales (CP, REn, Rep) y del huésped (pRBR, PCNA, RF-C, NbsCE1, etc.). Funciona como factor transcripcional.	1, 4, 6, 10, 12, 16
	AC2 (AL2)	TrAP	Activador transcripcional y supresor del silenciamiento génico.	18, 20
	AC3 (AL3)	REn	Participa en la acumulación del DNA viral e interactúa con Rep y pRBR.	15, 17
	AC4	AC4	Supresor del silenciamiento génico	3, 19
B	BV1 (BR1)	NSP	Exporta el DNA viral del citoplasma al núcleo, interacciona con BC1 para el movimiento célula-célula	7, 14
	BC1 (BL1)	MP	Involucrada en el movimiento sistémico del DNA vira, modificando el plasmodesmo e induciendo la formación de estructuras tubulares para la traslocación del virus. También esta involucrada en la patogenicidad.	5, 9, 11, 13

<sup>a</sup>Referencias: Ach *et al.*, 1997<sup>1</sup>; Briddon *et al.*, 1990<sup>2</sup>; Chellappan *et al.*, 2004<sup>3</sup>; Choudhury *et al.*, 2006<sup>4</sup>; Duan *et al.*, 1997<sup>5</sup>; Fontes *et al.*, 1994<sup>6</sup>; Gafni y Epel, 2002<sup>7</sup>; Harrison *et al.*, 2002<sup>8</sup>; Hou *et al.*, 2000<sup>9</sup>; Laufs *et al.*, 1995<sup>10</sup>; Noueir *et al.*, 1994<sup>11</sup>; Orozco *et al.*, 1997<sup>12</sup>; Rojas *et al.*, 2001<sup>13</sup>; Sanderfoot *et al.*, 1996<sup>14</sup>; Settlege *et al.*, 2001<sup>15</sup>; Settlege *et al.*, 2005<sup>16</sup>; Sunter *et al.*, 1990<sup>17</sup>; Sunter *et al.*, 1994<sup>18</sup>; Vanitharani *et al.*, 2004<sup>19</sup>; Voinnet *et al.*, 1999<sup>20</sup>.

### **La replicación de los geminivirus: el papel de la proteína de replicación (Rep)**

Cuando el insecto vector (*Bemisia tabaci*) se alimenta de la savia de las plantas, los geminivirus son depositados directamente al sistema vascular. No está claro si son las partículas virales completas o solo las moléculas de ssDNA las que llegan al núcleo para replicarse. Lo que sí se sabe es que los geminivirus no codifican sus propias DNA-polimerasas, por lo que dependen por completo de la maquinaria de replicación del huésped. Una vez en el núcleo de las células permisibles, las moléculas de ssDNA son convertidas en moléculas de dsDNA. Posteriormente, las moléculas de dsDNA son

empaquetadas por los nucleosomas del huésped para formar minicromosomas (Abouzid *et al.*, 1988; Pilartz y Jeske, 1992; Pilartz y Jeske, 2003), los cuales son los moldes para la transcripción y la replicación (Figura 3A).

Todos los geminivirus se replican principalmente por el mecanismo RCR (Gutierrez, 1999; Hanley Bowdoin *et al.*, 1999), el cual es análogo al mecanismo utilizado por numerosos replicones de procariotes (Baas, 1987). No obstante, también se ha reportado recientemente que los geminivirus pueden replicar sus genomas por un mecanismo alternativo: la replicación mediada por recombinación (RDR) (Jeske *et al.*, 2001; Preiss y Jeske, 2003; Stenger *et al.*, 1991). La RCR en geminivirus es iniciada por la proteína Rep (proteína multifuncional) y se lleva a cabo en dos etapas: 1) Rep se une a los elementos repetidos en tándem (iterones) ubicados a distancias variables de la estructura tallo-asa, y 2) La secuencia nonanucleotídica (5'-TAATATT<sub>7</sub>↓A<sub>8</sub>C-3') es reconocida y cortada específicamente (↓) por la proteína Rep entre el nucleótido 7 y 8 para iniciar la replicación del virus por RCR (Elmer *et al.*, 1998; Fontes *et al.*, 1994; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1990; Laufs *et al.*, 1995). La proteína Rep se une covalentemente con el extremo 5' de la hebra de DNA cortada, mientras que el extremo 3' OH queda libre y es utilizado como templado para la polimerización mediada por las pDdD del huésped.

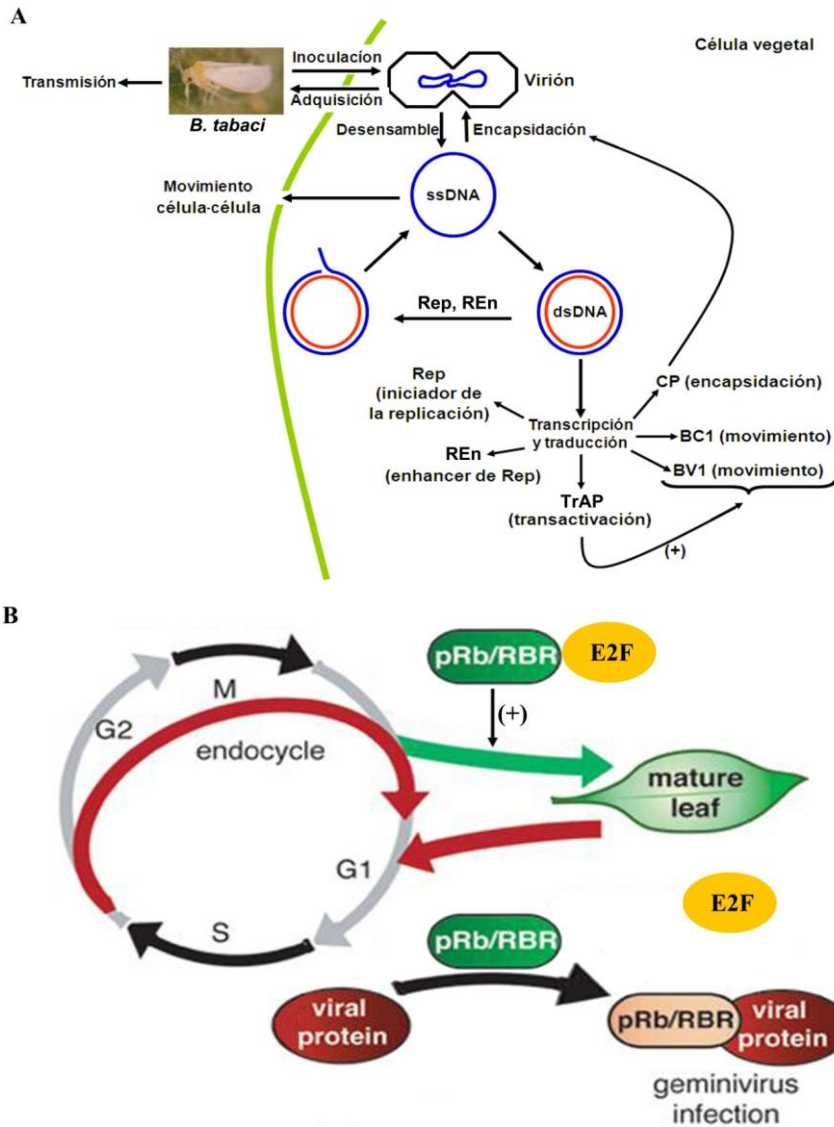
Las proteínas Rep de TYLCSV y TGMV son las que se han caracterizado en mayor detalle a nivel bioquímico (Hanley- Bowdoin *et al.*, 2000; Laufs *et al.*, 1995), pero al presente sólo se ha resuelto la estructura tridimensional del dominio endonucleotico (residuos aminoácidos 1-120) de la proteína Rep de TYLCSV (Campos-Olivas *et al.*, 2002). Los dominios estructurales en la región amino terminal de las proteínas Rep se caracterizan por tres "motifs" o secuencias de aminoácidos distintivas (I, II y III), los cuales están involucrados en la unión al DNA, corte y ligación, así como en la oligomerización e interacción con otras proteínas (Figura 2B) (Orozco *et al.*, 1997; Orozco y Hanley-Bowdoin, 1998; Campos-Olivas *et al.*, 2002). Los motivos I, II y III se encuentran comúnmente en proteínas involucradas en la RCR, tales como las de bacteriófagos y algunos plásmidos eubacterianos, por lo que se ha propuesto que las proteínas Rep de los geminivirus forman parte de una superfamilia de proteínas que participan en la replicación de virus y plásmidos

que utilizan el mismo mecanismo de replicación (Ilyina y Koonin, 1992; Iyer *et al.*, 2004; Koonin y Ilyina, 1992; Londoño-Avedaño *et al.*, 2010).

### **Participación de Rep en la interferencia del Ciclo Celular de la planta**

Las evidencias sugieren que la modulación del ciclo celular por parte de los geminivirus es mediada por la interacción de la proteína Rep con pRBR (Ach *et al.*, 1997; Collin *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1995; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004). La proteína pRBR regula la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. En G1, pRBR se encuentra unido a los factores transcripcionales E2F (que son seis en *Arabidopsis thaliana* E2F a-f) y evita de ese modo la activación de ciertos genes que determinan la transición hacia la fase S (Mariconti *et al.*, 2002; Vandepoele *et al.*, 2005). En una infección geminiviral, la proteína Rep interactúa con pRBR y permite la liberación de los factores E2F. En consecuencia, los factores E2F activan los genes para la reprogramación de las células diferenciadas y se crean las condiciones necesarias para la replicación de los geminivirus (Gutierrez, 2000; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2000) (Figura 3B).

El dominio de unión a pRBR se ha localizado en la región que comprende los aminoácidos 101 a 180 de la proteína Rep de TGMV (Figura 2B) (Kong *et al.*, 2000). En dicha región se predice la existencia de dos alfa hélices conservadas, de la que al menos una (llamada hélice 4) es esencial para la interacción con pRBR (Argüello-Astorga *et al.*, 2004). Por mutagénesis dirigida se determinó que la Leucina 148 de la hélice 4 es crítica para la unión con pRBR. Además, un análisis posterior de las proteínas Rep de la mayoría de los begomovirus y curtovirus conocidos resaltó la importancia del aminoácido en la posición equivalente al residuo 148 de TGMV, ya que éste siempre es Leucina o Metionina, exclusivamente.



**Figura 3. Replicación de los geminivirus por RCR y modulación del Ciclo Celular.**

A) Cuando el insecto vector *B. tabaci* se alimenta de la savia de las plantas, las partículas virales son inoculadas en el sistema vascular (floema). Posteriormente, los eventos de desensamble y transporte hacia el núcleo de la célula permiten la conversión de las moléculas de ssDNA en dsDNA. El genoma en forma de dsDNA es utilizado como molde para la transcripción y la replicación virales. Estos procesos son llevados a cabo por los factores del huésped, con una participación mínima de algunas proteínas virales. En el caso de los begomovirus bipartitas, los genes codificados tempranamente en el componente A (Rep y REn) cumplen con la función de replicación; mientras que los genes tardíos (TrAP, CP, BV1 y BC1) participan en la encapsidación y movimientos del virus. Finalmente, las partículas virales que circulan en el floema de la planta en etapas tardías de la infección son nuevamente adquiridas por el insecto vector y transmitidas horizontalmente a otras plantas. B) Los begomovirus son capaces de replicarse en células diferenciadas. Para ello, la interferencia del ciclo celular es crucial para crear las condiciones adecuadas para su replicación. En células diferenciadas, la proteína pRBR mantiene secuestrados a los factores E2F para evitar la entrada a la fase S. Sin embargo, en una infección geminiviral Rep interactúa con pRBR y permite la desdiferenciación de las células en fase G0 mediante la liberación de los factores E2F y la activación de genes relacionados con la entrada a la fase S. Figura tomada y modificada de Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004.



## **El impacto de los begomovirus en la agricultura: la recombinación y la pseudorecombinación como motores de la evolución**

En las últimas décadas se ha registrado la emergencia de enfermedades virales en plantas causadas principalmente por begomovirus (familia *Geminiviridae*), crinivirus (familia *Closteroviridae*) y tospovirus (familia *Bunyaviridae*). Factores como el transporte de material contaminado a largas distancias, la emergencia de los insectos vectores que los transmiten, o los propios mecanismos de evolución como la mutación, la recombinación y el intercambio de componentes genómicos, han ocasionado la emergencia de estos virus (Rojas y Gilbertson, 2008).

Durante las tres décadas pasadas, los insectos pertenecientes al género *Bemisia* (*Homoptera: Aleyrodidae*), comúnmente conocidos como mosquitas blancas, se han convertido en una de las principales plagas agrícolas a nivel mundial (Jones, 2003; Naranjo y Ellsworth, 2001; Oliveira *et al.*, 2001). El principal problema asociado al aumento en las poblaciones de las mosquitas blancas ha sido la proliferación de las enfermedades virales transmitidas por estos insectos. Las enfermedades más ampliamente distribuidas y de mayor importancia son aquellas asociadas con los virus de la familia *Geminiviridae*, específicamente aquellos del género *Begomovirus* (Morales y Anderson, 2001; Moriones y Navas-Castillo, 2000; Polston y Anderson, 1997; Ribeiro *et al.*, 2003; Varma y Malathi, 2003).

Como consecuencia del amplio espectro de huéspedes de las mosquitas blancas, en condiciones naturales es común encontrar infecciones mixtas con dos o más geminivirus (Harrison *et al.*, 1997; Pita *et al.*, 2001a; Ribeiro *et al.*, 1998; Sanz *et al.*, 2000). Las interacciones que se observan entre los virus co-infectantes comprenden una gama de relaciones, que van desde las interacciones sinérgicas a nivel de la replicación y el movimiento virales, hasta la interferencia negativa de los virus a diferentes niveles (Fondong *et al.*, 2000; Méndez-Lozano *et al.*, 2003).

En los geminivirus, especialmente en los BGVs, las infecciones mixtas propician los eventos de recombinación y pseudorecombinación de los geminivirus co-infectantes, por lo que juegan un papel crucial en la evolución de los geminivirus. La recombinación es el intercambio de fragmentos de DNA entre componentes homólogos (Froissart *et al.*, 2005; Kirthi *et al.*, 2002),

mientras que la pseudorecombinación es el intercambio de componentes genómicos completos (Chakraborty *et al.*, 2008; Pita *et al.*, 2001a; Sanz *et al.*, 2000). La ocurrencia de ambos procesos ha sido demostrado tanto en el laboratorio (Bull *et al.*, 2007; Hill *et al.*, 1998; Hou *et al.*, 1998; van der Walt *et al.*, 2009) como en condiciones naturales (Pita *et al.*, 2001a). Un ejemplo de esto ocurrió en Camerún, donde un nuevo virus recombinante surgió a partir de dos aislados de begomovirus que infectan casava (yuca) y causó una pandemia en la región, que tuvo como consecuencias grandes pérdidas económicas y una desestabilización de la seguridad regional en el rubro de alimentos (Legg y Thresh, 2000; Fondong *et al.*, 2000; Pita *et al.*, 2001b). Otro ejemplo de recombinación entre dos begomovirus ha sido documentado en España, donde el virus *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) y el virus TYLCV dieron origen a un nuevo virus recombinante, mejor adaptado que los virus parentales (Monci *et al.*, 2002). Por todo lo anterior, queda claro que el potencial evolutivo de los geminivirus debe ser tomado en cuenta en las estrategias de control utilizadas en el sector agrícola.

### **Begomovirus de importancia económica en México**

La alta incidencia de los begomovirus en América se ha asociado a las grandes poblaciones de *B. tabaci*, y ha resultado en pérdidas cuantiosas para los agricultores. Además, la introducción del biotipo B de *B. tabaci* a principios de la década de los 80's y la adopción de las técnicas de cultivo de los españoles (monocultivos) han contribuido a la rápida expansión de las enfermedades de etiología begomoviral. El biotipo B de la mosquita blanca ha desplazado a los biotipos nativos debido a su amplio espectro de huéspedes, alta fecundidad, capacidad de dispersión, la eficiencia de transmisión de virus y la resistencia a los insecticidas tradicionales (Brown *et al.*, 1995).

Los síntomas causados por los begomovirus suelen incluir algunos de los siguientes síntomas: clorosis foliar marginal, moteado clorótico, mosaicos amarillos, reducción del área foliar, epinastia, enanismo, abultamiento en hojas, abscisión floral y reducción del tamaño del fruto. Se ha reportado que los begomovirus limitan la producción de varios cultivos en América, tales como el algodón, el frijol, el chile y las cucurbitáceas, entre otros (Morales y Anderson, 2001; Polston y Anderson, 1997). En México, las primeras enfermedades

ocasionadas por geminivirus se reportaron en plantas de tomate, chile y frijol, en los estados de Sonora y Sinaloa (Gallegos, 1978). Actualmente, la presencia de los begomovirus se ha reportado en la mayor parte de las zonas agrícolas de la República Mexicana. Las especies de BGVs más comúnmente encontradas en México son PepGMV, PHYVV, CdTV, ToMoV, STLCV y TYLCV (Ascencio-Ibañez *et al.*, 1999). Los BGVs denominados PepGMV (*virus del mosaico dorado del chile*) y PHYVV (*virus huasteco del amarillamiento de las venas del chile*) infectan diferentes tipos de solanáceas como chile, tomate, tomatillo y tabaco (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Con frecuencia, PepGMV se encuentra en infecciones mixtas con PHYVV causando la enfermedad del rizado amarillo del chile (Garzon-Tiznado *et al.*, 1993). En esta infección mixta se da un sinergismo que aumenta la severidad de los síntomas y se presenta también un incremento de la replicación de los virus, principalmente de PepGMV (Renteria-Canett, 2004; Renteria-Canett *et al.*, 2007).

La primera descripción de PepGMV data de 1990 y originalmente se le denominó virus del chile de Texas (TPV), ya que se encontró en plantas de chile en el estado de Texas (Stenger *et al.*, 1990). Ahora se sabe que su distribución es amplia e incluye a México y América Central (Guatemala, Honduras, Nicaragua y Costa Rica). La organización genómica de PepGMV es típica de los begomovirus bipartitas. El componente A consta de 2613 nt, mientras que el B es de 2595 nt. En las plantas infectadas por PepGMV se encuentran mosaicos o lesiones cloróticas locales, arrugamiento de hojas, enanismo, así como deformaciones del fruto. Por otro lado, PHYVV es uno de los virus asociados a la enfermedad conocida como “rizado amarillo” y fue el primer geminivirus aislado en México (Garzon-Tiznado *et al.*, 1993; Torres-Pacheco *et al.*, 1993). PHYVV causa una rugosidad severa, clorosis en las venas de las hojas y un reticulado fino (Holguin-Peña *et al.*, 2007). Su distribución incluye a México y el sur de los Estados Unidos, donde afecta cultivos de solanáceas, principalmente el chile, tomate, y el tomate de cáscara (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Al igual que PepGMV, PHYVV es un begomovirus bipartita, con el componente A de 2631 nucleótidos y el componente B de 2589 nucleótidos (Torres-Pacheco *et al.*, 1993).

De forma interesante, PepGMV pertenece a un pequeño clado que consta de 18 miembros y es tipificado como el clado del SLCV (por el virus *Squash leaf*

*curl virus*). El clado SLCV se caracteriza por presentar varias diferencias relevantes en la organización de la región intergénica, así como en la región amino-terminal de la proteína Rep, respecto al resto de los BGVs, tanto del NM como del VM. PHYVV por su parte, se agrupa con los begomovirus típicos de América. No obstante, los análisis filogenéticos sugieren que PHYVV es un virus híbrido entre los geminivirus del VM y el NM (Ruiz-Medrano, 1996).

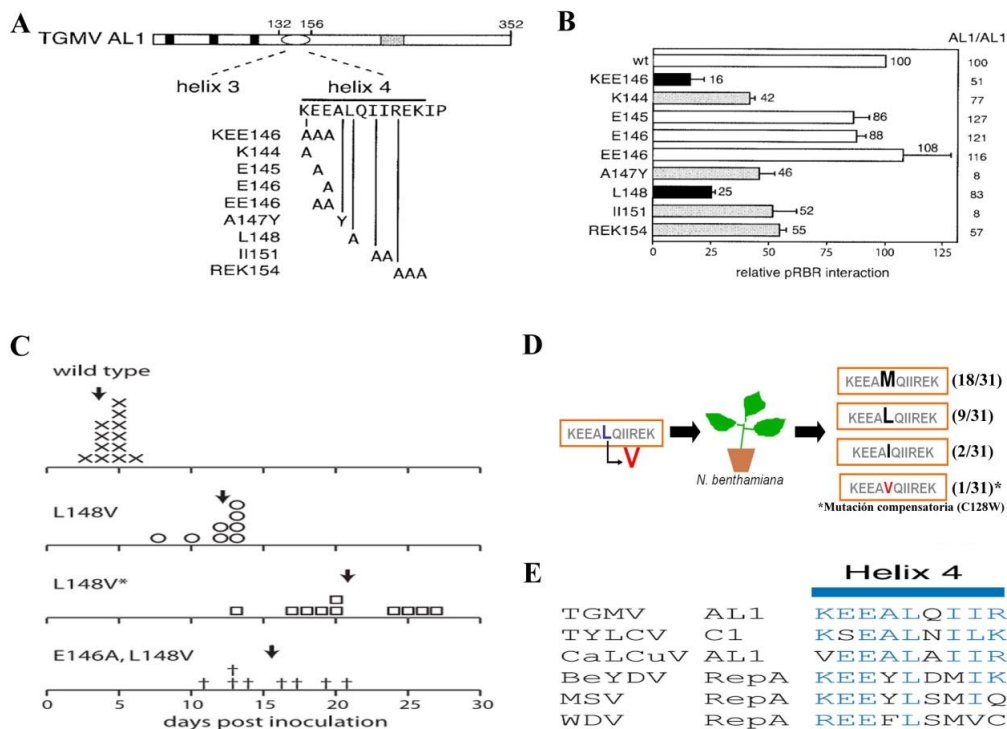
Por otra parte, el *virus Taíno del moteado del tomate* (ToMoTV) es originario de la Isla de Cuba, y presenta una organización genómica bipartita como el resto de los begomovirus del Nuevo Mundo (Ramos *et al.*, 1997). Este virus es un patógeno de varias especies de solanáceas como tomate, papa y tabaco. Los síntomas que produce incluyen mosaicos, disminución del crecimiento, clorosis moteado y arrugamiento de las hojas (Cordero *et al.*, 2003). Los componentes A y B de ToMoTV tienen un tamaño de 2597 y 2562 nt, respectivamente (Ramos *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 2003). El análisis filogenético de todos los marcos de lectura de ToMoTV coloca a este virus dentro de un “subcluster” de los begomovirus típicos del Nuevo Mundo, junto con otros geminivirus del Caribe como ToMoV, AbMV, PYMV, BDMV, SiGMV y HTV. Recientemente, se ha reportado la presencia de dos begomovirus (CoYVV y CoGMV) en Vietnam que presentan características de los begomovirus americanos (Ha *et al.*, 2006; Ha *et al.*, 2008). El análisis filogenético del componente B de CoYVV mostró que está más relacionado con ToMoTV que con otros BGVs conocidos.

### **Antecedentes directos del trabajo**

Los estudios de evolución de los geminivirus se han enfocado por mucho tiempo en el papel de la recombinación, debido a que estos eventos son tan frecuentes que pueden ocurrir entre cepas (Fondong *et al.*, 2000), especies (Bridson *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 2000; Saunders *et al.*, 2002), géneros (Klute *et al.*, 1996; Saunders y Stanley, 1999), e incluso entre familias (Jones, 2003). Sin embargo, la contribución de las mutaciones como última fuente de variabilidad genética para adaptarse a ambientes cambiantes se ha ignorado en gran medida.

En TGMV, el análisis de la hélice 4 de Rep como un dominio importante para la interacción con pRBR (Arguello-Astorga *et al.*, 2004), derivó en el descubrimiento de que ciertas substituciones en el residuo L148 eran poco

toleradas y las mutaciones introducidas revertían con alta frecuencia al fenotipo silvestre (Argüello-Astorga *et al.*, 2007) (Figura 4). Lo interesante de estos análisis fue el descubrimiento de que los genotipos revertantes habían adquirido cambios que daban lugar a aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas en la posición 148 (Figura 4D), lo que sugería que solo algunos aminoácidos son permisibles en esta posición (Figura 4E). De manera importante, la evaluación de una sustitución equivalente en CaLCuV también experimento el fenómeno de reversión, indicando que la aparición de mutaciones a lo largo del genoma ocurre continuamente durante el curso de la infección y evidenciando el gran potencial evolutivo que poseen los geminivirus.



**Figura 4. Inestabilidad de mutaciones en el residuo L148 de la proteína Rep de TGMV.** A) El dominio de unión a pRBR de la proteína Rep de TGMV se ha delimitado entre los aminoácidos 101 a 180. En esta región se encuentran dos motivos conservados (hélices 3 y 4). B) La mutagénesis dirigida de cada uno de los residuos dentro de la hélice-4 altera diferencialmente la interacción con pRBR, así como la oligomerización de Rep. La mutación del aminoácido L148 mostró el efecto más pronunciado en la interacción con pRBR, pero no para la oligomerización de Rep. C y D) La evaluación del efecto fenotípico in planta de la mutación L148V mostró un retraso en la aparición de plantas con síntomas. El genotipo de los virus recuperados en las plantas con retraso de síntomas indicó que la progenie viral había revertido la mutación original, adquiriendo diversos cambios que restauraban las propiedades del virus. E) La importancia del aminoácido L148 se refleja en la conservación de este residuo en todas las proteínas de begomovirus reportados. Figuras tomadas y modificadas de Argüello-Astorga *et al.*, 2004, Argüello-Astorga *et al.*, 2007 y Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004.

En este trabajo hemos extendido los hallazgos en TGMV y hemos explorado el fenómeno de la reversión fenotípica en begomovirus americanos con relaciones filogenéticas distantes a TGMV y CaLCuV. Nuestros experimentos *in planta* con los virus mutantes de PepGMV, PHYVV y ToMoTV indican que ciertas substituciones en la posición equivalente a L148 de TGMV son inestables durante el curso de la infección y generan variantes que causan síntomas similares al virus silvestre. Estos resultados apoyan la idea de que los geminivirus experimentan una alta substitución nucleotídica. Además, la recuperación única y exclusiva de cambios no sinónimos en posiciones específicas de Rep está de acuerdo con una selección positiva en nuestros experimentos de evolución forzada, y probablemente un papel del tamaño de la población. El significado de este interesante fenómeno biológico y sus implicaciones en las estrategias de control contra los geminivirus se discutirán más adelante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIALES Y REACTIVOS

#### Begomovirus utilizados

Los virus utilizados en este trabajo fueron los siguientes: a) el *virus del mosaico dorado del chile* (PepGMV; [NC\_004101 y NC\_004096]), b) el *virus Huasteco del amarillamiento del chile* (PHYVV; [NC\_001359 y NC\_001369]) y el *virus Taino del moteado del tomate* (ToMoTV; [NC\_001828 y NC\_001917]). Estos virus nos fueron amablemente donados por el Dr. Rafael Rivera Bustamante, y se encontraban clonados como monómeros virales en los vectores pBluescript (Stratagene; 2961 pb) y pZero-2 (Invitrogen; 3297 pb) (Tabla 2). A partir de estas clonas se construyeron los vectores virales que se describen más adelante.

**Tabla 2.** Begomovirus bipartitas utilizados.

Virus	Componente	Vector	Sitio de clonación	Tamaño total
PepGMV	A (2,613 pb; NC_004101)	pBlueScript	EcoRI	5,574 pb
	B (2,595 pb; NC_004096)	pBlueScript	HindIII	5,556 pb
PHYVV	A (2,631 pb; NC_001359)	pBlueScript	HindIII	5,592 pb
	B (2,589 pb; NC_001369)	pBlueScript	BamHI	5,550 pb
ToMoTV	A (2,597 pb; NC_001828)	pBlueScript	XbaI	5,558 pb
	B (2,562 pb; NC_001917)	pZero-2	XbaI	5,859 pb

#### Especies vegetales utilizadas

En los ensayos de infectividad se utilizaron como plantas huéspedes las siguientes especies: *Nicotiana benthamiana* y *Capsicum annuum* var. *Sonora Anaheim*. Las plantas se crecieron en cámaras de crecimiento libre de insectos con ciclos diurnos (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) a una temperatura de 27°C. La colecta de las muestras se realizó en puntos específicos del experimento y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta la extracción del DNA total.

## **Cepas bacterianas y plásmidos**

A lo largo de todo el trabajo de laboratorio se utilizó la cepa de *Escherichia coli* TOP10F' [F'<sup>+</sup>{lacI<sup>q</sup> Tn10 (TetR)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG] y los plásmidos pBlueScript (Stratagene) y pGEM-Teasy (Promega) (Apéndice A). Los cultivos líquidos de bacterias, *E. coli* y *Agrobacterium tumefaciens* se incubaron toda la noche a 37°C y 28°C respectivamente, con agitación de 200 revoluciones por minuto (rpm). Los cultivos de *E. coli* y *A. tumefaciens* en cajas con medio sólido se incubaron toda la noche en estufa a 37°C y de dos a tres días a 28°C, respectivamente.

## **Enzimas y kits comerciales: generalidades**

Las enzimas de restricción y modificación utilizadas a lo largo del presente estudio fueron de las siguientes compañías: Promega, Invitrogen, New England Biolabs, Roche y Fermentas. La purificación de DNA a partir de geles de agarosa se realizó con los Kits de Promega (Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System) y QIAGEN (QIAquick Gel Extraction Kit) (Apéndice B). Las reacciones de PCR rutinarias se realizaron usando diversos lotes comerciales de Taq-DNA polimerasa. En cambio, en las reacciones de PCR para crear mutaciones se utilizó una polimerasa de alta fidelidad (PCR SuperMix High Fidelity de Invitrogen). En las reacciones de amplificación con la polimerasa phi29 se usó el kit de TempliPhi™ de Life Sciences (GE Healthcare). Por último, las membranas de nylon Hybond-N" que se usaron en los análisis de hibridación tipo Southern blot fueron de Amersham Life Science.

## **Reactivos**

Todos los reactivos utilizados en este estudio fueron de alta pureza. Los proveedores fueron los siguientes: Sigma, J. T. Baker, Fluka Chemika, Life Technologies, Merck, Difco laboratories, USB y Phyto Technology Lab.

## **MÉTODOS**

### **Clonación y manipulación genética: generalidades**

Los fragmentos creados por las enzimas de restricción fueron separados y purificados en geles de agarosa como se describe en el Apéndice B. El



“rellenado” (salientes 5’) o “rasurado” (salientes 3’) de extremos cohesivos se realizó utilizando el fragmento grande de la DNA polimerasa I de *E. coli* (fragmento Klenow) (Invitrogen). Las ligaciones se llevaron a cabo a 4 °C durante toda la noche en presencia de la T4 DNA ligasa (Promega). En el caso de evitar la religación de extremos compatibles, se usó la fosfatasa alcalina de intestino de ternero para la remoción de los grupos fosfatos (CIP de New England BioLabs). La transformación de células calcio competentes de *Escherichia coli* TOP10F’ (Apéndice C) se realizó por choque térmico (Apéndice D) y la selección de las colonias se realizó en placas con medio LB sólido, usando el antibiótico adecuado (ver Apéndices E y F). En el caso de clonaciones de fragmentos de PCR en pGEM-Teasy, la selección de las colonias positivas se llevó a cabo en placas de LB sólido que contenían Carbenicilina (100 µg/mL), IPTG y X-Gal (Apéndice G). La comprobación de los clones con insertos del tamaño apropiado se efectuó mediante digestiones con enzimas de restricción y/o secuenciación según fue el caso.

### **Obtención de DNA plasmídico**

La extracción de DNA plasmídico a partir de cultivos de *E.coli* se realizó por el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 2001), empleando las soluciones I (10 mM de EDTA pH 8.0, 25 mM de Tris-HCl pH 8.0), II (0.2 N de NaOH y 1% de SDS) y III (Acetato de Potasio 3M y 5.75 mL de Acido Acético glacial). El protocolo detallado de las minipreparaciones y las maxipreparaciones de DNA plasmídico se describen en los Apéndices H y I, respectivamente. Para las minipreparaciones de DNA plasmídico (Apéndices H), se partieron de un cultivo de 3 ml crecido durante una noche en medio líquido LB suplementado con el correspondiente antibiótico. Las maxipreparaciones de DNA plasmídico (Apéndices I), se realizaron a partir de cultivos crecidos durante una noche en 200 ml de medio líquido LB suplementado con antibiótico.

### **Construcción de vectores virales: estrategia general**

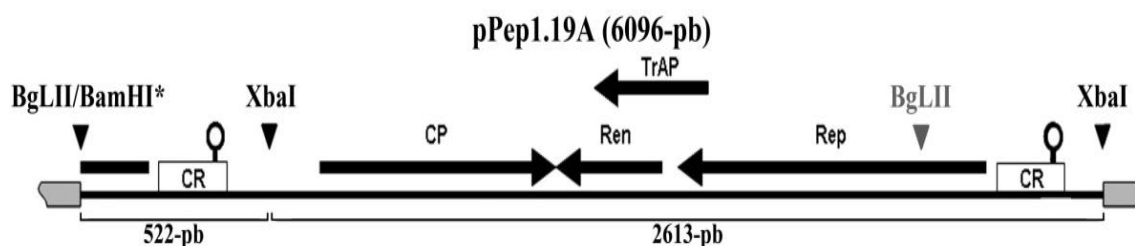
La forma de replicación de los geminivirus se ha explotado para la construcción de clonas infectivas (Stenger *et al.*, 1991). Una clona infectiva consta de una unidad genómica viral completa (1; tamaño total del componente A o B) con un origen de replicación adicional (X; tamaño variable). Por lo tanto, la

nomenclatura adoptada para las clonas infectivas es el nombre de la clona infectiva con la terminación 1.XA o 1.XB, según sea el caso. La construcción de las clonas infectivas permite la inoculación directa del virus, sin la necesidad de usar enzimas de restricción para la liberación del virus previo a la inoculación de las plantas.

La construcción de los vectores virales se llevó a cabo en dos pasos secuenciales. A continuación se describe la estrategia general, usando como ejemplo la construcción de la clona infectiva del componente A de PepGMV:

1) El origen de replicación del componente A de PepGMV (522-pb) se obtuvo con las enzimas BgLII y XbaI. Posteriormente se clonó en los sitios BamHI y XbaI del vector pBS. A esta construcción se le denominó pPep-oriA.

2) El componente A completo de PepGMV (2,613-pb) se obtuvo con XbaI y se clonó en sitio XbaI del plásmido pPep-oriA; generando la clona infectiva pPep1.19A de 6,096-pb (Figura 5). La clonación de PepGMV-A en la orientación correcta se verificó mediante patrones de bandeo, usando las enzimas apropiadas.



**Figura 5. Vector viral del componente A de PepGMV.** Las clonas infectivas de PepGMV (pPep1.19A), así como del resto de los vectores virales construidos constan de dos repetidos directos de los orígenes de replicación. En pPep1.19A, el primer origen de replicación consta de 522-pb y la unidad genómica completa del componente A de PepGMV de 2,613-pb. Los sitios BgLII y BamHI (en pPep-oriA) son compatibles pero no regeneran los sitios (marcado con asterisco).

Con la estrategia descrita anteriormente se construyeron los vectores virales del componente B de PepGMV (pPep1.32B), ambos componentes de PHYVV (pPHY1.38A y pPHY1.42B), así como los dos componentes genómicos de ToMoTV (pTa1.46A y pTa1.38B) (Tabla 3). Todas las clonas de los vectores virales se mantuvieron y propagaron en la cepa de *Escherichia coli* TOP10F' con 100 µg/mL de Carbenicilina (Cb).

**Tabla 3.** Vectores virales silvestres.

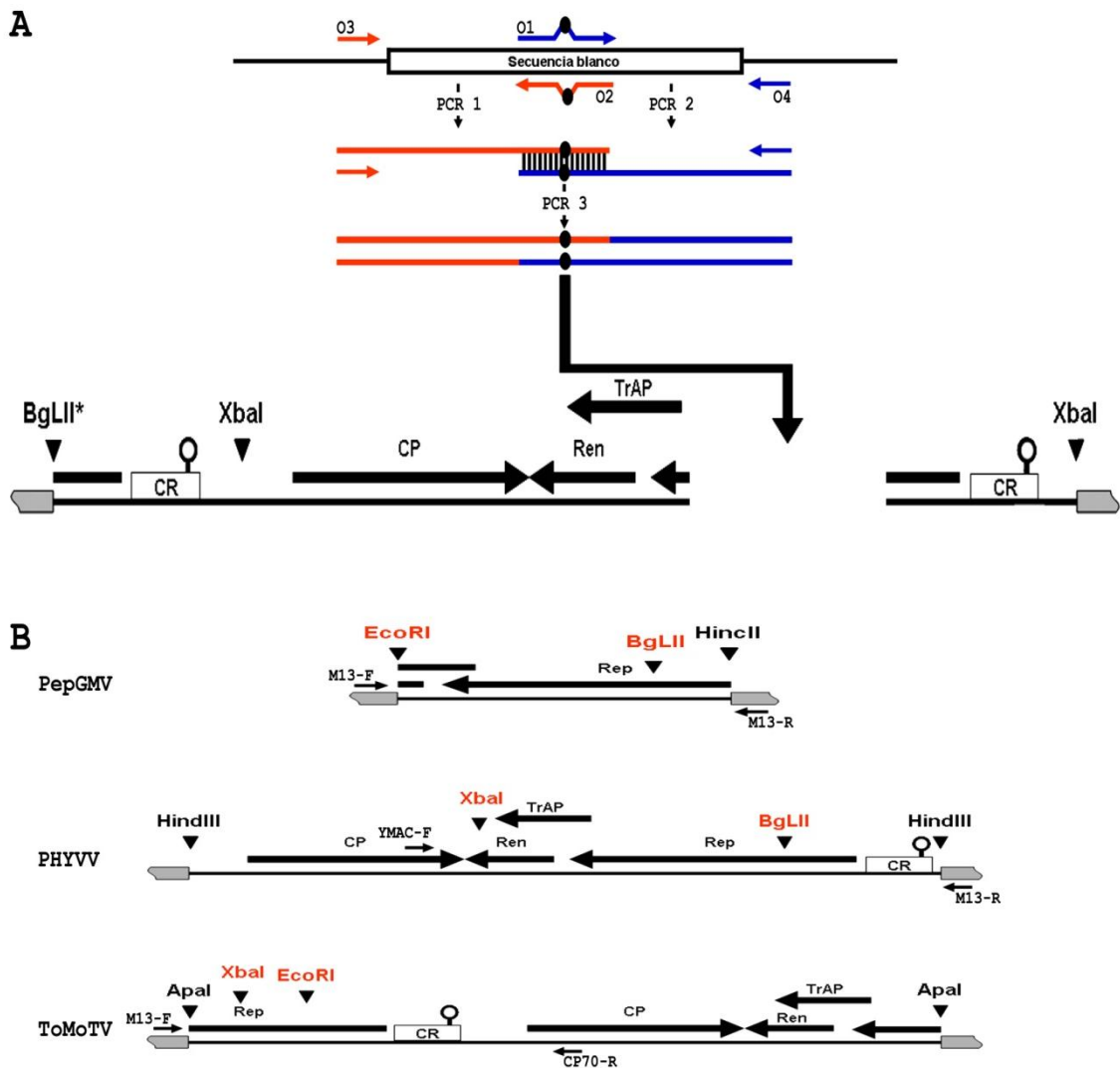
<b>Virus (componente)</b>	<b>Repetido directo</b>	<b>Sitios de clonación en pBS</b>	<b>Vector viral</b>
PepGMV-A	1,431-pb (EcoRI/ <b>XbaI</b> )	EcoRI/ <b>XbaI</b>	pPep1.35A (7,005 pb)
PepGMV-A	522-pb (BglII <sup>a</sup> / <b>XbaI</b> )	BamHI <sup>a</sup> / <b>XbaI</b>	pPep1.19A (6,096 pb)
PepGMV-B	846-pb (SpeI/ <b>HindIII</b> )	SpeI/ <b>HindIII</b>	pPep1.32B (6,402 pb)
PHYVV-A	1,838-pb (EcoR/ <b>XbaI</b> )	EcoRI/ <b>XbaI</b>	pPHY1.59A (7,100 pb)
PHYVV-A	1,010-pb (BglII <sup>a</sup> / <b>BstXI</b> )	BamHI <sup>a</sup> / <b>BstXI</b>	pPHY1.38A (6,602 pb)
PHYVV-B	1,120-pb (SacI/ <b>BamHI</b> )	SacI/ <b>BamHI</b>	pPHY1.42B (6,670 pb)
ToMoTV-A	1,298-pb (ScaI <sup>a</sup> / <b>XbaI</b> )	EcoRV <sup>a</sup> / <b>XbaI</b>	pTa1.46A (6,856 pb)
ToMoTV-B	1,083-pb (XbaI/ <b>BamHI</b> )	XbaI/ <b>BamHI</b>	pTa1.38B (6,606 pb)

<sup>a</sup>Los sitios no son regenerados. Los sitios de clonación de los componentes completos se señalan en negritas (segunda etapa de la construcción de los vectores virales).

### **Mutagénesis del residuo conservado de la hélice 4 de Rep**

En todos los casos, las posiciones de los nucleótidos mutados en el gen *Rep* corresponden al sistema de nomenclatura en que se reportan los genomas de los geminivirus en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). El primer nucleótido es aquel que queda inmediatamente después del sitio de corte que realiza la proteína Rep en la secuencia nonanucleotídica (TAATATTAC).

La mutagénesis dirigida del residuo conservado de la hélice 4 de las proteínas Rep se realizó mediante el traslape de productos de PCR mutagénicos (Figura 6A) (Wang y Malcolm, 1999). Los moldes usados para cada virus se muestran en la Figura 6B. Con los oligonucleótidos mutagénicos (Anexo 1: Tabla M1;), en combinación con los oligonucleótidos apropiados [M13-F (5'GATTGCCTCGGCATATG3'), M13-R (5'CATATGCCGAGGCAATC3'), YMAC-F (5'CTAAGCTTGTAYATGGCATGTACNCATGC3') y CP70-R (5'CGCGAATTCGATTGRACCTTACANGGNCCTTCACAACC3')], se generaron las mutaciones en PepGMV, PHYVV y ToMoTV.



**Figura 6. Estrategia general de la mutagénesis dirigida.** A) Método utilizado para introducir mutaciones mediante productos de PCR. Los oligonucleótidos mutagénicos O1 y O2, en combinación con los oligos flanqueantes (O3 y O4), se emplearon para obtener dos productos de PCR (PCR1 y PCR2). Posteriormente, los productos de PCR1 y PCR2 son mezclados en proporciones equimolares para una tercera amplificación (PCR3) con los oligos O3 y O4. El producto de PCR con la mutación deseada (PCR3) se transfiere al fondo silvestre, usando sitios únicos que flanquean a la mutación. El vector viral mostrado en A que recibe la mutación es el vector pPep1.19A. B) Moldes usados para la mutagénesis del residuo L145 de PepGMV, L147 de PHYVV y M147 de ToMoTV. Los oligonucleótidos mutagénicos (Anexo 1: Tabla M1) se usaron en combinación con los oligonucleótidos M13F y M13R para PepGMV, YMAC-F y M13R para PHYVV, y M13F y CP70R para ToMoTV. Los sitios de restricción en rojo indican los sitios utilizados para transferir la mutación.

El producto de PCR con la mutación deseada (PCR 3) (Figura 6A), se clonó en el vector pGEM-Teasy y se transformaron las células de *E. coli* TOP10F'. El escrutinio de las colonias transformantes se realizó mediante PCR de colonia usando los oligonucleótidos universales M13-F y M13-R. De las colonias positivas, se aisló el plásmido y la identificación de clonas con la mutación

deseada se verificó mediante patrones de restricción, ya que los oligonucleótidos mutagénicos poseían mutaciones silenciosas que crearon o eliminaron sitios de restricción (Anexo1: Tabla M1). Una vez confirmada la presencia de la mutación por restricción y secuenciación, se cortó la clona correspondiente con las enzimas de restricción en los sitios que flanqueaban la mutación (Figura 6B; en rojo) y se transfirió el fragmento mutante en el vector viral correspondiente con un fondo genético silvestre. En la figura 7 se muestran las mutaciones introducidas para cada virus. A continuación se detalla la mutagénesis para PepGMV, PHYVV y ToMoTV.

### **Mutagénesis del residuo L145 de PepGMV**

La mutagénesis del gen *Rep* de PepGMV para generar el cambio L145V se realizó con los oligonucleótidos mutagénicos P1 y P2 (Anexo 1: Tabla M1), en combinación con los oligos universales M13. El molde para las mutagénesis fue un fragmento de aproximadamente 1-kb (EcoRI-HincII), clonado en pBS que contenía el gen *Rep* de PepGMV (Figura 6B). De manera más específica, con los oligos mutagénicos se cambió el nucleótido G-2050 por C, y además, con este único cambio se propició la creación del sitio de restricción Sall (GTCGAC). Por otra parte, los oligos P3 y P4 (Anexo 1: Tabla M1), generaron la mutación L145A al cambiar los nucleótidos A-2049 y G-2050 por G y C, respectivamente. Adicionalmente se generaron mutaciones silenciosas para crear el sitio de restricción EcoRV (GATATC). Estos cambios involucraron a los nucleótidos T-2042 y G-2045 por los nucleótidos G y A, respectivamente. Finalmente, la mutación del codón 145 por Treonina se generó con los oligos P5 y P6 (Anexo 1: Tabla M1), al cambiar los nucleótidos A-2049 y G-2050 por los nucleótidos G y T, respectivamente. La generación del sitio de restricción EcoRV se realizó de la misma forma como se describió anteriormente en la generación de la mutación L145A. Una vez confirmada la presencia de la mutación deseada (por restricción y secuenciación), se transfirieron las mutaciones al fondo silvestre de PepGMV A utilizando los sitios BglII y EcoRI (920-pb) y se generaron los vectores virales pPep1.19L145V, pPep1.19L145A y pPep1.19L145T (Anexo 1: Tabla M2).

### **Mutagénesis del residuo L147 de PHYVV**

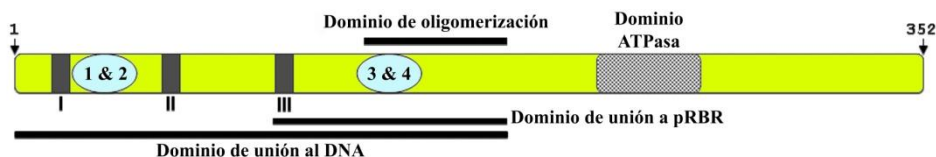
Las mutaciones en el codón 147 del gen *Rep* en PHYVV por codones codificantes para Valina, Alanina y Treonina se generaron utilizando los oligos mutagénicos P7 a P12 (Anexo 1: Tabla M1) y empleando como molde un genoma A completo de PHYVV clonado en pBlueScript en los sitios HindIII (Figura 6B). Con los oligos P7 y P8 (Anexo 1: Tabla M1) se mutaron los nucleótidos G-2056 y T-2066 por C y A, respectivamente. La primera mutación generó la sustitución L145V, y también eliminó un sitio PstI; mientras que con la segunda mutación se eliminó un segundo sitio PstI, sin cambiar la secuencia de aminoácidos codificados. En el caso de la mutación L147A, los nucleótidos A-2055 y G-2056 se substituyeron por los nucleótidos G y C utilizando los oligos P9 y P10 (Anexo 1: Tabla M1). Nuevamente, el cambio del nucleótido T-2066 por A eliminó el segundo sitio PstI. Para la mutación L147T, los oligos P11 y P12 (Anexo 1: Tabla M1) se emplearon en el PCR mutagénico para generar las mutaciones A-2055-G, G-2056-T y T-2066-A. Con ello, además de generar la mutación deseada, también se eliminaron los dos sitios de restricción PstI. Finalmente, las substituciones L147V, L147A y L147T se subclonaron (1055-pb) al fondo silvestre de PHYVV A utilizando los sitios BglII y XbaI, obteniendo los vectores virales pPHY1.38L147V, pPHY1.38L147A y pPHY1.38L147T (Anexo 1: Tabla M2).

### **Mutagénesis del residuo M147 de ToMoTV**

Por otra parte, con los oligos P13 y P14 (Anexo 1: Tabla M1) se mutó el codón 147 (Met) del gen *Rep* de ToMoTV por el codón de Valina, utilizando una construcción molde de un genoma completo de ToMoTV A (2597-pb) clonado en pBlueScript en los sitios ApaI (Figura 6B). Con los oligos P13 y P14 (Anexo 1: Tabla M1) se mutaron los nucleótidos A-2007 por G, y T-2015 por C. El primer cambio corresponde a una mutación silenciosa que eliminó el sitio DraI, mientras que el segundo cambio involucró la mutación no silenciosa M147V. De igual manera, los oligos P15 y P16 (Anexo 1: Tabla M1) se utilizaron para eliminar el sitio de restricción DraI (A-2007 por G), mientras que los cambios A-2014-G y T-2015-C sirvieron para generar la mutación M147A. Por último, con los oligos P17 y P18 se generaron los cambios A-2014-G y T-2015-T para crear la sustitución M147T en el gen *Rep* de ToMoTV. En este último caso, la

eliminación del sitio Dral se realizó de la misma forma como se describió anteriormente. Por último, una vez confirmada la presencia de las mutaciones sin cambios adicionales, se subclonaron en el fondo silvestre de ToMoTV A utilizando los sitios de corte único EcoRI y XbaI, generando los vectores virales pTa1.46M147V, pTa1.46M147A y pTa1.46M147T (Anexo 1: Tabla M2).

A



B

PepGMV			PHYVV			ToMoTV		
hélice 4			hélice 4			hélice 4		
	AGEALDI IKAG	CTC		AEEALQI I KEE	CTG		VQSAMAVLKEE	ATG
L145V	V	gTC	L147V	V	gTG	L147V	V	gTG
L145A	A	gcC	L147A	A	gcG	L147A	A	gcG
L145T	T	acC	L147T	T	acG	L147T	T	acG

**Figura 7. Mutaciones de la proteína Rep.** A) Representación de la proteína Rep y sus principales dominios funcionales se muestran en la parte superior del esquema (A). Los 11 amino ácidos de la hélice-4 son mostrados para cada virus. B) Tres clases de mutaciones fueron generadas. En el caso de PepGMV, el codón 145 (CTC: Leu) del gen *Rep* se mutó a gTC (Val), gcC (Ala) y acC (Thr). De igual forma, el codón 147 (CTG) del gen de PHYVV se cambió a gTG (Val), gcG (Ala) y acG (Thr). Finalmente, para ToMoTV, el codón 147 (ATG) fue mutado a gTG (Val), gcG (Ala) y acG (Thr).

### Ensayos de infectividad con los vectores virales silvestres y mutantes

Los vectores virales silvestres (Tabla 3) y sus correspondientes mutantes (Anexo 1: Tabla M2) se evaluaron funcionalmente inoculando plantas de *Capsicum annuum* y *Nicotiana benthamiana*. En cada experimento, plantas inoculadas con el vector pBS vacío se utilizaron como controles negativos.

Las semillas de *C. annuum* y *N. benthamiana* se germinaron en una cámara bioclimática con las condiciones propicias para su crecimiento. A los 30 días posteriores a la germinación, grupos de 10 plántulas de ambas especies se inocularon por biobalística a baja presión (100 a 120 PSI) con una preparación de partículas de tungsteno cubiertas de DNA viral de las clonas infectivas tanto silvestres como mutantes, con sus respectivos componentes B (ver Apéndices J y K) (Pons-Corona, 2001). La inoculación de cada planta se llevó a cabo con 10 microlitros ( $\mu$ L) de la preparación de partículas cubiertas con el DNA viral (5  $\mu$ g de cada componente). El blanco fueron hojas jóvenes de la zona apical de las plantas. Una vez inoculadas, las plantas se mantuvieron en una cámara de

crecimiento libre de insectos con ciclos de luz-oscuridad de 16/8 horas, a una temperatura de 27°C. Posteriormente, se registraron los signos de virosis de manera visual en un periodo máximo de 45 días. El muestreo de todas las plantas se realizó periódicamente, tomando tanto hojas jóvenes como en senescencia. Posteriormente se sometieron a la extracción de DNA total y finalmente se llevó a cabo la amplificación de cada virus por PCR utilizando los oligos de la Tabla M3 (Anexo 1). Para el experimento de Southern blot, el muestreo se realizó a los 7, 14 y 21-dpi.

### **Extracción de DNA total de plantas**

Las hojas jóvenes de las plantas inoculadas con pBlueScript o con los vectores virales fueron colectadas a los 7, 14 y 21 días posteriores a la inoculación (dpi) y se almacenaron a -80°C hasta la extracción del DNA. En un microtubo de 1.5 mL conteniendo la muestra vegetal colectada, se agregan 750 µL del buffer AP (Urea 7M, NaCl 0.35M, Tris-HCl 0.05M, EDTA 0.02M, 1% de sarcosina) y se mezcla en el vórtex, seguido de una incubación a temperatura ambiente por 30 minutos (min.). Posteriormente, se centrifuga a 11,000 rpm por 3 min. El sobrenadante se transfiere a un nuevo microtubo y se adiciona un volumen de fenol-cloroformo (1:1) y se mezcla vigorosamente antes de centrifugar a 11,000 rpm por 3 min. La fase acuosa se transfiere a un tubo nuevo y nuevamente se agrega fenol-cloroformo (1:1) y se extrae la fase acuosa. Se agregan 0.2 volúmenes de acetato de amonio 10M y un volumen de isopropanol, se mezcla muy bien y se almacena a -20°C por 1 hora. Transcurrido este tiempo, se centrifuga a 11,000 rpm por 10 min y se descarta el sobrenadante. Se agregan 500 µL de etanol al 70% y se centrifuga por 5 min. a 11,000 rpm. Finalmente, se decanta el sobrenadante, se seca la pastilla de DNA a temperatura ambiente y se resuspende el DNA en 30 µL de agua desionizada estéril. La integridad del DNA se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

### **Amplificación por PCR y secuenciación**

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: primer ciclo de 5 min. a 94 °C, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 1 min., 55 °C por 1 min. y 72 °C por 1 min. Por último, una amplificación final a 72



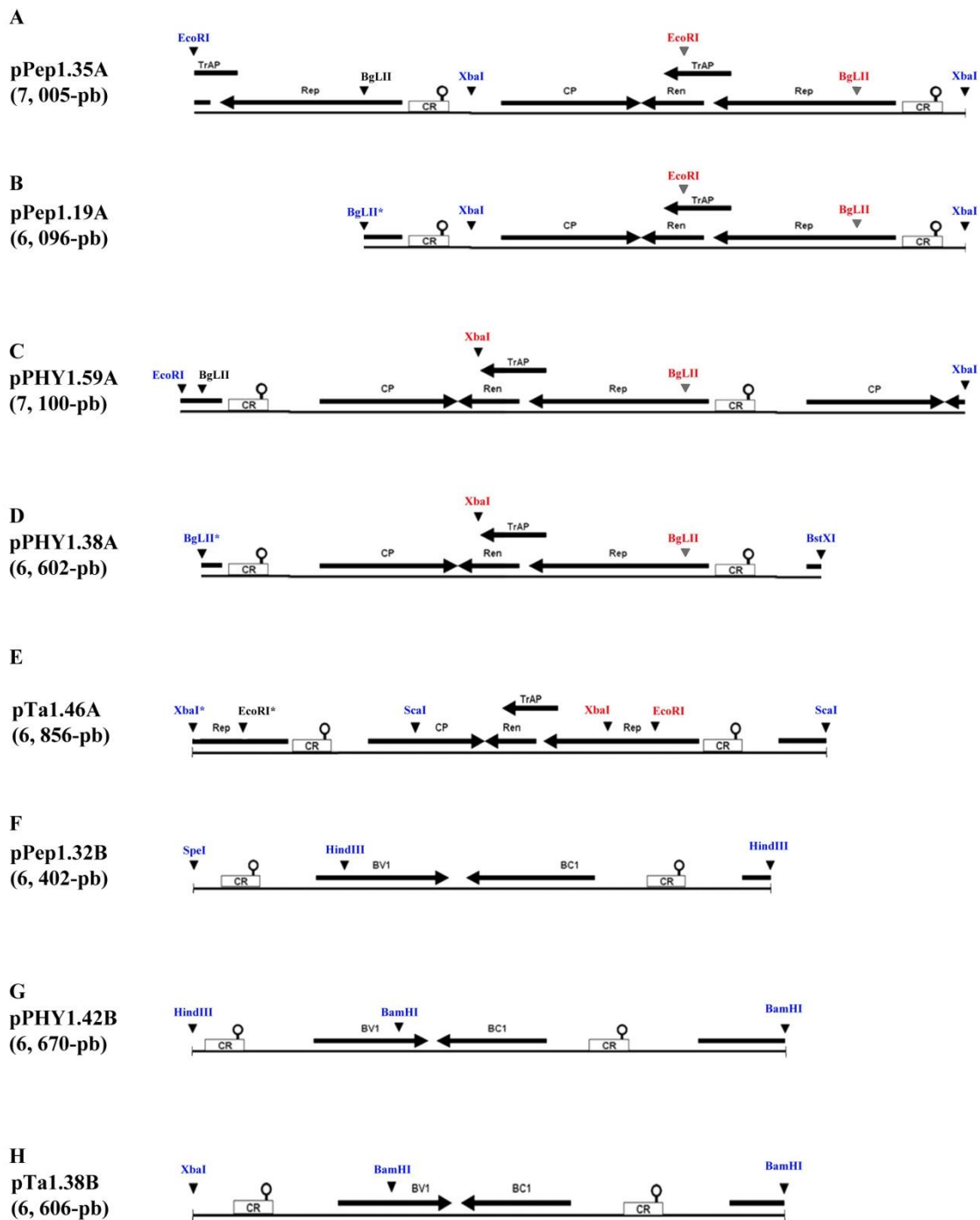
°C por 5 min. En el caso de los extractos de DNA total de las plantas inoculadas con los virus silvestres así como de los virus mutantes, el gen *Rep* de cada virus se amplificó en su totalidad usando los oligos de la Tabla M3 (Anexo 1). Para PepGMV y PHYVV se amplificó un fragmento de 1150-pb; mientras que para ToMoTV, el producto de PCR fue de 1159-pb. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa y posteriormente teñidos con bromuro de etidio. Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEM-Teasy y se secuenciaron en ambas orientaciones con los oligos M13-F y M13-R (Al menos 5 clonas de cada planta). Las secuencias se editaron con el programa Editseq (DNASTAR, Madison, WI), y se analizaron mediante alineamiento múltiple con el programa Clustal V (Megalign, DNASTAR). Solo los cambios que se encontraron conservados en ambas cadenas secuenciadas fueron considerados. De tal forma que la determinación de la frecuencia de mutaciones se calculó como la razón entre el número de mutaciones encontrados y la longitud de la región secuenciada.

### **Southern blot**

El DNA total de las plantas fue extraído por el método AP (Ascencio-Ibañez *et al.*, 2007). Veinte microgramos de DNA total fueron digeridos toda la noche con enzimas de corte único para cada componente viral. Los componentes A y B de PepGMV se cortaron con EcoRI y HindIII, respectivamente; mientras que ambos componentes virales de PHYVV se digirieron con HindIII. Finalmente, ambos componentes de ToMoTV se cortaron con XbaI. Las muestras digeridas se corrieron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente, el gel fue tratado para despurinar, desnaturalizar y neutralizar las muestras antes de transferirlas con SSC 20X (Apéndice L) a una membrana Hybond N+ (Amersham), transfiriendo con NaOH 0.4 N, siguiendo las instrucciones sugeridas por Amersham.

## RESULTADOS

Las clonas infectivas construidas están constituidas por dos repetidos directos de los orígenes de replicación que flanquean una unidad genómica viral (Figura 8 y Tabla 3). Esto permite la inoculación directa del virus y se aprovecha la maquinaria del huésped para liberar al virus.



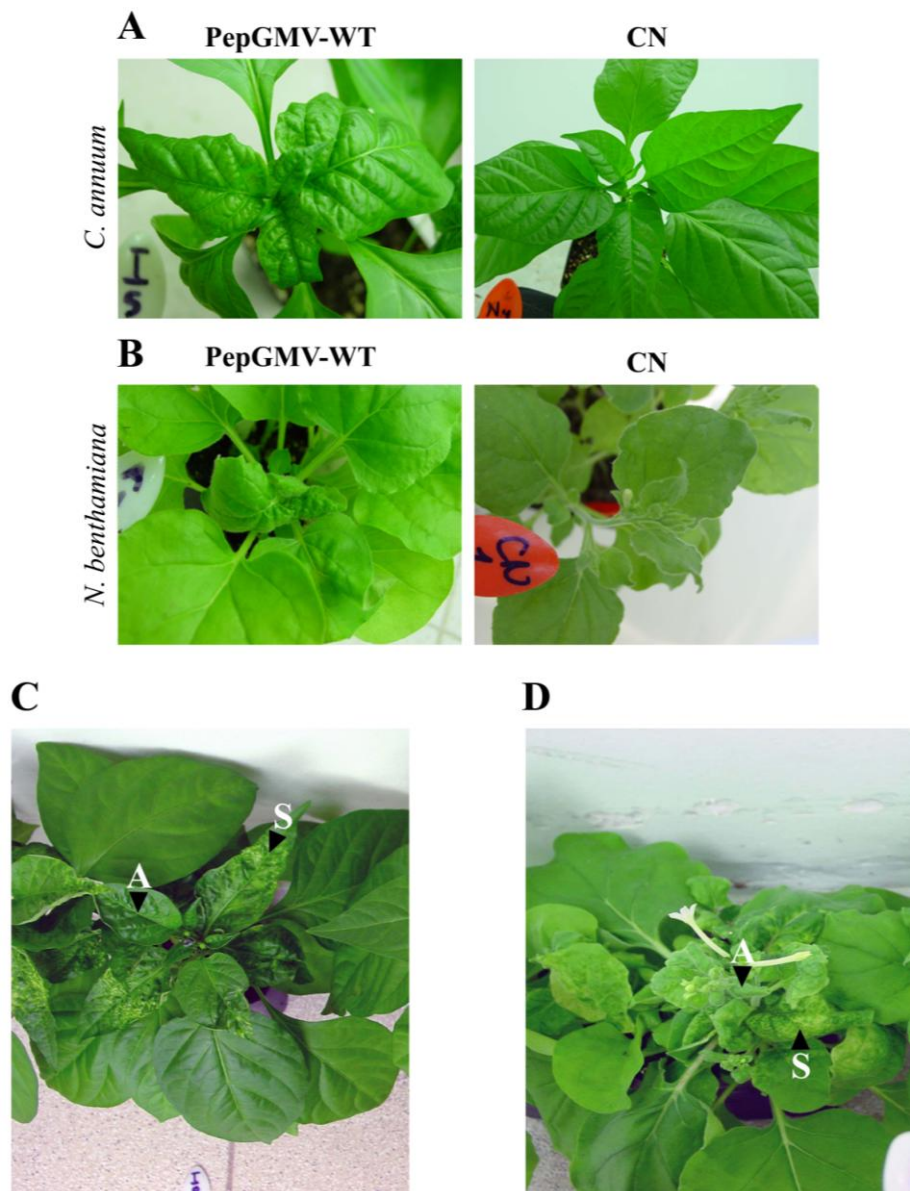
**Figura 8. Estructura de los vectores virales infecciosos de PepGMV, PHYVV y ToMoTV.** Los sitios de restricción utilizados para la generación de los vectores virales se señalan en azul (ver Materiales y Métodos), mientras que los sitios de restricción

usados para la subclonación de las mutaciones se muestran en rojo. En algunos casos, se eliminaron sitios de restricción (marcados con asteriscos) para facilitar la transferencia de las mutaciones.

Para constatar la funcionalidad de las clonas infectivas construidas, se inocularon plantas de *C. annuum* y *N. benthamiana*. La inoculación se realizó mediante bombardeo con partículas de tungsteno cubiertas con el DNA viral de ambos componentes. Las plantas inoculadas se inspeccionaron diariamente con la finalidad de registrar la aparición de síntomas. En cada experimento de infección se incluyeron los controles negativos, los cuales consistían en plantas inoculadas con el vector vacío (pBlueScript: CN). La colecta de muestras se realizó tomando hojas jóvenes, formadas tiempo después de la inoculación por biobalística y se sometieron al análisis por PCR, usando oligonucleótidos específicos para cada virus (Anexo 1: Tabla M3). A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los virus utilizados en este estudio, los cuales engloban varios experimentos independientes.

### **Infección de chile y *N. benthamiana* con PepGMV**

Se generaron dos vectores virales del componente A de PepGMV (Figura 8A y 8B), los cuales, en combinación con el vector viral del componente B (Figura 8F) se utilizaron para inocular plantas de *C. annuum* y *N. benthamiana*. Los síntomas producidos en ambos huéspedes por los vectores virales pPep1.35A y pPep1.19A fueron indistinguibles. Sin embargo, para los propósitos posteriores de la transferencia de mutaciones sólo fue útil el vector viral pPep1.19A. A continuación se describen las características de los síntomas producidos por PepGMV en las plantas de *C. annuum* (los síntomas en las plantas de *N. benthamiana* fueron similares). En *C. annuum*, los síntomas consistían en la aparición de pequeños puntos amarillos y un arrugamiento de las hojas emergentes desde los 6-dpi (Figura 9; A y B). Los puntos amarillos evolucionaron a mosaicos amarillos y la severidad del arrugamiento causó la distorsión de las hojas nuevas, y una marcada disminución del crecimiento apical. Los síntomas ocasionados por PepGMV fueron más marcados en las plantas de *C. annuum* que en *N. benthamiana*. Las plantas de ambas especies inoculadas con el vector vacío (pBS) no presentaron ningún signo de virosis a lo largo del experimento (Figura 9; A y B: CN).



**Figura 9. Infectividad de PepGMV-WT (pPep1.19A y pPep1.32B).** Los síntomas causados por PepGMV en plantas de *C. annuum* (A) y *N. benthamiana* (B) a 7-dpi consistían en mosaicos amarillos, así como distorsión de las hojas y una disminución del tamaño de la planta. Los controles negativos (CN) no mostraron ningún signo de enfermedad (A y B). Con el paso del tiempo los síntomas disminuyeron de intensidad en las hojas nuevas, iniciando este fenómeno aproximadamente entre los 12 a 14-dpi. La remisión se presentó en ambas especies de plantas (C y D; 37-dpi). Las hojas aún sintomáticas (“S”), así como las hojas nuevas asintomáticas (“A”) son señaladas.

En todos los experimentos realizados con PepGMV-WT las eficiencias de infección fueron variables. No obstante, los resultados que se presentan en este trabajo son de aquellos experimentos con una eficiencia de al menos el 95 % en ambas especies de plantas. En la Figura 12A (PepGMV-WT) se muestra un esquema representativo de dos experimentos independientes realizados en

*C. annuum* (20 plantas). Como se mencionó anteriormente, los primeros síntomas se registraron a partir de los 6-dpi; los cuales se agravaron con el paso del tiempo. Sin embargo, entre los 12 y 14-dpi se observó una disminución en la severidad de los síntomas, especialmente en las hojas recién emergidas, que exhibieron síntomas muy atenuados y finalmente ninguno. Este fenómeno, conocido como remisión, fue más evidente en las plantas de *C. annuum* (Figura 9C) que en las plantas de *N. benthamiana* (Figura 9D).

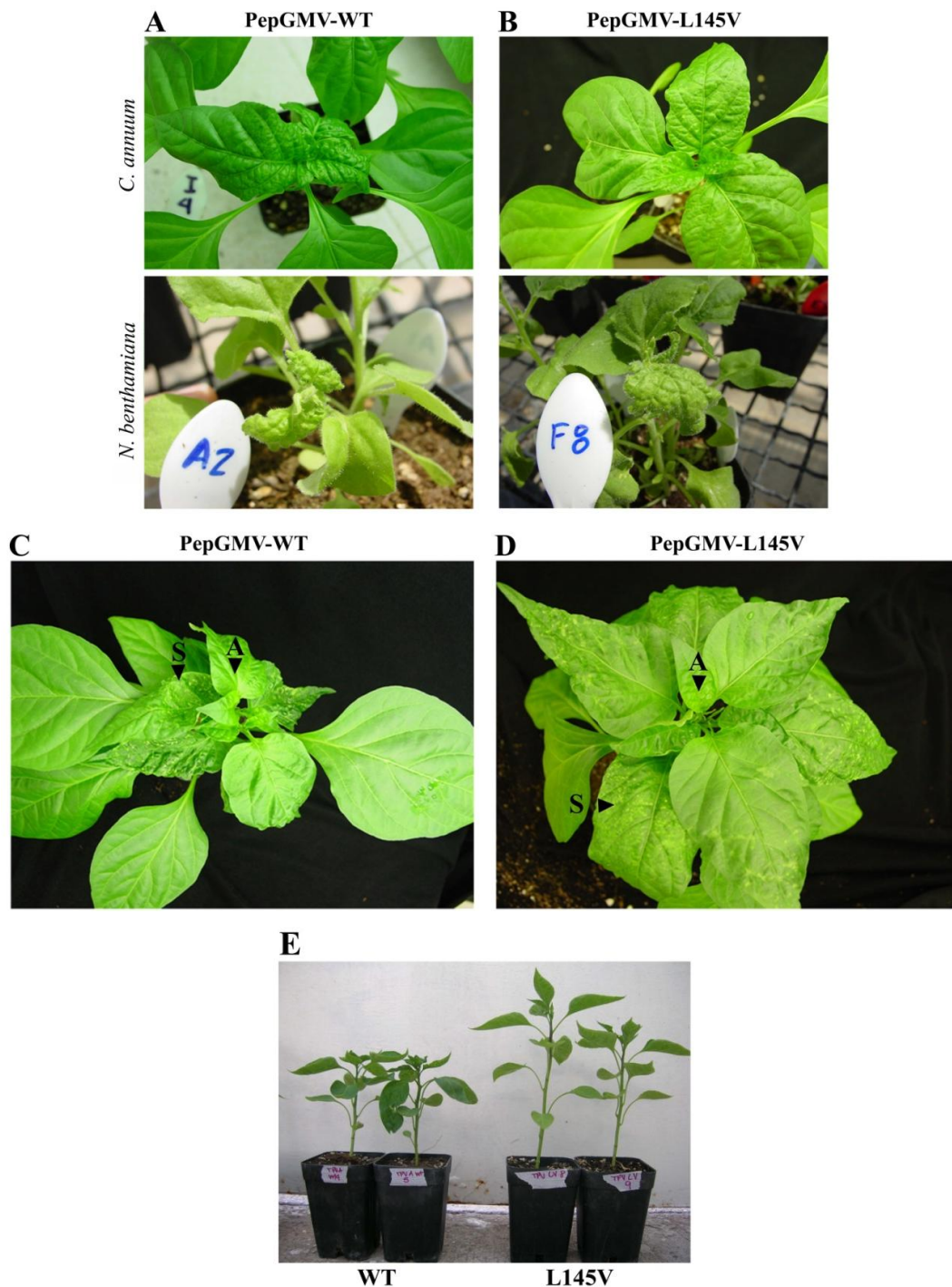
Con el propósito de explorar si la progenie viral producida en las hojas nuevas (con remisión de síntomas) poseía cambios a nivel de secuencia nucleotídica, se extrajo DNA viral de las hojas asintomáticas (A) y sintomáticas (S) de un grupo de 5 plantas de cada especie (Figura 9; C y D) y se amplificó un fragmento de 1150-pb del gen *Rep* de PepGMV, usando los oligos P19 y P20 (Anexo 1: Tabla M3). El análisis de las secuencias no mostró ningún cambio a lo largo de este segmento de DNA.

### **El efecto de las mutaciones en la infectividad de PepGMV**

Una vez caracterizados los síntomas producidos por PepGMV-WT, se evaluó el efecto de las mutaciones introducidas en la proteína Rep de PepGMV (Figura 7B). Las tres mutaciones (L145V, L145A y L145T) se transfirieron al fondo silvestre reemplazando la región EcoRI-BglII del gen *Rep* de PepGMV (Figura 8B). Con los vectores virales mutantes de PepGMV (Anexo 1: Tabla M2), se inocularon plantas de *C. annuum* y *N. benthamiana* y se registró el fenotipo causado por cada uno de ellos.

#### **A. La mutación L145V no afecta dramáticamente la infectividad de PepGMV**

Ambas especies de plantas fueron inoculadas con el vector viral pPep1.19L145V (en combinación con pPep1.32B). Las plantas de ambas especies inoculadas con el virus PepGMV-L145V presentaron una sintomatología similar a la causada por el virus parental (PepGMV-WT); es decir, el desarrollo de mosaicos amarillos, acompañado con distorsión de las hojas jóvenes (Figura 10; comparar columna A con B).



**Figura 10. Síntomas causados por PepGMV-L145V.** Los síntomas provocados por PepGMV-L145V son indistinguibles de los causados por PepGMV-WT. Comparación de síntomas causados por PepGMV-WT (A) y PepGMV-L145V (B) a 7-dpi en plantas de *C. annuum* (panel superior de A y B) y plantas de *N. benthamiana* (panel inferior de A y B). La remisión de síntomas se presentó en ambas especies de plantas. En la figura solo se muestran las plantas de *C. annuum* con remisión de síntomas a los 15-dpi (C: PepGMV-WT; D: PepGMV-L145V). Adicionalmente, se observó una diferencia en el tamaño de las plantas entre las inoculadas con el virus silvestre y la mutante L145V (E).

Aunque a simple vista los signos de la enfermedad causados por PepGMV-L145V parecían ser similares, se encontró una diferencia significativa en la cinética de aparición de plantas sintomáticas en ambas especies de plantas (Figura 12A y 12B; PepGMV-L145V) y una notable diferencia en el tamaño de las plantas al final del experimento (Figura 10E). Finalmente, en lo que respecta a las observaciones del efecto fenotípico, la remisión de síntomas se presentó en ambas especies de plantas inoculadas con PepGMV-L145V (Figura 10D).

Para explorar la posibilidad de que la sintomatología causada por PepGMV-L145V fuera el resultado de la aparición de virus revertantes durante el curso de la infección, se extrajo el DNA viral de todas las plantas inoculadas (ambos huéspedes: 40 plantas en total) y se amplificó el gen *Rep* con los oligos P19 y P20 (Anexo 1: Tabla M3). Los productos de PCR (1150 pb) fueron clonados y secuenciados en su totalidad (al menos 5 secuencias por planta). El análisis reveló que la mutación original (L145V) aún se conservaba en todas las plantas analizadas, sin ningún cambio adicional en el gen *Rep*. Por lo tanto, el fenotipo descrito anteriormente en ambas especies de plantas es exclusivo de la mutación introducida L145V y no de cambios adicionales en el genoma. Además, el análisis de los niveles de replicación de PepGMV-L145V en plantas tomadas al azar en diferentes puntos del experimento mostró que la replicación de PepGMV-L145V era equiparable a la del virus silvestre (Figura 13A), apoyando la idea de que la mutación L145V es la única responsable del fenotipo descrito en los dos huéspedes inoculados. En resumen, estos datos indican que la mutación L145V no afectó significativamente la infectividad de PepGMV y que ese cambio genético permaneció estable en el curso de la infección.

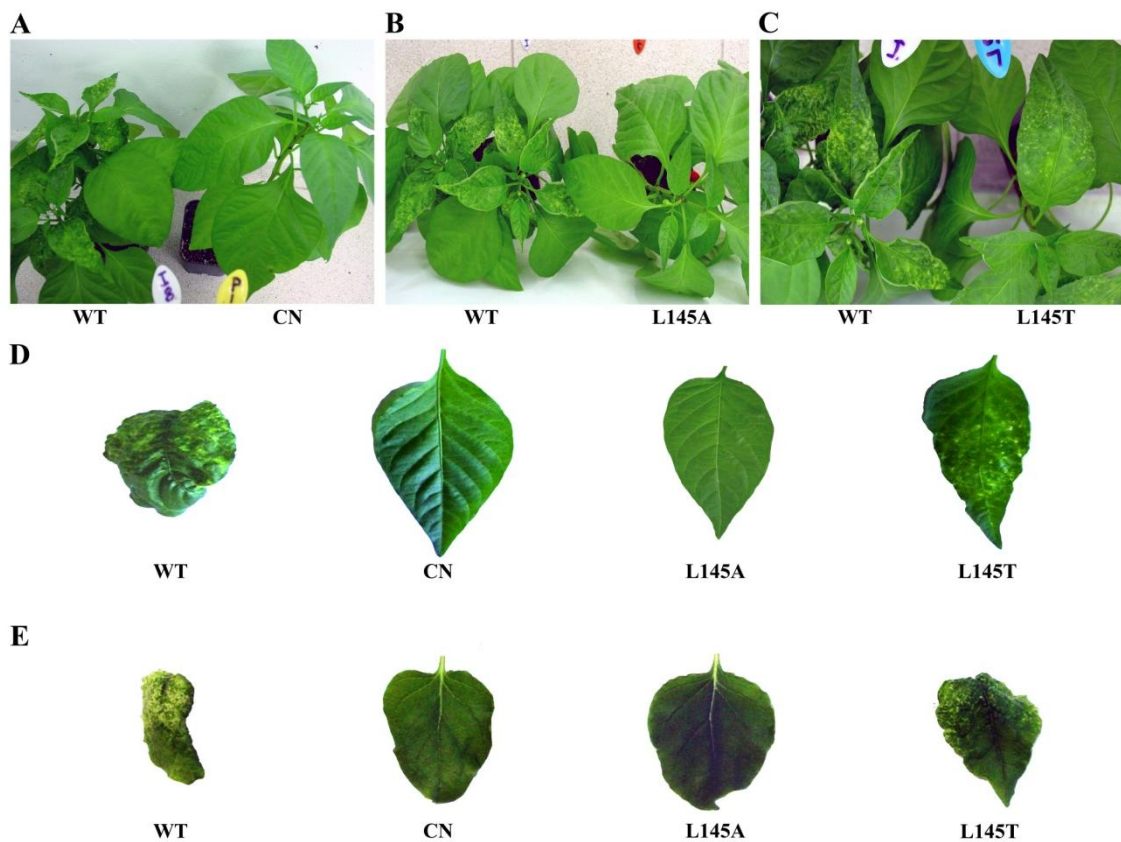
#### **B. La mutación L145A no causa síntomas visibles, pero hay replicación viral**

Se inocularon 20 plantas de *C. annuum* y 20 plantas de *N. benthamiana*. Posteriormente se inspeccionaron diariamente para el registro de plantas con síntomas de virosis. No obstante, el virus PepGMV-L145A no causó síntomas apreciables a simple vista (Figura 11B); aunque una inspección más detallada reveló la presencia de pequeños puntos amarillos apenas perceptibles. El



seguimiento de todas las plantas inoculadas de ambas especies no mostró ningún progreso de los síntomas (puntos amarillos) hasta el final del experimento (30 a 45-dpi). De hecho, el aspecto general de las plantas fue similar a los controles negativos (Figura 11; D y E).

La extracción del DNA total de las plantas inoculadas y la amplificación posterior del gen *Rep* con los oligos P19 y P20 reveló la presencia de DNA viral en todas las plantas inoculadas. En el análisis de las secuencias de la progenie viral no se encontraron cambios adicionales a lo largo del gen *Rep*, solo la presencia de la mutación original (L145A). Contra lo esperado, en el análisis por Southern blot de las plantas inoculadas no se logró detectar acumulación de DNA viral (Figura 13A), lo que sugiere que los niveles de replicación viral son extremadamente bajos. A la luz de estos resultados, se concluye que la sustitución del residuo de Leucina por Alanina en la posición 145 del gen *Rep* resultó en una infección con síntomas muy atenuados, y en descenso muy notable de los niveles de replicación de PepGMV, pero la mutación permaneció estable a lo largo del proceso de infección.



**Figura 11. Diferencias en la severidad de los síntomas causados por PepGMV-WT, PepGMV-L145A y PepGMV-L145T a los 37-dpi.** En A, comparación entre una planta inoculada con PepGMV-WT y una planta inoculada con el vector pBS (CN). Las



plantas inoculadas con PepGMV-L145A y PepGMV-L145T son comparadas con la sintomatología causada por el virus silvestre (B y C, respectivamente). En D (*C. annuum*) y E (*N. benthamiana*) se muestran hojas del mismo nivel de desarrollo con los diferentes fenotipos causados por cada mutante de PepGMV a los 30-dpi. El fenotipo de PepGMV-L145V no es mostrado, pero es similar al de PepGMV-WT.

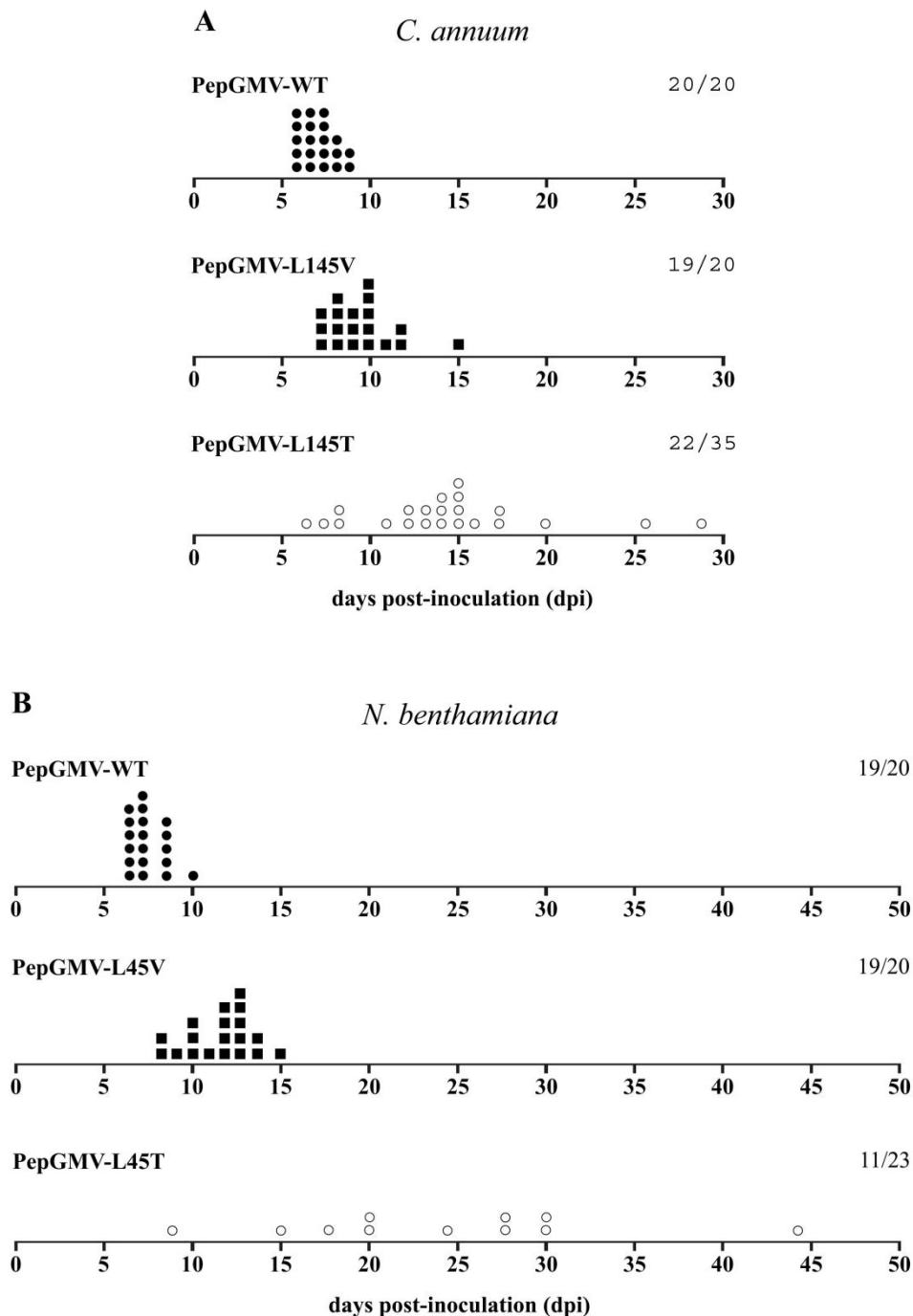
### **C. La mutación L145T en PeGMV es inestable y revierte durante el curso de la infección.**

La evaluación del efecto de la mutación L145T en las plantas de ambas especies arrojó resultados interesantes. En los experimentos realizados con *C. annuum*, se inocularon 35 plantas (cuatro experimentos independientes), mientras que en *N. benthamiana* se inocularon 23 plantas (tres experimentos independientes).

Mientras que la mayoría de las plantas inoculadas con el virus silvestre mostró sintomatología característica de PepGMV entre los 6 y 8-dpi, las plantas inoculadas con PepGMV-L145T se mantuvieron asintomáticas durante ese periodo (Anexo 2: Figura R1B). Con el paso del tiempo, las plantas inoculadas con PepGMV-L145T desarrollaron síntomas similares a las causadas con el virus silvestre (Figura 11C; también ver Figura R1B de Anexo 2). La determinación de los niveles de DNA viral en las plantas inoculadas con PepGMV-L145T, tomadas aleatoriamente en tres puntos específicos del experimento, mostró que el retardo en la aparición de plantas sintomáticas correlacionaba con la acumulación de DNA viral en etapas tardías (Comparar Figura 12A con Figura 13A).

Al final del experimento (30-dpi), el análisis por PCR de las plantas de *C. annuum* inoculadas con PepGMV-L145T mostró que aproximadamente el 88% de ellas mostraba replicación de DNA viral (31/35) (ver Tablas R1 y R2 de Anexo 3). Si se toma de referencia el número de plantas positivas por PCR (31), entonces el 71% de ellas correspondía a las plantas con reversión fenotípica (22/31); en tanto que el resto fueron plantas asintomáticas (9/31; 29%). En las plantas de *N. benthamiana* se presentó una situación similar. El análisis por PCR mostró que el 70% de las plantas inoculadas sustentaban la replicación del virus (16/23) (ver Tablas R3 y R4 de Anexo 3). Nuevamente tomando como referencia solamente a las plantas con replicación viral (16), aproximadamente el 68% correspondían a las plantas con reversión fenotípica

(11/16); mientras que el resto de las plantas eran asintomáticas pero positivas por PCR (5/16; ~32%).



**Figura 12. La cinética de aparición de síntomas en plantas inoculadas con PepGMV-L145T es diferente a la del virus silvestre. En A y B, se presentan las cinéticas de aparición de síntomas en plantas de *C. annuum* y *N. benthamiana* (respectivamente) inoculadas con PepGMV-WT, PepGMV-L145V y PepGMV-L145T. Los días en que aparecieron los síntomas característicos de PepGMV son indicados con símbolos diferentes para cada construcción. Los números de la derecha indican el número de plantas que presentaron síntomas contra las plantas inoculadas. En el caso de PepGMV-L145A no fue posible la elaboración de una gráfica debido a que fue difícil**

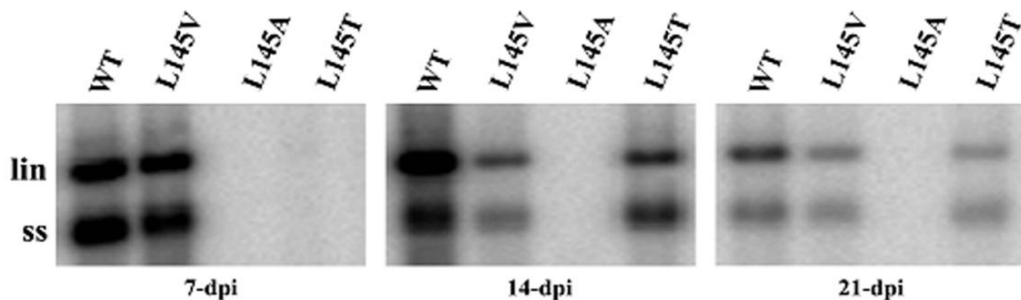
detectar las plantas sintomáticas a lo largo del experimento. Los datos presentados representan dos experimentos independientes para PepGMV-WT y PepGMV-L145V; mientras que para PepGMV-L145T es la condensación de 4 (A) y 3 (B) experimentos, respectivamente.

Se analizaron las secuencias de la progenie viral producida en las plantas con aparente reversión fenotípica (Figura 12; PepGMV-L145T), así como en las plantas asintomáticas pero con replicación viral. En las plantas de *C. annuum* y *N. benthamiana* con reversión fenotípica se encontraron diversos genotipos (variantes), incluyendo el del virus parental (PepGMV-L145T) en algunos casos; en tanto que en las plantas asintomáticas solo se encontró al virus parental (Anexo 3: Tablas R2 y R4). En las plantas de *C. annuum* con reversión fenotípica se encontró al virus parental coexistiendo con los virus revertantes en 9 de 22 casos. Los genotipos revertantes que fueron recuperados consistían de 5 tipos distintos (Figura 13B): 1) [T145I], en el que el residuo mutante original (Thr) fue cambiado a Isoleucina (Ile) por una transición C-T en la segunda posición del codón; 2) [V136I:L145T], mutación compensatoria en el residuo 136 que cambió de Val a Ile por una transición G-A en el primer nucleótido del codón (GTA a ATA); 3) [V136L:L145T], similar al anterior pero en el que el residuo Val136 fue sustituida por Leu como resultado de uno de dos cambios diferentes, las transversiones G-T (GTA a TTA) o G-C (GTA a CTA); 4) [I167L:L145T], mutación compensatoria en el codón 167 que cambió el aminoácido Ile a Leu, por una transversión A-C en el primer nucleótido del codón (ATA a CTA); 5) En un solo caso se encontró una mutante [K125E:V136I:L145T] involucrando dos mutaciones en codones diferentes al 145 con la mutación original, L145T; la mutación en el codón 125 del gen *Rep* involucró una transición A-G (AAA a GAA). Entre lo más destacado de los datos obtenidos en las infecciones de plantas de Chile fue el hallazgo de más de un genotipo revertante en la progenie viral de una misma planta, lo cual se observó en 11 de las 22 plantas con reversión fenotípica (Anexo 3: ver Tabla R2).

En el caso de las plantas de *N. benthamiana* que exhibieron reversión fenotípica, el virus parental (PepGMV-L145T) se encontró coexistiendo con genotipos revertantes en 6 de las 11 plantas analizadas (Anexo 3: ver Tabla R4). Los genotipos revertantes fueron los mismos que se encontraron en las

plantas de Chile (Figura 13B), aunque su frecuencia relativa fue marcadamente diferente, pues los genotipos [T145I] y [V136L:L145T] se encontraron en 5 (45%) y 3 (27%) de las 11 plantas que mostraron reversión fenotípica, respectivamente; lo que contrasta de modo notorio con las incidencias del 18% y el 50% de las mismas revertantes aisladas de las plantas de Chile.

**A**



**B**

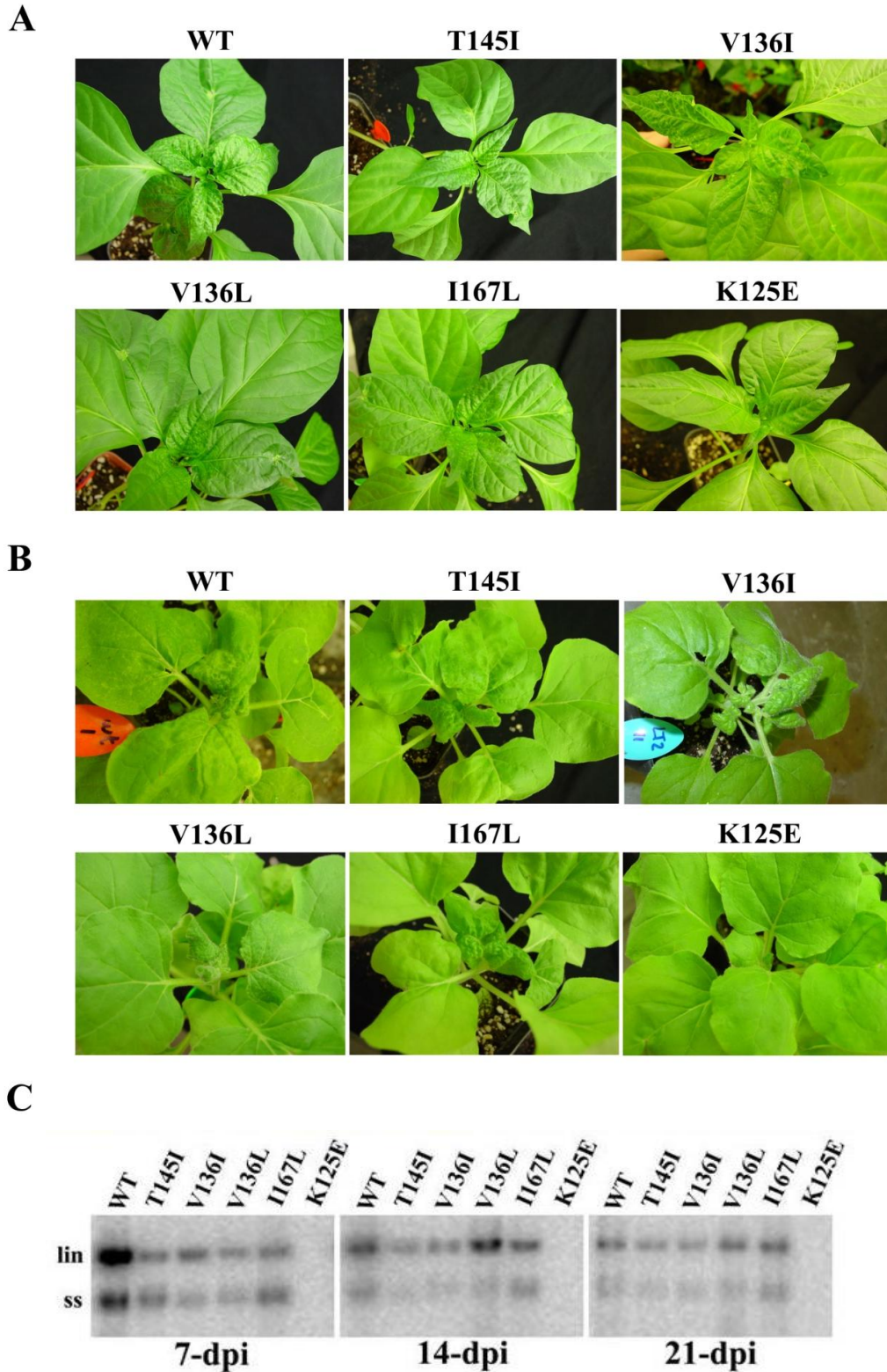
	<u>Motif III</u>	<u>helix 3</u>	<u>helix 4</u>
WT	VKNYITK-14-GSKANKDDVYHNAVNAASAGEA	L	LDIIKAGDPKTFIVSYHNIKANIERLFTTTP
L145T	VKNYITK-14-GSKANKDDVYHNAVNAASAGEA	T	LDIIKAGDPKTFIVSYHNIKANIERLFTTTP
T145I	VKNYITK-14-GSKANKDDVYHNAVNAASAGEA	I	LDIIKAGDPKTFIVSYHNIKANIERLFTTTP
V136I:L145T	VKNYITK-14-GSKANKDDVYHNA	I	NAASAGEA
V136L:L145T	VKNYITK-14-GSKANKDDVYHNA	L	NAASAGEA
I167L:L145T	VKNYITK-14-GSKANKDDVYHNAVNAASAGEA	T	LDIIKAGDPKTFIVSYHNIKAN
K125E:V136I:L145T	VKNYITK-14-GS	E	ANKDDVYHNA

**Figura 13. La acumulación viral de PepGMV-L145T inicia en etapas tardías.** Un fragmento del gen *Rep* se utilizó como sonda para detectar la replicación del virus silvestre, así como de los virus mutantes en plantas de *C. annuum* en diferentes tiempos (A). Las formas de DNA viral son indicadas como lineal (lin) y DNA de cadena sencilla (ss). Los diversos genotipos encontrados en las plantas con reversión fenotípica son mostrados en B. El motivo III, así como las hélices 3 y 4 son indicados. La mutación original se muestra en rojo, mientras que los cambios que aparecieron durante el curso de la infección se muestran en azul. Las frecuencias de cada genotipo fueron las siguientes: a) En *C. annuum* el virus parental [L145T] se encontró en 18/31; [T145I] en 4/31; [V136I:L145T] en 6/31; [V136L:L145T] en 11/31; [I167L:L145T] en 6/31 y [K125E:V136I:L145T] en 1/31. b) En *N. benthamiana*, el virus parental [L145T] se encontró en 11/16; [T145I] en 5/16; [V136I:L145T] en 2/16; [V136L:L145T] en 3/16; [I167L:L145T] en 1/16 y [K125E:V136I:L145T] en 1/16.

#### **D. El efecto deletéreo de L145T es suprimido por mutaciones compensatorias.**

Para examinar si cada uno de los genotipos encontrados en los experimentos con PepGMV-L145T (Figura 13B) jugaban realmente algún papel en la sintomatología observada en las plantas de las cuales se recuperaron, se procedió a transferir cada una de estas probables mutaciones compensatorias al vector pPep1.19A y se generaron los vectores virales pPep1.19A-T145I,

pPep1.19A-V136L(CTA), pPep1.19A-V136L(TTA), pPep1.19A-V136I, pPep1.19A-I167L y pPep1.19A-K125E. La transferencia de cada uno de las probables mutaciones compensatorias al fondo silvestre de PepGMV, se realizó con los sitios EcoRI y BgIII (Figura 8B).



**Figura 14. Infectividad de los virus revertantes de PepGMV con mutaciones compensatorias.** Ambas especies de plantas se inocularon con las clonas infectivas

de PepGMV conteniendo las probables mutaciones compensatorias ([T145I], [V136I:L145T], [V136L:L145T], [I167L:L145T] y [K125E:V136I:L145T]), así como con el virus silvestre (WT). Los fenotipos causados por cada uno de los virus mutantes en plantas de *C. annuum* (A) y plantas de *N. benthamiana* (B) a los 7-dpi son mostrados. Los niveles de replicación de cada genotipo son comparados con respecto al virus silvestre a diferentes tiempos (C).

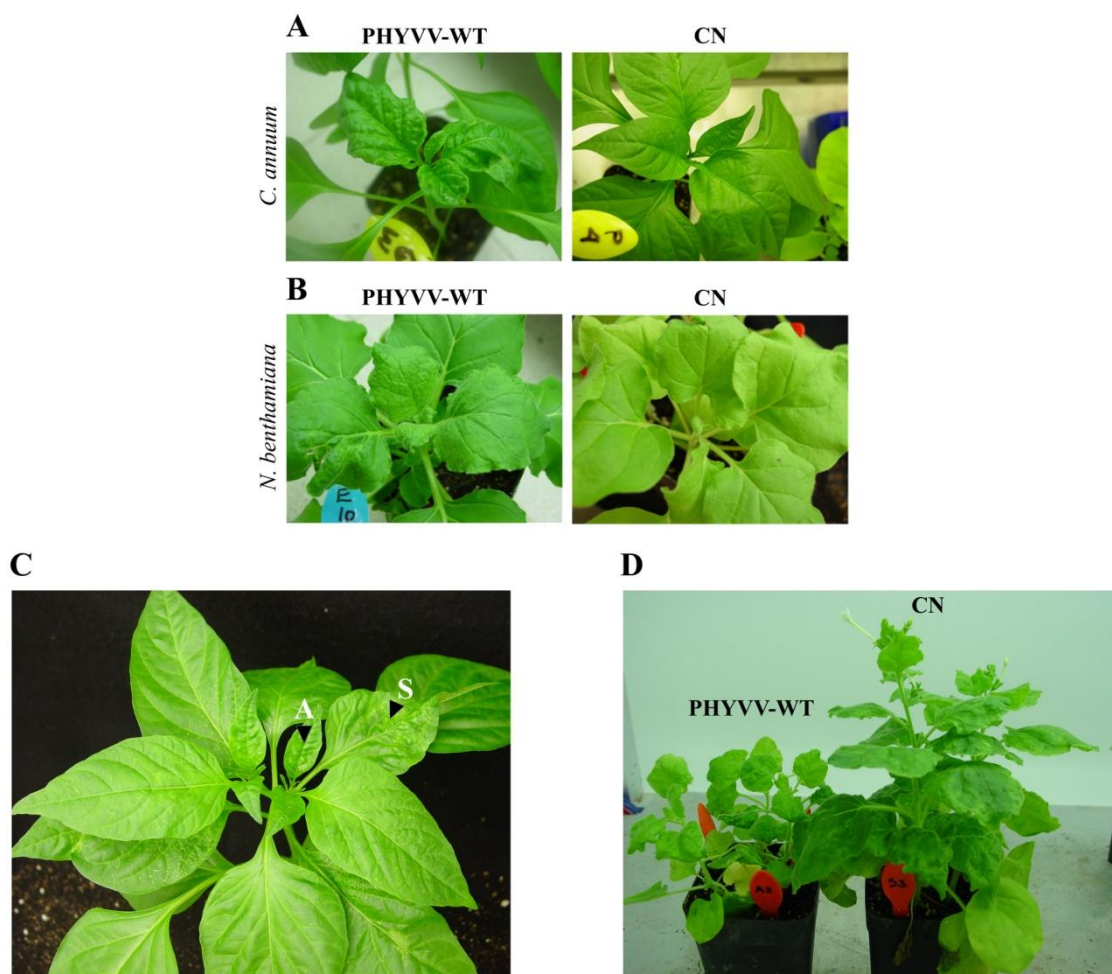
Diez plantas de ambas especies vegetales fueron inoculadas con cada uno de los vectores virales descrito anteriormente y se inspeccionaron periódicamente para el registró de síntomas. Ambas especies de plantas inoculadas con el virus PepGMV-WT desarrollaron síntomas típicos de este virus a los 6-dpi (Figura 14A y 14B). De forma interesante, las plantas inoculadas con los vectores virales conteniendo las probables mutaciones compensatorias descritas anteriormente presentaron una sintomatología similar a la producida por el virus silvestre, excepto pPep1.19A-K125E (Figura 14A y 14B). Además, la cinética de aparición de plantas sintomáticas también fue similar a la del virus silvestre (Anexo 3: Tabla R9). Los niveles de replicación de cada genotipo fueron equiparables a los del virus silvestre (Figura 14C). En conjunto, nuestros resultados demuestran que los cambios individuales T145I, V136I, V136L e I167L son efectivamente los responsables de la reversión fenotípica observada en nuestros experimentos.

### **PHYVV causa síntomas característicos en ambas especies de plantas**

Los ensayos de infectividad con los vectores virales de PHYVV (pPHY1.59A, pPHY1.38A y pPHY1.42B) en ambas especies de plantas causaron síntomas ligeramente menos drásticos que los provocados por PepGMV. Aunque el vector viral pPHY1.59A fue infeccioso (no mostrado), para los propósitos de la transferencia de las mutaciones no fue adecuado. Los síntomas inducidos por PHYVV en ambas especies de plantas involucraban la aparición de clorosis en las venas, rugosidad de las hojas y un mosaico fino (Figura 15A y 15B). Estos síntomas aparecieron desde los 6-dpi y se agravaron con el paso del tiempo. En todas las plantas infectadas (ambas especies: 32/35 plantas), la remisión de síntomas se observó en un periodo de 12 a 14-dpi (Figura 15C), y al igual que en PepGMV, las plantas no se recuperaron por completo hasta el final del experimento (Figura 15D). No obstante, en las plantas co-inoculadas con



PepGMV y PHYVV (infección mixta) no se observó el fenómeno de remisión, y la sintomatología fue más severa (Anexo 2: Figura R3).



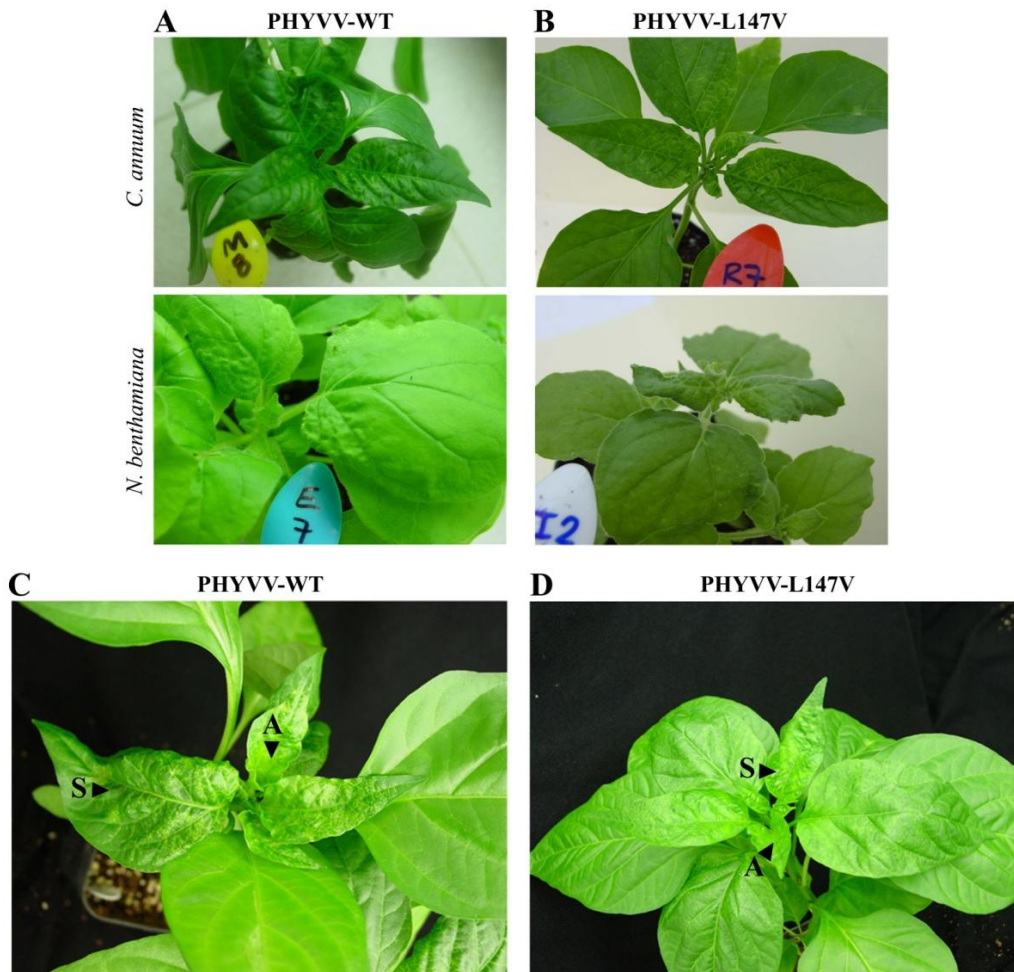
**Figura 15. Infectividad de PHYVV-WT (pPHY1.38A y pPHY1.42B).** Plantas de *C. annuum* y *N. benthamiana* fueron inoculadas con los vectores virales de PHYVV. La aparición de plantas sintomáticas de ambas especies se registró desde los 6-dpi (A y B; PHYVV-WT), mientras que los controles negativos no presentaron ningún síntoma hasta el final del experimento (A y B; CN). La remisión de síntomas (C), así como el enanismo fue un fenómeno común en las plantas inoculadas con PHYVV-WT (D) y PepGMV (no mostrado).

### El efecto de las mutaciones L147V, L147A y L147T en PHYVV

El efecto de las mutaciones introducidas en el gen *Rep* de PHYVV también se evaluó al inocular plantas de *C. annuum* y *N. benthamiana*. Al igual que en PepGMV, los experimentos de infectividad mostraron resultados que se pueden clasificar en tres grupos.

### A. PHYVV L147V causa síntomas similares al virus silvestre

La inoculación de las plantas de *C. annuum* y *N. benthamiana* (40 plantas en total) con el vector viral mutante pPHY1.38L147V produjo una sintomatología similar a la del virus silvestre; aunque atenuada (Figura 16B; comparar con 16A). El fenómeno de recuperación (remisión) se observó también en las plantas inoculadas con el virus mutante (Figura 16D), así como en las plantas inoculadas con el virus silvestre (Figura 16C).



**Figura 16. La sintomatología causada por PHYVV-L147V es similar a la de PHYVV-WT.** Las plantas inoculadas con PHYVV-L147V mostraron síntomas en el mismo tiempo que el virus silvestre en ambas especies de plantas (A y B). No obstante, la sintomatología causada por PHYVV-L147V fue ligeramente menos drástica que la causada por el virus silvestre. La remisión de síntomas también fue similar entre las dos construcciones (comparar C y D).

Notablemente, las cinéticas de aparición de plantas sintomáticas (ambas especies) fueron ligeramente diferentes a las del virus silvestre, con un desfase aparente de 2 a 3 días, lo que sugería la presencia de virus revertantes (Figura 18A y 18B). Sin embargo, la amplificación del gen *Rep* de PHYVV con los



oligos P21 y P22 (Anexo 1: Tabla M3) a partir de los extractos totales de DNA de las plantas inoculadas mostró que la progenie viral no contenía cambios adicionales en el gen *Rep*, descartando la reversión fenotípica en estos experimentos. Más aún, el análisis de los niveles de replicación del virus mutante (L147V) a diferentes tiempos durante el curso de la infección demostró que efectivamente el virus se replicaba a niveles equiparables al virus silvestre (Figura 19A), indicando así que el aparente desfase de aparición de síntomas obedece a su detección tardía por la menor severidad de los mismos. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la mutación L147V no causa un efecto detrimental significativo sobre la infectividad de PHYVV.

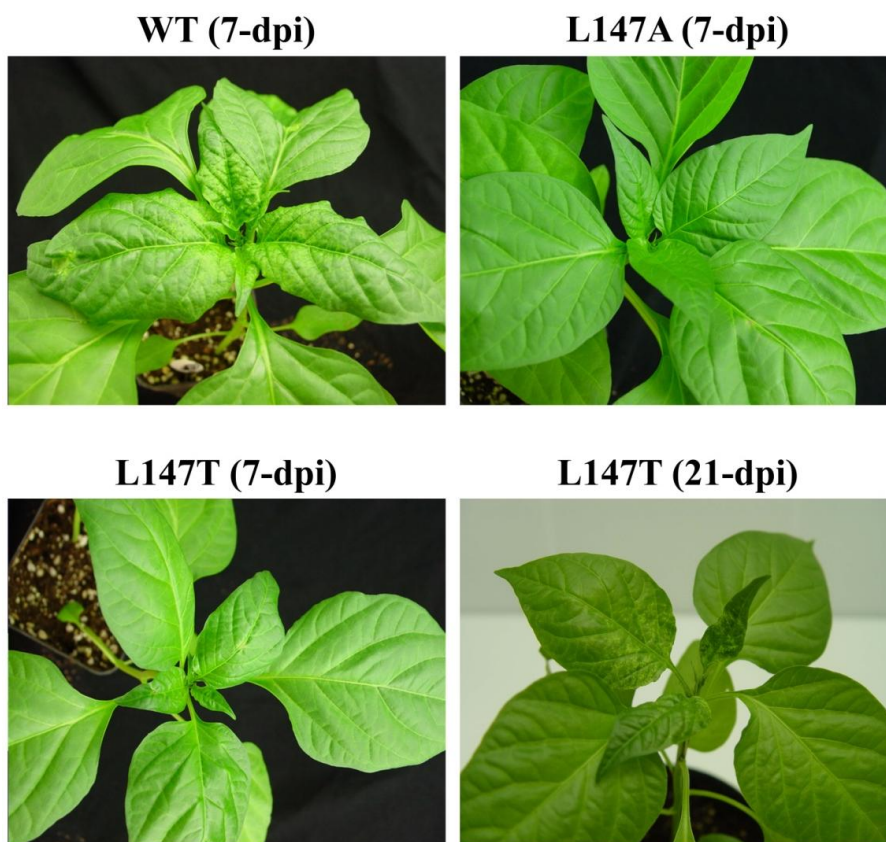
### **B. La mutación L147A afecta la replicación de PHYVV**

Las plantas de ambas especies inoculadas con el virus mutante PHYVV-L147A (20 plantas de *C. annuum* y 20 plantas de *N. benthamiana*) se mantuvieron asintomáticas desde el inicio hasta el final del experimento (Figura 17; L147A). En el análisis por PCR con los oligos P21 y P22 (Anexo 1: Tabla M3) no se detectó DNA viral en ninguna de las plantas inoculadas (ambas especies), por lo que los extractos totales de DNA fueron usados para enriquecer la probable existencia de DNA viral en bajo número de copias, mediante la polimerasa phi29 de TempliPhi™. Aún con el enriquecimiento de estos extractos y su posterior análisis por PCR, nuevamente se obtuvieron resultados negativos. Los mismos resultados negativos se obtuvieron al analizar las mismas plantas por Southern blot (Figura 19A), por lo que se concluyó que la mutación L147A elimina por completo la capacidad de replicación de PHYVV.

### **C. Reversión fenotípica de las plantas inoculadas con PHYVV L147T.**

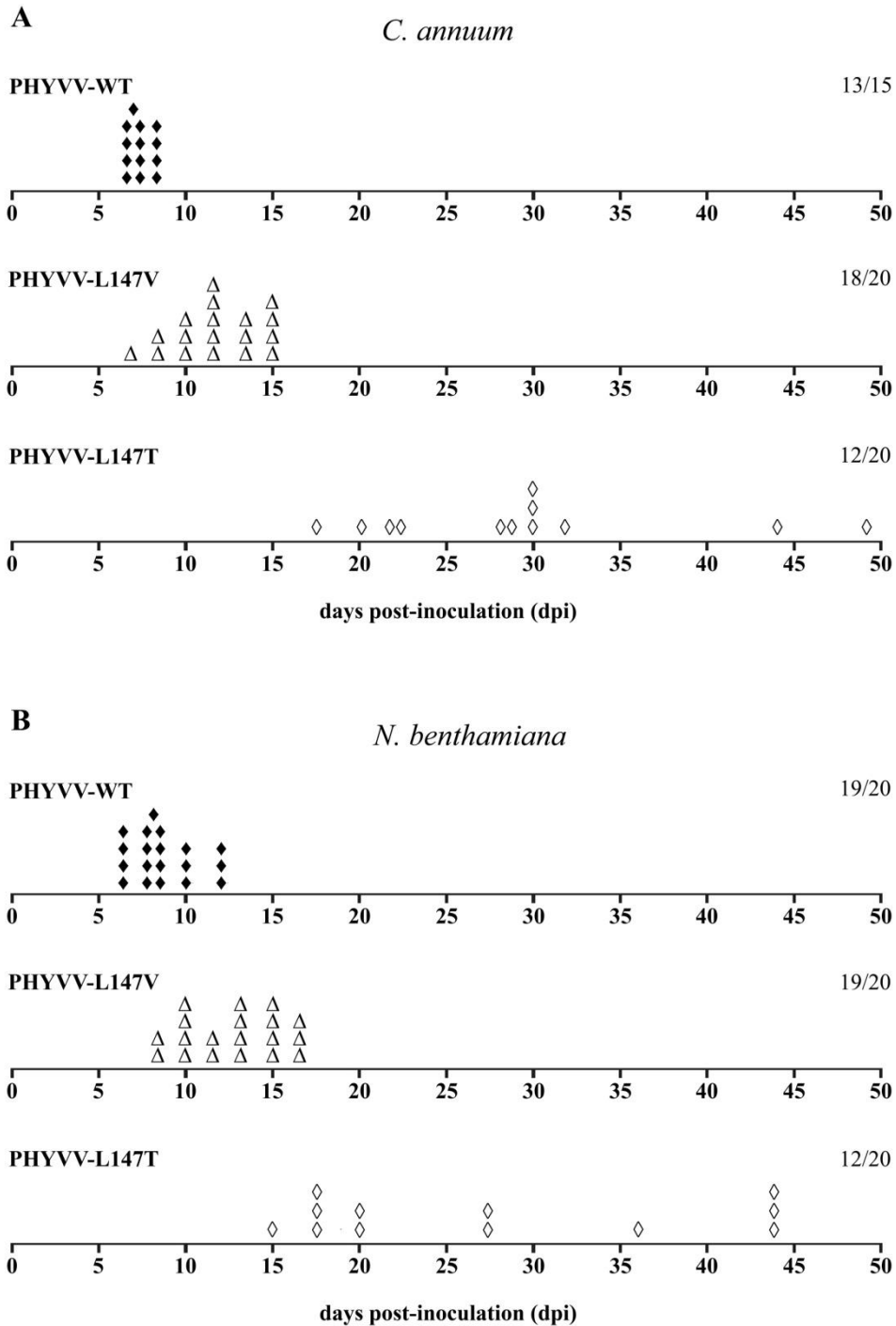
Las plantas de *C. annuum* (20 plantas) y *N. benthamiana* (20 plantas) que se inocularon con PHYVV L147T mostraron resultados similares a los obtenidos con PepGMV L145T; es decir, un retraso en la aparición de síntomas con respecto a los controles positivos (Figura 17; Figura 18A y 18B). Los síntomas observados en las plantas con reversión fenotípica incluían los síntomas característicos de PHYVV: clorosis en las venas, rugosidad de las hojas y un mosaico fino (Figura 17; L147T; 21-dpi). En la figura R2B (Anexo 2) se muestra

la sintomatología de las plantas de ambas especies inoculadas con el virus PHYVV-L147T.



**Figura 17. Fenotipo de plantas de *C. annuum* inoculadas con PHYVV-L147A y PHYVV-L147T.** Las plantas inoculadas con el virus PHYVV silvestre presentaron síntomas característicos de este virus (parte superior izquierda). Por otro lado, las plantas inoculadas con los virus mutantes PHYVV-L147A (parte superior derecha) y PHYVV-L147T (parte inferior izquierda) se mantenían asintomáticas en el mismo periodo de tiempo. De forma notable, solo las plantas inoculadas con PHYVV-L147T presentaron síntomas similares a los producidos por el virus silvestre en etapas tardías (parte inferior derecha). Los mismos fenotipos fueron registrados en *N. benthamiana* (no mostrado).

El porcentaje de plantas que experimentaron reversión fenotípica fue similar en ambas especies (60%=12/20) (Figura 18; ver Anexo 3: Tablas R5 y R7). No obstante, el análisis por PCR de todas las plantas de *C. annuum* inoculadas indicó que el 85% (17/20) tenían DNA viral (Anexo 3: Tabla R5); mientras que en *N. benthamiana*, solo el 75% (15/20) tenía DNA viral (Anexo 3: Tabla R7). De lo anterior se desprende que 5 plantas de *C. annuum* (5/17) se mantuvieron asintomáticas, pero mantenían replicación del DNA viral. En el caso de *N. benthamiana*, las plantas con la misma situación; es decir, asintomáticas pero con DNA viral, fueron solo 3 (3/15).

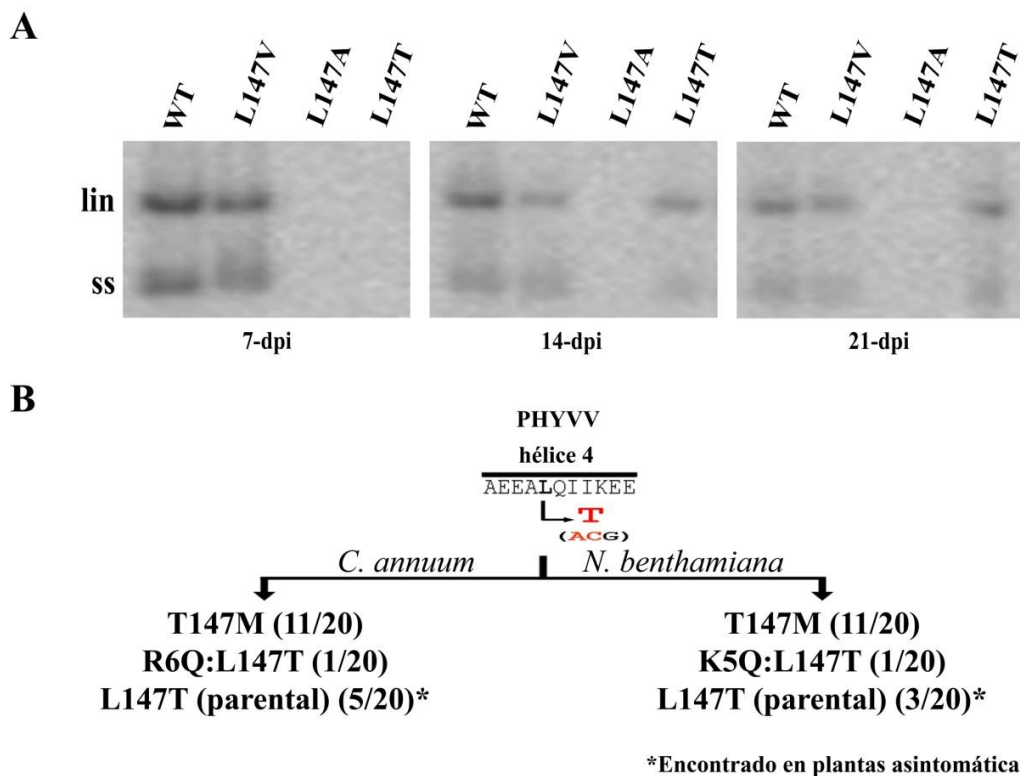


**Figura 18. PHYVV-L147T revierte fenotípicamente.** La aparición de plantas sintomáticas de *C. annuum* (A) y *N. benthamiana* (B) inoculadas con PepGMV-WT, PepGMV-L145V y PepGMV-L145T son presentados con símbolos diferentes para cada construcción. Los números de la derecha indican el número de plantas que presentaron síntomas contra las plantas inoculadas. Los datos presentados representan dos experimentos independientes para cada construcción.

El fenómeno de reversión fenotípica en ambas especies de plantas también sugería la reversión de la mutación durante el curso de la infección. Por lo tanto, las plantas de *C. annuum* inoculadas con PHYVV-L147T se analizaron

por Southern blot para detectar acumulación viral a diferentes tiempos. Este análisis mostró que la acumulación de DNA viral correspondía a las plantas sintomáticas en etapas tardías del experimento (Figura 19A). Además, se analizaron las secuencias de la progenie viral producida en las plantas con reversión fenotípica, así como también en las plantas asintomáticas pero con replicación del DNA viral. En las plantas con reversión fenotípica se encontraron virus con un cambio en la posición de la mutación original (T147M), mientras que en las plantas asintomáticas pero con cierto nivel de replicación viral, solo se recuperó el virus mutante parental PHYVV-L147T (Figura 19B y ver Anexo 3: Tablas R6 y R8). Es importante hacer notar que a diferencia de los resultados con PepGMV-L145T, en los experimentos con PHYVV-L145T no se encontró el virus parental co-existiendo con los virus revertantes (Anexo 3: Tablas R6 y R8).

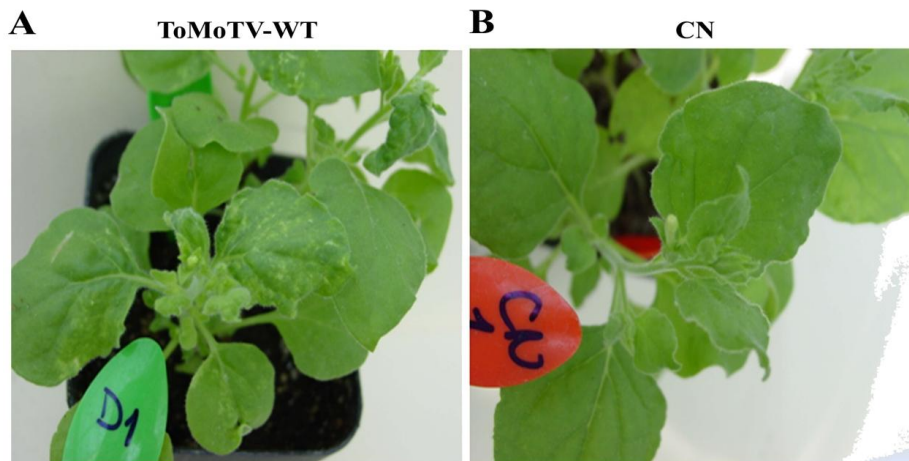
La reversión de T147M ocurrió por una transición C-T en el codón 147 del gen *Rep* de PHYVV (ACG a ATG). El genotipo T147M se encontró en ambas especies de plantas (24/40) (Figura 19B; ver Anexo 3: Tablas R5 y R7). De forma interesante, en dos casos se encontró que la reversión fenotípica no estaba asociada con el genotipo T147M, sino con presuntas mutaciones compensatorias localizadas en los codones 5 y 6 del gen *Rep* (Figura 19B). Lo interesante fue que cada una de estas probables mutaciones compensatorias se encontró en especies de plantas diferentes. Esto es, en una planta de *C. annuum* con reversión fenotípica se encontró que la progenie viral contenía una transición G-A en el codón 6 del gen *Rep* (CGA a CAA), la cual generaba el cambio R6Q a nivel de aminoácidos (Figura 19B; Anexo 3: Tablas R6). Por otro lado, en la planta de *N. benthamiana* se encontró una transversión de A-C en el codón 5 del gen *Rep* (AAA a CAA) que daba lugar al cambio K5Q en la proteína Rep (Figura 19B; Anexo 3: Tablas R6 y R8). En conjunto, estos datos indican que la mutación L147T en PHYVV es inestable y revierte en el proceso de infección.



**Figura 19. La acumulación de DNA viral de PHYVV-L147T correlaciona con la reversión fenotípica.** Un fragmento del componente A de PHYVV correspondiente al gen *Rep* se utilizó como sonda para detectar la acumulación de DNA viral a 7, 14 y 21-dpi (A). La acumulación de DNA viral de PHYVV-WT y PHYVV-L147V (A; WT y L147V, respectivamente) es acorde con los registros visuales (ver Figura 17). De igual manera, la ausencia de plantas sintomáticas en los experimentos de infectividad con el virus PHYVV-L147A (L147A) es consistente con la detección nula de replicación de este virus mutante (A; L147A, ver 7, 14 y 21-dpi). El retraso en la aparición de plantas sintomáticas con PHYVV-L147T (ver Figura 18) correlaciona con la acumulación de DNA viral en tiempos tardíos (A; L147T, ver 14 y 21-dpi). Los genotipos recuperados en los de infectividad con PHYVV-L147T se muestran en B. La región mutada de la hélice 4 de la proteína Rep se muestra en la parte superior.

### El virus ToMoTV solo infecta *N. benthamiana*.

Por último, en el caso de ToMoTV, los vectores virales pTa1.46A y pTa1.38B solo infectaron plantas de *N. benthamiana*, por lo que la evaluación del efecto de las mutaciones se hicieron con esta especie. La sintomatología inducida por ToMoTV en *N. benthamiana* incluyó puntos amarillos y un ligero arrugamiento de las hojas nuevas (Figura 20A), mientras que las plantas inoculadas con pBS no mostraron ninguna sintomatología (Figura 20B). El efecto de las mutaciones en ToMoTV se describe a continuación.

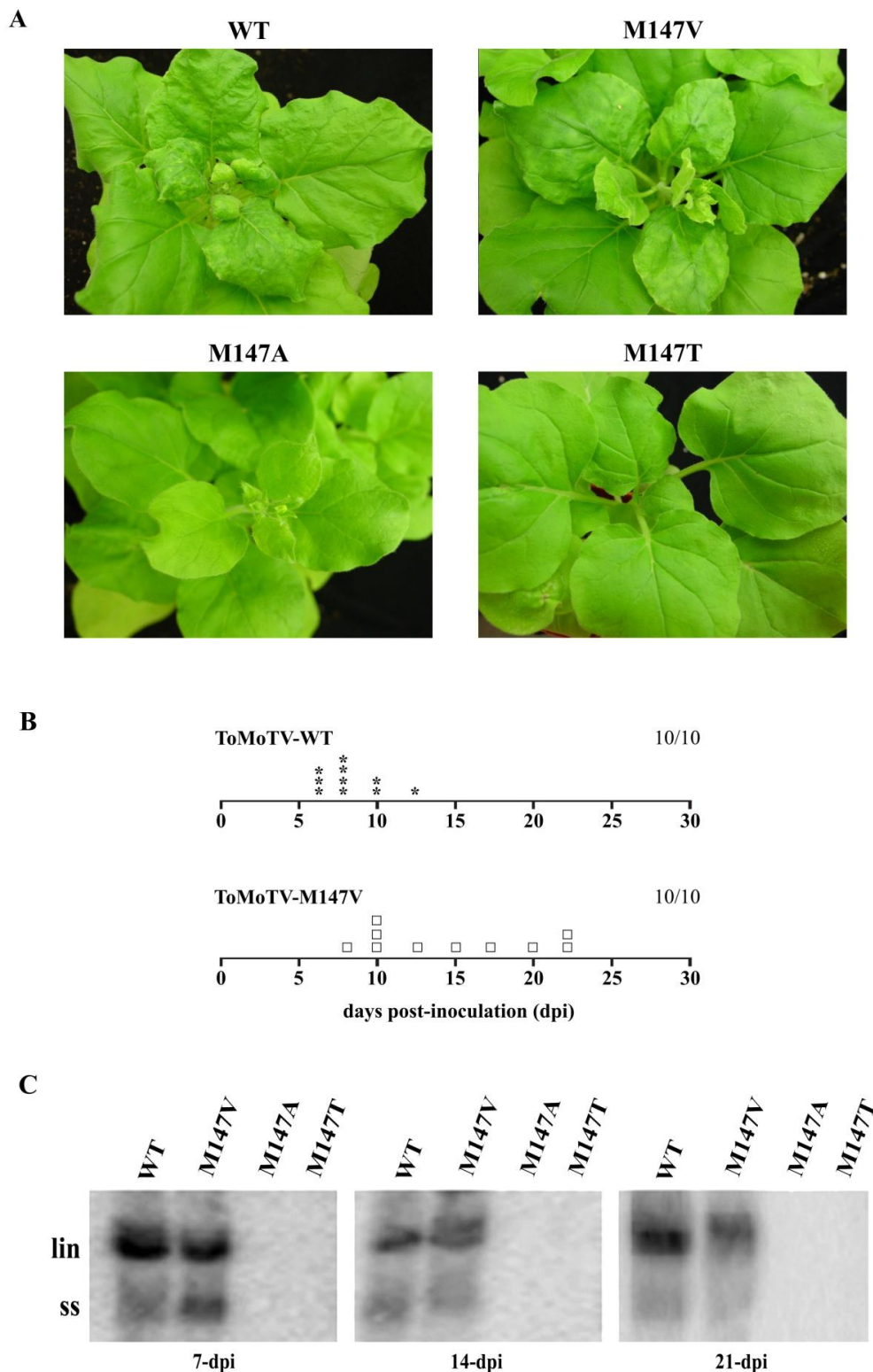


**Figura 20. ToMoTV-WT solo infecta plantas de *N. benthamiana*.** La inoculación de plantas de *N. benthamiana* presentaron síntomas de virosis, como puntos amarillos, distorsión de las hojas y un ligero arrugamiento entre los 8 a 10 dpi (A). Por el otro lado, las plantas inoculadas con el vector pBS (CN) no presentaron ninguna sintomatología.

**A. Las mutaciones M147A y M147T no causan síntomas visibles en *N. benthamiana*.**

Los experimentos de infectividad realizados en plantas de *N. benthamiana* utilizando los virus mutantes ToMoTV M147A y ToMoTV M147T arrojaron resultados similares a los obtenidos con PepGMV L145A. Es decir, de manera visual las plantas inoculadas no desarrollaron ningún signo de virosis (Figura 21A; M147A y M147T). Sin embargo, se logró amplificar DNA viral con los oligos P23 y P24 a partir de estas plantas asintomáticas (Anexo 1: Tabla M3). En cambio, con el Southern blot, la acumulación de DNA viral en las plantas inoculadas con ToMoTV M147A y ToMoTV M147T no fue detectada (Figura 21C). El análisis de las secuencias de la progenie viral no reveló ningún cambio adicional en el gen *Rep*, sugiriendo que las mutaciones son estables durante el curso de la infección.





**Figura 21. La mutación M147V es inestable en plantas de *N. benthamiana*.** El fenotipo de las plantas de *N. benthamiana* inoculadas con el virus silvestre de ToMoTV, así como con los virus mutantes a los 21-dpi son mostrados en el panel superior (A). Solo el virus ToMoTV-M147V reversionó fenotípicamente en tiempos tardíos, comparado con el virus silvestre (A: M147V, y B: ToMoTV-M147V). La cinética de aparición de plantas sintomáticas tanto las inoculadas con el virus ToMoTV-WT y ToMoTV-M147V son mostrados con símbolos diferentes (B). Los números del lado derecho en B indican la eficiencia de la infección por las construcciones mostradas. La

reversión fenotípica de ToMoTV-M147V (A y B) coincide con la acumulación de DNA viral de este virus mutante en tiempos similares al virus silvestre (C).

### **B. La mutación M147V de ToMoTV es inestable y revierte a la secuencia silvestre.**

El virus ToMoTV fue el único que no siguió el mismo comportamiento del efecto de las sustituciones en la posición equivalente a L148 de TGMV. En PepGMV y PHYVV, las sustituciones a Treonina resultaron en una reversión fenotípica en las plantas inoculadas. En ToMoTV, la sustitución M147V fue el único genotipo inestable en las plantas de *N. benthamiana*. Mientras que las plantas inoculadas con ToMoTV silvestre desarrollaron síntomas característicos de este virus a los 7-dpi (Figura 21A; WT), en este mismo periodo las plantas inoculadas con ToMoTV M147V no presentaron síntomas de virosis (Figura 21A; M147V). Sin embargo, en los días posteriores empezaron a aparecer plantas con sintomatología similar a las inoculadas con el virus silvestre. Este retraso en la aparición de síntomas en las plantas inoculadas con el virus mutante ToMoTV M147V (Figura 21B), sugería fuertemente una reversión de la mutación original, por lo que se analizaron las secuencias de la progenie viral en estas plantas. Interesantemente, la totalidad de las plantas inoculadas con ToMoTV M147V experimentaron la reversión fenotípica y la amplificación del DNA viral de estas plantas y su posterior análisis reveló que la mutación original (M147V) había revertido al codón silvestre mediante una transición del nucleótido G por A (V147M). La determinación de los niveles de acumulación de DNA viral en estas plantas fueron equiparables a los del virus silvestre (Figura 21C). A diferencia de los resultados con PepGMV L145T y PHYVV L147T, no se encontró el virus mutante original en ninguna de las plantas analizadas.



## DISCUSIÓN

La mutación es una de las principales fuentes de variabilidad genética en los organismos y es un motor muy importante para la evolución. Las mutaciones puntuales se pueden clasificar en cuatro clases de acuerdo al impacto que tienen en la aptitud (“fitness”) de un organismo, definida esta como la capacidad de generar progenie: 1) Las mutaciones neutrales son aquellas que no afectan de forma significativa esa capacidad; 2) Las mutaciones letales son las que disminuyen esa capacidad a cero; 3) Las mutaciones deletéreas disminuyen el fitness, pero a valores por encima de cero; y 4) Las mutaciones benéficas (muy inusuales) aumentan la aptitud. Las dos últimas clases son las que juegan un papel mayor en la evolución.

En los virus de RNA, la ausencia de actividad correctora de las polimerasas que usan durante su replicación es la principal causa de la alta tasa de mutaciones (Drake *et al.*, 1999). Por el contrario, en los virus de DNA se ha asumido que sus tasas de mutación son similares a las de sus huéspedes, debido a que utilizan la maquinaria de replicación de sus hospederos. Tal es el caso de los geminivirus, los cuales poseen genomas de DNA y por mucho tiempo se había pensado que su tasa de mutación era similar a la de otros virus de DNA; es decir, del orden de  $1.8 \times 10^{-8}$  mut/nt/rep (Bernard, 1994; Drake, 1991; Drake y Hwang, 2005; Hartwell y Sharp, 2000). No obstante, en los últimos años se han acumulado evidencias que sugieren una alta variabilidad de los geminivirus (Duffy y Holmes, 2008; Duffy y Holmes, 2009; Sanz *et al.*, 1999). En este trabajo hemos encontrado evidencias experimentales que apoyan la idea de que los geminivirus mutan con una frecuencia mucho mayor que otros virus de DNA. Además, los datos arrojados en los experimentos de evolución forzada han revelado las restricciones selectivas a las que está sujeta la proteína Rep.

### **La inestabilidad de mutaciones en el residuo conservado (Leu/Met) de la hélice-4 de Rep y el papel del contexto genético**

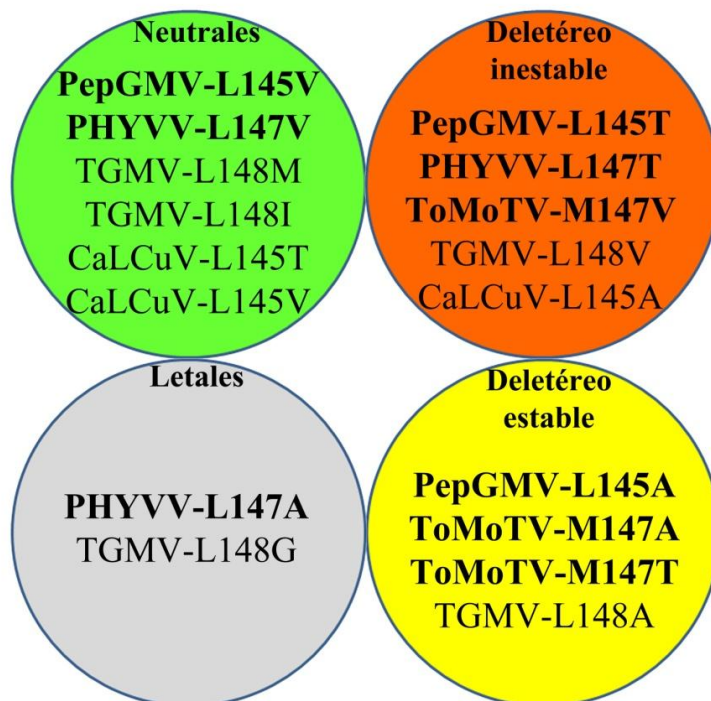
En TGMV, el análisis de la mutación L148V en experimentos de infectividad reveló una tendencia a revertir la mutación a los codones de Leucina (L), Metionina (M) e Isoleucina (I) durante el curso de la infección (Argüello-Astorga

*et al.*, 2007). En ese mismo trabajo, la evaluación experimental de una mutación equivalente (L145A) en CaLCuV, un begomovirus filogenéticamente distante a TGMV, también reveló una elevada eficiencia del fenómeno de reversión. Lo interesante es que la mutación inestable en CaLCuV fue L145A, y no L145V como en TGMV. Además, los cambios experimentados originaron codones diferentes (GTC: Valina y ACC: Treonina), insinuando una importante contribución del fondo genético viral.

Tomando en cuenta lo anterior, nosotros evaluamos tres substituciones diferentes en las proteínas Rep de otros begomovirus del Nuevo Mundo (PepGMV, PHYVV y ToMoTV), con la finalidad de identificar las mutaciones con efecto deletéreo y su posterior análisis en experimentos de evolución forzada. La evaluación fenotípica de los virus mutantes en plantas de *C. annuum* y *N. benthamiana* permitió identificar mutaciones con efectos distintos, desde mutaciones neutrales hasta parcialmente detrimentales o letales (Figura 22A).

En congruencia con los primeros hallazgos en TGMV y CaLCuV, nuestros análisis indican que el efecto de las mutaciones introducidas en la hélice-4 depende del contexto genético, pues una misma substitución en posición homóloga produce efectos diferentes en los distintos virus (Figura 22A). Por otra parte, lo más importante de nuestras evaluaciones fue la identificación de las mutaciones deletéreas inestables (Figura 22A, en rojo; y Figura 22B); es decir, aquellas mutaciones que revertieron fenotípicamente durante el curso de la infección.

A



B

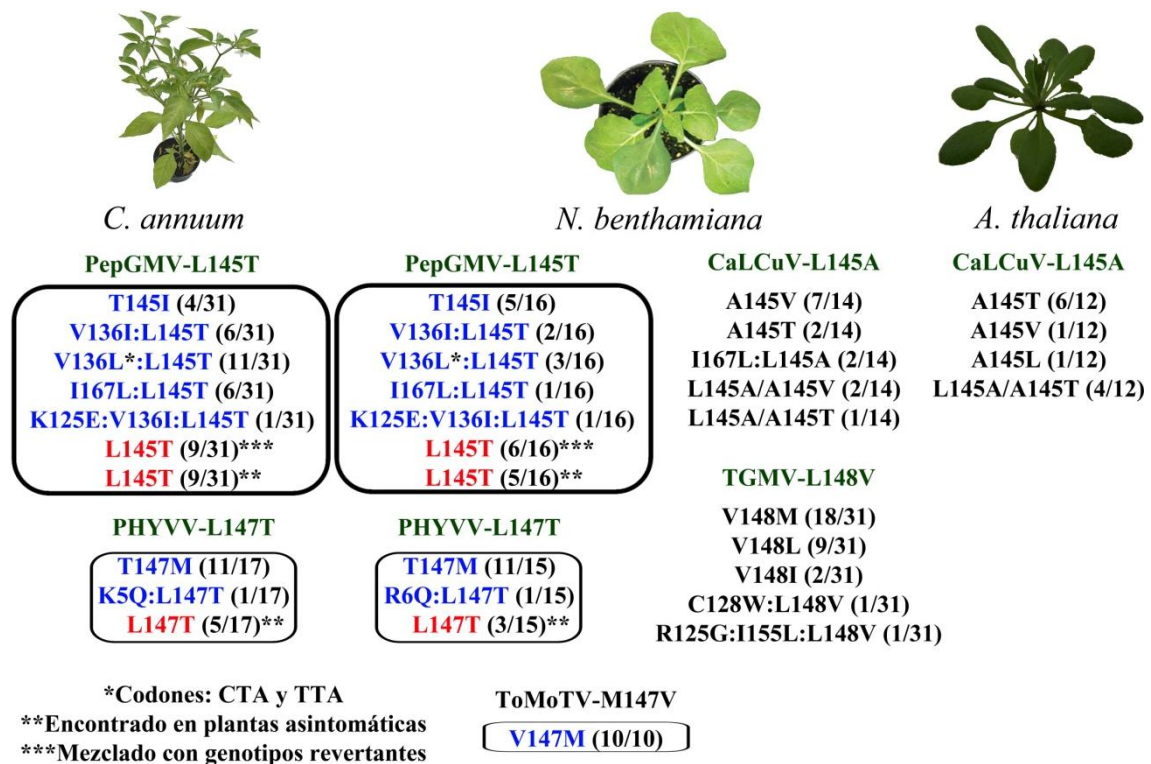
PepGMV CTC (Leu) ► <b>acC</b> (Thr)	PHYVV CTG (Leu) ► <b>acG</b> (Thr)	ToMoTV ATG (Met) ► <b>gTG</b> (Val)
<b>Ts</b>	<b>Ts</b>	<b>Ts</b>
GCC (Ala)	GCG (Ala)	<b>ATG (Met)</b>
<b>ATC (Ile)</b>	<b>ATG (Met)</b>	GCG (Ala)
ACT (Thr)	ACA (Thr)	GTA (Val)
<b>Tv</b>	<b>Tv</b>	<b>Tv</b>
TCC (Ser)	CCG (Pro)	TTG (Leu)
CCC (Pro)	TCG (Ser)	CTG (Leu)
AGC (Ser)	AAG (Lys)	<b>GAG (Glu)</b>
AAC (Asn)	AGG (Arg)	GGG (Gly)
ACA (Thr)	ACC (Thr)	GTT (Val)
ACG (Thr)	ACT (Thr)	GTA (Val)

**Figura 22. Efecto de las mutaciones equivalentes a L148 de TGMV en PepGMV, PHYVV y ToMoTV.** La evaluación de cada una de las mutaciones en las plantas de *C. annuum* y *N. benthamiana* mostraron efectos distintos, desde efectos neutrales hasta letales. En negritas se muestran las mutaciones evaluadas en este estudio y el resto proviene de Argüello-Astorga *et al.*, 2004 y Argüello-Astorga *et al.*, 2007 (A). Las mutaciones deletéreas inestables (PepGMV-L145T, PHYVV-L147T y ToMoTV-M147V) pueden ser revertidas mediante un solo cambio de base y dependen de los eventos de transición (Ts) o transversión (Tv). Se marcan en azul los cambios que se encontraron en los ensayos de infectividad. Los cambios que pudieron haber ocurrido, pero que no se encontraron en los experimentos, se marcan en gris. Nótese que en los tres casos fueron eventos de transición.

El fenómeno de reversión fenotípica parece implicar la aparición de variantes virales con una eficacia biológica mayor que la del virus parental (selección positiva o direccional). Al proceso opuesto, donde las nuevas variantes tienen una eficacia biológica menor y por lo tanto son opacadas por el virus parental, se denomina selección negativa (Freeman *et al.*, 2002). De acuerdo a lo anterior, en los experimentos de infección con las mutantes inestables se recuperaron distintos genotipos en la progenie viral, desde cambios en el sitio original de la mutación hasta cambios en otros sitios del gen *Rep* (Figura 25B), evidencia de una selección positiva. Una observación notable es la aparición de los mismos genotipos revertantes en ambos huéspedes (Figura 23). Esto sugiere que la proteína Rep está restringida selectivamente y que esta presión de selección es independiente del huésped.

Las mutaciones deletéreas inestables se generaron por medio de cambios puntuales en el codón equivalente a L148 de TGMV (Figura 22B). Así tenemos que la mutación L145T en PepGMV se generó mediante dos cambios en el codón CTC (Leucina), de tal forma que se creó el codón ACC (Treonina) mediante una transversión (C-A) y una transición (T-C). De igual forma, una transversión (C-A) y una transición (T-C) generaron el codón ACG (Thr) en PHYVV (L147T). Finalmente, en el virus ToMoV, la mutación M147V se generó por una sola transición (G-A) en el codón ATG (Met), creando el codón GTG (Val). Tomando en cuenta estas consideraciones, y con la noción de que las transiciones tienen una probabilidad de ocurrencia mayor que las transversiones, es interesante hacer notar que los genotipos que revertieron en el sitio original de la mutación fueron producto de eventos de transición (Figura 22B). Para el caso de PepGMV-L145T, aunque las opciones para revertir la mutación por un solo cambio de base podían conducir a diversos residuos, el único genotipo recuperado fue T145I (producto de una transición C-T), lo cual coincide con lo esperado teóricamente (Figura 22B) y además, correlaciona con los residuos que son tolerados en esa posición (Argüello-Astorga *et al.*, 2004). Lo mismo sucedió con las mutaciones L147T y M147V de PHYVV y ToMoTV, respectivamente. En ambos casos, eventos de transición originaron el codón ATG (Met). Nuevamente, aunque las opciones de revertir la mutación eran diversas, los cambios condujeron a un residuo permisible. Estos resultados coinciden con las observaciones previas en TGMV donde se

evaluaron dos mutantes en el residuo L148 de la proteína Rep (Argüello-Astorga *et al.*, 2007). El primero de ellos se generó mediante una transversión C-G (CTG a GTG) (L148V); mientras que el segundo se creó con dos modificaciones en el codón CTG (Leu), creándose el codón GTI (Val) (L148V\*). El análisis de los revertantes con ambos mutantes reveló que L148V generó principalmente el codón ATG (Met) mediante un evento de transición (G-A); mientras que L148V\* dio lugar principalmente al codón CTT (Leu) por una transversión G-C. En conjunto, lo expuesto anteriormente sugiere que las opciones de revertir al residuo original dependen del número de cambios que se generan al momento de introducir la mutación y confirman la importancia del residuo Leucina/Metionina en la parte central de la hélice-4 en la función de la proteína Rep de begomovirus. Además, demuestran la utilidad de las mutaciones deletéreas inestables para realizar experimentos de evolución forzada.



**Figura 23. Genotipos recuperados en los experimentos de evolución forzada con las mutaciones inestables.** La evaluación de las mutaciones inestables de PepGMV, PHYVV y ToMoTV en las plantas de *C. annuum* y *N. benthamiana* permitió la identificación de variantes virales en la progenie (señaladas en los recuadro). En los experimentos de PepGMV y PHYVV se recuperaron además a los virus mutantes parentales (en rojo). Los genotipos obtenidos en este trabajo son comparados con los datos obtenidos previamente de TGMV y CaLCuV (Argüello-Astorga *et al.*, 2007). Nótese que la mutación compensatoria I167L ya se había aislado previamente en CaLCuV.

## **El potencial evolutivo de los geminivirus y los probables factores que lo causan**

El potencial de revertir el efecto deletéreo de las mutaciones introducidas en la hélice-4 de la proteína Rep en tiempos muy cortos (pocos días) va en contra de la noción general de que los virus de DNA poseen tasas de mutación similares a las de sus hospederos. En los virus de RNA, el potencial de superar el efecto de las mutaciones deletéreas depende en gran medida de su naturaleza heterogénea (cuasi-especies) (Domingo y Holland, 1994; Domingo y Holland, 1997; Roossinck, 1997).

En este estudio, el análisis de los genotipos revertantes indicó que las mutaciones encontradas son únicas en todo el genoma. Tomando esto en cuenta, si estimamos la frecuencia de mutaciones obtenemos un valor de  $3.8 \times 10^{-4}$  para el componente A de PepGMV (ver Materiales y Métodos), lo cual es equivalente a las estimaciones en otros begomovirus (Duffy y Holmes, 2008; Duffy y Holmes, 2009). Aunque en algunos casos se identificaron hasta dos mutaciones puntuales ([K125E:V136I:L145T]), el valor estimado es del mismo orden de magnitud ( $7.6 \times 10^{-4}$ ). Por lo tanto, las evidencias que encontramos en nuestros análisis con las mutaciones inestables; es decir, de una selección positiva o direccional durante el curso de la infección sugiere una naturaleza de tipo cuasi-especies en los geminivirus, lo cual coincide con las estimaciones recientes de las altas tasas de sustitución nucleotídica en TYLCV y EACMV que oscilan entre los  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  sustituciones por sitio por año (Duffy y Holmes, 2008; Duffy y Holmes, 2009). Más interesante aún es que las estimaciones de las tasas de mutación en otros sistemas virales con genomas de ssDNA como parvovirus (Lopez-Bueno *et al.*, 2006; Shackleton *et al.*, 2005; Shackleton y Holmes, 2006), circovirus (Biagini, 2004; Gallian *et al.*, 2002), anellovirus (Umemura *et al.*, 2002) y bacteriófagos (Cuevas *et al.*, 2009; Raney *et al.*, 2004) son similares ( $10^{-6}$  a  $10^{-4}$ ); lo que sugiere que los virus con este tipo de genomas poseen un potencial evolutivo equiparable al de los virus de RNA, aunque los factores que ocasionan este fenómeno son desconocidos hasta ahora (Duffy *et al.*, 2008).

Los geminivirus se replican en el núcleo de las células vegetales por los mecanismos de RCR y RDR (Gutierrez, 1999; Hanley Bowdoin *et al.*, 1999; Jeske *et al.*, 2001; Preiss y Jeske, 2003; Stenger *et al.*, 1991). La búsqueda de

los factores que participan en la replicación de los geminivirus ha sido ardua, pero sin resultados promisorios. Recientemente se aisló una subunidad de la polimerasa épsilon (Pol $\epsilon$ ) que interactúa con la proteína Rep de MYMV y podría jugar un papel en la replicación viral (Dr. Sunil Kumar Mukherjee; comunicación personal). No obstante, Pol $\epsilon$  es comúnmente utilizada durante la replicación en eucariotes por poseer la actividad de corregir errores e introduce un error por cada  $10^9$  a  $10^{10}$  bases replicado (Echols y Goodman, 1991; Garcia-Diaz y Bebenek, 2007; Thomas *et al.*, 1991), lo que la descarta como responsable de la introducción de mutaciones en los geminivirus.

Por otra parte, si se consideran las etapas del ciclo infectivo de los geminivirus, se tiene que la primera etapa de la replicación involucra la conversión de las formas ssDNA a dsDNA. En el género mastrevirus se sabe que un oligonucleótido de RNA es el responsable de iniciar la síntesis de la cadena complementaria durante la conversión de ssDNA a dsDNA (Donson *et al.*, 1984). Esto implica la participación de polimerasas de DNA dependientes de RNA, las cuales podrían ser de baja fidelidad; aunque no se puede descartar la participación de factores adicionales como la presencia de radicales libres o una poza ("pool") de nucleótidos no balanceados, o que la actividad de las polimerasas de alta fidelidad se vea afectada por el ambiente celular creado durante la infección.

Aunque el DNA es el portador de la información genética, su estabilidad química es limitada. Procesos como la hidrólisis, la oxidación y la metilación no enzimática del DNA ocurren en tasas muy altas *in vivo*. La depurinación y la desaminación son las reacciones químicas espontáneas más frecuentes que crean serios daños en el DNA. La depurinación ocurre por la hidrólisis del enlace N-glicosil que une las purinas (Adenina y Guanina) y la desoxirribosa; mientras que la desaminación convierte a las citosinas (C) a uracilo (U) (Lindahl, 1993). Además, se sabe que la desaminación oxidativa ocurre espontáneamente y es de 200 a 300 veces más probable que ocurra en moléculas de ssDNA que en las de dsDNA (Bjelland y Seeberg, 2003; Frederico *et al.*, 1990). Considerando lo anterior y con el conocimiento de que durante el ciclo de infección de los geminivirus, un tiempo considerable se encuentra en el estado de ssDNA, la desaminación oxidativa podría ser la explicación de la alta tasa de substitución nucleotídica en los geminivirus. De

manera interesante, se reportó recientemente que en los genomas de TYLCV y EACMV hay una sobre-representación de las transiciones C-T y G-A (Duffy y Holmes, 2008; Duffy y Holmes, 2009), lo que apoya la hipótesis de que la desaminación oxidativa es responsable de la alta tasa de mutaciones en los geminivirus. Un factor adicional que se ha especulado puede jugar un papel en la incorporación errónea de nucleótidos durante la replicación de los geminivirus es la ausencia de metilación del DNA viral (Brough *et al.*, 1992; Inamdar *et al.*, 1992). Se sabe que los geminivirus interfieren con la metilación y como resultado, las formas replicativas de los geminivirus no son metilados, por lo que la maquinaria de corrección de errores podría no diferenciar entre el templado original y la cadena naciente, permitiendo la incorporación errónea de nucleótidos (Wang *et al.*, 2005).

Muchos virus son restringidos a poseer genomas pequeños, ya que deben empaquetarse en un espacio físico limitado con el fin de poder transportarse entre las células a través de los plasmodesmos (Lucas, 2006). Los geminivirus no son la excepción, y por ello se proponen dos escenarios por la alta tasa de sustitución nucleotídica: 1) la adaptación rápida a los ambientes cambiantes; y 2) la extinción de la población. El segundo escenario obedece a que poseen genomas pequeños, codifican proteínas multifuncionales y están expuestos a constantes eventos de cuellos de botella por su forma de transmisión (horizontal). A pesar de ello, la extinción parece ser evadida eficazmente, ya que la edad estimada de los geminivirus es de 100 a 125 millones de años (Briddon *et al.*, 2010; Grimaldi y Engel, 2005). Uno de los factores que podría explicar la evasión de la extinción de la población por la alta tasa de mutaciones puede ser la recombinación. La recombinación genera una variabilidad enorme que no podría alcanzarse con los eventos de mutación puntual (Keightley *et al.*, 2006, Martin *et al.*, 2006; Roossinck 1997). Por lo tanto, es de gran interés conocer la distribución de las mutaciones a lo largo del genoma, así como el impacto de las mutaciones puntuales en la viabilidad de los geminivirus. De hecho, se piensa que las tasas de mutación en los virus de RNA y ssDNA están íntimamente relacionadas con el efecto que produce cada mutación puntual espontánea en el fitness del virus. De tal forma que se optimiza una tasa de mutaciones que maximiza la adaptación a las nuevas circunstancias del ambiente (Sanjuán, 2010).



## **Las mutaciones deletéreas y el probable papel del tamaño de la población viral**

De acuerdo a nuestras observaciones, la probabilidad de que un virus con una mutación deletérea se recupere por medio de una reversión en el sitio original de la mutación o mediante mutaciones compensatorias está directamente ligada al impacto de la mutación en la viabilidad del virus (fitness). En nuestro caso, el término “fitness” se referirá a la replicación, ya que las mutaciones impactan sobre la proteína Rep. Tomando en cuenta lo anterior, se tienen tres escenarios. En el primero, las mutaciones letales suprimen por completo la replicación viral y se entiende, por tanto, que tienen una probabilidad nula de generar variantes que reviertan o compensen la mutación original. En el segundo escenario, se tienen las mutaciones deletéreas (estables) con un impacto significativo en la replicación viral (disminución del fitness), pero sus tasas de replicación permiten un tamaño de población suficiente para opacar a los virus revertantes (selección negativa). Finalmente, en el tercer escenario se tiene que el impacto de la mutación es muy pronunciado (mutación deletérea inestable), afectando el fitness de forma significativa. En el último escenario, el tamaño de la población viral viable es tan pequeño que se genera una mayor oportunidad para la emergencia de variantes virales que superan en frecuencia al virus mutante original (selección positiva). Tomando en cuenta los tres escenarios anteriores, las mutaciones L148G en TGMV y L147A en PHYVV pertenecerían al primer escenario, ya que eliminaron por completo la replicación viral (Figura 22A; mutaciones letales). Por el contrario, en el segundo escenario se encuentran los mutantes TGMV Rep L145A, PepGMV Rep L145A, ToMoTV Rep M147A y M147T, los cuales se replicaron en el huésped pero no revirtieron en el curso de la infección (Figura 22A; mutaciones deletéreas estables). En el último escenario, se clasificarían las mutaciones L148V en TGMV, L145A en CaLCuV, L145T en PepGMV, L147T en PHYVV y M147V en ToMoTV, ya que generaron virus revertantes con propiedades similares al virus silvestre (Figura 22A; mutaciones deletéreas inestables).

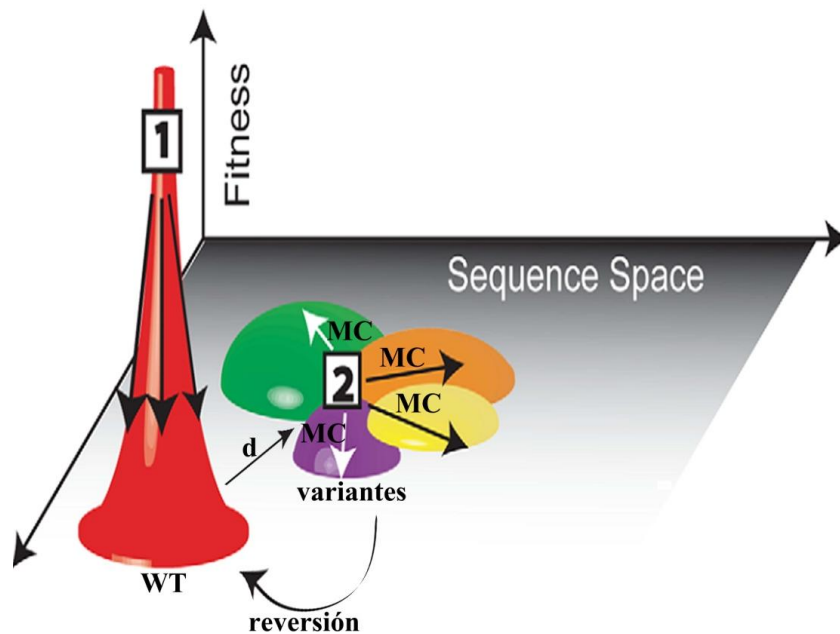
Aunque en el presente trabajo no se determinaron las tasas de replicación de los virus mutantes, hay algunas extrapolaciones que se pueden realizar con los resultados de TGMV y CaLCuV (Argüello-Astorga *et al.*, 2007). En TGMV-L148V y CaLCuV-L145A (mutaciones deletéreas inestables), las tasas de

replicación disminuyeron hasta un 99%. De tal forma que se puede especular que las mutaciones L145T (PepGMV), L147T (PHYVV) y M147V (ToMoTV) afectaron la replicación en una tasa similar y crearon las condiciones para que variantes virales con mayor eficacia biológica que el virus mutante parental emergieran durante el curso de la infección. Por el contrario, en los casos de PepGMV-L145A, ToMoTV-M147A y ToMoTV-M147T son equivalentes a la mutación L148A de TGMV, donde la sustitución L148A disminuyó la replicación en un 88% y por lo tanto las nuevas variantes que surgieron en la población fueron opacadas por el virus parental. En conjunto, los datos expuestos anteriormente sugieren que el tamaño de población generada por la introducción de una mutación deletérea es importante; ya que, entre mayor sea el tamaño de la población (mayor al 12%; TGMV-L148A), menor será la probabilidad de fijar una variante nueva. En cambio, entre menor sea el tamaño de la población fundadora (~1%; TGMV-L148V y CbLCuV-L145A), mayor será la probabilidad de que variantes virales más adaptados surjan y persistan en la población.

La mutación-selección son procesos fundamentales que determinan el destino de las variantes generadas durante el proceso de infección. En la evolución darwiniana, la selección natural actúa sobre la población para optimizar la aptitud del organismo (Orr, 2009). En el laboratorio, la medición precisa de la aptitud es necesaria, y en el caso de los virus se utiliza la capacidad de replicación como una aproximación para medir la aptitud viral (Quinones-Mateu y Arts, 2006). No obstante, otros factores como la transmisibilidad, el tropismo celular; entre otros, son componentes importantes del ambiente en el hospedero y que deben ser considerados (Domingo y Holland, 1997).

En los virus de RNA, la nube de variantes que es generada durante la infección (por su naturaleza de cuasiespecie) es la unidad sobre la que actúa la selección natural. Por lo tanto, la frecuencia de una determinada variante está dada por su habilidad de sobrevivir y reproducirse (fitness). Así tenemos que el hallazgo de varios genotipos virales de PepGMV co-existiendo en la misma planta (máximo 4 genotipos) sugiere una naturaleza tipo cuasi-especies en los geminivirus. Entre los genotipos aislados que se encontraron co-existiendo con otras variantes, llama la atención el genotipo denominado K125E, ya que su evaluación *in planta* no causó síntomas ni se encontró replicación viral, por lo

que no se puede explicar su perpetuación a lo largo de la infección. De igual forma, se encontró al virus parental (PepGMV-L145T) co-existiendo con otros genotipos, a pesar del mantenimiento de la mutación deletérea (menor aptitud). Es importante hacer notar que la co-existencia de variantes sólo se observó en los experimentos con PepGMV (en ambos huéspedes), lo cuál lo convierte en un buen modelo de estudio para la evolución experimental.



**Figura 24. Cambios en los relieves de adaptación causados por mutaciones deletéreas.** El virus silvestre (WT) posee una aptitud elevada (pico rojo) y la aparición de mutaciones conduce a una pérdida dramática de su aptitud (1). Por tanto, la población que genera el virus WT está restringida a un espacio pequeño (menor robustez). Al introducir una mutación deletérea (d) hay un cambio en la estructura de la población (2), el cual va acompañado de una pérdida en la aptitud. Esta pérdida de aptitud del virus WT es una oportunidad para las variantes de surgir y desplazar al virus parental mediante mutaciones compensatorias (MC) o por la reversión de la mutación (población con mayor robustez). En 2, cada color representa una variante. Modificado de Lauring y Andino, 2010.

La co-existencia de variantes en parte se podría explicar por el efecto que causa la mutación deletérea en la estructura de la población (Figura 24). El virus silvestre (WT) con una población de variantes restringida a un espacio pequeño sería estable genotípicamente, ya que opacaría las variantes generadas *de novo*. En contraste, con la presencia de una mutación deletérea, el virus experimentaría un cambio en la estructura de la población y las variantes con una eficacia biológica mayor que el virus parental podrían surgir y aumentar su frecuencia en la población. El modelo de la Figura 24 podría explicar la identificación de diversos variantes en una misma planta en

PepGMV. Sin embargo, no explica por qué no se presentó el desplazamiento de las variantes con menor eficacia biológica como K125E y L145T (parental). En los virus de RNA se ha encontrado que la contribución de la mutación en la frecuencia del genotipo es significativo, ya que se ha observado que las variantes son “acopladas” en el espacio de la nube de mutantes (Wilke, 2005). Esto es, una variante con una aptitud baja puede ser mantenida en una frecuencia mayor que la esperada debido a que se encuentra acoplada a una variante con una aptitud mayor. Este fenómeno conocido como “acoplado de mutaciones” es característico de las cuasi-especies, ya que mutantes individuales se colocan dentro de una red funcional de variantes y por lo tanto se mantienen a pesar de su baja aptitud (Domingo *et al.*, 2006). El fenómeno de “acoplado de mutaciones” podría explicar la presencia de varios genotipos en una misma planta; incluso la presencia de variantes con una eficacia biológica menor como la K125E.

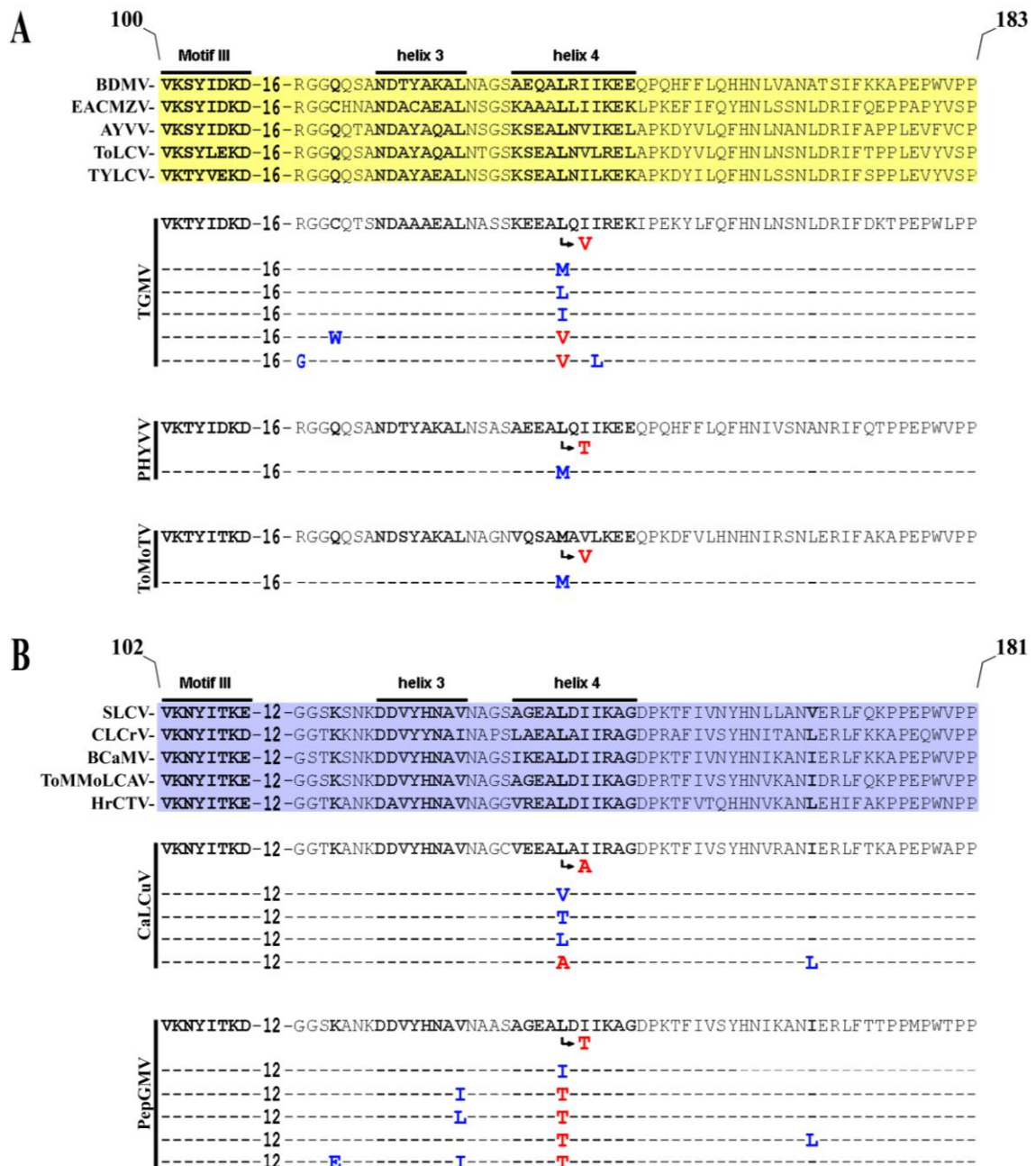
#### **Las mutaciones compensatorias: ¿Delimitación de un dominio funcional?**

Dado nuestro conocimiento acerca de la importancia de la estructura de las proteínas para su función, no es de sorprender el hallazgo del impacto diferencial de las diversas mutaciones introducidas en la proteína Rep (Figura 22A). Más aún, las relaciones entre aminoácidos a nivel de la estructura tridimensional propician las interacciones epistáticas entre ellos, por lo que algunos aminoácidos son más importantes que otros. De tal forma que los residuos altamente conservados de una proteína están fuertemente restringidos por la relación estructura-función; y la introducción de mutaciones en estos sitios es una buena estrategia para evaluar la co-evolución; es decir, la aparición de mutaciones compensatorias en otros sitios de la proteína por la presencia de la mutación deletérea (Wang y Pollock, 2005). Aunque la ruta más corta para revertir las mutaciones deletéreas es mediante un cambio en el sitio de la mutación (Poon *et al.*, 2005), la aparición de las mutaciones compensatorias constituye una vía alterna.

En el análisis de nuestros virus mutantes se identificaron mutaciones deletéreas inestables, las cuales condujeron a la identificación de algunos residuos que probablemente interactúan, directa o indirectamente, con el residuo equivalente a L148 de TGMV. Así se encontró que los residuos K125,

V136, e I167 de la proteína Rep de PepGMV, son residuos importantes en su función (Figura 25). De forma interesante, la recuperación del genotipo I167L ya se había reportado previamente en CaLCuV, indicando que la mutación dirigida del residuo central de la hélice-4 es una herramienta útil para localizar aminoácidos importantes de la proteína Rep. Hasta el momento, la estructura tridimensional de la proteína Rep no ha sido resuelta en su totalidad (Campos-Olivas *et al.*, 2002), por lo que la recuperación de genotipos con mutaciones compensatorias es de gran ayuda para localizar residuos importantes para la estructura y/o función de esta proteína.

Las mutaciones compensatorias V136I y V136L se localizan en la hélice-3, sugiriendo que las dos hélices (3 y 4) pueden estar en contacto a nivel tridimensional y son importantes en la función apropiada de Rep. Por otro lado, es importante mencionar que la mutación compensatoria C128W en TGMV coincide en posición con el residuo K125 de PepGMV (Figura 25). A diferencia del genotipo C128W de TGMV, el genotipo K125E de PepGMV no se confirmó como una mutación compensatoria verdadera. No obstante, el contexto genético de K125E es diferente a C128W. Mientras que C128W solo estaba en combinación con L148V, K125E se encontró en combinación con V136I y L145T (mutación original). Esto podría sugerir que la combinación [K125E:V136I:L145T] es incompatible, o que los geminivirus no toleran más de dos mutaciones en la proteína Rep. Desafortunadamente, no se evaluó sólo la combinación K125E con L145T, que sería equivalente a C128W+L148V; sin embargo, cabe especular que la combinación K125E+L145T podría recuperar las propiedades funcionales de Rep. Una situación similar se encontró en TGMV donde se identificaron los residuos R125 e I155 como probables sitios compensatorios. Las mutaciones R125G e I155L se encontraron en combinación con L148V, y la evaluación de este genotipo en un sistema de protoplastos, reveló una replicación nula. No obstante, no se puede descartar que las combinaciones R125G+L148V, así como la combinación I155L+L148V, pudieran ser genotipos viables. En conjunto, el mapeo de mutaciones compensatorias apoya la idea de que la región comprendida entre los aminoácidos 125 a 167 podría formar parte de un dominio funcional importante.



**Figura 25. Reversiones verdaderas, reversiones funcionales y mutaciones compensatorias.** Los experimentos de evolución forzada utilizando las mutaciones deletéreas inestables permitieron localizar residuos funcionalmente importantes de la proteína Rep. Un alineamiento de un segmento de la proteína Rep que comprende el motivo III y las hélices 3 y 4 es mostrado. En el panel superior se muestran los begomovirus del linaje típico (A; amarillo); mientras que en el panel inferior se muestran los begomovirus que pertenecen al linaje de SLCV (B; azul). En cada caso se muestran los aminoácidos sujetos al proceso de selección positiva en los experimentos de infectividad con los virus mutantes de TGMV, PHYVV, ToMoTV, CaLCuV y PepGMV. La mutación original se muestra en rojo y los genotipos encontrados al final de los experimentos se indican en color azul. Las secuencias de TGMV (NC\_001507), PHYVV (NC\_001359), ToMoTV (NC\_001828), BDMV (NC\_001931), EACMV (AJ717542), AYVV (NC\_004626), ToLCV (AF084006), TYLCV (X15656), SLCV (NC\_001936), PepGMV (NC\_004101), CaLCuV (NC\_003866), ToMMoLCAV (NC\_009490) y HrCTV (U49907) se obtuvieron de la base de datos del NCBI.

## **Las mutaciones compensatorias: Implicaciones en la evolución de proteínas**

Se sabe que las mutaciones que ocurren en regiones que se encuentran expuestas (superficiales) son menos desestabilizadoras que las que ocurren en regiones internas de la proteína (Guo *et al.*, 2004; Loh *et al.*, 2007; Suckow *et al.*, 1996). Esto se explica por el hecho de que los residuos que se encuentran en el interior de las proteínas están en una red de conexiones más compleja que los residuos expuestos (superficiales). Por tal motivo, las mutaciones que ocurren en regiones internas de la proteína tienen mayor probabilidad de ser compensadas que las mutaciones que ocurren en la superficie de las proteínas. Tomando en cuenta lo anterior, la compensación de las mutaciones deletéreas tiene serias implicaciones en la evolución de las proteínas. Por ejemplo, la mayoría de los métodos utilizados asume que las probabilidades de sustitución en cada residuo son independientes. Sin embargo, dado el conocimiento de que la estructura y función de una proteína está dada por las interacciones entre los aminoácidos que los componen, es obvio que esta presunción es incorrecta.

Por otro lado, se sabe que la mayoría de las proteínas solo pueden tolerar cambios en su estabilidad ( $\Delta G$ ) de 3 a 10 kcal/mol (DePristo *et al.*, 2005). Esto quiere decir que las proteínas en general tienen una estabilidad termodinámica muy baja. Además, se sabe que una mutación deletérea puede causar un efecto pleiotrópico, afectando propiedades como la estabilidad, la actividad o el correcto plegamiento de la proteína (folding) (Ferrer-Costa *et al.*, 2007). En ese sentido, la introducción de las mutaciones en las proteínas Rep de los tres begomovirus utilizados en este estudio pudieron haber afectado cualquiera de estas propiedades (Figura 26A). En cuanto a las distancias, se piensa que las mutaciones compensatorias que ocurren en distancias cercanas al sitio original de la mutación tienen un papel en la estabilidad, mientras que aquellas que ocurren en distancias más alejadas son cambios que juegan un papel en la adopción apropiada de la estructura tridimensional de la proteína. Por ejemplo, Poon y Chao (2006) encontraron que las mutaciones compensatorias son más efectivas cuando se encuentran a menor distancia de la mutación deletérea que las más alejadas (Poon y Chao, 2006). Considerando lo anterior, se especula que las mutaciones compensatorias encontradas en este trabajo son

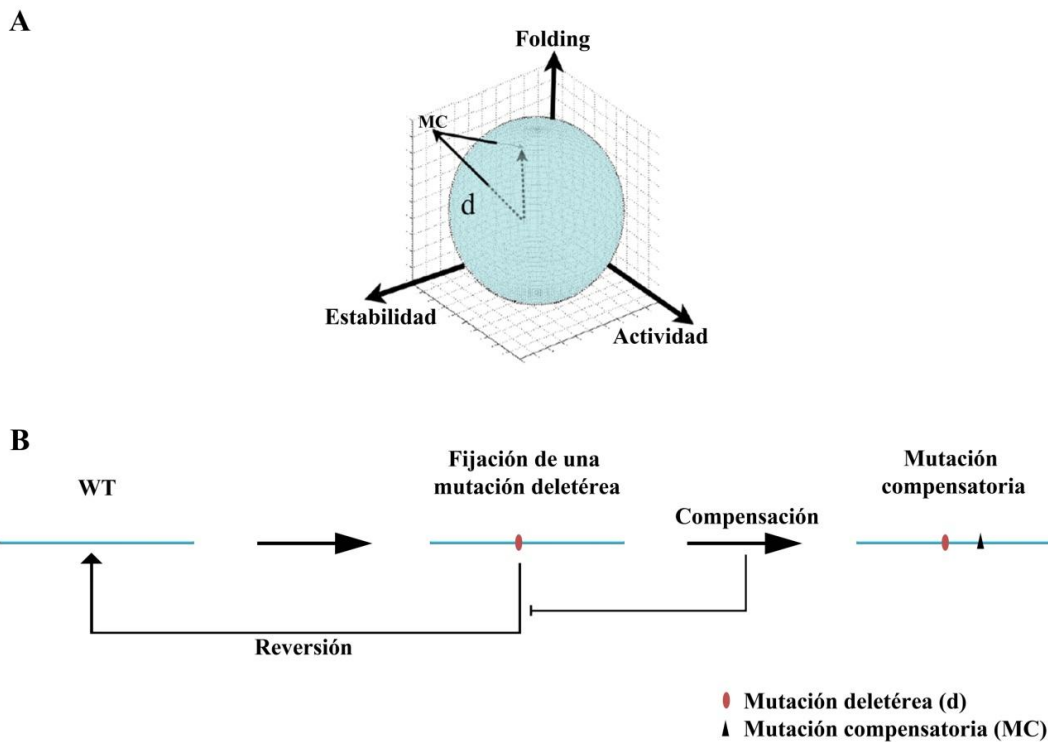
residuos no expuestos en la estructura terciaria de Rep (por sus propiedades hidrofóbicas). Además, se ha reportado que las mutaciones compensatorias ocurren en promedio a una distancia de 22% alrededor de la mutación deletérea (tomando en cuenta la longitud total del gen); de tal manera que las mutaciones compensatorias de Rep podrían jugar un papel en la estabilidad (Davis *et al.*, 2009). Las mutaciones compensatorias encontradas en PepGMV están a menos de 6% de la mutación deletérea (L145T), apoyando la hipótesis anterior. Más aún, la concentración de las mutaciones compensatorias alrededor de la mutación deletérea tendría un significado biológico si se toman en cuenta los eventos de recombinación en los geminivirus durante la replicación. Esto es, la mutación deletérea y las mutaciones compensatorias tendrían una mayor probabilidad de ser conservados como un módulo al encontrarse en una región concentrada, y consecuentemente se mantendría la funcionalidad de Rep.

Por otro lado, llama la atención que la compensación de las mutaciones deletéreas haya ocurrido con residuos funcionalmente equivalentes. Por ejemplo, las mutaciones compensatorias en los residuos V136 e I167 de PepGMV dieron lugar a aminoácidos con propiedades bioquímicas similares (Isoleucina y Leucina, respectivamente) (Figura 25). En TGMV, la probable mutación compensatoria I155L también mostró el mismo patrón, aunque no fue confirmada como una mutación compensatoria verdadera. Por el momento, nuestra ignorancia a cerca del efecto de estos cambios en las propiedades funcionales de la proteína es absoluta. Lo que si se sabe es que las interacciones entre los aminoácidos de una proteína son las que proporcionan la estructura y función. Por tanto, las mutaciones compensatorias mapeadas en sitios específicos de Rep probablemente hayan restaurado interacciones como puentes de hidrogeno, interacciones de carga o fuerzas de van der Waals, reflejando la interdependencia de estos aminoácidos para la correcta estructura/función de Rep.

A continuación se presenta un modelo que trata de explicar el efecto de las mutaciones deletéreas introducidas en la proteína Rep, considerando a las tres propiedades de las proteínas mencionadas anteriormente como vectores en un espacio tridimensional (Figura 26A). La esfera azul representa el volumen de tolerancia que tiene la proteína ante la introducción de mutaciones. Con este



modelo, se considera que las mutaciones evaluadas en este estudio afectaron diferencialmente a los tres vectores. Es decir, las mutaciones neutrales (L145V y L147V de PepGMV y PHYVV, respectivamente) y deletéreas estables (PepGMV-L145A, ToMoTV-M147A y ToMoTV-M147T) se mantuvieron dentro del volumen de tolerancia. Por el contrario, las mutaciones deletéreas inestables (d) desplazaron los vectores fuera de la zona de tolerancia. De tal forma que durante el proceso de infección, las mutaciones compensatorias (MC) restauraron alguna (si no todas) de las propiedades de la proteína, desplazando nuevamente a los vectores dentro del volumen de tolerancia (Figura 26A). Tomando en consideración lo anterior, se tiene que las mutaciones compensatorias juegan un papel importante en la restauración de las propiedades del virus silvestre por la presencia de una mutación deletérea (Figura 26B). Esto es, la aparición de una mutación deletérea afecta la estructura poblacional viral, la cual, en ocasiones conduce a una reversión de la mutación; mientras que en otras conduce a la emergencia de variantes con mutaciones compensatorias. Por el momento, se desconocen los factores que ocasionan estas oscilaciones; sin embargo, estudios en el futuro podrían conducir a un mayor entendimiento de este fenómeno.



**Figura 26. Las mutaciones deletéreas afectan las propiedades intrínsecas de las proteínas.** A) Las proteínas tienen el potencial de tolerar las mutaciones dentro de

ciertos límites (volumen de tolerancia representado por la esfera azul; aunque podría tener cualquier forma). Se asume que las mutaciones tienen un efecto pleiotrópico, por lo que simultáneamente pueden afectar la estabilidad, la actividad o el plegamiento (vectores en A), las cuales son propiedades intrínsecas de las proteínas. El efecto de una mutación deletérea (d) puede seguir cualquier dirección. Las mutaciones deletéreas que conducen fuera del volumen de tolerancia pueden ser compensadas por mutaciones compensatorias (MC) y llevar de nuevo a la proteína dentro de los límites del volumen de tolerancia. B) De acuerdo a los resultados con nuestros experimentos de evolución forzada se tiene un modelo en el cual la introducción de una mutación deletérea puede ser superada mediante la restauración de la secuencia silvestre (reversión) o en su defecto por la adquisición de mutaciones compensatorias. Este último evento ocurre solamente si el fenómeno de reversión es contrarrestado durante la infección.

## CONCLUSIONES

Este trabajo provee una base experimental para análisis posteriores de las hipótesis clásicas de la evolución viral, como el umbral de mutaciones que puede tolerar un virus, la interferencia clonal, la deriva génica o el papel de las mutaciones compensatorias en poblaciones pequeñas. Además, también aporta evidencias a cerca de las restricciones selectivas a las que está sujeta la proteína Rep y confirma la naturaleza tipo cuasi-especies de los geminivirus. Por tanto, el potencial evolutivo de los geminivirus debería ser considerado en las estrategias de control a largo plazo, ya que cualquier esfuerzo que tenga como finalidad controlar a los geminivirus resultará en una presión de selección sobre la población viral heterogénea y que eventualmente conducirá a la adaptación de las nuevas circunstancias. Más aún, el hecho de que nosotros hemos encontrado mutaciones compensatorias en sitios específicos de la proteína Rep, sugiere el mapeo de un dominio funcional que es importante para las funciones de la proteína y su utilidad como blanco para estrategias de control más efectivas contra los geminivirus. Finalmente, el hallazgo de una evolución convergente de la proteína Rep es un indicio de que las soluciones adaptativas son limitadas a pesar de la alta variabilidad. De tal forma que un mayor entendimiento de las fuerzas que gobiernan los niveles altos de variabilidad genética podría ayudarnos para predecir y posiblemente prevenir los escenarios que conducen a la emergencia de los geminivirus como patógenos devastadores.

## REFERENCIAS I

1. Abouzid, A.M., T. Frischmuth, H. Jeske (1988). A putative replicative form of the abutilon mosaic virus (Gemini group) in a chromatin-like structure. *Molecular and General Genetics* 212, 252-258.
2. Ach, R. A., T. Durfee, A. Miller, P. Taranto, L. Hanley-Bowdoin, P.C. Zambryski, W. Gruissem (1997). RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol Cell Biol* 17. 5077-5086.
3. Arguello-Astorga, G., J.T. Ascencio-Ibañez, M.B. Dallas, B.M. Orozco, L. Hanley-Bowdoin (2007). High-frequency reversion of geminivirus replication protein mutants during infection. *J. Virol.* 81:11005-11015.
4. Arguello-Astorga, G., L. Lopez-Ochoa, L.J. Kong, B.M. Orozco, S.B. Settlege, L. Hanley-Bowdoin (2004). A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma homolog RBR. *J. Virol.* 78:4817-4826.
5. Ascencio-Ibañez J.T, R. Diaz-Plaza, J. Mendez-Lozano, Z. Monsalve-Fonnegra, G. Arguello-Astorga, R.F. Rivera-Bustamante (1999). First report of TYLCV in Yucatán, Mexico. *Plant Disease* 83: 1178.
6. Ascencio-Ibañez J.T., S.B. Settlege (2007). DNA abrasion onto plants is an effective method for geminivirus infection and virus-induced gene silencing. *J Virol Methods* 142: 198-203.
7. Bass, P.D. (1987). Mutational analysis of the bacteriophage phi X174 replication origin. *J Mol Biol* 198, 51-61.
8. Bernard, H.U. (1994). Coevolution of papillomaviruses with human populations. *Trends Microbiol.* 2: 140 - 143.
9. Biagini, P. (2004). Human circoviruses. *Vet. Microbiol.* 98: 95-101.
10. Bjelland, S.; Seeberg, E. (2003). Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat. Res.* 531: 37-80.
11. Bos, L. (1995). The embryonic beginning of virology: unbiased thinking and dogmatic stagnation. *Arch. Virol.* 140:613-619.
12. Briddon R.W., B.L. Patil, B. Bagewadi, M.S. Nawaz-ul-Rehman, C.M. Fauquet (2010). Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evol Biol* 10:97
13. Briddon, R.W., I.D. Bedford, J.H. Tsai, P.G. Markham (1996). Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus tomato pseudo-curly top virus, suggest a recombinant origin. *Virology.* 219:387-394.
14. Briddon, R.W., M.S. Pinner, J. Stanley, P.G. Markham (1990). Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 177: 85-94.
15. Brody, J.R., Kern, S.E. (2004). Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques.* 36(2): 216-216.
16. Brough, C.L., W.E. Gardiner, N.M. Inamdar, X.Y. Zhang, M. Ehrlich, D.M. Bisaro (1992). DNA methylation inhibits propagation of Tomato golden mosaic virus DNA in transfected protoplasts. *Plant Mol. Biol.* 18: 703-712.

17. Brown, J.K., D.R. Frohlich, R.C. Rosell (1995). The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annu Rev Entomol* 40, 511-534.
18. Bull, SE., R.W. Briddon, W.S. Sserubombwe, K. Ngugi, P.G. Markham, J. Stanley (2007). Infectivity, pseudorecombination and mutagenesis of Kenyan cassava mosaic begomoviruses. *J. Gen. Virol.* 88(5): 1624 - 1633.
19. Buonaguro, L., M.L. Tornesello, F.M. Buonaguro (2007). HIV-1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J. Virol*, 81:10209-19.
20. Campos-Olivas, R., J.M. Louis, D. Clerot, B. Gronenborn, A.M. Gronenborn (2002). The structure of a replication initiator unites diverse aspects of nucleic acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10310-10315.
21. Chakraborty, S., P.K. Pandey, M.K. Banerjee, G. Kalloo, C.M. Fauquet (2003). *Tomato leaf curl Gujarat virus*, a new *Begomovirus* species causing a severe leaf curl disease of tomato in Varanasi, India. *Phytopathology* 93: 1485–1495.
22. Chakraborty, S., R. Vanitharani, B. Chattopadhyay, C.M. Fauquet (2008). Supervirulent pseudorecombination and asymmetric synergism between genomic components of two distinct species of begomovirus associated with severe tomato leaf curl disease in India *J. Gen. Virol.* 89(3): 818 - 828.
23. Chellappan, P., R. Vanitharani, C.M. Fauquet (2004). Short interfering RNA accumulation correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences. *J. Virol.* 78: 7465-7477.
24. Choudhury, N.R., P.S. Malik, D.K. Singh, M.N. Islam, K. Kaliappan, S.K. Mukherjee (2006). The oligomeric Rep protein of mungbean yellow mosaic India virus (MYMIV) is a likely replicative helicase. *Nucleic Acids Res.* 34: 6362-6377.
25. Collin, S., M. Fernandez-Lobato, P.S. Gooding, P.M. Mullineaux, C. Fenol (1996). The two non-structural proteins from wheat dwarf virus involved in viral gene expression and replication are retinoblastoma-binding proteins. *Virology* 29, 324-9.
26. Cordero, M., P.L. Ramos, L. Hernandez, A.I. Fernandez, A.L. Echemedia, R. Peral, G. Gonzalez, D. Garcia, S. Valdes, A. Estevez, K. Hernandez (2003). Identification of tomato mottle Taino begomovirus strains in Cuban potato fields. *Phytoparasitica* 31: 478-489.
27. Cuevas, J.M., S. Duffy, R. Sanjuan (2009). Point mutation rate of bacteriophage Phi-X174. *Genetics* 183(2): 747-749.
28. Culver, J.N., Padmanabhan, M.S. (2007). Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:221-243.
29. Davis, B.H., A.F.Y. Poon, M.C. Whitlock (2009). Compensatory mutations are repeatable and clustered within proteins. *Proc. R. Soc. B.* 276, 1823-1827.
30. Dawood F.S., S. Jain, L. Finelli, M.W. Shaw, S. Lindstrom, R.J. Garten, L.V. Gubareva, X. Xu, C.B. Bridges, T.M. Uyeki (2009). Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med.* 18;360(25):2605-15. Epub 2009 May 7. Erratum in: *N Engl J Med.* 2009 Jul 2;361(1):102.
31. DePristo, M.A., D.M. Weinreich, D.L. Hartl (2005). Missense meanderings in sequence space: a biophysical view of protein evolution. *Nat Rev Genet* 6:678–687.

32. Domingo, E. (2003). Quasispecies and the development of new antiviral strategies. *Progress in Drug Res.* 60:133-158.
33. Domingo, E., Holland, J.J. (1994). Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In: *The Evolutionary Biology of Viruses* (Morse, S. S., ed.), pp. 161-184. Raven Press, New York, NY.
34. Domingo, E., Holland, J.J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual review of microbiology* 51, 151-78.
35. Domingo E., V. Martin, C. Perales, A. Grande-Perez, J. Garcia-Arriaza (2006). Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol* 299: 51–82.
36. Donson, J., B.A. Morris-Krsinich, P.M. Mullineaux, M.I. Boulton, J.W. Davies (1984). A putative primer for second strand-synthesis of maize streak virus is virion-associated. *The EMBO journal* 3, 3069-73.
37. Drake J.W., Holland J.J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:13910-13913. Drake, J.W. (1991). A constant rate of spontaneous mutations in DNA-based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7160-7164.
38. Drake, J.W. (1993). Rates of spontaneous mutations among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4171-4175.
39. Drake, J.W., Hwang, C.B.C. (2005). On the mutation rate of herpes simplex virus type 1. *Genetics*. 170:969-970.
40. Duan, Y.P., C.A. Powell, S.E. Webb, D.E. Purcifull, E. Hiebert (1997). Geminivirus resistance in transgenic tobacco expressing mutated BC1 protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10:610-623.
41. Duffy S., Holmes E.C. (2008) Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus tomato yellow leaf curl virus. *Virology* 472(2):957-65.
42. Duffy, S., Holmes, E. (2009). Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. *J. Gen. Virol.* doi:10.1099/vir.0.009266-0.
43. Duffy, S., L.A Shackelton, E.C. Holmes (2008). Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat. Rev.* 9: 267-276.
44. Echols H., Goodman M.F. (1991). Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu Rev Biochem.* 60:477–511.
45. Eigen, M. (1971). Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften*, 58, 465–523.
46. Elmer, J.S., L. Brand, G. Sunter, W.E. Gardiner, D.M. Bisaro, S.G. Rogers (1998). Genetic analysis of tomato golden mosaic virus. II. Requirement for the product of the highly conserved AL1 coding sequence for replication. *Nucleic Acids Res.* 16:7043-7060.
47. Fauquet, C.M., Stanley, J. (2005). Revising the way we conceive and name viruses below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for standardized isolate descriptors. *Arch. Virol.* 150: 2151-2179.
48. Fauquet, C.M., Stanley, J. (2003). Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems. *Ann. Appl. Biol.* 142:165-189.

49. Ferrer-Costa, C., M. Orozco, X. de la Cruz (2007). Characterization of compensated mutations in terms of structural and physico-chemical properties. *J Mol Biol*, 365(1):249–56.
50. Fondong, V.N., J.S. Pita, M.E.C. Rey, A. deKochko, R.N. Beachy, C.M. Fauquet (2000). Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. *Journal of General Virology* 81, 287-297.
51. Fontes, E.P.B., P.A. Eagle, P.S. Sipe, V.A. Luckow, L. Hanley-Bowdoin (1994). Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *J. Biol. Chem.* 269, 8459–8465.
52. Fraser, C., C. A. Donnelly, S. Cauchemez, W. P. Hanage, M. D. Van Kerkhove, T. D. Hollingsworth, J. Griffin, R. F. Baggaley, H. E. Jenkins, E. J. Lyons, T. Jombart, W. R. Hinsley, N. C. Grassly, F. Balloux, A. C. Ghani, N. M. Ferguson, A. Rambaut, O. G. Pybus, H. Lopez-Gatell, C. M. Alpuche-Aranda, I. B. Chapela, E. P. Zavala, D. M. Guevara, F. Checchi, E. Garcia, S. Hugonnet, C. Roth (2009). Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science* 324:1557-1561.
53. Frederico, L.A., T.A. Kunkel, B.R. Shaw (1990). A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. *Biochemistry* 29, 2532–2537.
54. Freeman, S.; Herron, J. (2002). *“Análisis Evolutivo”*. Prentice Hall. Madrid, ISBN: 84-205-3390-3394.
55. Froissart, R., D. Roze, M. Uzest, L. Galibert, S. Blanc, Y. Michalakis (2005). Recombination every day: abundant recombination in a virus during a single multi-cellular host infection. *PLoS Biol.* 3:389-395.
56. Futuyma, D.J.; Moreno, G. (1988). The evolution of ecological specialization. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 19: 207-233.
57. Gafni, Y., Epel, B. (2002). The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Physiol Mol Plant Pathol* 60, 231–241.
58. Gafni, Y., Kunik, T. (1997). Nuclear transport of geminiviral proteins. *Trends in Plant Pathology* 1, 65-70.
59. Gallegos, H.M.L. (1978). Enchinamiento del tomate (chino disease of tomato). In *Enfermedades de cultivos en el estado de Sinaloa*. Sinaloa, México. Secretaria Agric. Recursos Hidraulicos. p. 119.
60. Gallian, P., P. Biagini, H. Attoui, J.F. Cantaloube, B. Dussol, Y. Berland, P. de Nicco, X. de Lamballerie (2002). High genetic diversity revealed by the study of TLMV infection in French hemodialysis. *J. Med. Virol.* 67: 630-635.
61. Galvão, R.M., A.C. Mariano, D.R. Luz, P.F. Alfenas, E.C. Andrade, F.M. Zerbini, M.R. Almeida, E.P.B. Fontes (2003). A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. *Journal of General Virology* 84: 715-726.
62. García-Arenal, F., A. Fraile, J.M. Malpica (2001). Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology*, 157-186.
63. Garcia-Diaz, M., Bebenek, K. (2007). Multiple functions of DNA polymerases. *Critical reviews in plant sciences* 2, 105-122.

64. Garzon-Tiznado, J.A., I. Torres-Pacheco, J.T. Ascencio-Ibanez, L. Herrera-Estrella, R.F. Rivera-Bustamante (1993). Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. *Phytopathology* 83: 514-521.
65. Ge, L., J. Zhang, X. Zhou, H. Li (2007). Genetic structure and population variability of Tomato yellow leaf curl China virus. *J. Virol.* 81, 5902–5907.
66. Gilbertson R.L., Rojas M.R. (2004). Plant DNA virus diseases. In *Encyclopedia of Plant and Crop Science*, pp. 960–64. New York: Marcel Dekker.
67. Grimaldi, D.; Engel, M.S. (2005). Evolution of the insects. *J Insect Conserv* 11: 211-212.
68. Guo, H.H., J. Choe, L.A. Loeb (2004). Protein tolerance to random amino acid change. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9205–9210.
69. Gutierrez, C. (1999). Geminivirus DNA replication. *Cell Mol Life Sci* 56, 313-329.
70. Gutierrez, C. (2000). DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO J.* 19:792-799.
71. Ha C., S. Coombs, P. Revill, R. Harding, M. Vu, J. Dale (2006). Corchorus yellow vein virus, a New World geminivirus from the Old World. *J Gen Virol*, 87:997-1003.
72. Ha C., S. Coombs, P. Revill, R. Harding, M. Vu, J. Dale (2008). Molecular characterization of begomoviruses and DNA satellites from Vietnam: additional evidence that the New World geminiviruses were present in the Old World prior to continental separation. *J Gen Virol*, 89: 312-326.
73. Hahn, C.S., S. Lustig, E.G. Strauss, J.H. Strauss (1988). Western equine encephalitis virus is a recombinant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5997-6001.
74. Hanley- Bowdoin, L., S.B. Settlege, B.M. Orozco, S. Nagar, D. Robertson (2000). Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35, 105-140.
75. Hanley-Bowdoin, L., J.S. Elmer, S.G. Rogers (1990). Expression of functional replication protein from *Tomato golden mosaic virus* in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1446-1450.
76. Hanley-Bowdoin, L., S.B. Settlege, D. Robertson (2004). Reprogramming plant gene expression: A prerequisite to geminivirus DNA replication. *Mol Plant Pathol* 5, 149-156.
77. Hanley-Bowdoin, L., S.B. Settlege, B.M. Orozco, S. Nagar, D. Robertson (1999). Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 18:71-106.
78. Harrison, B.D. (1985). Advances in geminivirus research. *Annu Rev Phytopathol* 23, 55-82.
79. Harrison, B.D., Robinson, D.J. (2002). Green shoots of geminivirology. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60: 215-218.
80. Harrison, B.D., X. Zhou, G.W. Otim-Nape, Y. Liu, D.J. Robinson (1997). Role of a novel type of double infection in the geminivirus-induced epidemic of severe cassava mosaic in Uganda. *Annals of Applied Biology* 131, 437-448.
81. Hartwell, J.N., Sharp, P.M. (2000). Evolution of human polyomavirus JC. *J. Gen. Virol.* 81: 1191-1200.



82. Hill, J.E., J.O. Strandberg, E. Hiebert, S.G. Lazarowitz (1998). Asymmetric infectivity of pseudorecombinants of cabbage leaf curl virus and squash leaf curl virus: implications for bipartite geminivirus evolution and movement. *Virology* 250, 283-292.
83. Holguin-Peña, R.J., R.F. Rivera-Bustamante, J. Carrillo-Tripp (2007). Pepper golden mosaic virus and related geminiviruses affecting tomato crops. Characterization, Diagnosis and Management of Plant Viruses. Vegetable and Pulse Crops. Capitulo 7. Pp. 163-193.
84. Holmes, E.C., Drummond, A.J. (2007). The evolutionary genetics of viral emergence. IN *Curr Top Microbiol Immunol*, 315.51-66.
85. Hou, Y.M., E.J. Paplomatas, R.L. Gilbertson (1998). Host adaptation and replication properties of two bipartite geminiviruses and their pseudorecombinants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 208-217.
86. Hou, Y., R. Sanders, V.M. Ursin, R.L. Gilbertson (2000). Transgenic plants expressing geminivirus movement proteins: abnormal phenotypes and delayed infection by Tomato mottle virus in transgenic tomatoes expressing the Bean dwarf mosaic virus BV1 or BC1 proteins. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13: 297-308.
87. Hull, R. (2002). *Matthew's Plant Virology – Fourth Edition*. Academic Press, London.
88. Ilyina, T.V., Koonin, E.V. (1992). Conserved motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archibacteria. *Nucleic Acids Res* 20, 3279-3285.
89. Inamdar, N.M., X.Y. Zhang, C.L. Brough, W.E. Gardiner, D.M. Bisaro, M. Ehrlich (1992). Transfection of heteroduplexes containing uracil-guanine or thymine-guanine mispairs into plant cells. *Plant Mol. Biol.* 20: 123–131.
90. Isnard, M., M. Granier, R. Frutos, B. Reynaud, M. Peterschmitt (1998). Quasispecies nature of three Maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. *J. Gen. Virol.* 79, 3091-3099.
91. Iyer, L.M., D.D. Leipe, E.V. Koonin, L. Aravind (2004). Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J Str. Biol.* 146(1-2):11-31.
92. Keightley, P.D.; S.P. Otto (2006). Interference among deleterious mutations favours sex and recombination in finite populations. *Nature* 443:89–92.
93. Lauring, A.S., Andino, R. (2010). Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog* 6(7): e1001005.
94. Martin, D.P., J.A. Willment, R. Billharz, R. Velders, B. Odhiambo, J. Njuguna, D. James, E.P. Rybicki (2001). Sequence diversity and virulence in *Zea mays* of *Maize streak virus* isolates. *Virology* 288: 247-255.
95. Martin, G., S.P. Otto, T. Lenormand (2006). Selection for recombination in structured populations. *Genetics* 172:593–609.
96. Noueiry, A.O., W.J. Lucas, R.L. Gilbertson (1994). Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmatal transport. *Cell* 76: 925-932.
97. Jeske, H., M. Lütgemeier, W. Preiss (2001). DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *EMBO Journal* 20: 6158-6167.

98. Jones, D.R. (2003). Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology* 109: 195-219.
99. Kamei, T., T. Goto, R. Matsui (1969). Reduced turnip mosaic virus multiplication in leaves infected with cauliflower mosaic virus. *Phytopathology* 59, 1513-1516.
100. Kirthi, N., S.P. Maiya, M.R.N. Murthy, H.S. Savithri (2002). Evidence for recombination among the tomato leaf curl virus strains/species from Bangalore, India. *Archives of Virology* 147, 255-272.
101. Klute, K.A., S.A. Nadler, D.C. Stenger (1996). Horseradish curly top virus is a distinct subgroup II geminivirus species with Rep and C4 genes derived from subgroup III ancestor. *Journal of General Virology* 77, 1369-1378.
102. Kong L.J., B.M. Orozco, J.L. Roe, S. Nagar S, H.S. Feiler, T. Durfee, A.B. Miller, W. Gruissem, D. Robertson, L. Hanley-Bowdoin (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 J* 19: 3485–3495.
103. Koonin, E.V., Ilyina T.V. (1992). Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle replication initiator proteins. *Journal of general virology* 73, 2763-6.
104. Laufs, J., S. Schumacher, N. Geisler, I. Jupin, B. Gronenborn (1995). Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. *FEBS Lett.* 377:258-262.
105. Lazarowitz, S.G. (1992). Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critic Rev. Plant Sci.* 11: 327 - 349.
106. Legg, J.P., Thresh, J.M. (2000). Cassava mosaic virus disease in East Africa: A dynamic disease in a changing environment. *Virus Res.* 71:135–149.
107. Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709–715.
108. Loh, E., J. Choe, L.A. Loeb (2007). Highly tolerated amino acid substitutions increase the fidelity of E. coli DNA polymerase I. *J Biol Chem* 282:12201–12209.
109. Londoño-Avedaño, A., L. Riego-Ruiz, G.R. Argüello-Astorga (2010). DNA-binding specificity determinants of replication proteins encoded by eukaryotic ssDNA viruses are adjacent to widely separated RCR conserved motifs. *Arch Virol*, 155:1033–1046.
110. Lopez-Bueno, A., L.P. Villareal, J.M. Almendral (2006). Parvovirus variation for disease: a difference with RNA viruses? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 299: 349-370.
111. Lucas, J.W. (2006). Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* 344, 169-84.
112. Manrubia, S.C., J. Garcia-Arriaza, C. Escarmis, E. Domingo (2006). Long-range transport and universality classes in in vitro viral infection spread. *Europhysics Letters* 74:547-553.
113. Mariconti, L., B. Pellegrini, R. Cantoni, R. Stevens, C. Bergounioux, R. Cella, D. Albani (2002). The E2F family of transcription factors from *Arabidopsis thaliana*. Novel and conserved components of the retinoblastoma/E2F pathway in plants. *J. Biol. Chem.* 277: 9911–9919.

114. Martin, D.P., C. Williamson, D. Posada (2004). RDP2: Recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* Epub ahead of print.
115. Méndez Lozano, J., I. Torres Pacheco, C.M. Fauquet, R.F. Rivera Bustamante (2003). Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: Pepper huasteco virus and Pepper golden mosaic virus. *Phytopathology* 93, 270-277.
116. Moffat, A.S. (1999). Geminiviruses emerge as a serious crop threat. *Science*. 286:1835.
117. Monci, F., S. Sanchez-Campos, J. Navas-Castillo, E. Moriones (2002). A natural recombinant between the geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology*. 303: 317-326.
118. Morales, F.J.; Anderson, P.K. (2001). The emergence and dissemination of whiteflytransmitted geminiviruses in America Latina. *Archives of Virology* 146: 415-441.
119. Moriones, E.; Navas-Castillo, J. (2000). Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Res* 71, 123-134.
120. Naranjo, S.E.; Ellsworth, P.C. (2001). Challenges and opportunities for pest management of *Bemisia tabaci* in the new century. *Crop Prot* 20, 707.
121. Oliveira, M.R.V., T.J. Henneberry, P. Anderson (2001). History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Prot* 20, 709-723.
122. Orozco, B.M.; Hanley-Bowdoin, L. (1998) Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein *J. Biol. Chem.*, 273 (38):24448–24456.
123. Orozco, B.M., A.B. Miller, S.B. Settagle, L. Hanley-Bowdoin (1997). Functional domains of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry* 272: 9840-9846.
124. Orr, H.A. (2009). Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nat Rev Genet* 10:531–539.
125. Padidam, M., S. Sawyer, C.M. Fauquet (1999). Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265: 218-225.
126. Paximadis, M., A. M. Idris, I. Torres-Jerez, A. Villarreal, M.E.C. Rey, J. Brown (1999). Characterization of tobacco geminiviruses in the Old and New World. *Archives of Virology* 144, 703-717.
127. Pilartz, M.; Jeske, H. (2003). Mapping of Abutilon Mosaic Geminivirus Minichromosomes. *J. Virol.* 77: 10808-10818.
128. Pilartz, M.; Jeske, H. (1992). Abutilon mosaic geminivirus double-stranded DNA is packed into minichromosomes. *Virology* 189:800-802.
129. Pita, J.S., V.N. Fondong, A. Sangaré, G.W. Otim-Nape, S. Ogwal, C.M. Fauquet (2001a). Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General Virology* 82: 655-665.
130. Pita, J.S., V.N. Fondong, A. Sangare, R.N.N. Kokora, C.M. Fauquet (2001b). Genomic and biological diversity of the African cassava geminiviruses. *Euphytica* 120, 115-125.

131. Polston, J.E.; Anderson, P.K. (1997). The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease* 81: 1358-1369.
132. Pons-Corona, M. (2001). Transformación genética de papaya (*Carica papaya* L.) mediante biobalística. Tesis de maestría. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Santa Clara, Cuba.
133. Poon, A.; Chao, L. (2006). Functional origins of fitness effect-sizes of compensatory mutations in the DNA bacteriophage phiX174. *Evolution* 60, 2032–2043.
134. Poon, A., B.H. Davis, L. Chao (2005). The coupon collector and the suppressor mutation: estimating the number of compensatory alleles by maximum likelihood. *Genetics* 170, 1323–1332. (doi:10.1534/genetics.104.037259).
135. Preiss, W.; Jeske, H. (2003). Multitasking in replication is common among geminiviruses. *Journal of Virology* 77, 2972-2980.
136. Pruss, G., X. Ge, X.M. Shi, J.C. Carrington, V.B. Vance (1997). Plant viral synergism: The potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9, 859-868.
137. Quinones-Mateu, M.E., Arts E.J. (2006). Virus fitness: concept, quantification, and application to HIV population dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol* 299:83–140.
138. Ramos P.L., O. Guerra, R. Peral, P. Oramas, R.G. Guevara, R. Rivera-Bustamante (1997) Taino tomato mottle virus, a new bipartite geminivirus from Cuba. *Plant Dis* 81: 1095.
139. Ramos, P.L., O. Guerra, R. Peral, P. Oramas, R.G. Guevara, R.F. Rivera-Bustamante (1997). Taino tomato mottle virus, a new bipartite geminivirus from Cuba. *Plant Disease* 81: 1095.
140. Ramos, P.L., R.G. Guevara-Gonzalez, R. Peral, J.T. Ascencio-Ibañez, J.E. Polston, G.R. Argüello-Astorga, J.C. Vega-Arreguin, R.F. Rivera-Bustamante (2003). Tomato mottle Taino virus pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: Implications for the delimitation of cis- and trans-acting replication specificity determinants. *Archives of Virology* 148: 1697-1712.
141. Raney, J.L., R.R. Delongchamp, C.R. Valentine (2004). Spontaneous mutant frequency and mutation spectrum for gene A of phiX174 grown in *E. coli*. *Environ. Mol. Mutagen.* 44: 119-127.
142. Rentería-Canett, I. (2004). Mecanismos de la interacción sinérgica en la mezcla del virus del chile y el virus del mosaico dorado del chile a nivel de replicación. Tesis de maestría, Cinvestav-Irapuato.
143. Rentería-Canett, I., R. Ruiz-Medrano, R.F. Rivera-Bustamante (2007). Geminivirus mixed infection in pepper plants: effects in localization and replication of PHYVV and PepGMV viruses. XIII INTERNATIONAL CONGRESS ON MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS. Sorrento, Italia. PS 12-601.
144. Ribeiro, S.G., I.C. Bezerra, R.O. Resende, M.F. Lima, L.V. Rezende, A.C. Ávila (1998). New tomato geminiviruses in mixed infections in Brazil. In *2nd International Workshop on Bemisia and Geminiviruses*, pp. P-63. San Juan, Puerto Rico.
145. Ribeiro, S.G., L.P. Ambrozewicz, A.C. Ávila, I.C. Bezerra, R.F. Calegario, J.J. Fernandes, M.F. Lima, R.N. de Mello, H. Rocha, F.M. Zerbini (2003). Distribution and genetic diversity of tomato infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, v.148, p.281-295.

146. Rojas, M.R., C. Hagen, W.J. Lucas, R.L. Gilbertson (2005). Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:361-394.
147. Rojas M.R., Gilbertson R.L. (2008). Emerging plant viruses: a diversity of mechanisms and opportunities. In: Roossinck MJ (ed) *Plant virus evolution*, Springer-Verlag, Berlin, pp 27–51.
148. Rojas, M.R., H. Jiang, R. Salati, B. Xoconostle-Cazares, M.R. Sudarshana, W.J. Lucas, R.L. Gilbertson (2001). Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, Tomato yellow leaf curl virus. *Virology* 291: 110-125.
149. Roossinck, M.J. (1997). Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Review of Phytopathology*, 35, 191-209 DOI:10.1146/annurev.phyto.35.1.191.
150. Ruiz-Medrano, R. (1996). Analisis de la expresión de los principales protores del geminivirus huasteco del chile. Ph. D. Tesis. Irapuato, Gto. Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del IPN.
151. Sambrook, L.; Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd Ed. New York, USA: Cold spring Harbor Laboratory Press.
152. Sanderfoot, A.A., D.J. Ingham, S.G. Lazarowitz (1996). A viral movement protein as a nuclear shuttle. *Plant Physiol.* 110: 23-23.
153. Sanjuán, R. (2010). Mutational fitness effects in RNA and single-stranded DNA viruses: common patterns revealed by site-directed mutagenesis studies. *Phil. Trans. R. Soc.* 365:1975-1982.
154. Sanz, A.I., A. Fraile, F. Garcia-Arenal, X. Zhou, D.J. Robinson, S. Khalid, T. Butt, B.D. Harrison (2000). Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *J. Gen. Virol.* 81:1839-1849.
155. Sanz, A.I., A. Fraile, J.M. Gallego, J.M. Malpica, F. Garcia-Arenal (1999). Genetic variability of natural populations of cotton leaf curl geminivirus, a single-stranded DNA virus. *Journal of molecular evolution* 49, 672-81.
156. Saunders, K., I.D. Bedford, T. Yahara, J. Stanley (2003). The earliest recorded plant virus disease. *Nature* 422: 831.
157. Saunders, K.; Stanley, J. (1999). A nanovirus-like DNA component associated with yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. *Virology* 264, 142-152.
158. Saunders, K., N. Salim, V.R. Mali, V.G. Malathi, R. Briddon, P.G. Markham, J. Stanley (2002). Characterization of Sri Lankan Cassava mosaic virus and Indian Cassava mosaic virus: Evidence for acquisition of a DNA B component by a monopartite begomovirus. *Virology* 293: 63-74.
159. Seal, S.E., F. van den Bosch, M.J. Jeger (2006). Factors Influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 25:23-46.
160. Settlege, S.B., A.B. Miller, W. Grisse, L. Hanley-Bowdoin (2001). Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. *Virology* 279: 570-576.

161. Settlage, S.B., R.G. See, L. Hanley-Bowdoin (2005). Geminivirus C3 protein: replication enhancement and protein interactions. *J Virol* 79: 9885-9895.
162. Shackelton, L.A., C.R. Parrish, U. Truyen, E.C. Holmes (2005). High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 379-384.
163. Shackelton, L.A.; E.C. Holmes (2006). Phylogenetic evidence for the rapid evolution of human B19 erythrovirus. *J. Virol.* 80: 3666-3669.
164. Shivaprasad PV, R. Akbergenov, D. Trinks, R. Rajeswaran, K. Veluthambi, T. Hohn, M.M. Pooggin (2005). Promoters, transcripts, and regulatory proteins of Mungbean yellow mosaic geminivirus. *J Virol* 79:8149–8163.
165. Stanley, J., D.M. Bisaro, R. Briddon, J.K. Brown, C.M. Fauquet, B.D. Harrison, E.P. Rybicki, D.C. Stenger (2005). Geminiviridae: Eighth Report of the ICTV on Virus Taxonomy. Pages 301- 326 in: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L.A. (Eds.) 2005. *Virus Taxonomy-Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, London. 1257 pp.
166. Stenger D.C., G.N. Revington, M.C. Stevenson, D.M. Bisaro (1991). Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: Evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(18):8029-8033.
167. Stenger, D.C., J.E. Duffus, B. Villalon (1990). Biological and genomic properties of a geminivirus isolated from pepper. *Phytopathology* 80: 704.
168. Stevens, W.A. (1983). *Virology of flowering plants*. Chapman y Hall y Methuen. Inc., 733 Third Avenue, New York, NY 10017. ISBN 0-412-00071-7.
169. Suckow, J., P. Markiewicz, L.G. Kleina, J. Miller, B. Kisters-Woike, B. Muller-Hill (1996). Genetic studies of the Lac repressor. XV: 4000 single amino acid substitutions and analysis of the resulting phenotypes on the basis of the protein structure. *J Mol Biol* 261:509–523.
170. Sunter, G., D.C. Stenger, D.M. Bisaro (1994). Heterologous complementation by geminivirus AL2 and AL3 genes. *Virology* 203, 203-210.
171. Sunter, G., M.D. Hartz, S.G. Hormudzi, C.L. Brough, D.M. Bisaro (1990). Genetic analysis of Tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology* 179: 69-77.
172. Taubenberger J.K., Morens D.M. (2006). 1918 influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis* 12 (1): 15–22.
173. Thomas D.C., J.D. Roberts, R.D. Sabatino, T.W. Myers, C.K. Tan, K.M. Downey, A.G. So, R.A. Bambara, T.A. Kunkel (1991). Fidelity of mammalian DNA replication and replicative DNA polymerases. *Biochemistry* 30(51):11751-11759.
174. Tomes, S.T., A.K. Weissinger, M. Ross, R. Higgins, B.J. Drummond, S. Schaaf, J.B. Maline-Schoneberg, M. Staebell, P. Flynn, J. Anderson, J. Howard (1990). Transgenic tobacco plants and their progeny derived by microprojectile bombardment of tobacco leaves. *Plant Mol. Biol.* 14:261-268.
175. Torres-Pacheco, I., J.A. Garzon-Tiznado, J.K. Brown, A. Becerra-Flora, R.F. Rivera-Bustamante (1996). Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology* 86: 1186-1192.

176. Torres-Pacheco, I., J.A. Garzon-Tiznado, L. Herrera-Estrella, R.F. Rivera-Bustamante (1993). Complete nucleotide sequence of Pepper Huasteco virus: analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *Journal of General Virology* 74: 2225-2231.
177. Umemura T., Y. Tanaka, Kiyosawa, H.J. Aller, J.W. Shih (2002). Observation of positive selection within hypervariable regions of a newly identified DNA virus (SEN virus). *FEBS Lett.* 510:171–174.
178. Vandepoele, K., K. Vlieghe, K. Florquin, L. Hennig, G.T.S. Beemster, W. Grissem, Y. Van de Peer, D. Inze, L. De Veylder (2005). Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol.* 139: 316–328.
179. van der Walt, E., E.P. Rybicki, A. Varsani, J.E. Polston, R. Billharz, L. Donaldson, A.L. Monjane, D.P. Martin (2009) Rapid host adaptation by extensive recombination. *J. Gen. Virol.* 90:734-746.
180. Vanitharani, R., P. Chellappan, J.S. Pita, C.M. Fauquet (2004). Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 78: 9487-9498.
181. Varma, A.; Malathi, V.G. (2003). Emerging geminivirus problems. A serious threat to crop production. *Ann. Appl. Biol.* 142: 145-164.
182. Voinnet, O., Y.M. Pinto, D.C. Baulcombe (1999). Suppressor of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14147-14152.
183. Wang, W.; Malcolm, B.A. (1999). Two-Stage PCR Protocol Allowing Introduction of Multiple Mutations, Deletions and Insertions Using QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis. *BioTechniques.* 26 (4): 680-682.
184. Wang, H., K.J. Buckley, X. Yang, R.C. Bunchmann, D.M. Bisaro (2005). Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *J Virol* 79, 7410-7418.
185. Wang, Z.O.; Pollock, D.D. (2005). Context dependence and coevolution among amino acid residues in proteins. *Methods Enzymol.* 395, 779–790. (doi: 10.1016/S0076-6879(05)95040-4).
186. Whittock M.C. (1996). The Red Queen beats the jack-of-all-trades: the limitations on the evolution of phenotypic plasticity and niche breadth. *Am. Nat.* 148: S65-S77.
187. Wilke, C.O. (2005). Quasispecies theory in the context of population genetics. *BMC Evol Biol* 5: 44.
188. Xie Q., P. Suarez-Lopez, C. Gutierrez (1995). Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication. *EMBO J.* 14:4073–82.
189. Zaitlin, M. (1998). The discovery of the causal agent of the tobacco mosaic disease. pp. 105-110 in: *Discoveries in Plant Biology* S.-D. Kung, and S. F. Yang, eds. World Scientific Publishing Co. Ltd., Hong Kong.

## ANEXOS

### ANEXO 1: Tablas suplementarias de “MATERIALES Y MÉTODOS”

**Tabla M1. Oligonucleótidos mutagénicos**

Primer	Secuencia (5' → 3')	Marcador	Posición	Mutación
P1	CCAGCTTTGATTAT <u>GT</u> CGAcCGCCTCCCCGCACTTGC	SaI <sup>1</sup>	2030-2068	PepGMV-
P2	GCAAGTGCGGGGGAGGCGgTCGACATAATCAAAGCTGG	SaI <sup>1</sup>	2030-2068	L145V
P3	CCAGCTTTGATgATaTCGgCgCGCCTCCCCGCACTTGC	EcoRV <sup>1</sup>	2030-2068	PepGMV-
P4	GCAAGTGCGGGGGAGGCGgCGAtATcATCAAAGCTGG	EcoRV <sup>1</sup>	2030-2068	L145A
P5	CCAGCTTTGATgATaTCGgtCGCCTCCCCGCACTTGC	EcoRV <sup>1</sup>	2030-2068	PepGMV-
P6	GCAAGTGCGGGGGAGGCGacCGAtATcATCAAAGCTGG	EcoRV <sup>1</sup>	2030-2068	L145T
P7	CAGCATCTGctGAAGAAGCTgTGCAGATCATAAAGG	PstI <sup>2</sup>	2040-2076	PHYVV-
P8	CTGCacAGCTTCTTCaGCAGATGCTGAATTTAACGCC	PstI <sup>2</sup>	2050-2087	L147V
P9	CAGCATCTGctGAAGAAGCTgCGCAGATCATAAAGG	PstI <sup>2</sup>	2040-2076	PHYVV-
P10	CTGCgCAGCTTCTTCaGCAGATGCTGAATTTAACGCC	PstI <sup>2</sup>	2050-2087	L147A
P11	CAGCATCTGctGAAGAAGCTacGCAGATCATAAAGG	PstI <sup>2</sup>	2040-2076	PHYVV-
P12	CTGCgtAGCTTCTTCaGCAGATGCTGAATTTAACGCC	PstI <sup>2</sup>	2050-2087	L147T
P13	G TTCAGTCTGCCgTGGCAGTcTTAAAAGAAGAACAGCC	DraI <sup>2</sup>	1989-2027	ToMoTV-
P14	GGCTGTTCTTCTTTTAAgACTGCCAcGGCAGACTGAAC	DraI <sup>2</sup>	1989-2027	M147V
P15	G TTCAGTCTGCCgCGGCAGTcTTAAAAGAAGAACAGCC	DraI <sup>2</sup>	1989-2027	ToMoTV-
P16	GGCTGTTCTTCTTTTAAgACTGCCgCGGCAGACTGAAC	DraI <sup>2</sup>	1989-2027	M147A
P17	G TTCAGTCTGCCacGGCAGTcTTAAAAGAAGAACAGCC	DraI <sup>2</sup>	1989-2027	ToMoTV-
P18	GGCTGTTCTTCTTTTAAgACTGCCgtGGCAGACTGAAC	DraI <sup>2</sup>	1989-2027	M147T

Las mutaciones se señalan con letras minúsculas y los sitios de restricción (generado<sup>1</sup> o eliminado<sup>2</sup>) utilizados como marcadores son subrayados.



**ANEXO 1: Tablas suplementarias de “MATERIALES Y MÉTODOS”  
(continuación)**

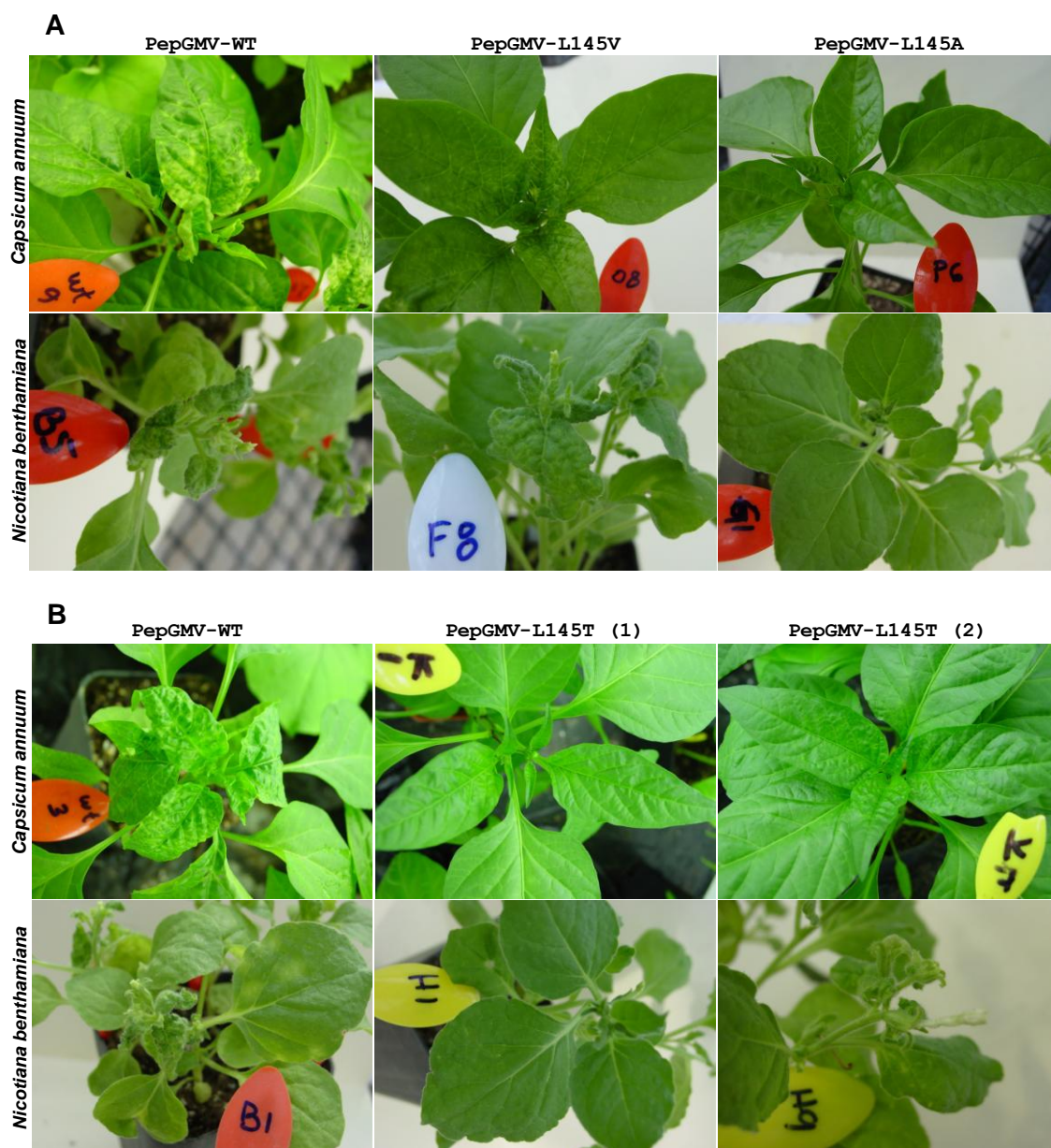
**Tabla M2.** Vectores virales mutantes.

Virus	Mutación	Sitios de clonación	Sitios de restricción generado <sup>1</sup> o eliminado <sup>2</sup> : marcador	Vector viral
PepGMV	L145V	EcoRI/BglII	SaI <sup>1</sup>	pPep1.19L145V
	L145A		EcoRV <sup>1</sup>	pPep1.19L145A
	L145T		EcoRV <sup>1</sup>	pPep1.19L145T
PHYVV	L147V	XbaI/BglII	Dos PstI <sup>2</sup>	pPHY1.38L147V
	L147A		Dos PstI <sup>2</sup>	pPHY1.38L147A
	L147T		Dos PstI <sup>2</sup>	pPHY1.38L147T
ToMoTV	M147V	XbaI/EcoRI	DraI <sup>2</sup>	pTa1.46M147V
	M147A		DraI <sup>2</sup>	pTa1.46M147A
	M147T		DraI <sup>2</sup>	pTa1.46M147T

**Tabla M3.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *Rep*.

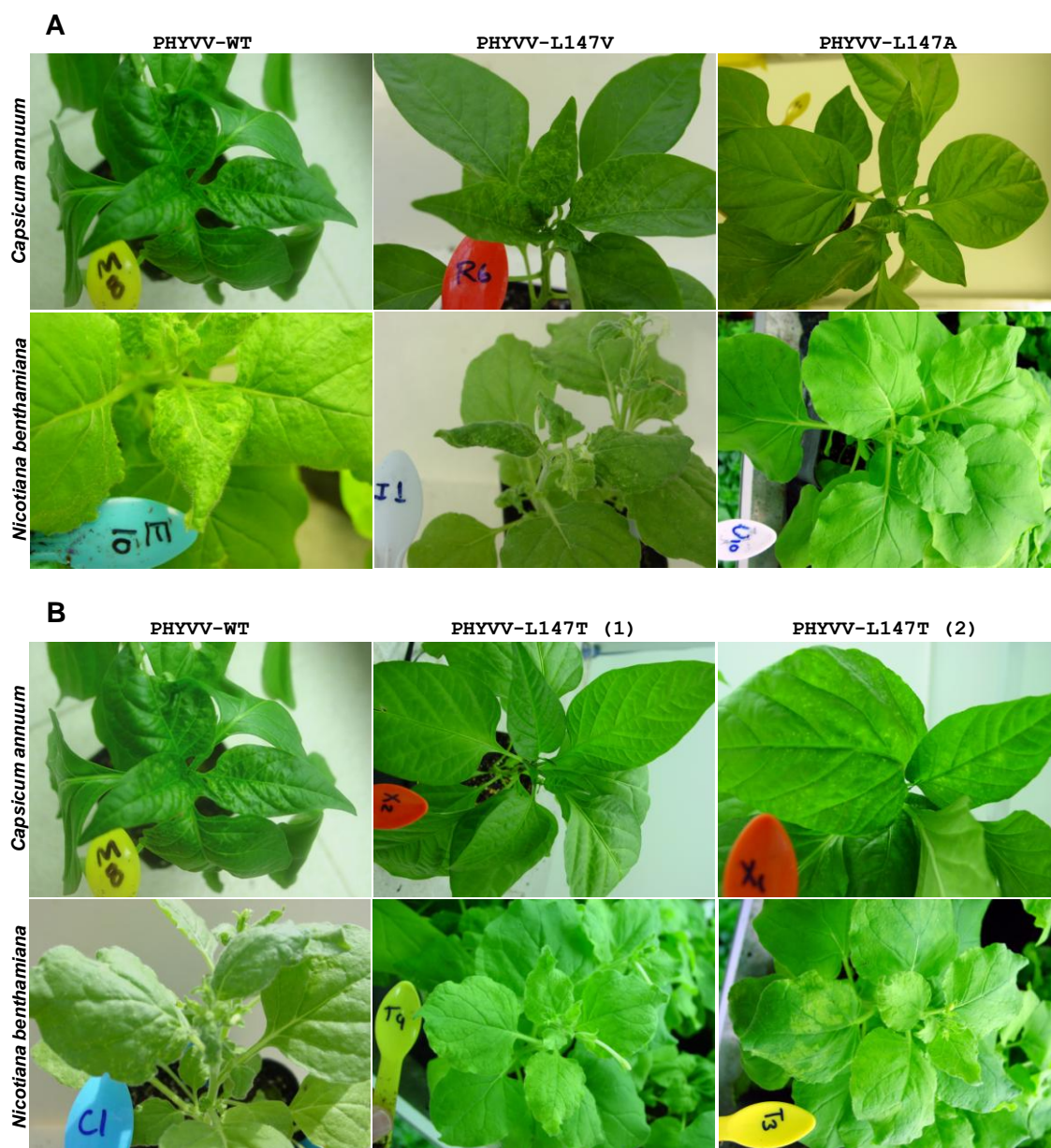
Primer	Secuencia (5' → 3')	Virus	Posición	Producto
P19	ACAGAAGTTGAGGGACTCTG	PepGMV	2509-2529	1150 bp
P20	TGGAGAAAGATAGAGCAGCC		1375-1395	
P21	ACCGATACAATAAGCCCAGG	PHYVV	2535-2555	1150 bp
P22	AGATCAACACGTCTACGTCG		1405-1425	
P23	TGTGAGAGAGAGCAATTGGG	ToMoTV	2475-2495	1159 bp
P24	GTGGAAGTATATGGAGCACC		1336-1356	

## ANEXO 2: Figuras suplementarias de “RESULTADOS”



**Figura R1. Efecto de las mutaciones en el residuo L145 de Rep de PepGMV.** La mayoría de las plantas de ambas especies inoculadas con PepGMV-WT presentaron síntomas característicos de este virus entre los 6 a 8-dpi (A y B; primera columna: 7-dpi). De forma similar, la mayoría de las plantas inoculadas con el virus mutante PepGMV-L145V mostraron signos de la enfermedad en el mismo tiempo que el control positivo (A; segunda columna; 7-dpi). Por el contrario, las plantas inoculadas con PepGMV-L145A no presentaron ninguna sintomatología (A; tercera columna; 7-dpi). En las plantas inoculadas con PepGMV-L145T, la mayoría mostró un retardo en la aparición de plantas con síntomas (B: PepGMV-L145T; compara no. 1 con n. 2).

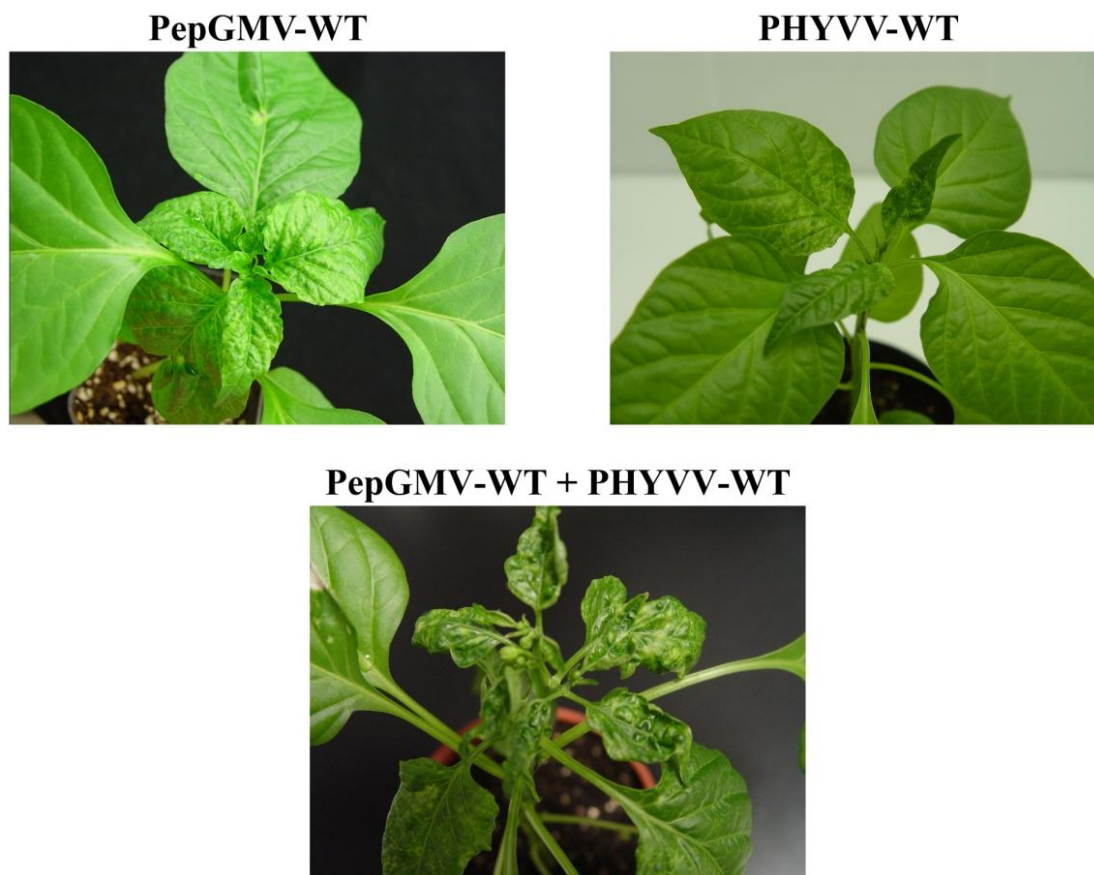
## ANEXO 2: Figuras suplementarias de “RESULTADOS” (continuación)



**Figura R2. Efecto de las mutaciones en el residuo L147 de Rep de PHYVV.** Los experimentos de infectividad con los virus de PHYVV mutantes en ambas especies de plantas fueron los mismos. PHYVV-L147V provocó síntomas similares a los causados por el virus silvestre (A; comparar PHYVV-WT y PHYVV-L147V). Las plantas de ambas especies inoculadas con PHYVV-L147A no presentaron ningún signo de la enfermedad a lo largo del experimento (A; PHYVV-L147A). Por el contrario, las plantas inoculadas con PHYVV-L147T presentaron síntomas de enfermedad en etapas tardías (B; comparar PHYVV-L147T no. 1 con no. 2).



**ANEXO 2: Figuras suplementarias de “RESULTADOS” (continuación)**



**Figura R3. La infección mixta entre PepGMV y PHYVV es sinérgica.** Las plantas de *C. annuum* se inocularon de forma independiente con PepGMV y PHYVV, observándose los síntomas característicos de cada virus (panel superior). Sin embargo, cuando los dos virus fueron inoculados en la misma planta, los síntomas se exacerbaron y la planta experimentó una afección muy marcada en los meristemas apicales, causando un enanismo severo.

### ANEXO 3: Tablas suplementarias de “RESULTADOS”

**Tabla R1:** Resumen de genotipos aislados en plantas de *C. annuum* inoculadas con PepGMV-L145T.

Plantas inoculadas de <i>C. annuum</i> : 35	
PCR positivas: 31	
Sintomáticas: 22	Asintomáticas: 9
1. L145T (mutante parental)*	L145T (mutante parental)
2. T145I	
3. V136L (CTA):L145T	
4. V136L (TTA):L145T	
5. V136I:L145T	
6. K125E:V136I:L145T	
7. I167L:L145T	

\*En algunos casos se encontró mezclado con virus revertantes (ver Tabla R2; marcadas en amarillo).

### ANEXO 3: Tablas suplementarias de “RESULTADOS” (continuación)

**Tabla R2:** Genotipos identificados en cada planta de *C. annuum* inoculada con PepGMV-L145T.

PepGMV-L145T					
Plantas con reversión fenotípica (22)				Plantas asintomáticas (9)	
Planta	Genotipo	Planta	Genotipo	Planta	Genotipo
1	[V136L:L145T]	12	[T145I] [L145T]	23	L145T
2	[I167L:L145T] [L145T]	13	[V136L(TTA):L145T] [V136L:L145T]	24	L145T
3	[I167L:L145T]	14	[I167L:L145T]	25	L145T
4	[I167L:L145T] [V136L:L145T]	15	[V136L(TTA):L145T]	26	L145T
5	[V136L(CTA):L145T]	16	[V136L:L145T]	27	L145T
6	[V136L(TTA):L145T] [I167L:L145T] [T145I] [L145T]	17	[V136L(TTA):L145T]	28	L145T
7	[V136L(TTA):L145T] [T145I] [K125E:V136L:L145T] [L145T]	18	[V136L:L145T] [L145T]	29	L145T
8	[V136L(CTA):L145T] [L145T]	19	[V136L:L145T]	30	L145T
9	[V136L(TTA):L145T] [L145T]	20	[V136L(CTA):L145T] [L145T]	31	L145T
10	[V136L(TTA):L145T]	21	[I167L:L145T]		
11	[V136L(TTA):L145T]	22	[T145I] [L145T]		

Se señalan en amarillo los genotipos parentales (L145T) encontrados con los virus revertantes.

**ANEXO 3: Tablas suplementarias de “RESULTADOS” (continuación)**

**Tabla R3:** Resumen de genotipos aislados en plantas de *N. benthamiana* inoculadas con PepGMV-L145T.

Plantas inoculadas de <i>N. benthamiana</i> : 23	
PCR positivas: 16	
Sintomáticas: 11	Asintomáticas: 5
1. L145T (mutante parental)*	L145T (mutante parental)
2. T145I	
3. V136L (CTA):L145T	
4. V136L (TTA):L145T	
5. V136I:L145T	
6. K125E:V136I:L145T	
7. I167L:L145T	

\*En algunos casos se encontró mezclado con virus revertantes (ver Tabla R4; marcadas en amarillo).

**ANEXO 3: Tablas suplementarias de “RESULTADOS” (continuación)**

**Tabla R4:** Genotipos identificados en cada planta de *N. benthamiana* inoculada con PepGMV-L145T.

<b>PepGMV-L145T</b>			
Plantas con reversión fenotípica (11)		Plantas asintomáticas (5)	
Planta	Genotipo	Planta	Genotipo
1	[V136I:L145T] [L145T]	12	L145T
2	[T145I]	13	L145T
3	[V136L(CTA):L145T] [L145T]	14	L145T
4	[T145I]	15	L145T
5	[V136L(CTA):L145T] [L145T]	16	L145T
6	[T145I] [L145T]		
7	[I167L:L145T] [L145T]		
8	[V136L(TTA):L145T] [L145T]		
9	[T145I]		
10	[V136I:L145T] [K125E:V136I:L145T]		
11	[T145I]		

Se señalan en amarillo los genotipos parentales (L145T) encontrados con los virus revertantes.



**ANEXO 3: Tablas suplementarias de “RESULTADOS” (continuación)**

**Tabla R5:** Genotipos identificados en plantas de *C. annuum* inoculadas con PHYVV-L147T.

Plantas inoculadas de <i>C. annuum</i> : 20	
PCR positivas: 17	
Sintomáticas: 12	Asintomáticas: 5
1. T147M 2. R6Q:L147T	L147T (mutante parental)

**Tabla R6:** Genotipos identificados en cada planta de *C. annuum* inoculada con PHYVV-L147T.

PHYVV-L147T			
Plantas con reversión fenotípica (12)		Plantas asintomáticas (5)	
Planta	Genotipo	Planta	Genotipo
1	T147M	13	L147T
2	T147M	14	L147T
3	T147M	15	L147T
4	T147M	16	L147T
5	T147M	17	L147T
6	T147M		
7	T147M		
8	T147M		
9	T147M		
10	T147M		
11	T147M		
12	[R6Q:L147T]		

**ANEXO 3: Tablas suplementarias de “RESULTADOS” (continuación)**

**Tabla R7:** Genotipos identificados en plantas de *N. benthamiana* inoculadas con PHYVV-L147T.

Plantas inoculadas de <i>C. annuum</i> : 20	
PCR positivas: 15	
Sintomáticas: 12	Asintomáticas: 3
1. T147M  2. K5Q:L147T	L147T (mutante parental)

**Tabla R8:** Genotipos identificados en cada planta de *N. benthamiana* inoculada con PHYVV-L147T.

PHYVV-L147T			
Plantas con reversión fenotípica (12)		Plantas asintomáticas (3)	
Planta	Genotipo	Planta	Genotipo
1	T147M	13	L147T
2	T147M	14	L147T
3	T147M	15	L147T
4	T147M		
5	T147M		
6	T147M		
7	T147M		
8	T147M		
9	T147M		
10	T147M		
11	T147M		
12	[K5Q:L147T]		

### ANEXO 3: Tablas suplementarias de “RESULTADOS” (continuación)

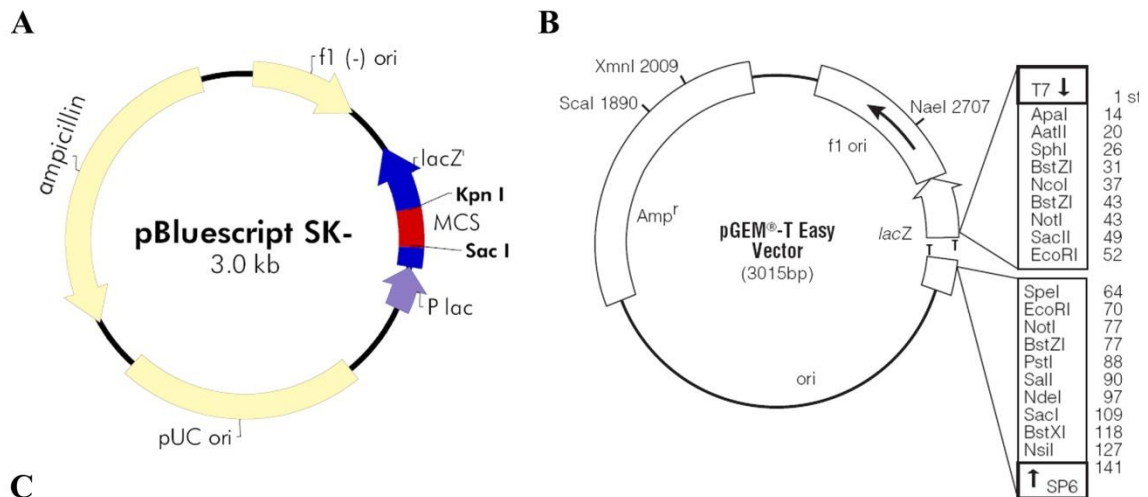
**Tabla R9.** Inoculación de plantas de *C. annuum* y *N. benthamiana* con los virus revertantes de PepGMV ([T145I], [V136I:L145T], [V136L:L145T], [I167L:L145T] y [K125E:V136I:L145T]).

Virus	<i>C. annuum</i>	Días después de la inoculación (dpi): número de plantas con síntomas			
		3-dpi	6-dpi	8-dpi	10-dpi
WT	10	0	9	<b>10</b>	10
T145I	10	0	<b>10</b>	10	10
V136I	10	0	8	<b>10</b>	10
V136L	10	0	<b>10</b>	10	10
V136L	10	0	<b>10</b>	10	10
I167L	10	0	9	<b>10</b>	10
K125E		0	0	0	0
Virus	<i>N. benthamiana</i>	Días después de la inoculación (dpi): número de plantas con síntomas			
		3-dpi	6-dpi	8-dpi	10-dpi
WT	10	0	6	8	<b>9</b>
T145I	10	0	5	8	<b>10</b>
V136I	10	0	4	8	<b>9</b>
V136L	10	0	4	<b>10</b>	10
V136L	10	0	7	<b>10</b>	10
I167L	10	0	4	<b>10</b>	10
K125E	10	0	0	0	0

## APÉNDICES

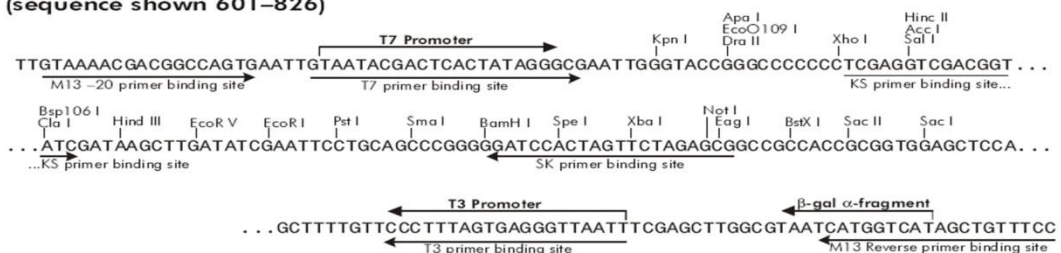
### A. Vectores de clonación

Los mapas de los vectores de clonación pBlueScript (A) (Stratagene) y pGEM-Teasy (B) (Promega) son mostrados a continuación. La secuencia del sitio múltiple de clonación de pBlueScript es detallado (C).



**C**

#### pBlueScript SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 601-826)



### B. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.

Los fragmentos de DNA fueron separados mediante geles de agarosa que variaban de concentración dependiendo del tamaño del fragmento. Los fragmentos con tamaños de entre 500-pb a 5000-pb se corrieron en geles de agarosa al 1% en buffer de TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1mM EDTA, pH8). Por el contrario, fragmentos menores de 500-pb se corrieron en geles de agarosa al 2% o más, en buffer SBE 1X (5nM Borato disódico decahidratado, pH 8.5) (Brody y Kern, 2004). Los geles de agarosa se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador. Una vez aislados, se purificaron

mediante el protocolo recomendado por el fabricante (Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System o QIAquick Gel Extraction Kit).

### **C. Preparación de células calcio-competentes de *Escherichia coli* TOP10F´.**

De un cultivo de la cepa de *E. coli* TOP10F´ crecida toda la noche, se toman 500 µL y se agrega en un matraz de 250 mL con 50 mL de medio LB líquido. Se incuba el cultivo a 37°C por aproximadamente 1.5 horas con agitación de 150 rpm. Posteriormente, se coloca el cultivo en una botella sorvall fría y se centrifuga a 8, 000 rpm por 7 minutos. Se elimina el sobrenadante y se coloca rápidamente la botella sorvall en hielo. Después, se agregan 7.7 mL de de CaCl<sub>2</sub> 0.1M y glicerol al 15% (solución fría) y se resuspende el pellet de células mediante agitación suave en el vórtex de 5 a 10 segundos, procurando mantener la botella fría. Luego, la muestra se centrifuga por 7 minutos a 8, 000 rpm y se descarta el sobrenadante. Se agrega 1.27 mL de la solución fría de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M y glicerol al 15% y se resuspende en el vórtex por un periodo de 5 a 10 segundos (nuevamente procurando mantener la botella fría). Finalmente, se preparan alícuotas de 30 µL en microtubos de 1.5 mL, se colocan de inmediato en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenan a -70°C.

### **D. Transformación de *E. coli* TOP10F´ por choque térmico.**

A una alícuota de 30 µL de las células de *E. coli* competentes por cloruro de calcio, se le agrega la cantidad apropiada de DNA y se incuba en hielo por 20 minutos. Después de este tiempo, se realiza el choque térmico a 42 °C por un minuto y rápidamente se coloca la muestra en hielo por 10 minutos. Posteriormente, en condiciones de esterilidad se agregan 750 µL de medio LB líquido y se incuba a 37 °C durante 45 a 60 minutos con agitación de 200 rpm. Se centrifuga la muestra a 8, 000 rpm por 2 minutos, se desecha parcialmente el sobrenadante y se resuspende el pellet de células en un volumen de 100 a 200 µL de medio LB. Finalmente, se siembran las células en placas de agar-LB con el antibiótico adecuado y se incuban las cajas a 37 °C por 16-24 horas.

### **E. Medio de cultivo: Luria Broth (LB).**

Para preparar 1 L de medio LB líquido, se pesan 10 g de Bactotripton (1%), 5 g de extracto de levadura (0.5%) y 10 g de NaCl (1%). Se ajusta el pH a 7.0 y se esteriliza por autoclave a 120°C por 20 minutos (15 lb/pulgada<sup>2</sup>). Para preparar medio de LB sólido, se pesan las cantidades descritas anteriormente y se agrega además 15g de agar bacteriológico al (1.5%). En los casos de placas de agar LB con antibiótico, se deja enfriar el medio recién esterilizado hasta una temperatura aproximada de 55°C, antes de agregar el antibiótico.

### **F. Antibióticos utilizados**

Para los medios de LB (líquido o placas de LB-agar), la concentración final de Carbenicilina fue de 100 µg/mL; mientras que para Kanamicina fue de 50 µg/mL. Los stocks de antibióticos se prepararon de la siguiente forma: a) 10 gramos de Carbenicilina se disolvió en agua estéril desionizada, se aforó a 100 mL y se esterilizó por filtración, almacenando el stock (100 mg/mL) a -20 °C. b) 5 gramos de sulfato de Kanamicina se disolvió en agua estéril desionizada. Se aforó a 100 mL y se esterilizó por filtración. Finalmente se almacenó el stock (50 mg/mL) a -20°C.

### **G. IPTG y X-Gal**

El stock de isopropil-β-D-tio-galactósido (IPTG) se preparó a 0.1 M con agua destilada estéril; mientras que el stock de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal) se preparó a 40 mg/mL en N,N-dimetilformamida (DMF). Ambos reactivos se almacenaron a -20°C. El X-Gal se protegió de la luz.

### **H. Obtención de DNA plasmídico: minipreparaciones**

En 3 mL de medio LB con el antibiótico adecuado, se agrega la cepa de bacteria a propagar y se incuba a 37°C por aproximadamente 12 horas con agitación constante (200 rpm). Posteriormente, se colecta el cultivo bacteriano en microtubos de 1.5 mL y se centrifuga a 8, 000 rpm durante 2 minutos. Se descarta el sobrenadante y se agregan 100 µL de la solución Birnboim I. El

pellet de células se resuspende en el vórtex y después se añaden 200  $\mu\text{L}$  de la solución Birnboim II. Se mezcla por inversión varias veces y se agregan 150  $\mu\text{L}$  de la solución Birnboim III. Nuevamente se mezclan las muestras suavemente por inversión y se dejan reposar en hielo por 3 minutos. Después, se centrifugan las muestras a 13, 000 rpm durante 10 minutos y se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo ( $\sim 500 \mu\text{L}$ ). Se adicionan 5  $\mu\text{L}$  de RNasa (stock de 2 mg/mL) y se incuban los tubos a temperatura ambiente por 20 a 30 minutos.

Posteriormente, se agregan 2 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato de sodio 3M con pH 5.5. Se mezclan los tubos por inversión y se dejan reposar en hielo por 3 minutos. Se centrifugan a 13,000 rpm por 10 minutos, se descarta el sobrenadante por decantación y se añaden 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%. Nuevamente se centrifugan las muestras a 13,000 rpm por 5 minutos, se elimina el sobrenadante por decantación y se dejan secar a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspende el DNA en TE pH 8.0 (o en agua estéril) en un volumen de 30 a 50  $\mu\text{L}$ .

#### **I. Obtención de DNA plasmídico: maxipreparaciones**

En 200 mL de medio LB (con el antibiótico apropiado), se coloca el inóculo de la cepa de bacteria a propagar y se incuba el cultivo con agitación constante (200 rpm) a 37°C por aproximadamente 16-18 horas. Transcurrido el tiempo, transfiere el cultivo en botellas sorvall y se centrifugan a 6, 000 rpm por 10 minutos. Se elimina el sobrenadante, se agregan 5 mL de la solución I y de forma vigorosa se resuspenden las células en el vórtex. Posteriormente, se añaden 10 mL de la solución II y se mezcla por inversión varias veces. Las muestras se dejan reposar a temperatura ambiente por 5 minutos y se agregan 7.5 mL de la solución III. Se mezclan las muestras por inversión (suavemente) y se dejan reposar en hielo por 10 minutos. Posteriormente, se centrifugan las muestras a 10, 000 rpm por 10 minutos y se transfieren los sobrenadantes a tubos sorvall nuevas. Se agregan 18 mL de isopropanol frío y se incuban los tubos a menos 20°C por 1 hora. Después, se centrifugan los tubos sorvall a 10, 000 rpm durante 20 minutos, se elimina el sobrenadante y se lava la pastilla con 5 mL de etanol al 70%. Nuevamente se centrifugan las muestras por 5 minutos a 10, 000 rpm, se elimina el sobrenadante y se deja secar el pellet a temperatura ambiente. Una vez seca la pastilla, se resuspende en 500  $\mu\text{L}$  de TE

pH 8.0 (o en agua estéril) y se transfiere a microtubos de 1.5 mL. Acto seguido, se agrega un volumen de fenol-cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1) y se mezcla vigorosamente en el vórtex. Se centrifugan las muestras a 13,000 rpm por 3 minutos y se transfiere la fase acuosa (fase superior) a un tubo nuevo. Nuevamente se repite la extracción con fenol-cloroformo-álcool isoamílico y la fase superior se transfiere a un tubo nuevo. Posteriormente, se agregan 2 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato de sodio 3M pH 5.5. Se mezclan los tubos por inversión y se dejan reposar a -20°C por 20 minutos. Las muestras se centrifugan a 13,000 rpm por 10 minutos y se descarta el sobrenadante. Se añaden 500 µL de etanol al 70% y nuevamente se centrifugan a 13,000 rpm por 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y se dejan secar las muestras a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspende el DNA en un volumen de 500 µL de TE pH 8.0 o en agua estéril.

#### **J. Preparación de partículas de tungsteno cubiertas con DNA**

Las partículas de tungsteno de 0.73 µm de diámetro se prepararon como se describe en Tomes *et al.* (1990). Se pesan 60 mg de partículas de tungsteno y se resuspenden en 2 mL de ácido nítrico al 0.1 N (HNO<sub>3</sub>). Se sonicán las partículas en frío durante 20 minutos y posteriormente se centrifugan a 10,000 rpm por 2 minutos. Se elimina el sobrenadante y se agregan 2 mL de etanol absoluto. Se sónica brevemente y se centrifugan nuevamente a 10,000 rpm por 2 minutos. El sobrenadante se descarta y se adiciona 1 mL de agua desionizada estéril. Se toman 250 µL y se lleva a un volumen final de 750 µL con agua desionizada estéril. La concentración final es de 15 µg/µL. Se almacenan a -20°C.

#### **K. Recubrimiento de las partículas de tungsteno con DNA**

En un microtubo de 1.5 mL se agregan 50 µL de las partículas de tungsteno (750 µg) y se mezcla con 10 µg de DNA (ambos componentes). Después, se agregan 50 µL de cloruro de calcio 2.5 M (CaCl<sub>2</sub>) y 20 µL de espermidina 0.1 M. Se homogeniza la mezcla por sonicación breve y se centrifuga a 10,000 rpm por 10 segundos. Se descarta el sobrenadante, se añaden 400 µL de etanol absoluto y se sónica brevemente. Nuevamente se centrifuga por 10 segundos a 10,000 rpm, se elimina el sobrenadante y se resuspenden las partículas en 70



$\mu\text{L}$  de etanol absoluto. Las partículas preparadas se mantienen en hielo y se homogeniza por sonicación antes de utilizarlas. Para los experimentos de infección, se usaron 10  $\mu\text{L}$  de las partículas preparadas por cada planta inoculada.

#### **L. Solución stock de SSC 20X**

Para preparar 1 L de solución SSC 20X, se pesan 175.3 g de cloruro de sodio (NaCl) y 88.2 g de citrato de sodio [ $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$ ] y se disuelven en agua desionizada. El pH se ajusta a 7.6, usando hidróxido de sodio al 10 N. Aforar a un volumen final de 1 L y esterilizar por autoclave (120°C por 20 minutos a 15 lb/pulgada<sup>2</sup>).

## **PARTE II.- Caracterización de una nueva cepa de *Euphorbia mosaic virus* y descubrimiento de un linaje viral que contiene un presunto microRNA para regular al gen *Rep*.**

### **Resumen**

El *virus del mosaico de la Euphorbia* (EuMV) es un miembro del clado SLCV, un linaje de begomovirus del Nuevo Mundo que presenta características particulares en la proteína de replicación (*Rep*) y el origen de replicación. El primer aislado de EuMV que se caracterizó completamente es nativo de la península de Yucatán, México (EuMV-YP). Posteriormente, se identificó otro aislado de EuMV, el cual se encontró infectando plantas de chile y malezas en el estado de Jalisco, México (EuMV-Jal). El análisis de las secuencias parciales del componente A de EuMV-Jal reveló diferencias significativas en los determinantes de especificidad para la replicación con respecto a EuMV-YP. Por consiguiente, se procedió a investigar la compatibilidad de la replicación entre los dos aislados de EuMV mediante experimentos de pseudorecombinación en *Nicotiana benthamiana*. Los resultados obtenidos indican que EuMV-Jal y EuMV-YP no son compatibles en la replicación, lo que probablemente sugiere que los dos begomovirus no pertenecen a un linaje replicativo en la naturaleza. Además, el análisis genómico detallado de EuMV-Jal condujo al descubrimiento de una secuencia corta en la región intergénica del componente B, que es idéntica a un segmento del gen *Rep* del componente A (sRepHS). La búsqueda de sRepHS en otros begomovirus del clado SLCV indicó que está presente en todos los aislados de EuMV, así como en tres virus de Sudamérica que están relacionados a EuMV. La posición y el arreglo conservado de los sRepHS en varias especies de begomovirus sugieren un papel funcional de estas secuencias en el ciclo infeccioso, tal como la regulación del gen *Rep*, una posibilidad que deber ser examinada experimentalmente.

## INTRODUCCIÓN

La recombinación genética es un proceso biológico ubicuo, de gran importancia tanto para la reparación del DNA como para la evolución (Cromie *et al.*, 2001, Michel *et al.*, 2001). El proceso de recombinación genera una variabilidad enorme al combinar los polimorfismos presentes en las hebras parentales, de tal forma que la selección opera en esta población generada y la evolución del organismo en cuestión es acelerada. Paradójicamente, la recombinación puede prevenir la acumulación de mutaciones deletéreas en los genomas individuales (Gao *et al.*, 2003, Keightley *et al.*, 2006, Martin *et al.*, 2006). Además, la recombinación hace posible las innovaciones evolutivas que no podrían alcanzarse con la mutación por sí sola.

La recombinación es uno de los factores más importantes en la evolución viral. El requisito principal es la presencia de dos o más virus en el mismo huésped. Sin embargo, la viabilidad de los virus recombinantes depende en gran medida de la conservación de las redes de interacciones existentes en los virus parentales, y estas interacciones incluyen las relaciones a nivel de secuencia de nucleótidos para formar estructuras secundarias, así como las interacciones proteína-proteína y proteína-secuencia nucleotídica. Este fenómeno se ha registrado en virus con genomas de DNA y RNA de cadena doble (Suzuki *et al.*, 1998; Varsani *et al.*, 2006), así como en retrovirus (Chenault y Melcher, 1994; Katz y Skalka, 1990; Sharp *et al.*, 1995), virus de RNA de polaridad positiva (Chare y Holmes, 2006; Heath *et al.*, 2006) y virus de DNA de cadena sencilla (Heath *et al.*, 2004; Padidam *et al.*, 1999; Shackelton *et al.*, 2007; Worobey, 2000).

Los geminivirus pertenecen a la familia *Geminiviridae* y poseen genomas de DNA de cadena sencilla (ssDNA). De los cuatro géneros, el género *Begomovirus* es el más grande y diverso, con aproximadamente 200 especies conocidas hasta ahora, agrupándose en begomovirus del Nuevo Mundo y begomovirus del Viejo Mundo.

En el continente americano los begomovirus se han expandido desde su llegada, formándose linajes o clados (Briddon *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2005; Rybicki, 1994). El clado más atípico está formado por los begomovirus que se agrupan con el virus SLCV (*Squash leaf curl virus*) y comprende más de 15 especies virales. Su distribución abarca desde el sur de los Estados Unidos

hasta Brasil (Fauquet *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 2005). Los miembros del clado SLCV se distinguen del resto de los begomovirus americanos por presentar dos características principales: 1) la organización y el número de iterones presentes en el origen de replicación son diferentes, y 2) la región amino terminal de la proteína Rep (i.e., residuos 1 to 150) presenta baja identidad (< 50%) con proteínas de begomovirus típicos (Argüello-Astorga *et al.*, 1994a; Argüello-Astorga *et al.*, 1994b; Argüello-Astorga y Ruiz-Medrano, 2001).

En los begomovirus, las infecciones mixtas propician los eventos de recombinación y pseudorecombinación (Seal *et al.*, 2006). La recombinación es el intercambio de fragmentos de DNA entre componentes homólogos (Froissart *et al.*, 2005; Kirthi *et al.*, 2002), mientras que la pseudorecombinación es el intercambio de componentes genómicos completos (Chakraborty *et al.*, 2008; Pita *et al.*, 2001; Sanz *et al.*, 2000). Los primeros reportes de recombinación de los begomovirus en condiciones naturales son relativamente recientes (Harrison *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1997; Padidam *et al.*, 1999), pero cada vez es más claro que la recombinación es un factor muy importante en la generación de diversidad genética y juega un papel crucial en la evolución de los geminivirus (Harrison *et al.*, 1997; Pita *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 1998; Sanz *et al.*, 2000).

La frecuencia de recombinación en los begomovirus se puede explicar por las infecciones mixtas y la replicación dependiente de recombinación (Jeske *et al.*, 2001; Preiss y Jeske, 2003). Sin embargo, la prevalencia de los virus recombinantes en la naturaleza depende de sus ventajas selectivas (Seal *et al.*, 2006). Se cree que la recombinación entre los componentes A es la principal fuente de variación en los begomovirus (Padidam *et al.*, 1999), conduciendo en algunas ocasiones en una ganancia de virulencia de los virus recombinantes (Nawaz-ul-Rehman y Fauquet, 2009). Las regiones que participan en la recombinación van desde pequeñas porciones hasta fragmentos grandes. Los eventos de recombinación se pueden detectar mediante el análisis de las secuencias nucleotídicas, ya que generan incongruencias en las filogenias entre los componentes A y B. En los últimos años, el aumento rápido en el número de secuencias publicadas y la mejora de los programas bioinformáticos para identificar en las secuencias genómicas regiones de origen recombinante,

ha producido un gran avance en el área de la virología molecular (Martin *et al.*, 2005).

El fenómeno de pseudorecombinación se demostró experimentalmente en los años 80's y ocurre principalmente en los begomovirus bipartitas (Stanley *et al.*, 1985). La viabilidad de los virus pseudorecombinantes depende, entre otros factores, de la compatibilidad de los determinantes de especificidad (SPDs) de las proteínas Rep, así como de las secuencias de los iterones presentes en la región común (CR) de los begomovirus involucrados (Londoño *et al.*, 2010). Por ejemplo, la pseudorecombinación entre el *virus moteado del tomate* (ToMoV) y el virus de mosaico y enanismo del frijol (BDMV) resultó en la viabilidad de ambas combinaciones, pero con una atenuación de los síntomas (Gilbertson *et al.*, 1993). Por el contrario, en la pseudorecombinación del *virus del mosaico dorado de Sida*, de Costa Rica (SiGMCRV) y el *virus del mosaico del Abutilon* (AbMV), se encontró que solo una de las combinaciones era viable (Höfer *et al.*, 1997). Por estas razones, en los virus pseudorecombinantes se requieren cambios secundarios (adaptación al huésped, por ejemplo) para adquirir una aptitud biológica suficiente y así sobrevivir en las condiciones naturales (Harrison y Robinson, 1999).

En este trabajo, se reporta la caracterización molecular completa de EuMV-Jal, un begomovirus perteneciente al clado SLCV, el cual se encontró infectando plantas de chile y malezas en el estado de Jalisco, México. Los experimentos de pseudorecombinación con EuMV-YP mostraron una incompatibilidad en la replicación. Además, el análisis detallado del componente B de EuMV-Jal reveló la presencia de una secuencia corta en la región intergénica que es idéntica a un segmento del gen *Rep* en el componente A. Esta secuencia denominada sRepHS se encontró en todos los aislados de EuMV, y en tres virus de Sudamérica que están relacionados a EuMV. Todos estos virus forman un pequeño linaje dentro del clado del SLCV. La posición y el arreglo conservado de los sRepHS en varias especies de begomovirus sugieren que podrían formar parte de un sistema de regulación post-transcripcional del gen que codifica la proteína de replicación viral (Rep), análogo al único microRNA presente en el virus 40 de simios (SV40). Si la hipótesis es correcta, este sería el primer hallazgo de un microRNA en virus con genomas de ssDNA.



## RESEARCH

## Open Access

# Analysis of a new strain of *Euphorbia mosaic virus* with distinct replication specificity unveils a lineage of begomoviruses with short Rep sequences in the DNA-B intergenic region

Josefat Gregorio-Jorge<sup>1†</sup>, Artemiza Bernal-Alcocer<sup>2†</sup>, Bernardo Bañuelos-Hernández<sup>1</sup>, Ángel G Alpuche-Solís<sup>1</sup>, Cecilia Hernández-Zepeda<sup>3</sup>, Oscar Moreno-Valenzuela<sup>3</sup>, Gustavo Frías-Treviño<sup>2</sup>, Gerardo R Argüello-Astorga<sup>1\*</sup>

**Abstract**

**Background:** *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) is a member of the SLCV clade, a lineage of New World begomoviruses that display distinctive features in their replication-associated protein (Rep) and virion-strand replication origin. The first entirely characterized EuMV isolate is native from Yucatan Peninsula, Mexico; subsequently, EuMV was detected in weeds and pepper plants from another region of Mexico, and partial DNA-A sequences revealed significant differences in their putative replication specificity determinants with respect to EuMV-YP. This study was aimed to investigate the replication compatibility between two EuMV isolates from the same country.

**Results:** A new isolate of EuMV was obtained from pepper plants collected at Jalisco, Mexico. Full-length clones of both genomic components of EuMV-Jal were biolistically inoculated into plants of three different species, which developed symptoms indistinguishable from those induced by EuMV-YP. Pseudorecombination experiments with EuMV-Jal and EuMV-YP genomic components demonstrated that these viruses do not form infectious reassortants in *Nicotiana benthamiana*, presumably because of Rep-iteron incompatibility. Sequence analysis of the EuMV-Jal DNA-B intergenic region (IR) led to the unexpected discovery of a 35-nt-long sequence that is identical to a segment of the *rep* gene in the cognate viral DNA-A. Similar short *rep* sequences ranging from 35- to 51-nt in length were identified in all EuMV isolates and in three distinct viruses from South America related to EuMV. These short *rep* sequences in the DNA-B IR are positioned downstream to a ~160-nt non-coding domain highly similar to the CP promoter of begomoviruses belonging to the SLCV clade.

**Conclusions:** EuMV strains are not compatible in replication, indicating that this begomovirus species probably is not a replicating lineage in nature. The genomic analysis of EuMV-Jal led to the discovery of a subgroup of SLCV clade viruses that contain in the non-coding region of their DNA-B component, short *rep* gene sequences located downstream to a CP-promoter-like domain. This assemblage of DNA-A-related sequences within the DNA-B IR is reminiscent of polyomavirus microRNAs and could be involved in the posttranscriptional regulation of the cognate viral *rep* gene, an intriguing possibility that should be experimentally explored.

**Background**

The members of the family *Geminiviridae*, one of the two largest natural groups of plant viruses, are characterized

by a circular, single-stranded DNA (ssDNA) genome encapsidated within virions whose morphology is unique in the known virosphere, consisting of two joined, incomplete T = 1 icosahedra [1,2]. Geminiviruses are classified into four genera, based on their genome organization, plant host range, and insect vector. Members of the most diversified genus, *Begomovirus*, are transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera; Aleyrodidae), infect

\* Correspondence: grarguel@ipicyt.edu.mx

† Contributed equally

<sup>1</sup>Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., Camino a la Presa San José, 78216 San Luis Potosí, SLP, México

Full list of author information is available at the end of the article





collected, and total DNA extracts were tested for the presence of begomoviruses using polymerase chain reaction (PCR) with several pairs of degenerated primers (see Methods). More than 80% of the examined samples were PCR-positive and sequence analyses of the amplicons revealed that the majority of the symptomatic plants were infected by begomoviruses belonging to two different species, *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) and *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), which commonly infect pepper and tomato crops throughout the north and central areas of Mexico [22-24]. Partial DNA-A sequences of a third begomovirus were obtained from two pepper samples from the Castillo locality (close to the Pacific coast, coordinates 19°45'00" N; 104°23'30" W), one *Nicotiana glauca* plant ("tabaquillo") collected at Sayula (coordinates 19° 47'55" N; 103°46'05" W) and one *Euphorbia heterophylla* plant collected at Teocuitatlán (coordinates 20°12'30" N; 103° 30'00" W). In the four cases the plants were co-infected with either PHYVV or PepGMV. The complete sequence of the DNA-A and DNA-B genomic components of the unidentified begomovirus was obtained from overlapped PCR products derived from one pepper plant co-infected with PHYVV (see Methods). Comparisons with sequences available at the GenBank database using BlastN showed that the third pepper-infecting virus was an isolate of *Euphorbia mosaic virus*, displaying a DNA-A overall sequence identity of 95.4%, 92.8% and 92.1% with EuMV isolates from Jamaica [GenBank: DQ395342], Puerto Rico [GenBank: AF068642] and the Yucatan Peninsula [GenBank: DQ318937], respectively.

#### Genome organization of EuMV-Jal

The EuMV-Jal genome exhibited a genetic organization typical of NW-Beg. The DNA-A molecule [GenBank: DQ520942] was 2609 nt in length, and encoded five genes (*cp*, *rep*, *trp*, *ren* and *AC4*). The DNA-B molecule [GenBank: HQ185235] was 2590 nt in size, and contained two major ORFs (*BV1* and *BC1*). The common region (CR) of EuMV-Jal DNA-A and DNA-B encompassed 169 and 170 nt, respectively, with 98% identity. The CR contained the origin of replication comprising the conserved hairpin element and five iterations (GGAGTCC) that displayed the characteristic arrangement of the viruses belonging to the SLCV-cluster [15,16]. Comparisons of EuMV-Jal CR with the homologous region of other EuMV isolates revealed that EuMV-Jal and EuMV-JM have a DNA-A replication origin with a composition of putative *cis*-acting elements different to the homologous *Ori* of EuMV-YP and EuMV-PR. Indeed, in addition to harbor iterative elements with a distinct nucleotide sequence, the EuMV isolates from Jalisco and Jamaica display a G-box motif in the immediate vicinity of the conserved hairpin

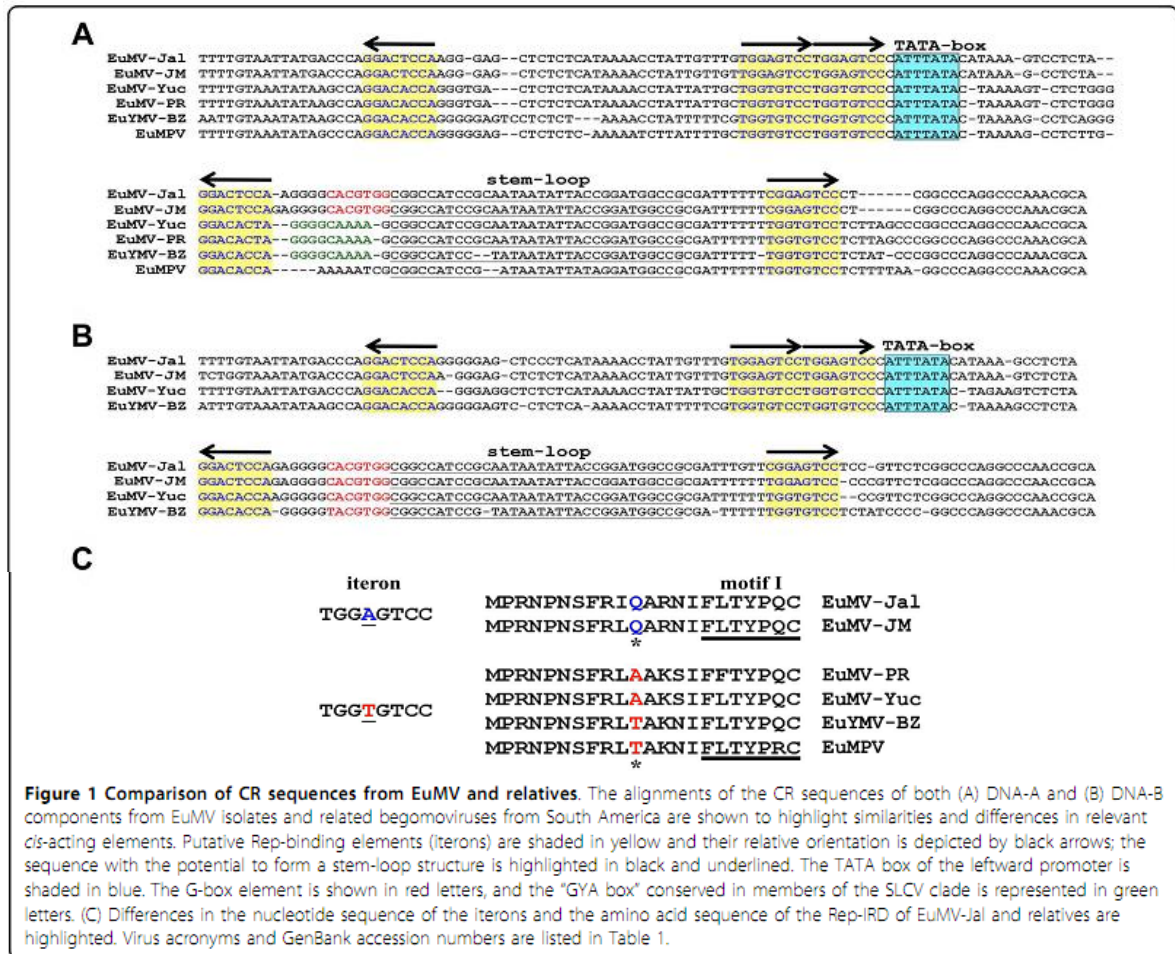
element, which is absent in the DNA-A of EuMV-PR and EuMV-YP (Figure 1A). The later viruses display instead a conserved motif (GGGGCAAAA) that is characteristic of most members of the SLCV-clade (our unpublished data). In contrast with the differences observed between the DNA-A components, comparisons of the DNA-B CR revealed a similar modular organization in all EuMV isolates, with a G-box motif adjacent to the hairpin element (Figure 1B). A similar organization of the DNA-B CR is observed in *Euphorbia yellow mosaic virus* (Fernandes et al., unpublished) [GenBank: FJ619507 and FJ619508], a recently described begomovirus from Brazil, that is a distant relative of EuMV (Figure 1B).

#### Phylogenetic relationships

A phylogenetic tree based on the full-length DNA-A of four EuMV isolates, 20 NW-Beg and several bipartite and monopartite OW-Beg (Table 1), was generated using the neighbor-joining method with 1,000 bootstraps replications (Figure 2). The analysis indicated a close relationship between the EuMV isolates from Mexico and the Caribbean basin with the following three begomoviruses from South America: *Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus* (TMYLCAV) from Venezuela [GenBank: AY927277], *Euphorbia mosaic Peru virus* (EuMPV) [25], and *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) from Brazil. This grouping was well-supported by both the phylogenetic analysis (bootstrap value 84) and the pairwise-identity analyses (Table 2), thus defining a sub-lineage within the SLCV clade that is broadly distributed in the American continent. A phylogenetic analysis based on the full-length DNA-B sequences produced similar results for the EuMV subclade and the group of cucurbit-infecting viruses (data not shown), but not for other members of the SLCV lineage that were placed into groups that are not congruent with the phylogeny derived from their DNA-A sequences. The incongruent phylogenies of DNA-A and DNA-B components of some begomoviruses is generally indicative of recombination and/or reassortment events [6,26].

#### Recombination analysis

The differences between the strains A and B of EuMV regarding nucleotide sequence and modular organization of the *Ori* region could be indicative of either divergent molecular evolution or intermolecular recombination between co-infecting begomoviruses [27,28]. To search for potential recombinant sequences in the genome of EuMV strains, we analyzed sequence alignments that included the DNA-A of the four EuMV isolates under exam, as well as diverse sets of begomoviruses of the SLCV clade, using the suite of programs for detection of recombinant breakpoints integrated within the RDP package [29]. The



**Figure 1 Comparison of CR sequences from EuMV and relatives.** The alignments of the CR sequences of both (A) DNA-A and (B) DNA-B components from EuMV isolates and related begomoviruses from South America are shown to highlight similarities and differences in relevant cis-acting elements. Putative Rep-binding elements (iterons) are shaded in yellow and their relative orientation is depicted by black arrows; the sequence with the potential to form a stem-loop structure is highlighted in black and underlined. The TATA box of the leftward promoter is shaded in blue. The G-box element is shown in red letters, and the "GYA box" conserved in members of the SLCV clade is represented in green letters. (C) Differences in the nucleotide sequence of the iterons and the amino acid sequence of the Rep-IRD of EuMV-Jal and relatives are highlighted. Virus acronyms and GenBank accession numbers are listed in Table 1.

analysis identified a ~210-nt long EuMV genomic region (recombinant breakpoints at positions 2432 and 33 of EuMV-Jal DNA-A) as a fragment of possible recombinant origin, which includes the entire common region (~170-nt) as well as the first 44 nucleotides of the *rep* gene, encompassing the IRD-coding sequence [17]. The plausible recombinant origin of this DNA fragment is underscored by direct comparisons of the DNA-A components from EuMV-JM and EuMV-PR, which are members from different strains exhibiting very high sequence identity (97.4%) along a segment encompassing ~2,400 out of the 2,609-nt of its DNA-A, a fact that is in clear contrast with the low sequence identity (77.5%) displayed in the 210-nt genomic region flanked by the recombinant breakpoints detected by our analysis.

The assembled data suggest that EuMV A-strain viruses are the product of an intermolecular recombination event involving an EuMV-JM-related virus (the major parent) and a virus closely related to *Calopogonium golden mosaic*

*virus* (CpGMV) [GenBank: AF439402] which might have donated the ~210-nt fragment with the viral replication module. This DNA segment, which is entirely identical in sequence between EuMV-PR and EuMV-YP, is shared with CpGMV at 90% of nucleotide identity. Two additional observations support the hypothesis of intermolecular recombination: (1) The absence of a G-box element within the CR of the DNA-A component of EuMV-YP, that is nevertheless present in their cognate DNA-B component (see Figure 1); and (2) The lower than expected sequence identity of the EuMV-YP common region (i.e., 86%) that is in contrast with the high identity of the CR of both EuMV-Jal and EuMV-JM (98% and 96%, respectively) [20,21].

#### Experimental infection of host plants

EuMV-Jal was identified in four field samples that contained an additional, distinct begomovirus, as mentioned above. In order to examine experimentally EuMV-Jal in



**Table 1 Names, acronyms, and GenBank accession numbers of the geminiviruses used in this study**

Name	Acronym	Accession number	
		DNA-A	DNA-B
Abutilon mosaic virus	AbMV	NC_001928	NC_001929
African cassava mosaic virus	ACMV	NC_001467	NC_001468
Ageratum yellow vein virus	AYV	NC_004626	
Bean calico mosaic virus	BCaMV	NC_003504	NC_003505
Bean dwarf mosaic virus	BDMV	NC_001931	NC_001930
Bean golden yellow mosaic virus	BGYMV	NC_001439	NC_001438
Beet curly top virus	BCTV	NC_001412	
Beet mild curly top virus	BMCTV	NC_004753	
Cabbage leaf curl virus	CabLCV	NC_003866	NC_003887
Chino del tomate virus	CdTV	NC_003830	NC_003831
Corchorus golden mosaic virus	CoGMV	NC_009644	NC_009646
Corchorus yellow vein virus	CoYV	NC_006358	NC_006359
Cotton leaf crumple virus	CLCV	NC_004580	NC_00481
Cotton leaf curl multan virus	CLCuMV	NC_004607	
Cucurbit leaf crumple virus	CuLCrV	NC_002984	NC_002985
Desmodium leaf distortion virus	DeLDV	NC_008494	NC_008495
Euphorbia leaf curl virus	EuLCV	NC_005319	
Euphorbia leaf curl India virus	EuLCIV	EU194914	
Euphorbia mosaic Peru virus	EuMPV	AM886131	
Euphorbia mosaic virus-Jalisco	EuMV-Jal	DQ520942	HQ185235
Euphorbia mosaic virus-Jamaica	EuMV-JM	FJ407052	EU740969
Euphorbia mosaic virus-Puerto Rico	EuMV-PR	AF068642	
Euphorbia mosaic virus- Yucatan	EuMV-YP	NC_008304	NC_008305
Euphorbia yellow mosaic virus	EUYMV	NC_012553	NC_012554
Papaya leaf curl virus	PaLCuV	AJ436992	
Pepper golden mosaic virus	PepGMV	NC_004101	NC_004096
Pepper huasteco yellow vein virus	PHYV	NC_001359	NC_001369
Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus	RhGMYucV	NC_012481	NC_012482
Sida golden mosaic virus	SIGMV	NC_002046	NC_002047
Squash leaf curl virus	SLCV	NC_001936	NC_001937
Squash mild leaf curl virus	SMLCV	NC_004645	NC_004646
Squash yellow mild mottle virus	SYMMoV	NC_003865	NC_003860
Tomato common mosaic virus-Brazil	ToCoMV-BZ	NC_010835	NC_010836
Tomato golden mosaic virus	TGMV	NC_001507	NC_001508
Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus	TMYLCAV	NC_009490	NC_009491
Tomato mottle virus	ToMoV	NC_001938	NC_001939
Tomato severe leaf curl virus	ToSLCV	DQ347947	
Tomato yellow leaf curl Thailand virus	TYLCTHV	X63015	X63016
Tomato yellow leaf curl virus	TYLCV	X15656	
Watermelon chlorotic stunt virus	WmCSV	NC_003708	NC_003709

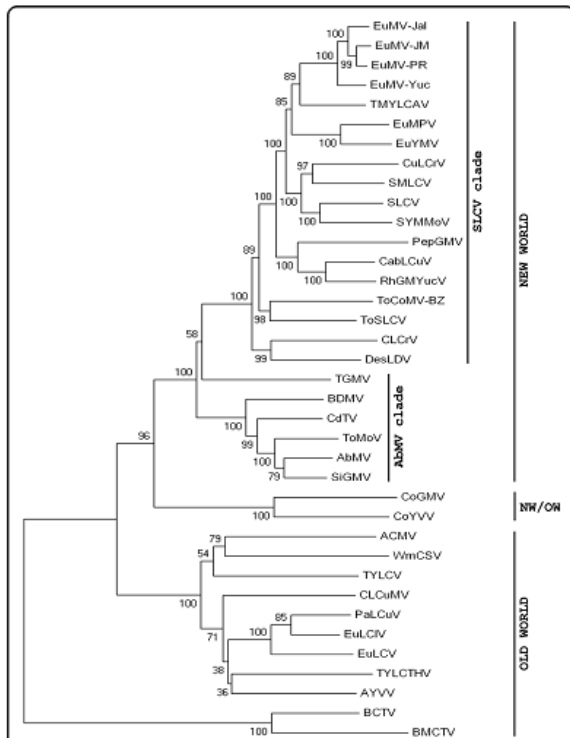
single plant infections, we generated infectious clones of both DNA-A and DNA-B components (see Methods), and carried out biolistic inoculation of these clones into

four plant species: *Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiana*, pepper (*Capsicum annum*), and zucchini (*Cucurbita pepo*). All solanaceous species were susceptible and developed systemic symptoms at 10-12 dpi, while the zucchini plants did not show symptoms and no viral DNA was detected by PCR in their tissues at 14 dpi. Symptoms of EuMV-Jal infection varied between plant species. In *N. benthamiana* the symptoms included leaf crumpling, greenish mosaics and shortened internodes (Figure 3A). In pepper plants the first symptom was the appearance of small green spots that progressed into a pale green mosaic and moderate downward leaf curling; a few small necrotic spots were also observed in several plants (Figure 3B). The most severe symptoms were observed in *D. stramonium* plants, whose leaves showed deformation and extensive green and yellow mottle covering most of the foliar surface, progressing in time to necrotic lesions leading to the destruction of significant parts of the foliar lamina (Figure 3C). In all, the symptoms induced by EuMV-Jal in the examined three plant species were very similar to those generated by infection of EuMV-YP [20], hence suggesting that these viruses express equivalent pathogenesis factors, as expected from the high amino acid sequence identity of their predicted proteins (Table 2).

#### EuMV-Jal and EuMV-YP are incompatible in replication

The replication modules of the EuMV strains A and B exhibit two main differences: 1) their iterons display a different nucleotide N within the GGNGTCC core, and 2) the iteron-related domain of their Rep proteins have a different amino acid residue at position X<sub>3</sub> of the IRD core FX<sub>1</sub>L\*X<sub>3</sub> [17], that is either FRLA or FRLT in A-strain viruses, and FRLQ in B-strain members (Figure 1C). These observations suggest the intriguing possibility that EuMV strains A and B could be incompatible in replication. To answer this question we carried out reassortment experiments with the EuMV-Jal and EuMV-YP genomic components. The four possible combinations A+B of the cloned viral DNAs were biolistically inoculated into *N. benthamiana* plants, that were subsequently scored for the appearance of disease signs.

Systemic symptoms developed at 10-12 dpi in most plants inoculated with the homologous mixtures (i.e., EuMV-Jal [A+B], and EuMV-YP [A+B]); in contrast, the plants bombarded with the heterologous combinations (i.e., EuMV-Jal [A]/-YP [B] and its reciprocal, EuMV-YP [A]/-Jal [B]) displayed no symptoms at 12 dpi, and remained symptomless until the end of the experiment, at 30 dpi (Figure 4A). These experiments were repeated three times, six plants for each combination, with similar results obtained (data in Figure 4B). All plants inoculated with cognate viral components scored positive for presence of both EuMV DNA-A and DNA-B, based on



**Figure 2 Phylogenetic relationships of *Euphorbia mosaic virus*.**

The tree was constructed using Neighbor-joining algorithm implemented by MEGA4 software (66). Branch strengths were evaluated by constructing 1000 trees in bootstrap analysis by step-wise addition at random. Bootstrap values are shown above or under the horizontal line. The vertical distances are arbitrary, whereas the horizontal distances are drawn to scale with the bar indicating 0.05 nucleotide replacements per site. *Curtoviruses* (*Beet curly top virus* and *Beet mild curly top virus*) were used as out-groups. Virus acronyms and GenBank accession numbers are listed in Table 1.

PCR detection of a ~1300-bp fragment encompassing a part of the *rep* and *cp* genes and the entire DNA-A intergenic region, and a ~1400-bp segment comprising the DNA-B IR and a part of both *BV1* and *BC1* genes. In contrast, none of the newly emerged leaves of plants bombarded with the heterologous combinations of EuMV genomic components tested positive for presence of EuMV DNA-B, although a few plants (5 out 36) were PCR-positive for DNA-A at 14 dpi, but not at 28 dpi (data not shown). These results indicate that viral factors required for replication are not exchangeable between EuMV-Jal and EuMV-YP.

#### EuMV BV1 promoter contains a short sequence homologous to Rep gene

In the course of a meticulous scrutiny of the DNA-B intergenic region of EuMV-Jal to identify potential *cis*-

regulatory elements involved in the transcriptional control of the *BC1* and *BV1* genes, we unexpectedly discovered a 35-bp DNA stretch displaying 100% sequence identity with a segment of the homologous *rep* gene. This sequence is located ~150-nt upstream to the *BV1* gene (nucleotides 337-372) and contains the coding information for aa residues 15 to 25 of EuMV-Jal Rep (i.e., FLTYPQCDVPK) that includes the conserved Motif I of the RCR initiators [30]. No additional sequences homologous to the *rep* gene were found in the *BV1* promoter region. The finding of a short sequence apparently derived from the cognate DNA-A within the noncoding region of EuMV-Jal DNA-B was intriguing and prompted further scrutiny of other EuMV DNA-B components. In all the examined cases a short *Rep* homologous sequence (*sRepHS*) was found within the *BV1* promoter region, which in EuMV-JM is similar to the EuMV-Jal element in both sequence and length (35-nt), but that is longer in EuMV-YP that displays a DNA stretch 51-nt in length identical to a segment of its cognate *rep* gene (Figure 5). A search for analogous elements in the DNA-B IR from all members of the SLCV clade revealed that *sRepHS* elements are not common, being identified only in two close relatives of EuMV, namely, TMYLCAV from Venezuela and EuYMV from Brazil. The TMYLCAV *sRepHS* element is similar but not identical in both length (36-nt) and nucleotide sequence (88% identity) to the equivalent sequence of EuMV-Jal (Figure 5). In contrast, the *sRepHS* identified in EuYMV DNA-B is different in both length (45-nt) and nucleotide sequence (< 30% identity) to the analogous elements of EuMV strains. Indeed, the EuYMV *sRepHS* element corresponds to a distinct segment of the cognate *rep* gene, encoding the Rep aa residues 40-53 (i.e., VVKPTYIRVARELH) instead of Rep residues 15-25 encoded by the *sRepHS* elements of TMYLCAV and EuMV. Notwithstanding its divergent nucleotide sequence, the EuYMV *sRepHS* element is 100% identical in nucleotide sequence to a segment of its cognate *rep* gene, like in EuMV and TMYLCAV (Figure 5) and is located at a position equivalent to the *sRepHS* in the latter viruses.

#### *sRepHS* upstream sequences are similar to CP promoters

The conservation of *sRepHS* elements in the DNA-B intergenic region of EuMV and their relatives suggests that those atypical sequences might play a defined role in the infective cycle of these viruses. Since the *sRepHS* elements do not contain a start codon and are not a part of a distinctive ORF, it seems plausible that its function, if any, involves an intermediary RNA molecule. This notion naturally led us to suggest the existence of a functional promoter next to the *sRepHS* element.



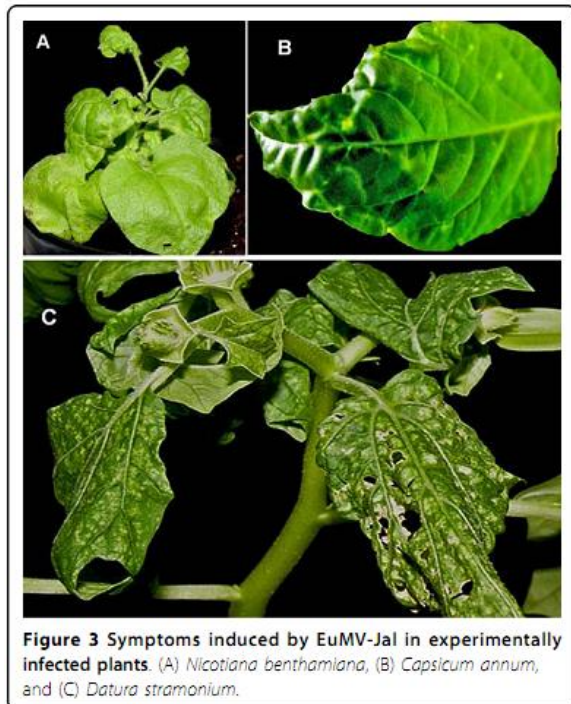
**Table 2 Percentages of sequence identities between EuMV-Jal and selected begomoviruses (DNA and predicted proteins\*)**

	DNA-A	IR-A	CP*	AC1*	AC2*	AC3*	AC4*	DNA-B	IR-B	BV1*	BC1*
Virus											
ACMV	45	25	66	49	43	42	19	27	22	24	41
BCaMV	76	50	92	86	78	77	64	55	28	73	83
BGYMV	64	37	91	63	70	78	11	48	22	67	80
CdTV	67	43	92	63	67	78	30	51	27	71	78
CoYVV	51	24	87	43	51	43	19	41	22	52	71
CuLCrV	77	46	91	83	71	71	72	51	27	66	76
DesLDV	72	44	91	80	66	73	58	50	23	64	77
EuMPV	77	52	93	86	81	76	58	-	-	-	-
EuYMV	77	51	90	85	80	76	62	52	35	73	82
EuMV-JM	<b>95</b>	<b>91</b>	<b>98</b>	<b>97</b>	<b>97</b>	<b>95</b>	<b>88</b>	<b>86</b>	<b>73</b>	<b>96</b>	<b>98</b>
EuMV-PR	92	82	<b>99</b>	96	93	91	<b>91</b>	-	-	-	-
EuMV-YP	92	80	99	93	93	91	87	85	63	94	<b>98</b>
PepGMV	72	50	90	80	71	75	14	48	25	64	74
PHYVV	59	33	89	49	50	63	12	47	25	66	74
RhGMYV	76	54	94	86	70	70	66	51	31	69	78
SLCV	78	57	94	82	72	80	77	50	30	63	80
ToCoMV-BZ	73	43	90	85	64	72	57	52	31	63	77
TMYLCAV	84	66	95	88	87	80	82	56	43	75	83
TYLCTHV	48	28	68	48	43	39	22	25	19	21	39

In order to identify potential IR internal promoters, we analyzed the sequences upstream to *sRepHS* in all members of the EuMV lineage using a phylogenetic-structural approach. This methodology entails the identification of “phylogenetic footprints” (i.e., putative binding sites for transcription factors) and conserved arrays of them, named “Conserved Modular Arrangements” (CMAs), in non-coding regions of evolutionarily-related DNA sequences [31,32]. The new analysis exposed a DNA-B IR domain ~160-bp-long exhibiting a remarkable similarity both in overall nucleotide sequence and modular organization, to CP promoters of viruses that belong to the SLCV clade. The example showed in Figure 6 illustrates the remarkable similarity between the CP promoter-like (CPprom-L) domain of EuMV-Jal IR and a 156-nt segment of the CP promoter of *Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus* (RhGMYuV), a recently described virus of the SLCV lineage [33]. The similarity between these DNA-B and DNA-A sequences, respectively, includes nine phylogenetic footprints in a definite order, and it is extended beyond the start codon of RhGMYuV *cp* gene including a block of 8-nt of coding sequence that is conserved in the non-coding sequence of EuMV-Jal DNA-B.

The demarcated CPprom-L domain of the DNA-B IR includes several putative *cis*-regulatory elements that were identified by consulting plant transcription factors databases like PlantCare [34] and PLACE [35].

Among the identified potential *cis*-acting motifs there were well-characterized regulatory elements such as the “Conserved Late Element” (CLE) [36], the CCAAT box, and several elements that confer responsiveness to a variety of plant hormones (see Figure 6 legend). Among these sequences there is a 12-bp long element (consensus: CTTTAATTCAAA) which is identical to a conserved sequence immediately adjacent to the *cp* gene in more than 75% of the known begomoviruses from America (Cardenas-Conejo et al., unpublished data). The AATTCAAA motif of the former element is both a putative ethylene-responsive element (ERE) and a binding-site for nuclear factors of carnation, tomato and *Solanum melongena* [37-39]. In addition, this motif constitutes the 8-nt long leader sequence of the CPmRNA of *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) [40]. The ERE-like motif is located downstream to the actual TATA-box of NW-Beg CP promoters, at a similar distance (21-29 bp) to that observed between the ERE and a putative TATA box in the CPprom-L domain [Additional file 1: Supplemental Figure S1a]. Taken as a whole, these remarkable similarities between noncoding DNA regions from two different genome components of separate begomovirus species, can hardly be explained by random sequence convergence; rather, they strongly suggest that the DNA-B CPprom-L domain of EuMV and relatives is evolutionarily derived from a begomovirus CP promoter.

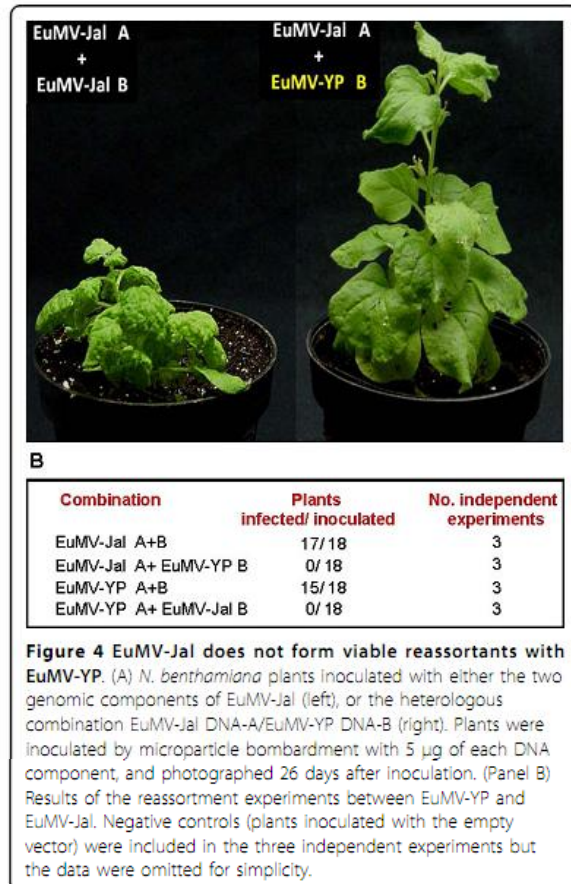


**Figure 3** Symptoms induced by EuMV-Jal in experimentally infected plants. (A) *Nicotiana benthamiana*, (B) *Capsicum annuum*, and (C) *Datura stramonium*.

#### Distantly related begomoviruses contain sRepHS elements

The existence of *sRepHS* elements in the DNA-B IR of viruses belonging to a minor lineage of the SLCV clade is an interesting evolutionary enigma. To determine whether analogous elements actually exist in other viral lineages, we searched for *rep* homologous sequences in the DNA-B IR of begomoviruses belonging to 12 major and minor clades, distributed in several continents. The analysis of ~60 members of those lineages led us to the identification of only two additional begomoviruses displaying *sRepHS* in the *BV1* upstream region: TGMV and the recently described *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV) [41]. These viruses are native from Brazil, like EuYMV, but do not belong to the SLCV clade. The *sRepHS* element of CILCrV is 100% identical to a 46-nt-long segment of its cognate *rep* gene, encoding the aa residues 97 to 110 (SSSDVKSYVDKDGD), that comprise the conserved RCR Motif 3 (underlined) [30]. On the other hand, the TGMV *sRepHS* element is only 88% identical to a 52-nt-long segment of its cognate *rep* gene, encoding the aa residues 255 -271 (NKVEYN-VIDDVTPQYLK) of this replication initiator, that include the Walker B-motif (underlined), a critical aa sequence of the protein ATPase/helicase domain [42,43].

The upstream sequences of TGMV and CILCrV *sRepHS* elements were examined, but no significant similarity between them nor with the *BV1* promoter region of EuMV lineage viruses was found. However, a



**Figure 4** EuMV-Jal does not form viable reassortants with EuMV-YP. (A) *N. benthamiana* plants inoculated with either the two genomic components of EuMV-Jal (left), or the heterologous combination EuMV-Jal DNA-A/EuMV-YP DNA-B (right). Plants were inoculated by microparticle bombardment with 5 µg of each DNA component, and photographed 26 days after inoculation. (Panel B) Results of the reassortment experiments between EuMV-YP and EuMV-Jal. Negative controls (plants inoculated with the empty vector) were included in the three independent experiments but the data were omitted for simplicity.

careful re-examination of sequences nearby to the 5' end of CILCrV *sRepHS* revealed a 23-bp sequence with partial dyad symmetry that is well-conserved both in sequence and in position relative to the *sRepHS* element in all viruses of the EuMV cluster [Additional file 1: Suppl. Figure S1b]. The consensus of this conserved sequence includes a palindromic core with the repeated motif TTGTGGTCC, similar to the CLE, a functional target of plant transcriptional activators [44,45] that has been involved in TrAP-mediated activation of the CP promoter in some begomoviruses [36]. No sequence similar to the latter symmetric element was found in the *BV1* promoter region of TGMV. In fact, the *sRepHS* of the latter virus differs from the analogous elements in CILCrV and the EuMV subclade viruses in several other important features: (1) It is not 100% identical to the corresponding segment of its cognate *rep* gene; (2) It has opposite polarity compared to all other known *sRepHS* elements; (3) It is closely located downstream to a putative internal promoter that does not exhibit significant similitude with *CP* promoters of SLCV clade viruses (data not shown). It is relevant to point out here



that TGMV and CILCrV are grouped, on the basis of their full-length DNA-A sequences, within the Brazilian cluster of NW-Beg [41], but they have very divergent DNA-B components. Thus, our finding of the *sRepHS*-associated semi-palindromic sequence in CILCrV DNA-B suggests an actual relationship of the latter with the homologous genomic components of EuMV and relatives, a notion that is supported by a recent study that groups the CILCrV DNA-B with viruses of the EuMV lineage [41].

## Discussion

In this study, we described the molecular and biological characterization of a novel strain of *Euphorbia mosaic virus* that was isolated from pepper plants in the state of Jalisco, Mexico, near to the Pacific shoreline. This virus displays 92% sequence identity with EuMV-YP, that was isolated in the same country but in a distant region, close to the Atlantic coastline [20]. These viruses differ in two important features of their DNA-A replication origin region: the nucleotide sequence of their iterons, and the presence or absence of a G-box element, a *cis*-acting sequence which is critical for *Rep* promoter activity in some NW-Beg [46]. The differences observed in the predicted *Rep*-binding sites of EuMV-Jal and EuMV-YP prompted us to explore experimentally their ability to form viable reassortants in pseudorecombination tests. The results of these experiments confirmed the presumption of replication incompatibility between EuMV-YP and EuMV-Jal, thus demonstrating that the latter is a new, biologically-defined strain exhibiting different replication specificity.

The finding of begomovirus strains that are not able to form viable reassortants is somehow bewildering because the common definition of a virus species is "A... class of viruses that constitutes a replicating lineage and occupies a particular ecological niche." [47,48]. Accordingly, it is not expected that strains of a virus species would be incompatible in replication because that implies that they do not constitute an actual replicating lineage. Nonetheless, it is generally recognized that several strains of begomoviruses probably are not complementary in replication because they display different putative *cis*- and *trans*-acting replication specificity determinants [7,17]. There is at least one report of strains belonging to a bipartite begomovirus that are not equivalent in replication functions (the "severe" and "mild" strains of *Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV) [49]. However, that case is different from the one examined here because the "mild" phenotype of one ToLCNDV strain seems to be related to an inefficient *trans*-replication of the "cognate" DNA-B, which displays *Rep* binding-sites different to those of the associated DNA-A [49,50].

The case of the EuMV strains is significant because it is paradigmatic of an apparently common theme in begomovirus evolution, i.e., the sudden change of virus replication specificity determinants by intermolecular recombination between co-infecting viruses [27,51]. Indeed, the recombination analysis of EuMV isolates indicates that viruses of the EuMV A-strain probably evolved by an event of DNA intermolecular exchange involving a member of the EuMV B-strain and a virus related to CpGMV, which had donated a ~210-bp DNA segment encompassing the region of the virus replication origin and the first 44 nucleotides of the *rep* gene. If this hypothetical scenario is accurate, then the recombination event should have changed simultaneously both the iterons and the *Rep* aa residues interacting with them, thus maintaining the proper matching of *cis*- and *trans*-acting replication determinants in the recombinant DNA-A component.

Diverse studies have identified the sequences encompassing the viral strand replication origin and the *rep* gene segment encoding the *Rep* N-terminal domain, as the regions of geminivirus genomes most frequently exchanged during recombination [28,51-53]. This is consistent with the known genome localization of the *Rep*-binding sites and the coding sequence of the *Rep* domain that contains the putative DNA-binding specificity determinants of this protein, which have been theoretically mapped into the first 75 aa residues [17,54]. Consequently, a recombination event involving a genome portion as small as 200 to 360-bp might confers a completely different replication phenotype to begomoviruses involved in mixed infections, as presumably is the case for the EuMV strains.

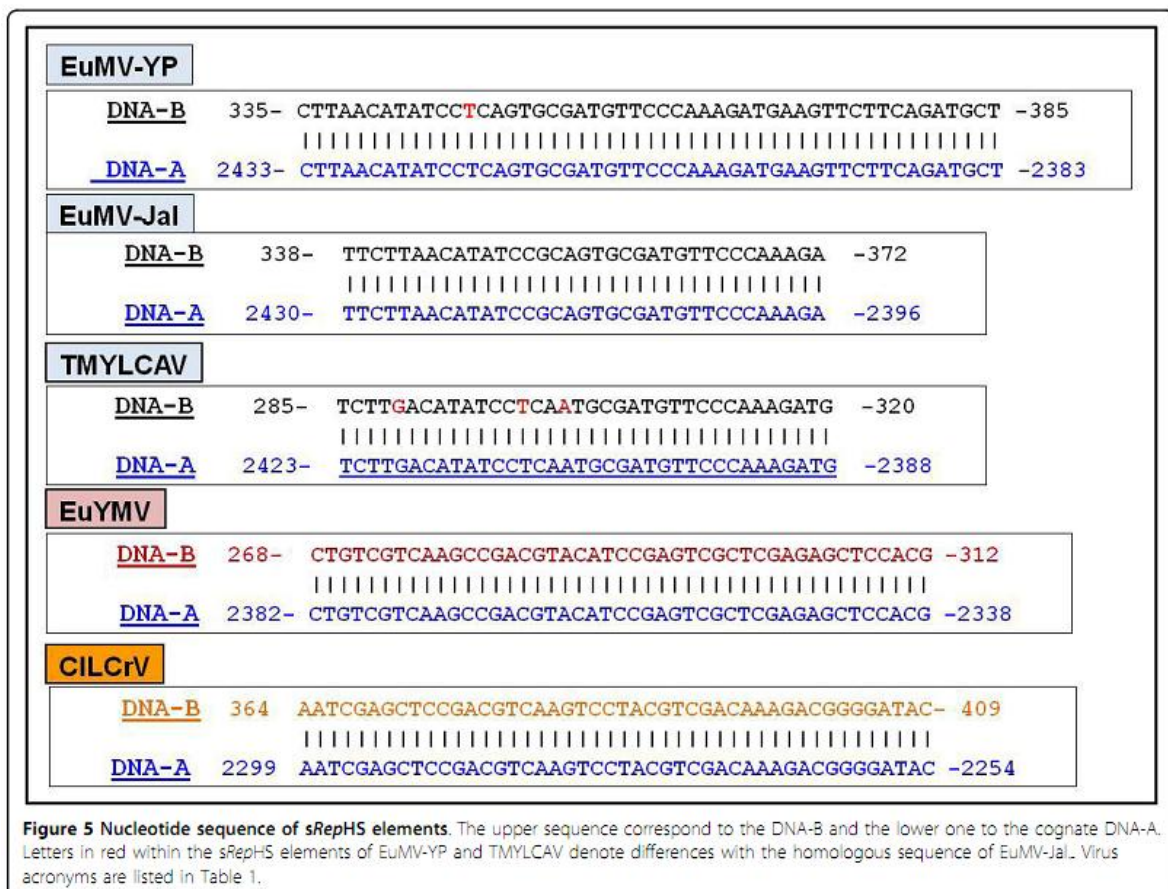
Since that intermolecular recombination is/has been a major force in the evolution of geminiviruses, the concepts of both "species" and "strains" should be adapted to the peculiar nature of these entities, that are genetic mosaics in continual change, different in quality to cellular organisms. In fact, it is altogether possible that a significant part of the currently recognized begomovirus species would not constitute "replicating lineages" in a strict sense, as would be the case of EuMV, according to our experimental data. For instance, a thorough sequence analysis entailing the identification of the putative *cis*- and *trans*-acting Replication Specificity Determinants (RSDs) of the 182 recognized begomovirus species summarized by Fauquet et al. in 2008 [7] revealed the existence of 34 species that include at least two groups of viruses exhibiting distinct putative RSDs, analogous to the strains A and B of EuMV. Furthermore, some ICTV-accepted species as *Ageratum yellow vein Hualian virus*, *Honeysuckle yellow vein virus*, *Tomato leaf curl Bangalore virus*, *Tomato leaf curl Philippines virus*, *Tomato leaf curl Taiwan virus*, and

ToLCNDV, include three classes of viruses differing in their putative RSDs, and one viral species, *Ageratum yellow vein virus*, comprises four types of viruses harboring distinct replication modules, plausibly acquired through independent episodes of intermolecular recombination (Arguello-Astorga, unpublished data). In view of the significant number of begomovirus species with variants that are seemingly analogous to the strains of EuMV, it would be important to establish a formal distinction between strains with similar RSDs, that represent actual replicating lineages, and replication-incompatible strains, that apparently do not.

#### What is the function of the DNA-B *sRepHS* elements?

During the analysis of the intergenic region of EuMV-Jal DNA-B we discovered a short DNA stretch identical to a segment of the *rep* gene coded in the cognate DNA-A. It was subsequently found that analogous *sRepHS* elements exist in the DNA-B IR of at least five begomovirus species, all them from the New World: EuMV from Mexico and the Caribbean basin, TMYLCAV from

Venezuela, and EuYMV, CILCrV and TGMV from Brazil. With the exception of the short *rep* homologous sequence in the DNA-B IR of TGMV (that seems to be evolutionarily unrelated) the *sRepHS* elements of begomoviruses have in common several characteristics. All of them: (1) are short sequences, ranging from 35 to 51 nucleotides in length; (2) are 100% identical in nucleotide sequence to a segment of its cognate *rep* gene; (3) have opposite polarity than the *rep* gene; (4) are located 65 to 80-nt downstream to a putative internal promoter highly similar to *CP* promoters of viruses of the SLCV clade (CILCrV being an exception); (5) are positioned 7-9 nt downstream to a 23-bp partly palindromic element with a repeated motif similar to the CLE; and (6) are situated 115 to 145-nt upstream to the *BVI* gene. In contrast, the *sRepHS* elements of viruses that are distantly related, like EuMV, EuYMV and CILCrV, have entirely different nucleotide sequences (see Figure 5), because the coding sequence represented in those elements corresponds to distinct sections of the cognate *rep* gene.





An intriguing observation is that the identified *sRepHS* elements reproduce sequences encoding conserved aa motifs which are critical for Rep functions. For example, the *sRepHS* of EuMV strains and TMYLCAV correspond to the coding sequence of RCR Motif 1; the equivalent element of CILCrV encodes the RCR Motif 3, and the analogous *sRepHS* of TGMV duplicate the *rep* sequence encoding the Walker B motif of ATPases/helicases. An apparent exception is the *sRepHS* of EuYMV, which displays the coding sequence of a conserved Rep motif of unknown function. The evolutionary conservation of *sRepHS* elements and the associated sequence motifs, suggests that those atypical elements play a definite but hitherto unknown function in the viral infective cycle. In absence of any factual data it is only feasible to speculate about the possible function(s) of the *sRepHS* on the basis of their common characteristics.

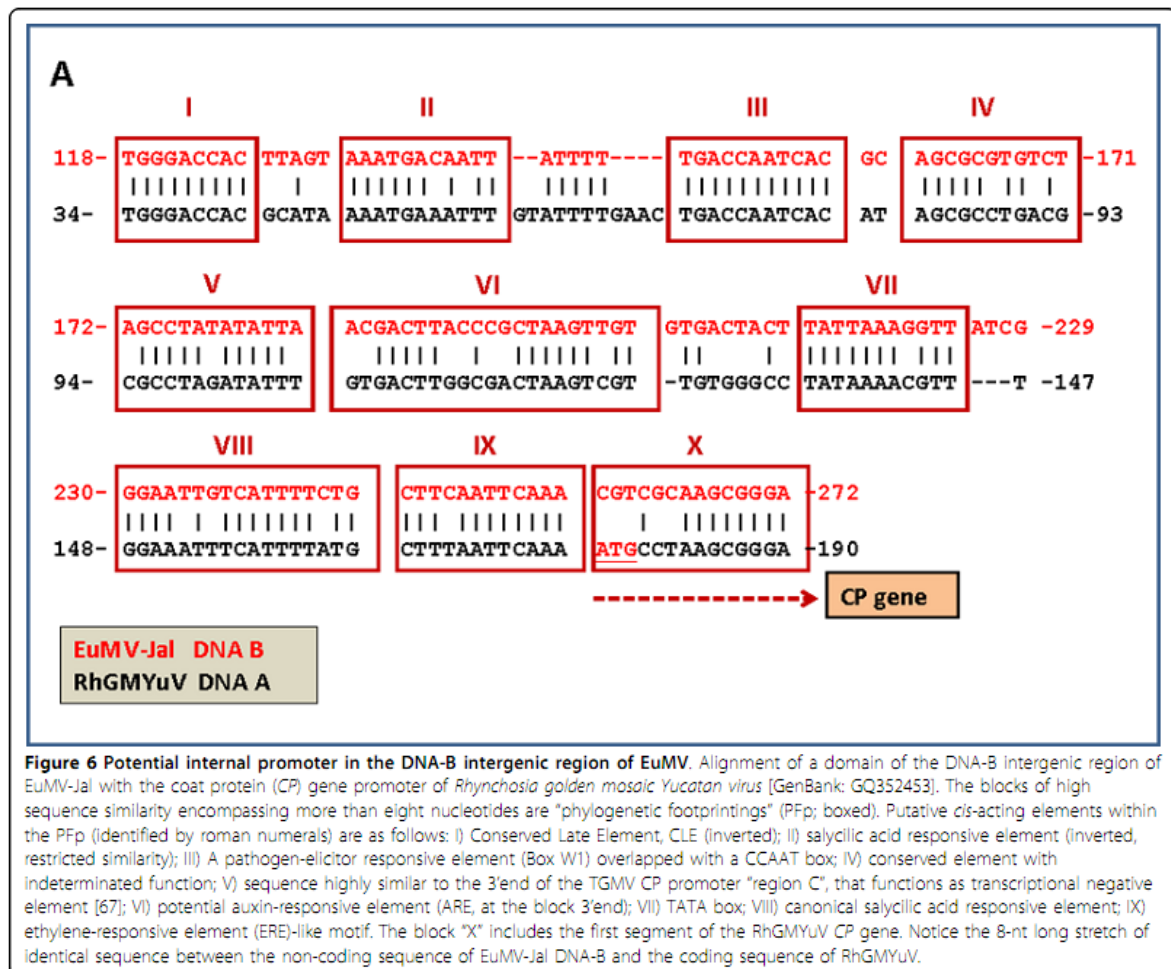
Certainly, the most remarkable feature of the *sRepHS* elements is its complete identity in nucleotide sequence with a specific segment of the *rep* gene in the cognate DNA-A component, because the evolutionary preservation of such an absolute matching between specific segments of distinct, physically separated DNA molecules, should involve very strong selective pressures against mutations diminishing the identity between the former DNA sequences. Therefore, the function of the *sRepHS* elements is most likely related to a process that requires a perfect or very high complementarity between DNA and/or RNA molecules, such as the gene regulation by microRNAs (miRNAs).

The miRNAs are ~22-nt-long noncoding RNAs that posttranscriptionally regulate gene expression by binding to specific mRNAs, thus repressing its translation and/or inducing its degradation [55]. Several DNA viruses (i.e., herpesviruses, adenoviruses, ascoviruses and polyomaviruses) encode miRNAs which participate in the regulation of some processes of the viral infection cycle [56,57]. For example, the simian virus 40 (SV40) encodes a single miRNA which lie antisense to the viral mRNA encoding the T-antigen, a multifunctional protein essential for virus replication. This miRNA is expressed late in infection, hence promoting the T-antigen mRNA degradation and downregulating the synthesis of this protein at late stages of the SV40 replication cycle [58]. In close analogy with SV40 miRNA, the *sRepHS* elements of begomoviruses are single, discrete noncoding DNA sequences highly similar to a specific segment of the gene encoding the viral replication protein. Further analogies between those heterologous viral sequences are the following: (1) The genomic location of the miRNA, but not its nucleotide sequence, is conserved among polyomaviruses (i.e., SV40, Merkel cell virus, human BK virus, JC virus, and mouse polyomavirus) [59-61]; similarly, the location of *sRepHS* elements

within the DNA-B intergenic region, but not its specific sequence, is conserved among begomoviruses (data from this study); (2) The temporal expression of the SV40 miRNA, that is restricted to the late stage of infection, is similar among all the examined polyomaviruses [57,59]; likewise, although the temporal expression of begomovirus transcripts including the *sRepHS* region (if any) is unknown, it is plausible than them would be late expressed, because the hypothetical promoter that lead its transcription is similar to begomovirus *CP* promoters, which are typically active at the late phase of the viral infection cycle [1,36]; (3) Like the polyomavirus pre-miRNAs, the DNA-B sequences encompassing *sRepHS* and the neighboring sequences, have the potential to form extensive hairpin structures susceptible to cleavage by RNase III enzymes (i.e., Drosha and Dicer) involved in the processing of pre-miRNAs (data not shown). Taken together, these lines of indirect evidence suggest a potential function of the *sRepHS* elements in the posttranscriptional regulation of Rep expression, a hypothesis that must be experimentally examined.

## Conclusions

The evidence gathered in this study indicates that EuMV-YP and EuMV-Jal, which are members from the strains A and B of *Euphorbia mosaic virus* respectively, are actually incompatible in replication, hence implying that these viruses probably represent distinct replicating lineages in natural ecosystems. The scenario we propose for the origin of the EuMV A-strain viruses involves a recombination event that substituted the DNA-A core replication module of an EuMV B- strain virus, with the analogous genomic region of a virus related to CpGMV. This intermolecular exchange suddenly changed the replication specificity of the recombinant DNA-A, thus triggering the process that led to the evolutionary differentiation of EuMV into two distinct strains. The fact that more than 30 recognized begomovirus species include two or more classes of viruses with distinct putative RSDs (i.e., analogous to the EuMV strains) suggests that intermolecular recombination events that involve the virion-strand origin of replication and the first part of the *rep* gene, are quite common in this group of ssDNA viruses, as has been previously pointed out (51, 52, 53). Another relevant result from this study is the discovery of atypical sequences within the intergenic region of the DNA-B component from some NW-begomoviruses, mostly related to EuMV. These sequences include short fragments of the cognate *Rep* gene located downstream from a potential internal promoter very similar in modular organization to *CP* promoters of viruses of the SLCV clade. Even though we do not know the actual function of these *sRepHS* elements, several lines of indirect evidence suggest their



**Figure 6** Potential internal promoter in the DNA-B intergenic region of EuMV. Alignment of a domain of the DNA-B intergenic region of EuMV-Jal with the coat protein (CP) gene promoter of *Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus* [GenBank: GQ352453]. The blocks of high sequence similarity encompassing more than eight nucleotides are "phylogenetic footprints" (PFp; boxed). Putative *cis*-acting elements within the PFp (identified by roman numerals) are as follows: I) Conserved Late Element, CLE (inverted); II) salicylic acid responsive element (inverted, restricted similarity); III) A pathogen-elicitor responsive element (Box W1) overlapped with a CCAAT box; IV) conserved element with indeterminate function; V) sequence highly similar to the 3' end of the TMGMV CP promoter "region C", that functions as transcriptional negative element [67]; VI) potential auxin-responsive element (ARE, at the block 3' end); VII) TATA box; VIII) canonical salicylic acid responsive element; IX) ethylene-responsive element (ERE)-like motif. The block "X" includes the first segment of the RhGMYuV CP gene. Notice the 8-nt long stretch of identical sequence between the non-coding sequence of EuMV-Jal DNA-B and the coding sequence of RhGMYuV.

participation in the posttranscriptional regulation of Rep expression, an intriguing possibility that is currently being examined in our laboratory.

## Methods

### Plant samples and DNA extraction

Samples of symptomatic plants exhibiting leaf curling, yellow or golden mosaic, vein chlorosis and/or stunted growth were collected in several farm fields in the State of Jalisco, Mexico, during 2005. Young leaves from symptomatic pepper plants, as well as a variety of weed plants found as underbrush within the field were gathered. Total nucleic acids were extracted of field samples using a modified version of the Dellaporta method [62].

### PCR-based detection of begomoviruses

Total DNA extracts from 63 symptomatic plants were used as templates in PCR reactions with degenerate

primers designed to amplify two overlapping genomic segments encompassing either the complete DNA-A or DNA-B of begomoviruses belonging to the SLCV clade [63]. The primers SL2150-for (GACGGCRTTGGYGTCTTTGGC) and cpYMAC-rev (TTWGASGCATGNGTACATGCCA) were used to amplify a DNA-A segment encompassing the intergenic region and part of both Rep and CP genes, whereas the primers CP70-for (GGTTGTGAAGGNCCNTGTAAGGTYCA) and SL2150-rev (GCWGCAAAGACACCAAYGCCGT) were utilized to amplify a complementary and partially overlapped DNA-A segment. Amplification of DNA-B sequences was performed with degenerated primers BC1-290-for (GAARTAGTGGAGATCTATGTTCAYCT) and BV1-470-rev (CCATGRCTRTGRA TYCTWGCRCRCC), designed to amplify the complete intergenic region together with a part of both the BC1 and BV1 genes. To amplify the remaining part of DNA-



B the degenerate primers BC1- 290-rev (CCSAT-MAGRTGYAACATAGATCTCC) and BV1-310-for (AGGWACRGTNAARATYGARCGTGT) were used. The PCR-products were cloned into the pGEM-T easy vector (Promega) and subjected to Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)-analysis by using *EcoR* I in combination with either *Hinf* I or *Msp* I. The produced DNA molecules were fractionated in 2.5% agarose gels, and PCR clones with different restriction patterns were sequenced.

#### Generation of infectious EuMV clones

To clone the full-length genomic components A and B of EuMV-Jal, the DNA extract of one pepper plant infected with both EuMV-Jal and PHYVV collected at the Castillo locality (see Results) was subjected to rolling circle amplification (RCA) using the TempliPhi kit (GE Healthcare, USA) according to the manufacturer's instructions. The full-length EuMV DNA-A was obtained by cutting the RCA-amplified DNA with *Xho* I and subsequent cloning of the 2.6 Kb DNA molecule into a plasmid vector. The full-length EuMV DNA-B could not be obtained by a similar procedure after several attempts. Consequently, abutted divergent primers designed over the unique *Bam*HI site in the DNA-B of EuMV-Jal were used in a standard PCR procedure, and the generated 2.6 Kb amplicon was cloned into a pGEM-Teasy vector (Promega). The infectious clones of EuMV-Jal A and EuMV-Jal B were generated as follows: the 0.8-Kb *Bam*HI- *Xba*I fragment of EuMV-A containing the origin of replication was cloned into the *Bam*HI-*Xba*I sites of a modified pBlueScript plasmid to create pEu-oriA. Subsequently, a full-length DNA-A of EuMV digested with *Xba*I was inserted into the *Xba*I site of pEu-oriA to generate the viral replicon pEuMV1.33A. The infectious clone of EuMV-B was generated by an analogous procedure: the full-length DNA-B cloned into pGEM-T easy was digested with *Nco*I and re-ligated. This procedure deleted a portion of the viral genome, leaving intact all elements important for replication (1.3-kb), thus generating the pEu-oriB plasmid. Finally, a full-length DNA-B digested with *Bam*HI was cloned into the *Bam*HI site of pEu-oriB, yielding the infectious clone pEuMV1.5B.

#### Plant infection assays

*Nicotiana benthamiana*, *Capsicum annuum* and *Datura stramonium* plants were inoculated using a low-pressure biolistic method [64]. The target leaves (third- to four-leaf stage) were either directly shot at 100 to 120 psi helium pressure with tungsten particles (0.7 mm, BioRad, Hercules, CA) covered with the EuMV-A and EuMV-B viral DNAs (5 µg), or inoculated mechanically by using carborundum according to a procedure

recently described [65]. The inoculated plants were maintained in an insect-free growth chamber (27°C, daily cycle of 16 h light -8 h dark), and subsequently scored for the appearance of disease symptoms. The infection status of the inoculated plants was assessed by visual inspection of symptoms and by PCR analysis of all plants at the end of the experiment.

#### Reassortment experiments

Pseudorecombination experiments were carried out by biolistically inoculating seedlings of *N. benthamiana* plants with all possible pair combinations of A and B component clones of both EuMV-Jal and EuMV-YP. Infectious clones of EuMV-Jal were partial tandem repeats of either DNA-A or DNA-B components, as mentioned above, whereas in the case of EuMV-YP, cloned monomeric components were used as previously described [20]. A total of 18 seedlings (three independent experiments, six plants each replicate) were inoculated with each one of the four possible combinations of EuMV-Jal and EuMV-YP genomic components. Mock-inoculated negative controls were included for each replicate. The inoculated plants were maintained in a growth chamber (27°C, daily cycle of 16 h light -8 h dark) and scored for the appearance and development of disease symptoms during 4-5 weeks. All plants, both symptomless and symptomatic, were tested for the presence of viral DNA in newly emerged leaves at 14 dpi by PCR-based detection, using both DNA-A and DNA-B specific primers. Asymptomatic plants were re-examined by PCR at 28 dpi, to detect cases of delayed infection.

#### Phylogenetic analysis

Full DNA-A and DNA-B sequences from EuMV-Jal were compared with other New World and Old World begomoviruses available at the GenBank-NCBI database, using BLAST-N. The positions and sizes of EuMV-Jal open reading frames were predicted using EditSeq (DNASTAR Inc., Madison, WI). Paired alignments were obtained by the ClustalV and ClustalW methods in the MegAlign application of the Lasergene package (DNASTAR), using the default parameters. Neighbour-joining phylogenetic trees for EuMV DNA-A and DNA-B components were constructed using Mega 4.0 [66] with 1,000 bootstrap replicates and pairwise evolutionary distances calculated with a maximum likelihood nucleotide substitution model. Trees were drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree.

#### Recombination analysis

Detection of potential recombination breakpoints and recombinant sequences was carried out using the suite

of recombination detection methods implemented in RDP software (29). A sequence alignment containing four EuMV isolates and closely related species (sharing >76% of nucleotide identity with EuMV-Jal) was used as input data for RDP. The analysis was performed using the default settings in all detection methods, with a Bonferroni corrected P-value cut-off of 0.05.

## Additional material

**Additional file 1: Supplemental Figure S1: Conserved elements upstream to sRepHS elements.** (A) Comparisons of conserved modular arrangements (CMAs) composed by two *cis*-acting elements present in DNA-A of NW begomoviruses, and DNA-B of EuMV and relatives, respectively. The CPmRNA transcription start site of TGMV is indicated above the ERE-like motif. (B) Alignment of partially palindromic elements which are conserved in position relative to the sRepHS element of CILCRV and EuMV subclade members. The consensus of this symmetric element is indicated. Colors in boxes identify the distinct classes of sRepHS according to their nucleotide sequence, and numbers indicate the length (in base pairs) of those elements.

## Acknowledgements

We thank Salvador Ambríz-Granados for his technical assistance, and Dr. Braulio Gutierrez-Medina for critical reading of the manuscript. JGJ, ABA and BBH were supported by a PhD fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Mexico). This research was partially supported by a CONACYT grant (SEP-84004) to GAA.

## Author details

<sup>1</sup>Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., Camino a la Presa San José, 78216 San Luis Potosí, SLP, México. <sup>2</sup>Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Parasitología Agrícola. Bellavista, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila, Mexico. <sup>3</sup>Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Mérida, Yucatán, México.

## Authors' contributions

JGJ generated the infectious clones of EuMV-Jal, performed plant infection tests, carried out the phylogenetic analysis, and helped to prepare the manuscript. ABA collected isolates, cloned and sequence the viruses, analyzed the field data, and perform plant infection tests. BBH carried out the pseudorecombination experiments, and analyzed the experimentally infected plants. AAS helped in comparative sequence analyses, provided partial funding for the project's execution, and offered ideas and comments during manuscript preparation. CHZ carried out the recombination analysis, helped in plant infection tests. OMM provided the EuMV-YP clones and helped in plant infection tests with this virus. GFT collected isolates and helped to analyze the field data. GAA coordinated the project, carried out the comparative sequence analyses, secured funding for the project's execution, and prepared the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have not competing interests

Received: 18 August 2010 Accepted: 19 October 2010

Published: 19 October 2010

## References

- Hanley-Bowdoin L, Settlage SB, Orozco BM, Nagar S, Robertson D: Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit Rev Plant Sci* 1999, **18**:71-106.
- Zhang W, Olson NH, Baker TS, Faulkner L, Agbandje-McKenna M, Boulton MI, Davies JW, McKenna R: Structure of the Maize streak virus geminate particle. *Virology* 2001, **279**:471-477.

- Stanley J, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Fauquet CM, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC: Geminiviridae. In *Virus Taxonomy (VIIIth Report of the ICTV)*. Edited by: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Elsevier/Academic Press, London; 2005:301-306.
- Rojas MR, Hagen C, Lucas WJ, Gilbertson RL: Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu Rev Phytopathol* 2005, **43**:361-394.
- Seal SE, vandenBosch F, Jeger MJ: Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. *Crit Rev Plant Sci* 2006, **25**:23-46.
- Briddon RW, Patil BL, Bagewadi B, Nawaz-ul-Rehman MS, Fauquet CM: Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evol Biol* 2010, **10**:97.
- Fauquet CM, Briddon RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini M, Zhou X: Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch Virol* 2008, **153**:783-821.
- Bisaro DM: Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology* 2006, **344**:158-68.
- Hehnl S, Wege C, Jeske H: Interaction of DNA with the movement proteins of geminiviruses revisited. *J Virol* 2004, **78**:698-706.
- Sanderfoot AA, Lazarowitz SG: Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends Cell Biol* 1996, **9**:353-358.
- Fontes EP, Gladfelter HJ, Schaffer RL, Petty IT, Hanley-Bowdoin L: Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell* 1994, **6**:405-416.
- Singh DK, Malik PS, Choudhury NR, Mukherjee SK: MYMIV replication initiator protein (Rep): roles at the initiation and elongation steps of MYMIV DNA replication. *Virology* 2008, **380**:75-83.
- Rojas A, Kvarnheden A, Marcenaro D, Valkonen JP: Sequence characterization of tomato leaf curl Sinaloa virus and tomato severe leaf curl virus: phylogeny of New World begomoviruses and detection of recombination. *Arch Virol* 2005, **150**:1281-1299.
- Rybicki EP: A phylogenetic and evolutionary justification for 3 genera of Geminiviridae. *Arch Virol* 1994, **139**:49-77.
- Argüello-Astorga G, Herrera-Estrella L, Rivera-Bustamante R: Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Mol Biol* 1994, **26**:553-556.
- Argüello-Astorga GR, Guevara-González RG, Herrera-Estrella LR, Rivera-Bustamante RF: Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology* 1994, **203**:90-100.
- Argüello-Astorga GR, Ruiz-Medrano R: An iteron-related domain is associated to motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Arch Virol* 1994, **146**:1465-1485.
- Bird J, Sánchez J, Rodríguez RL, Juliá FJ: Rugaceous (whitefly-transmitted) viruses in Puerto Rico. In *Tropical Diseases of Legumes*. Edited by: Bird J, Maramorosch K. New York, USA: Academic Press; 1975:3-25.
- Costa AS: Whitefly-transmitted plant diseases. *Annu Rev Phytopathol* 1976, **14**:429-49.
- Hernández-Zepeda C, Idris AM, Carnevali G, Brown JK, Moreno-Valenzuela OA: Molecular characterization and experimental host range of Euphorbia mosaic virus-Yucatan Peninsula, a begomovirus species in the Squash leaf curl virus clade. *Plant Pathol* 2007, **56**:763-770.
- Collins AM, Brown JK, Rehman MM, Roye ME: Complete nucleotide sequence of an isolate of Euphorbia mosaic virus that infects Euphorbia heterophylla and Wissadula amplissima in Jamaica. *Arch Virol* 2009, **154**:1859-1860.
- Méndez-Lozano J, Torres-Pacheco I, Fauquet CM, Rivera-Bustamante RF: Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: Pepper huasteco virus and Pepper golden mosaic virus. *Phytopathology* 2003, **93**:270-277.
- Torres-Pacheco I, Garzón-Tiznado JA, Brown JK, Becerra-Flora A, Rivera-Bustamante RF: Detection and distribution of Geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology* 1996, **86**:1186-1192.
- Torres-Pacheco I, Garzón-Tiznado JA, Herrera-Estrella L, Rivera-Bustamante RF: Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *J Gen Virol* 1993, **74**:2225-2231.



25. Shepherd DN, Martin DP, Lefevre P, Monjane AL, Owor BE, Rybicki EP, Varsani A: A protocol for the rapid isolation of full geminivirus genomes from dried plant tissue. *J Virol Methods* 2008, **149**:97-102.
26. Hernández-Zepeda C, Argüello-Astorga G, Idris AM, Carnevali G, Brown JK, Moreno-Valenzuela OA: Molecular characterization and phylogenetic relationships of *Desmodium* leaf distortion virus (DeLDV): a new begomovirus infecting *Desmodium glabrum* in Yucatan, Mexico. *Virus Genes* 2009, **39**:371-374.
27. García-Andrés S, Tomás DM, Sánchez-Campos S, Navas-Castillo J, Moriones E: Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. *Virology* 2007, **365**:210-219.
28. van der Walt E, Rybicki EP, Varsani A, Polston JE, Billharz R, Donaldson L, Monjane AL, Martin DP: Rapid host adaptation by extensive recombination. *J Gen Virol* 2009, **90**:734-746.
29. Martin DP, Williamson C, Posada D: RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* 2005, **21**:260-262.
30. Ilyina TV, Koonin EV: Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria. *Nucleic Acids Res* 1992, **20**:3279-3285.
31. Argüello-Astorga G, Herrera-Estrella L: Ancestral multipartite units in light-responsive plant promoters have structural features correlating with specific phototransduction pathways. *Plant Physiol* 1996, **112**:1151-1166.
32. Argüello-Astorga G, Herrera-Estrella L: Evolution of light-regulated plant promoters. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1998, **49**:525-555.
33. Hernández-Zepeda C, Brown JK, Moreno-Valenzuela OA, Argüello-Astorga G, Idris AM, Carnevali G, Rivera-Bustamante RF: Characterization of *Rhynchosia* yellow mosaic Yucatan virus, a new recombinant begomovirus associated with two fabaceous weeds in Yucatan, Mexico. *Arch Virol* 2010, **155**:1571-1579.
34. Lescot M, Déhais P, Moreau Y, De Moor B, Rouzé P, Rombauts S: PlantCARE: a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 2002, **30**:325-327.
35. Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T: Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. *Nucleic Acids Research* 1999, **27**:297-300.
36. Ruiz-Medrano R, Guevara-Gonzalez RG, Argüello-Astorga GR, Monsalve-Fonnegra Z, Herrera-Estrella LR, Rivera-Bustamante RF: Identification of a sequence element involved in AC2-mediated transactivation of the *Pepper huasteco virus* coat protein gene. *Virology* 1999, **253**:162-169.
37. Itzhaki H, Maxson JM, Woodson WR: An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S transferase (GST1) gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**:8925-8929.
38. Montgomery J, Goldman S, Deikman J, Margossian L, Fischer RL: Identification of an ethylene responsive region in the promoter of a fruit ripening gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**:5939-5943.
39. Rawat R, Xu Z-F, Yao K-M, Chye ML: Identification of cis-elements for ethylene and circadian regulation of the *Solanum melongena* gene encoding cysteine proteinase. *Plant Mol Biol* 2005, **57**:629-643.
40. Petty ITD, Coutts RHA, Buck KW: Transcriptional mapping of the coat protein gene of tomato golden mosaic virus. *J Gen Virol* 1988, **69**:1359-1365.
41. Paprotka T, Metzler V, Jeske H: The first DNA 1-like alpha satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. *Virology* 2010, **404**:148-157.
42. Hanson SF, Hoogstraten RA, Ahlquist P, Gilbertson RL, Russell DR, Maxwell DP: Mutational analysis of a putative NTP-binding domain in the replication-associated protein (AC1) of Bean golden mosaic geminivirus. *Virology* 1995, **211**:1-9.
43. Koonin VE: A common set of conserved motifs in a vast variety of putative nucleic acid-dependent ATPases including MCM proteins involved in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Nucleic Acids Res* 1993, **21**:2541-2547.
44. Cazonelli CI, Burke J, Velten J: Functional characterization of the geminiviral conserved late element (CLE) in uninfected tobacco. *Plant Mol Biol* 2005, **58**:465-81.
45. Velten J, Morey KJ, Cazonelli CI: Plant viral intergenic DNA sequence repeats with transcription enhancing activity. *Viral J* 2005, **2**:16-24.
46. Eagle PA, Hanley-Bowdoin L: Cis elements that contribute to geminivirus transcriptional regulation and the efficiency of DNA replication. *J Virol* 1997, **71**:6947-6955.
47. Gibbs AJ, Gibbs MJ: A broader definition of the virus species. *Arch Virol* 2006, **151**:1419-1422.
48. Van Regenmortel MH: Applying the species concept to plant viruses. *Arch Virol* 1989, **104**:1-17.
49. Chatterji A, Padidam M, Beachy RN, Fauquet CM: Identification of replication specificity determinance in tomato leaf curl virus from New Delhi. *J Virol* 1999, **73**:5481-5489.
50. Padidam M, Beachy RN, Fauquet CM: Tomato leaf curl geminivirus from India has a bipartite genome and coat protein is not essential for infectivity. *J Gen Virol* 1995, **76**:25-35.
51. Lefevre P, Lett JM, Varsani A, Martin DP: Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. *J Virol* 2009, **83**:2697-707.
52. Lefevre P, Lett JM, Reynaud B, Martin DP: Avoidance of protein fold disruption in natural virus recombinants. *PLoS Pathog* 2007, **3**:e181.
53. Varsani A, Shepherd DN, Monjane AL, Owor BE, Erdmann JB, Rybicki EP, Peterschmitt M, Briddon RW, Markham PG, Oluwafemi S, Windram OP, Lefevre P, Lett JM, Martin DP: Recombination, decreased host specificity and increased mobility may have driven the emergence of maize streak virus as an agricultural pathogen. *J Gen Virol* 2008, **89**:2063-2074.
54. Londoño A, Riego-Ruiz L, Argüello-Astorga GR: DNA-binding specificity determinants of replication proteins encoded by eukaryotic ssDNA viruses are adjacent to widely separated RCR conserved motifs. *Arch Virol* 2010, **155**:1033-1046.
55. Bartel DP: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004, **116**:281-297.
56. Nair V, Zavolan M: Virus-encoded microRNAs: novel regulators of gene expression. *Trends Microbiol* 2006, **14**:169-175.
57. Skalsky RL, Cullen BR: Viruses, microRNAs, and host interactions. *Annu Rev Microbiol* 2010, **64**:123-141.
58. Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, Pipas JM, Ganem D: SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* 2005, **435**:682-686.
59. Cullen BR: Five Questions about Viruses and MicroRNAs. *PLoS Pathog* 2010, **6**:e1000787.
60. Seo GJ, Fink LH, O'Hara B, Atwood WJ, Sullivan CS: Evolutionarily conserved function of a viral microRNA. *J Virol* 2008, **82**:9823-9828.
61. Sullivan CS, Sung CK, Pack CD, Grundhoff A, Lukacher AE: Murine Polyomavirus encodes a microRNA that cleaves early RNA transcripts but is not essential for experimental infection. *Virology* 2009, **387**:157-167.
62. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB: A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1983, **1**:19-21.
63. Mauricio-Castillo JA, Argüello-Astorga GR, Alpuche-Solis AG, Monreal-Vargas CT, Díaz-Gómez O, de la Torre-Almaraz R: First Report of *Tomato severe leaf curl virus* in México. *Plant Dis* 2006, **90**:1116.
64. Carrillo-Tripp J, Lozoya-Gloria E, Rivera-Bustamante RF: Symptom remission and specific resistance of pepper plants after infection by *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* 2007, **97**:51-57.
65. Ascencio-Ibañez JT, Settlage SB: DNA abrasion onto plants is an effective method for geminivirus infection and virus induced gene silencing. *J Virol Met* 2007, **142**:198-203.
66. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Eval* 2007, **24**:1596-1599.
67. Sunter G, Bisaro DM: Identification of a minimal sequence required for activation of the *Tomato golden mosaic virus* coat protein promoter in protoplasts. *Virology* 2003, **305**:452-462.

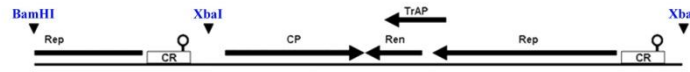
doi:10.1186/1743-422X-7-275

Cite this article as: Gregorio-Jorge et al: Analysis of a new strain of *Euphorbia* mosaic virus with distinct replication specificity unveils a lineage of begomoviruses with short Rep sequences in the DNA-B intergenic region. *Virology Journal* 2010 **7**:275.

## DATOS ADICIONALES

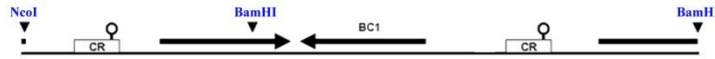
A

pEupJ1.29A  
(6, 339-pb)



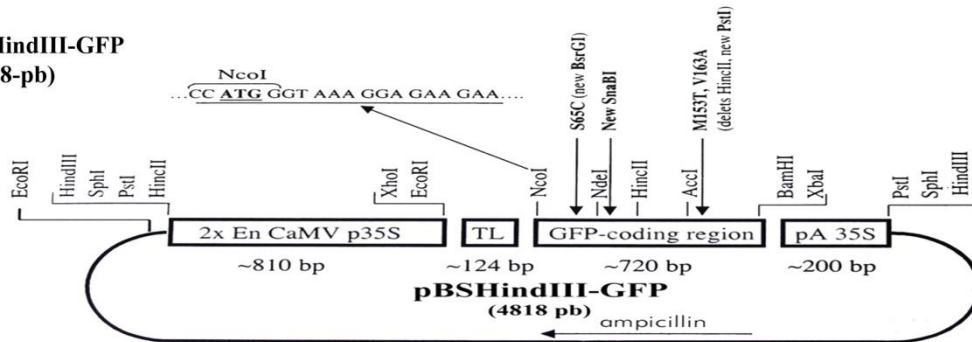
B

pEupJ1.50B  
(6, 923-pb)

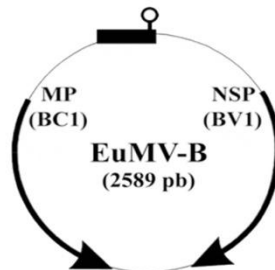


C

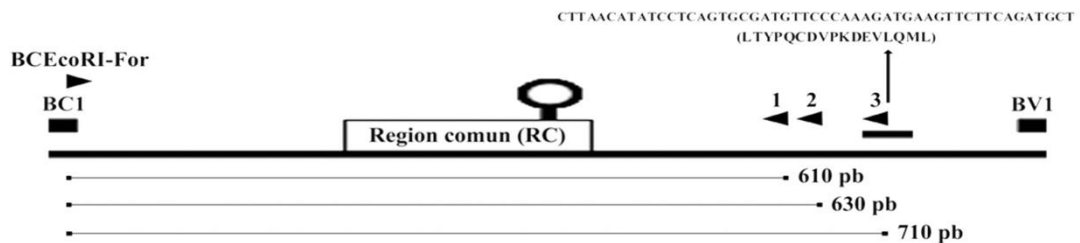
pBSHindIII-GFP  
(4, 818-pb)



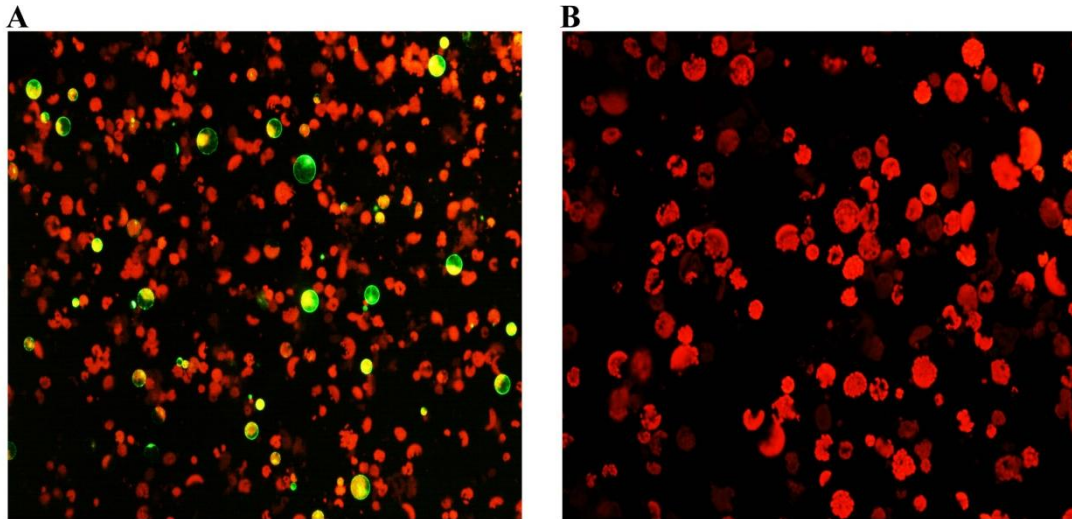
D



E



**Figura A1. Vectores virales de EuMV-Jal y fusiones transcripcionales de sRepHS con GFP.** Los esquemas de las clonas infectivas del componente A y B de EuMV-Jal son mostrados (A y B). El gen reportero GFP proveniente de un vector desconocido se aisló y posteriormente se clonó en el vector pBlueScript usando los sitios HindIII (C). En D se muestra el componente B de EuMV-YP, mientras que en E se esquematizan las fusiones transcripcionales del promotor críptico del elemento sRepHS de EuMV-YP (EcoRI/NcoI) con el gen reportero GFP.



**Figura A2. El promotor críptico del elemento sRepHS de EuMV-YP aparentemente no es funcional en protoplastos de *Arabidopsis thaliana* (resultados preliminares).** Las fusiones transcripcionales se evaluaron en protoplastos de *A. thaliana* preparados a partir de células de mesófilo (Yoo, *et al.*, 2007). Se utilizó el vector pBSHindIII-GFP (Figura A1: C) como control positivo (A). Ninguna de las fusiones transcripcionales (ver Figura A1: E) mostró fluorescencia positiva (B). El resultado negativo podría deberse a varios factores (tipo celular, especie vegetal, ausencia del componente A, etc.). Imágenes tomadas con el objetivo 10X (Microscopio de Fluorescencia Olympus BX51).

## REFERENCIAS II

1. Argüello-Astorga G., L. Herrera-Estrella, R. Rivera-Bustamante (1994a). Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Mol Biol* 26:553-556.
2. Argüello-Astorga G.R., R.G. Guevara-González, L.R. Herrera-Estrella, R.F. Rivera-Bustamante (1994b). Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology* 203:90-100.
3. Argüello-Astorga G.R.; Ruiz-Medrano, R. (2001). An iteron-related domain is associated to motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Arch Virol* 146:1465-1485.
4. Briddon R.W., B.L. Patil, B. Bagewadi, M.S. Nawaz-ul-Rehman, C.M. Fauquet (2010). Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evol Biol* 10:97.
5. Chakraborty, S., P.K. Pandey, M.K. Banerjee, G. Kalloo, C.M. Fauquet (2003). Tomato leaf curl Gujarat virus, a new Begomovirus species causing a severe leaf curl disease of tomato in Varanasi, India. *Phytopathology* 93: 1485–1495.
6. Chare E.R.; Holmes, E.C (2006). A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. *Arch Virol* 151, 933–946.
7. Chenault, K.D.; Melcher, U. (1994). Phylogenetic relationships reveal recombination among isolates of cauliflower mosaic virus. *JMol Evol* 39, 496–505.
8. Cromie, G.A., J.C. Connelly, D.R. Leach (2001). Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Mol. Cell* 8:1163–1174.
9. Fauquet C.M., R.W. Briddon, J.K. Brown, E. Moriones, J. Stanley, M. Zerbini, X. Zhou (2008). Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch Virol* 153:783-821.
10. Froissart, R., D. Roze, M. Uzest, L. Galibert, S. Blanc, Y. Michalakis (2005). Recombination every day: abundant recombination in a virus during a single multicellular host infection. *PLoS Biol.* 3:389-395.
11. Gao, G., M.R. Alvira, S. Somanathan, Y. Lu, L.H. Vandenberghe, J.J. Rux, R. Calcedo, J. Sanmiguel, Z. Abbas, and J.M. Wilson (2003). Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:6081–6086.
12. Gilbertson, R.L., S.H. Hidayat, E.J. Paplomatas, M.R. Rojas, Y.M. Hou, D.P. Maxwell (1993). Pseudorecombination between infectious cloned components of tomato mottle and bean dwarf mosaic viruses. *J. Gen. Virol.* 74: 23-31.
13. Harrison, B.D., Robinson, D.J. (1999). Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (begomoviruses). *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 369-398.
14. Harrison, B.D., X. Zhou, G.W. Otim-Nape, Y. Liu, D.J. Robinson (1997). Role of a novel type of double infection in the geminivirus-induced epidemic of severe cassava mosaic in Uganda. *Annals of Applied Biology* 131, 437-448.
15. Heath, L., D.P. Martin, L. Warburton, M. Perrin, W. Horsfield, C. Kingsley, E.P. Rybicki, A.L. Williamson (2004). Evidence of unique genotypes of beak and feather disease virus in southern Africa. *J Virol* 78, 9277–9284.

16. Heath, L., E. van der Walt, A. Varsani, D.P. Martin (2006). Recombination patterns in aphthoviruses mirror those found in other picornaviruses. *J Virol* 80, 11827–11832.
17. Höfer, P., M. Engel, H. Jeske, T. Frischmuth (1997). Host range limitation of a pseudo-recombinant virus produced by two distinct bipartite geminiviruses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 1019-1022.
18. Jeske, H., M. Lütgemeier, W. Preiss (2001). DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *EMBO Journal* 20: 6158-6167.
19. Katz, R.A.; Skalka, A.M. (1990). Generation of diversity in retroviruses. *Annu Rev Genet* 24, 409–445.
20. Keightley, P.D.; S.P. Otto (2006). Interference among deleterious mutations favours sex and recombination in finite populations. *Nature* 443:89–92.
21. Kirthi, N., S.P. Maiya, M.R.N. Murthy, H.S. Savithri (2002). Evidence for recombination among the tomato leaf curl virus strains/species from Bangalore, India. *Archives of Virology* 147, 255-272.
22. Londoño-Avedaño, A., L. Riego-Ruiz, G.R. Argüello-Astorga (2010). DNA-binding specificity determinants of replication proteins encoded by eukaryotic ssDNA viruses are adjacent to widely separated RCR conserved motifs. *Arch Virol*, 155:1033–1046.
23. Martin, D.P., C. Williamson, D. Posada (2005). Recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* 21: 260-262.
24. Martin, G., S.P. Otto, T. Lenormand (2006). Selection for recombination in structured populations. *Genetics* 172:593–609.
25. Michel, B., M.J. Flores, E. Viguera, G. Grompone, M. Seigneur, V. Bidnenko (2001). Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:8181–8188.
26. Nawaz-ul-Rehman, M.S., Fauquet, C.M. (2009). Evolution of geminiviruses and their satellites. *FEBS Lett.* 583: 1825-1832.
27. Padidam, M., S. Sawyer, C.M. Fauquet (1999). Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265, 218–225.
28. Pita, J.S., V.N. Fondong, A. Sangaré, G.W. Otim-Nape, S. Ogwal, C.M. Fauquet (2001). Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General Virology* 82: 655-665.
29. Preiss, W.; Jeske, H. (2003). Multitasking in replication is common among geminiviruses. *Journal of Virology* 77, 2972-2980.
30. Ribeiro, S.G., I.C. Bezerra, R.O. Resende, M.F. Lima, L.V. Rezende, A.C. Ávila (1998). New tomato geminiviruses in mixed infections in Brazil. In 2<sup>nd</sup> International Workshop on Bemisia and Geminiviruses, pp. P-63. San Juan, Puerto Rico.
31. Rojas A., A. Kvarnheden, D. Marcenaro, J.P. Valkonen (2005). Sequence characterization of tomato leaf curl Sinaloa virus and tomato severe leaf curl virus: phylogeny of New World begomoviruses and detection of recombination. *Arch Virol* 150:1281-1299.
32. Rybicki E.P. (1994). A phylogenetic and evolutionary justification for 3 genera of Geminiviridae. *Arch Virol* 139:49-77.

33. Sanz, A.I., A. Fraile, F. Garcia-Arenal, X. Zhou, D.J. Robinson, S. Khalid, T. Butt, B.D. Harrison (2000). Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *J. Gen. Virol.* 81:1839-1849.
34. Seal, S.E., F. van den Bosch, M.J. Jeger (2006). Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25: 23 -46.
35. Shackelton, L.A., K. Hoelzer, C.R. Parrish, E.C. Holmes (2007). Comparative analysis reveals frequent recombination in the parvoviruses. *J Gen Virol* 88, 3294–3301.
36. Sharp, P.M., D.L. Robertson, B.H. Hahn (1995). Cross-species transmission and recombination of 'AIDS' viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 349, 41–47.
37. Stanley, J., R. Townsend, S.L. Curson (1985). Pseudorecombinants between cloned DNAs of two isolates of cassava latent virus. *J. Gen. Virol.* 66: 1055-1061.
38. Suzuki, Y., T. Gojobori, O. Nakagomi (1998). Intragenic recombinations in rotaviruses. *FEBS Lett* 427, 183–187.
39. Varsani, A., E. van der Walt, L. Heath, E.P. Rybicki, A.L. Williamson, D.P. Martin (2006). Evidence of ancient papillomavirus recombination. *J. Gen. Virol.* 87:2527–2531.
40. Worobey, M. (2000). Extensive homologous recombination among widely divergent TT viruses. *J Virol* 74, 7666–7670.
41. Yoo, S.D., Y.H. Cho, J. Sheen (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols* 2: 1565 – 1572
42. Zhou, X., Y. Lui, L. Calvert, D. Munoz, G.W. Otim-Nape, D.J. Robinson, B.D. Harrison (1997). Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *J. Gen. Virol.* 78: 2101-2111.