

# Anatomic alterations and hyperplasia induced by *Euphorbia mosaic virus* Yucatan Peninsula isolate at the mesophyll

## Alteraciones anatómicas e hiperplasia inducidas por *Euphorbia mosaic virus* aislamiento Yucatán Península en el mesófilo

Naivy Gamboa-Tec, Angela Kú-González, Luis Carlos Gutiérrez-Pacheco, Enrique Castaño, Luisa López-Ochoa\*, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo CP. 97200. Mérida, Yucatán. México. \*Autor para correspondencia: luisa\_lopez@cicy.mx.

Recibido: 05 de Diciembre, 2017.

Aceptado: 05 de Febrero, 2018.

Gamboa-Tec N, Kú-González A, Gutiérrez-Pacheco LC, Castaño E, López-Ochoa L. 2018. Anatomic alterations and hyperplasia induced by *Euphorbia mosaic virus* Yucatan Peninsula isolate at the mesophyll. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 287-297.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1712-2

Primera publicación DOI: 09 de Marzo, 2018.

First DOI publication: March 09, 2018.

**Resumen.** *Euphorbia mosaic virus* aislamiento Yucatan Peninsula es un begomovirus bipartita con una amplia gama de hospedantes experimentales, que incluyen especies de importancia económica, como frijol, chile y tomate, entre otras. Este virus provocó síntomas severos en hojas de *Nicotiana benthamiana*, pérdida de identidad celular y tisular, deformaciones de la lámina foliar y de la nervadura central, cambios en la estructura del mesófilo y proliferación celular, a diferencia de otros begomovirus bipartitas. Activó la expresión de los genes *cycA1*, *cycA2* y *cdkB2.2*, implicados en la

**Abstract.** *Euphorbia mosaic virus* isolated from the Yucatan Peninsula is a bipartite begomovirus with a wide range of experimental hosts, including species of economic importance, such as bean, chilli and tomato, among others. This virus produced severe symptoms on *Nicotiana benthamiana* leaves, leaf blade deformations, loss of tissue and cell identity, as well as changes in the mesophyll structure. Unlike other bipartite begomoviruses, EuMV-YP induced cell proliferation at the mesophyll; it also positively regulated the expression of *cycA1*, *cycA2* and *cdkB2.2*, genes involved in the G2/M transition of the mitotic cell cycle, and localized at the mesophyll. This is the first example of a bipartite begomovirus capable of inducing cell proliferation.

**Key words:** geminivirus; cell cycle.

*Euphorbia mosaic virus*, isolated from the Yucatan Peninsula (EuMV-YP) is a bipartite begomovirus with a wide range of experimental

transición G2/M del ciclo celular mitótico y se localizó en el mesófilo de las hojas. EuMV-YP es el primer ejemplo de un begomovirus bipartita capaz de inducir la proliferación celular.

**Palabras clave:** geminivirus; ciclo celular.

*Euphorbia mosaic virus* aislamiento Yucatan Peninsula (EuMV-YP) es un begomovirus bipartita con una amplia gama de hospedantes experimentales. El silenciamiento génico inducido por EuMV-YP en *Nicotiana benthamiana* inicia en las nervaduras y se extiende hacia el resto de la hoja (Villanueva *et al.*, 2013), lo que sugiere que es capaz de alcanzar el mesófilo. La mayoría de los begomovirus bipartitas tienen hospedantes específicos, en los cuales permanecen restringidos al floema. El *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) y el *African cassava mosaic virus* (ACMV) pueden invadir el mesófilo. Existe una correlación en su capacidad de salir del floema y la de producir síntomas severos en *N. benthamiana* (Wege *et al.*, 2001). La replicación de los geminivirus ocurre en el núcleo de las células diferenciadas, para ello inducen su entrada al ciclo celular. Los begomovirus bipartitas y los mastrevirus promueven la síntesis de ADN sin pasar por la división celular (revisado por Hanley *et al.*, 2013); mientras que los curtovirus inducen la mitosis, produciendo verrugas en la nervadura central (Park *et al.*, 2004; Latham *et al.*, 1997). En este trabajo se abordó la pregunta de si EuMV-YP es capaz de infectar las células del mesófilo de *N. benthamiana* y si su localización correlaciona con la severidad de los síntomas producidos. Para inocular con el virus silvestre se emplearon clones infectivos construidos previamente (Villanueva *et al.*, 2013), para localizar al virus se construyó el vector de expresión pEuMV-YPDAV1:GFP. Las combinaciones de plásmidos utilizados por tratamiento se

hosts. The gene silencing induced by EuMV-YP in *Nicotiana benthamiana* begins in the midribs and extends to the rest of the leaf (Villanueva *et al.*, 2013), which indicates that it is capable of reaching the mesophyll. Most bipartite begomoviruses have specific hosts in which they are restricted to the phloem. The *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) and the *African cassava mosaic virus* (ACMV) can invade the mesophyll. There is a correlation in its capability to exit the phloem and to produce severe symptoms in *N. benthamiana* (Wege *et al.*, 2001). The replication of geminiviruses takes place in the nuclei of differentiated cells, and for this, they induce their entry into the cell cycle. The bipartite begomoviruses and mastreviruses promote DNA synthesis without undergoing cell division (revised by Hanley *et al.*, 2013); whereas curtoviruses induce mitosis, producing enations in the leaves midribs (Park *et al.*, 2004; Latham *et al.*, 1997). This investigation posed the question of whether EuMV-YP is able to reach cells of the *N. benthamiana* mesophyll and if its tissue tropism correlates with the severity of the symptoms produced. To inoculate with the wild virus, previously constructed infective clones were used (Villanueva *et al.*, 2013), and to locate the virus, expression vector pEuMV-YPDAV1:GFP was constructed. The combinations of plasmids used per treatment are indicated in Table 1. In each treatment, 20 *N. benthamiana* plants with four true leaves were inoculated, as reported previously (Villanueva *et al.*, 2013); in this investigation, a pressure of 70 psi was applied at a distance of 6 cm, as well as 1  $\mu\text{m}$  gold particles covered with 5  $\mu\text{g}$  of each plasmid. Fifteen days post inoculation (dpi), leaves number nine and 10 were harvested. They were named "systemic leaves," in this manuscript, since they emerged after inoculation. Paraffin inclusions of fixed tissues, and 8-10  $\mu\text{m}$  transversal cuts of the center of the leaves were

indican en el Cuadro 1. En cada tratamiento se inocularon 20 plantas de *N. benthamiana* de cuatro hojas verdaderas, como se reportó previamente (Villanueva *et al.*, 2013), en este trabajo se aplicó una presión de 70 psi a 6 cm de distancia y partículas de oro de 1 µm recubiertas con 5 µg de cada plásmido. A los 15 días después de la inoculación (ddi) se recolectaron las hojas número nueve y 10, denominadas “hojas con infección sistémica” porque emergieron después de la inoculación. Estas se fijaron y se embebieron en parafina, se hicieron cortes transversales de 8-10 µm en el centro de las hojas tal como se reportó previamente (Moo *et al.*, 2012). Se adquirieron imágenes con el objetivo 40x de un microscopio confocal láser modelo Olympus FV100 SW y se procesaron con el software FV10 ASW versión 4.1. La fluorescencia de GFP se capturó con longitudes de onda de excitación/emisión de 488/507 nm, respectivamente. Para el análisis histológico, las secciones se tiñeron con azul de toluidina. Se registraron imágenes de secciones transversales y de la región media de las hojas con infección sistémica con el objetivo 6.5x de un microscopio Eclipse E200 Nikon. Se midió el grosor de la hoja y se contó el número de células por mm<sup>2</sup> de cuatro plantas con síntomas moderados o severos a los 15 ddi. Se graficó el número de células y

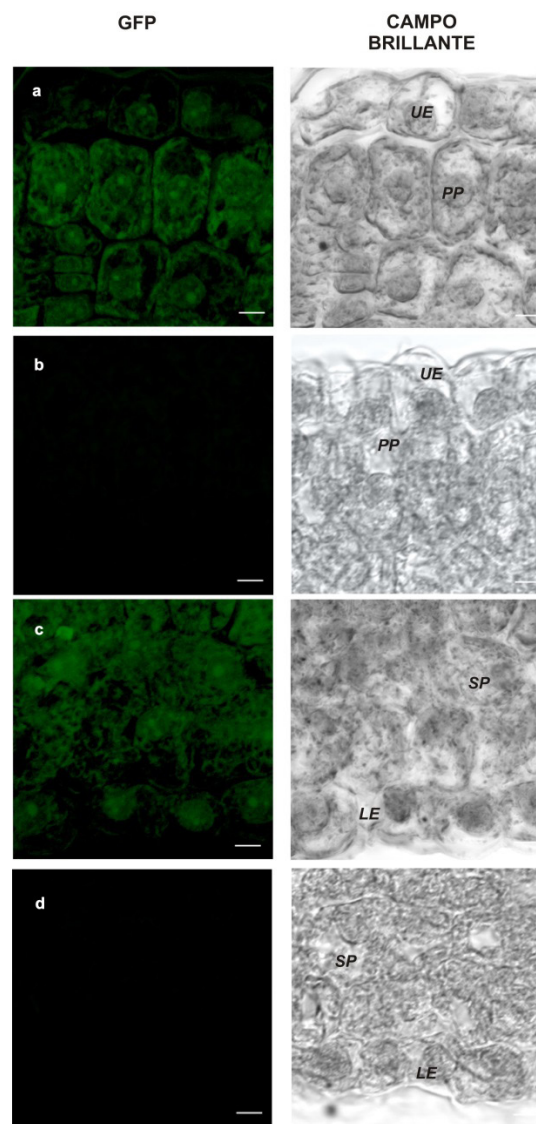
made, as reported previously (Moo *et al.*, 2012). Images were taken using a 40x lens of an Olympus FV100 SW laser confocal microscope, and they were processed using the FV10 ASW software version 4.1. The GFP fluorescence was captured with 488/507 nm wavelengths of excitation/emission, respectively. For the histological analysis, the sections were dyed with toluidine blue. Images were taken of transversal sections and of the midsections of leaves with systemic infections using the 6.5x lens of a Nikon E200 microscope. The leaf's thickness was measured and the number of cells per mm<sup>2</sup> was counted in four plants with moderate to severe symptoms at 15dpi. The number of cells and the thickness of the leaf blade were graphed using 12 individual values. We tested the null hypothesis that the means of plants with severe and moderate symptoms are equal to healthy plants. F tests were performed on two samples to determine the homogeneity of variances. The statistical significance between the pairs of means (severe or moderate symptoms vs healthy plants) was obtained using the Student's t-test on two samples, assuming unequal variances, using Excel's Data Analysis ToolPak program. For the gene expression studies, leaves with systemic infections were taken from three plants, frozen, and ground together in liquid

**Cuadro 1. Plásmidos usados por tratamiento**  
**Table 1. Plasmids used per treatment**

Tratamiento/treatment	Plásmidos/plasmids	Ensayo/Assay	
		<sup>x</sup> TT	<sup>y</sup> SH
Testigo/control	pBluescript II SK+	+	+
Virus silvestre/ Wild type virus	pEuMV-YP:HA + pEuMV-YP:HB	+	-
Vector GFP / GFP vector	pEuMV-YPDAV1:GFP	+	-
EuMV-YP GFP	pEuMV-YPDAV1:GFP + pEuMV-YP:HB	+	-
EuMV-YP + EuMV-YP GFP	pEuMV-YP:HA + pEuMV-YP:HB + pEuMV-YPDAV1:GFP	+	-

<sup>x</sup>T=Localización en tejidos, <sup>y</sup>SH=Síntomas e Histología / <sup>x</sup>TT = Tissue Tropism. <sup>y</sup>SH=Symptoms and Histology

el espesor de la lámina foliar a partir de 12 valores individuales. Se probó la hipótesis nula de que las medias de las plantas con síntomas severos y moderados son iguales a las plantas sanas. Se llevaron a cabo pruebas F de dos muestras para determinar la homogeneidad de varianzas. La significancia estadística de la diferencia entre pares de medias (síntomas severos o moderados contra plantas sanas) se obtuvo con la prueba t de Student de dos muestras suponiendo varianzas desiguales, utilizando el programa Data Analysis ToolPak de Excel. Para los estudios de expresión génica, se tomaron hojas con infección sistémica de tres plantas, se congelaron y se molieron juntas en nitrógeno líquido. Se extrajo RNA total con el estuche RNeasy Plant mini kit (Qiagen) y un tratamiento con DNasa I. La primera cadena de cDNA se sintetizó con 500 ng de RNA total, Oligo-dT [d (T) 23VN] y el estuche ProtoScript M-MuLV, siguiendo el protocolo del fabricante (New England Biolabs, EE. UU.), el volumen final se ajustó a 50 µL. Para la segunda cadena, se utilizaron 0.2 µM de los cebadores para los genes *cycA1*, *cycA2*, *cdkB2.2* (Caracuel *et al.*, 2012) y *ubi3* (Kotakis *et al.*, 2010), 5 µL del cDNA, 0.2 mM dNTPs, 1.25 unidades de Taq polimerasa y amortiguador Thermo Pol (New England Biolabs) en 25 µL, con el programa: 94 °C por 5 min / 28 ciclos a 94 °C por 30 s, 56 °C por 60 s y 72 °C por 1 min / 72 °C por 10 min. Se separaron 10 µL en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. GFP se detectó en forma directa en todos los tipos de células del mesófilo, como la epidermis superior y el parénquima en empalizada (Figura 1A), el parénquima esponjoso y la epidermis inferior (Figura 1C) de las hojas con infección sistémica a los 15 ddi. No se detectó GFP en plantas sanas (Figura 1B y 1D). La fluorescencia de GFP fue baja y no fue posible detectarla en forma directa en el floema de la nervadura media y en otras células de los haces vasculares, pero si mediante inmunodetección



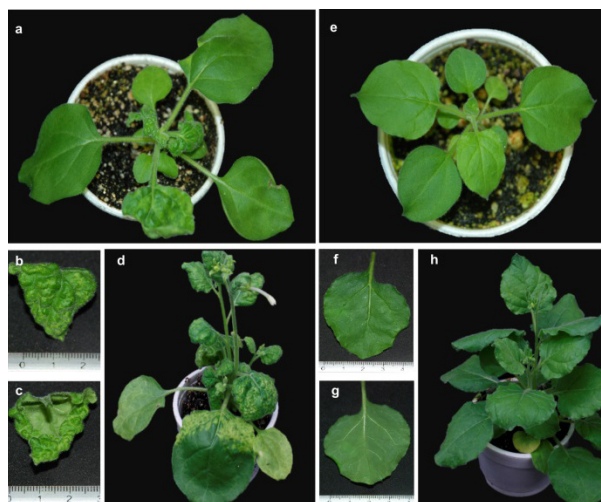
**Figura 1. Localización de EuMV-YP en *N. benthamiana*.** Plantas inoculadas con el virus silvestre + EuMV-YP GFP a los 15 ddi (A, C) y plantas sanas (B, D). Parénquima en empalizada (A, B) y esponjoso (C, D). Barras: 5 µm

**Figure 1. Tissue tropism of EuMV-YP in *N. benthamiana*.** Plants inoculated with the wild virus + EuMV-YP GFP at 15 ddi (A, C) and healthy plants (B, D). Palisade (A, B) and spongy parenchyma (C, D). Bars: 5 µm.

nitrogen. Total RNA was extracted with the RNeasy Plant mini kit (Qiagen) and a treatment with DNase I. The first cDNA strand was synthesized with 500 ng

(datos no mostrados). Estos resultados demuestran que EuMV-YP es capaz de invadir todos los tipos de células del mesófilo en *N. benthamiana* en una alta proporción, tal como lo hacen ACMV y TGMV (Wage *et al.*, 2001). EuMV-YP también causó síntomas severos en *N. benthamiana*; a los 15 ddi se encontraron plantas con distintos grados de severidad: siete leves, ocho moderados y cinco severos. Las hojas con infección sistémica de plantas con síntomas severos presentaron enrollamientos pronunciados del margen hacia el envés, así como arrugamientos o abultamientos abundantes (Figura 2A, 2B y 2C), estos síntomas se mantuvieron hasta los 21 ddi. A los 25 ddi aparecieron mosaicos cloróticos y a los 28 ddi se observó la atenuación de síntomas (Figura 2D), que permanecieron así hasta la finalización del experimento. Estos resultados demuestran que al igual que ACMV y TGMV, EuMV-YP es capaz de inducir síntomas severos en *N. benthamiana*. Se han descrito tres determinantes genéticos que confieren la localización tisular de TGMV (Morra y Petty, 2000). EuMV-YP pertenece a un clado taxonómico distinto (Hernández *et al.*, 2007), por tanto, los determinantes genéticos que le confieren la capacidad de invadir el mesófilo y de producir síntomas severos pueden ser distintos. Los abultamientos observados en las hojas de las plantas con síntomas severos sugerían que EuMV-YP causaba alteraciones anatómicas en las hojas (Figura 2A), además de una alta frecuencia de eventos de división celular (Figura 1A). Para caracterizar este hallazgo, se hizo un análisis histológico exhaustivo de las hojas en regiones discretas a lo largo de toda la lámina foliar (Figura 3A). En las plantas sanas se observó la organización tisular típica de *N. benthamiana*; epidermis superior, inferior y el parénquima en empalizada de una sola capa de células, éste último con células alargadas anticlinales; el parénquima esponjoso con dos o tres capas de células esféricas (Figura 1A). En plantas infectadas se

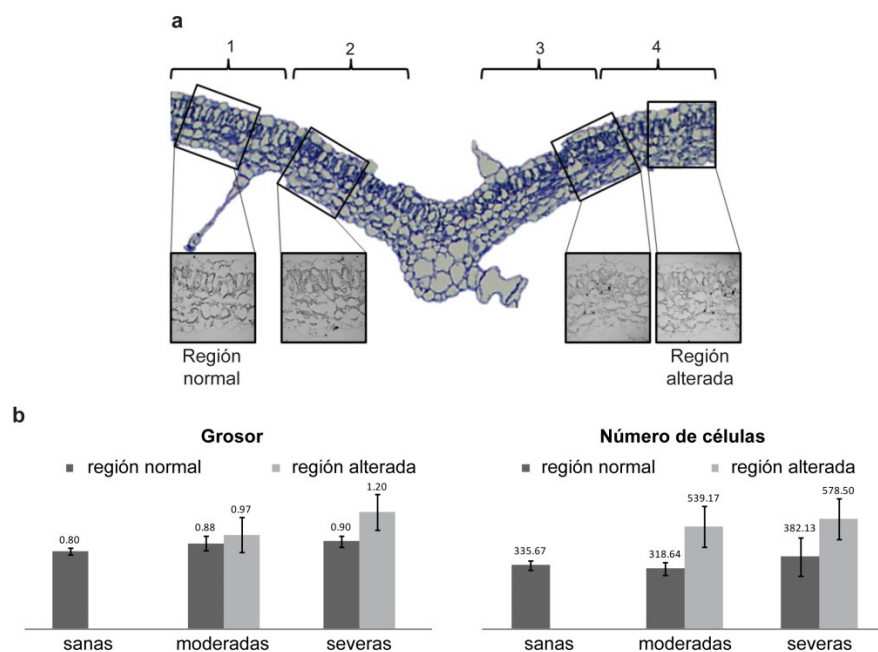
of total RNA, Oligo-dT [d (T) 23VN] and the ProtoScript M-MuLV kit, following the manufacturer protocol (New England Biolabs, U.S.A.), and the final volume was adjusted to 50  $\mu$ L. For the second strand, 0.2  $\mu$ M of specific primers were used for genes *cycA1*, *cycA2*, *cdkB2.2* (Caracuel *et al.*, 2012) and *ubi3* (Kotakis *et al.*, 2010), 5  $\mu$ L of the cDNA, 0.2 mM dNTPs, 1.25 units of Taq polymerase and Thermo Pol buffer (New England Biolabs) in 25  $\mu$ L, with the program: 94 °C for 5 min / 28 cycles at 94 °C for 30 s, 56 °C for 60 s and 72 °C for 1 min / 72 °C for 10 min. We separated 10  $\mu$ L in an agarose gel at 0.8% stained with ethidium bromide. GFP was found directly in all types of mesophyll cells, such as the upper epidermis and the parenchyma in palisade (Figure 1A), the spongy parenchyma and the lower epidermis (Figure 1C) of the leaves with systemic infections 15 dpi. No GFP was found in healthy plants (Figure 1B and 1C). GFP fluorescence was low and was not directly detectable in the phloem of the midrib and in other cells of the vascular bundles, although it was found using immunodetection (data not shown). These results show that EuMV-YP is capable of invading all types of mesophyll cells in *N. benthamiana* in a high proportion, just as ACMV and TGMV (Wage *et al.*, 2001). EuMV-YP also caused severe symptoms in *N. benthamiana*; at 15 dpi, plants were found with different degrees of severity: seven mild, eight moderate and five severe. The leaves with systemic infections from plants with severe symptoms presented strong downward curling of the margins, as well as abundant crinkling or bulging (Figure 2A, 2B and 2C); these symptoms remained until 21 dpi. At 25 dpi, chlorotic mosaics appeared and at 28 dpi, the symptoms became attenuated (Figure 2D), and remained mitigated until the end of the experiment. These results show that, like ACMV and TGMV, EuMV-YP is capable



**Figura 2.** Síntomas severos producidos por EuMV-YP. EuMV-YP (A-D) y plantas sanas (E-H), a los 15 (A-C, E-G) y 28 ddi (D y H). Vistas dorsal (B y F) y ventral (C y G).

**Figure 2.** Severe symptoms produced by EuMV-YP. EuMV-YP (A-D) and healthy plants (E-H), at 15 (A-C, E-G) and 28 dpi (D and H). Dorsal (B and F) and ventral (C and G) views.

of inducing severe symptoms in *N. benthamiana*. Three genetic determinants have been described that confer the tissue tropism of TGMV (Morra and Petty, 2000). EuMV-YP belongs to a different taxonomic clade (Hernández *et al.*, 2007), and therefore the genetic determinants that give it the capability of invading the mesophyll and of producing severe symptoms can be different. The bulges observed in the leaves of plants with severe symptoms suggested that EuMV-YP caused anatomic alterations in the leaves (Figure 2A), as well as a high frequency of cell division events (Figure 1A). To characterize this finding, a thorough histological analysis was carried out on the leaves in discreet regions throughout the entire leaf blade (Figure 3A). In healthy plants, a typical *N. benthamiana* tissue organization was observed; upper and lower epidermis and the palisade

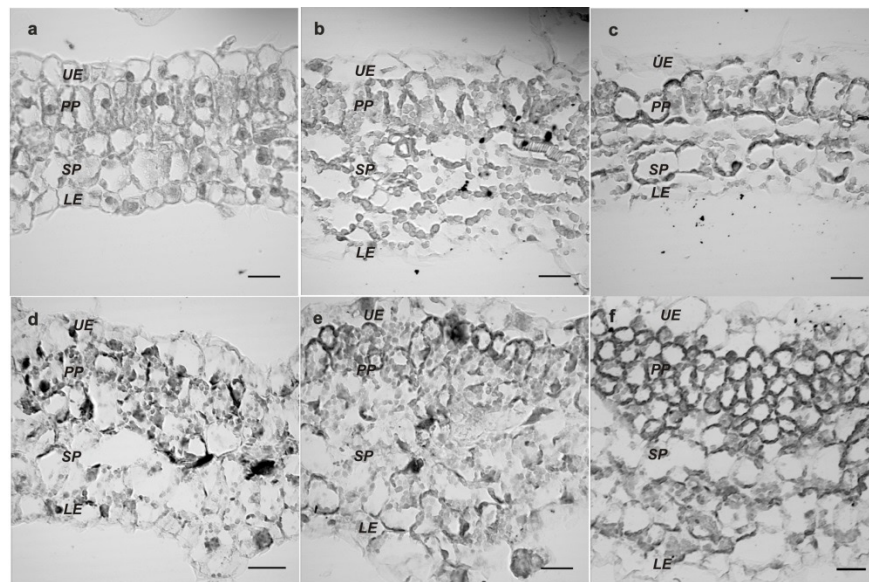


**Figura 3.** Análisis cuantitativo del efecto de EuMV-YP. Sección transversal de una hoja (A). Gráficas de grosor de la lámina foliar y del número de células (B) en plantas con síntomas moderados, severos o sanas. Se incluyen barras de desviación estándar.

**Figure 3.** Quantitative analysis of the effect of EuMV-YP. Cross section of a leaf (A). Graphs of the thickness of the leaf blade and number of cells (B) in plants with moderate or severe symptoms, or healthy plants. Includes standard deviation error bars.

observaron regiones con cambios en la morfología de las células y regiones engrosadas (Figura 4B, D, E y F), representando el 20 y el 50% de la hoja de las plantas con síntomas moderados y severos, respectivamente. El valor medio de las regiones engrosadas (alteradas) en plantas que mostraron síntomas severos fue significativamente diferente al de las regiones sin cambios (normales) en pruebas de t student ( $t \leq 7.55$ ,  $P \ll 0.01$ ); lo mismo ocurrió en regiones alteradas vs normales de plantas con síntomas moderados ( $t \leq 2.71$ ,  $P \leq 0.02$ ) (Figura 3B Izq.). El número de células fue significativamente mayor en las plantas con síntomas severos o moderados en comparación con el de las sanas ( $t \leq 6.18$ ,  $P < 0.01$ ,  $t < 3.87$ ,  $P \leq 0.01$ , respectivamente), con incrementos de 50 y 100% de las plantas con síntomas moderados y severos, respectivamente (Figura 3B Der.). La proliferación celular se observó en el parénquima en empalizada y esponjoso (Figura 4),

parenchyma of one single layer of cells, the latter with elongated anticlinal cells; the spongy parenchyma with two or three layers of spherical cells (Figure 4F). In infected plants, areas were noticed with changes in the morphology of cells and thickened regions (Figure 4B, D, E and F), accounting for 10 and 50% of the leaf in plants with moderate and severe symptoms, respectively. The average value of the thickened regions (altered) in plants that displayed severe symptoms was significantly different to that of the regions without changes (normal) in Student's t tests ( $t \leq 7.55$ ,  $P \ll 0.01$ ); the same happened in regions vs normal regions of plants with moderate symptoms ( $t \leq 2.71$ ,  $P \leq 0.02$ ) (Figure 3B Left). The number of cells was significantly higher in plants with severe or moderate symptoms in comparison with those in healthy plants ( $t \leq 6.18$ ,  $P < 0.01$ ,  $t < 3.87$ ,  $P \leq 0.01$ , respectively), with increases of 50 and 100% of the



**Figura 4.** Cambios anatómicos inducidos por EuMV-YP. Plantas sanas (A) o con síntomas severos (B-F). Cambios de morfología celular en parénquima esponjoso (SP) y en empalizada (PP) (B-C). Epidermis superior (UE) e inferior (LE). Aumento de 680x. Barras: 20  $\mu$ m.

**Figure 4.** Anatomical changes induced by EuMV-YP. Healthy plants (A) or with severe symptoms (B-F). Changes in cell morphology in spongy (SP) and in palisade parenchyma (PP) (B-C). Upper (UE) and lower (LE) epidermis. 680x scale. Bars: 20  $\mu$ m.

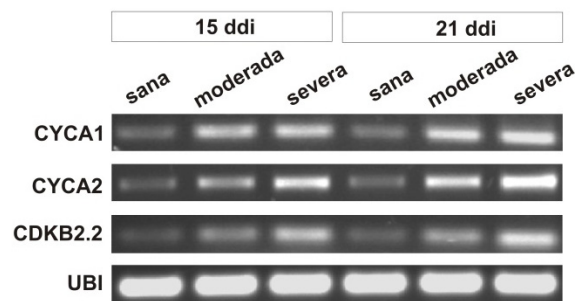
que comúnmente tenían cuatro capas de células (Figura 4E y 4F). Sin embargo, en las plantas con los síntomas más severos, se encontraron hasta 10 capas (datos no mostrados). Ciertas regiones de las hojas presentaban alteración de la morfología celular, particularmente del parénquima en empalizada y esponjoso (Figura 4B y 4B). Además, se observaron células esféricas y de tamaño reducido en las regiones con mayor proliferación celular (Figura 4F). Estos resultados confirman que los abultamientos de las hojas son producto de la inducción de la división celular en el mesófilo de *N. benthamiana*. Resultados similares se encontraron al expresar la proteína C12 del *Chrysanthemum virus B* (CVB) en las hojas de *N. tabacum*, la cual es un determinante de patogenicidad y virulencia. CVB provoca enrollamientos y proliferación celular en las hojas del crisantemo, su hospedero natural (Lukhovitskaya *et al.*, 2014). De hecho, muchos virus producen síntomas similares, pero no se han realizado los estudios histológicos que revelen la naturaleza de los síntomas, he aquí la relevancia del presente estudio. Cabe destacar que EuMV-YP es el primer ejemplo de un geminivirus que puede inducir la división celular en el parénquima en empalizada y esponjoso, por tanto, resulta un modelo interesante para estudiar los determinantes genéticos que están induciendo este fenómeno. Por el contrario, existen múltiples reportes de la inducción de la división celular en las células del floema y células asociadas en las nervaduras de las hojas. Tal es el caso de los Curtovirus y los begomovirus monopartitas, entre los geminivirus (Park *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2017) y de virus de RNA (Xie *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2016), en todos estos casos, la proliferación celular inducida conlleva a la producción de tumores en las nervaduras de las hojas. En concordancia con los resultados anteriores, la expresión los de los genes *cycA1*, *cycA2* y *cdkB2.2* se incrementó en las hojas de plantas

plants with moderate and severe symptoms, respectively (Figure 3B Right). Cell proliferation was observed in the palisade and spongy parenchyma (Figure 4), which commonly had four layers of cells (Figure 4E and 4F). However, in plants with the most severe symptoms, up to 10 layers were found (data not shown). Certain regions of the leaves presented alterations in cell morphology, particularly of the palisade and spongy parenchyma (Figure 4B y 4B). Also, shpere-shaped and small cells were observed in the regions with the greatest cell proliferation (Figure 4F). These results confirm that the bulges in the leaves are a product of the induction of cell division in the *N. benthamiana* mesophyll. Similar results were found when expressing protein C12 of the *Chrysanthemum virus B* (CVB) in *N. tabacum* leaves, which is a determinant of pathogenicity and virulence. CVB causes curling and cell proliferation in the leaves of chrysanthemum, its natural host (Lukhovitskaya *et al.*, 2014). In fact, many viruses produce similar symptoms, though no histological studies have been carried out to reveal the nature of the symptoms, and hence the relevance of this study. It is worth pointing out that EuMV-YP is the first example of a geminivirus that can induce cell division in the palisade and spongy parenchyma, and is therefore an interesting model to study the gene determinants that are inducing this phenomenon. On the other hand, there are several reports on the induction of cell division in the phloem and phloem-associated cells in the leaf midribs. Such is the case of Curtoviruses and the monopartite begomoviruses, amongst the geminiviruses (Park *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2017) and RNA viruses (Xie *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2016); in all these cases, the induced cell proliferation leads to the production of tumors in the leafmidribs. In consistency with the previous results, the expression of genes *cycA1*, *cycA2* and



infectadas a los 15 y 21 ddi en comparación con la de plantas sanas (Figura 5), mientras que el gen *ubi3* se mantuvo sin cambio. La regulación positiva de genes que participan en la entrada a la fase mitótica (Breyne *et al.*, 2002) es congruente con los incrementos del número de células en plantas con síntomas moderados o severos. Resultados similares se observaron en plantas infectadas con BCVT (Park *et al.*, 2004), CBV (Lukhovitskaya *et al.*, 2014) y el *Rice black-streaked dwarf virus* (RBSDV; Shen *et al.*, 2016). Por el contrario, los begomovirus bipartitas *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) y TGMV, activan la entrada al endociclo en *Arabidopsis thaliana* y en *N. benthamiana*, respectivamente (Nagar *et al.*, 2002; Ascencio *et al.*, 2008). CaLCuV activa la expresión de la mayoría de los genes que participan en la entrada al ciclo celular en la fase de síntesis de ADN y reprime la expresión de la mayoría de los genes asociados con la fase M o de división celular como CDKB2 en *A. thaliana* (Ascencio *et al.*, 2008), lo que explica que CaLCuV induzca la endoreduplicación y no la división celular. Los aislados EuMV-Jal y EuMV-YP, que producen síntomas similares en varios hospederos experimentales y son incompatibles en replicación, han adquirido secuencias únicas en sus regiones intergénicas que los distinguen de virus filogenéticamente relacionados (Gregorio *et al.*, 2010). EuMV-YP puede haber perdido las secuencias necesarias para bloquear el punto de control G2 / M o puede haber adquirido determinantes genéticos para inducir un ciclo mitótico completo, mediante mutación o la incorporación de secuencias genómicas de otros virus. Esto queda por determinarse. En conclusión, EuMV-YP es capaz de producir síntomas severos en *N. benthamiana* y de llegar al mesófilo, donde induce la mitosis y cambios en la morfología celular, así como la expresión de genes relacionados con la división celular.

*cdk2.2* increased in the leaves of infected plants at 15 and 21 dpi in comparison with those for healthy plants (Figure 5), while gene *ubi3* remained unchanged. The positive regulation of genes that participate in the entry into the mitotic phase (M) (Breyne *et al.*, 2002) is consistent with the cell increases in number found in plants with moderate or severe symptoms. Similar results were observed in plants infected with BCVT (Park *et al.*, 2004), CBV (Lukhovitskaya *et al.*, 2014) and the *Rice black-streaked dwarf virus* (RBSDV; Shen *et al.*, 2016). On the other hand, the bipartite begomoviruses *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) and TGMV, activate the entry to the endocycle in *Arabidopsis thaliana* and in *N. benthamiana*, respectively (Nagar *et al.*, 2002; Ascencio *et al.*, 2008). CaLCuV activates the expression of most of the genes that participate in the entry to the cell cycle in the phase of DNA synthesis and suppresses the expression of most genes associated to M phase or cell division such as CDKB2 in *A. thaliana*



**Figura 5.** EuMV-YP induce la expresión de genes relacionados con la mitosis. RT-PCR de genes *cycA1*, *cycA2*, *cdk2.2* a los 15 y 21 ddi en plantas sanas, con síntomas moderados y severos. El gen *ubi3* permanece sin cambio.

**Figure 5.** EuMV-YP induces the expression of genes related to mitosis. RT-PCR of genes *cycA1*, *cycA2*, *cdk2.2* at 15 and 21 dpi in healthy plants or with moderate and severe symptoms. Gene *ubi3* remains unchanged.

## AGRADECIMIENTOS

A Oscar Moreno y Hernán Villanueva por los hemidímeros y el vector VIGS; a Jorge Ramírez Prado por apoyo con los análisis estadísticos. Al CONACYT por el financiamiento otorgado al proyecto #98920 a LL0 y por la beca de doctorado #46688 a NGT

## LITERATURA CITADA

- Ascencio IJT, Sozzani R, Lee TJ, Chu TM, Wolfinger RD, Cella R and Hanley BL. 2008. Global analysis of arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiology* 148:436-454. DOI: 10.1104/pp.108.121038
- Breyne P, Dreesen R, Vandepoele K, De Veylder L, Van Breusegem F, Callewaert L, and Zabeau M. 2002. Transcriptome analysis during cell division in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:14825-14830. <https://doi.org/10.1073/pnas.222561199>
- Caracuel Z, Lozano DR, Huguet S, Arroyo MM, Rodríguez NEA and Bejarano ER. 2012. C2 from beet curly top virus promotes a cell environment suitable for efficient replication of geminiviruses, providing a novel mechanism of viral synergism. *New Phytologist* 194:846-858. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2012.04080.x
- Gregorio JJ, Bernal AA, Bañuelos HB, Alpuche SAG, Hernández ZC, Moreno VO, Frías TG, Argüello AG. 2010. Analysis of a new strain of *Euphorbia mosaic virus* with distinct replicationspecificity unveils a lineage of begomoviruses with short Rep sequences in the DNA-B intergenic region. *Virology Journal* 7:275. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-275>
- Hanley BL, Bejarano ER, Robertson D and Mansoor S. 2013. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews Microbiology* 11:777-788. DOI: 10.1038/nrmicro3117
- Hernández ZC, Idris AM, Carnevali G, Brown JK and Moreno VO. 2007. Molecular characterization and experimental host range of *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan Peninsula, a begomovirus species in the *Squash leaf curl virus* clade. *Plant Pathology* 56:763-770. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2007.01652.x
- Kotakis C, Vrettos N, Kotsis D, Tsagris M, Kotzabasis K y Kallantidis K. 2010. Light intensity affects RNA silencing of a transgene in *Nicotiana benthamiana* plants. *BMC Plant Biology* 10:220. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-220>
- Latham JR, Saunders K, Pinner MS and Stanley J. 1997. Induction of plant cell division by beet curly top virus gene C4. *The Plant Journal* 11:1273-1283. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1997.11061273.x
- Lukhovitskaya NI, Solovieva AD, Boddeti SK, Thaduri S, Solov'yev AG and Savenkov EI. 2013. An RNA virus-

(Ascencio *et al.*, 2008), which explains CaLCuV inducing endoreduplication and not cell division. EuMV-Jal and EuMV-YP isolates, which produce similar symptoms in several experimental hosts and are incompatible in replication, have acquired unique sequences in their intergenic regions that set them apart from phylogenetically related viruses (Gregorio *et al.*, 2010). EuMV-YP may have lost the sequences needed to block the G2/M checkpoint or it may have acquired gene determinants to induce a complete mitotic cycle, whether by mutation or the incorporation of genomic sequences from other viruses. This is yet to be determined. In conclusion, EuMV-YP is capable of producing severe symptoms in *N. benthamiana* and of reaching the mesophyll, where it induces mitosis and changes in cell morphology, as well as the expression of genes related to cell division.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To Oscar Moreno and Hernán Villanueva for the hemidimers and the VIGS vector; to Jorge Ramírez Prado for his support with the statistical analyses. To CONACYT for the funds given to project #98920 to LL0 and for the PhD scholarship #46688 to NGT.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- encoded zinc-finger protein acts as a plant transcription factor and induces a regulator of cell size and proliferation in two tobacco species. *The Plant Cell* 25:960-973. DOI: 10.1105/tpc.112.106476
- Morra MR and Petty IT. 2000. Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *The Plant Cell* 12: 2259-2270. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2259>
- Moo LRC, González AK, Rodríguez LC, Suarez V, Castaño E. 2012. Expression of RNA polymerase IV and V in *Oryza sativa*. *Electronic Journal of Biotechnology* 15:9-9. DOI: 10.2225/vol15-issue2-fulltext-8
- Nagar S, Hanley BL and Robertson D. 2002. Host DNA replication is induced by geminivirus infection of differentiated plant cells. *The Plant Cell* 14:2995-3007. <http://doi.org/10.1105/tpc.005777>

- Park J, Hwang H, Shim H, Im K, Auh CK, Lee S and Davis KR. 2004. Altered cell shapes, hyperplasia, and secondary growth in *Arabidopsis* caused by beet curly top geminivirus infection. *Molecules and Cells* 17:117-124. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15055537>
- Shen J, Chen X, Chen J and Sun L. 2016. A phloem-limited fijivirus induces the formation of neoplastic phloem tissues that house virus multiplication in the host plant. *Scientific Reports* 6:29848. <http://doi.org/10.1038/srep29848>
- Srivastava A, Agrawal L, Raj R, Jaidi M, Raj SK, Gupta S, Dixit R, Singh PC, Tripathi T, Sidhu OP, Singh BN, Shukla S, Chauhan PS and Kumar S. 2017. Ageratum enation virus Infection Induces Programmed Cell Death and Alters Metabolite Biosynthesis in *Papaver somniferum*. *Frontiers in Plant Science* 8:1172. DOI: 10.3389/fpls.2017.01172
- Villanueva AH, Us CR, López 0L, Robertson D, Guerra PO, Minero GY and Moreno VO. 2013. A new virus-induced gene silencing vector based on Euphorbia mosaic virus-Yucatan peninsula for NPR1 silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Capsicum annuum* var. Anaheim. *Biotechnology Letters* 35:811-823. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1146-1>
- Wege C, Saunders, K, Stanley J and Jeske H. 2001. Comparative analysis of tissue tropism of bipartite geminiviruses. *Journal of Phytopathology* 149:359-368. DOI: 10.1046/j.1439-0434.2001.00640.x
- Xie L, Lv MF, Zhang HM, Yang J, Li JM, Chen JP. 2014. Tumours induced by a plant virus are derived from vascular tissue and have multiple intercellular gateways that facilitate virus movement. *Journal of Experimental Botany* 65:4873-4886. DOI: 10.1093/jxb/eru254