

TRAMPAS GÉNICAS COMO HERRAMIENTA PARA IDENTIFICAR GENES EN PLANTAS QUE RESPONDEN A LA INFECCIÓN POR VIRUS

GENE TRAPS AS A TOOL FOR IDENTIFICATION OF PLANT GENES INVOLVED IN VIRAL INFECTION RESPONSE

Diana L. Trejo-Saavedra¹, Edgar A. Rodríguez-Negrete¹, Jean P. Vielle-Calzada²,
Rafael F. Rivera-Bustamante^{1*}

¹Departamento de Ingeniería Genética. ²Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), Unidad Irapuato. 36821. Km. 9.6 Libramiento Norte, Irapuato, Guanajuato, México. (rrivera@ira.cinvestav.mx).

RESUMEN

Los elementos transponibles se usan como herramienta de mutagénesis insercional en plantas, por ejemplo, el sistema de transposones de maíz *Ac* (*Activator*) y *Ds* (*Dissociation*). Estos elementos se modificaron para facilitar la transposición en *Arabidopsis thaliana* con lo cual es posible el etiquetamiento y la clonación de genes. Esta herramienta se usa principalmente en la biología del desarrollo de plantas, generando marcadores específicos de tejidos y células, y su potencial se amplía en estudios de estrés biótico, como la infección por fitopatógenos como los geminivirus. El objetivo de este estudio fue usar trampas génicas como metodología para identificar genes que responden a la infección del virus de la hoja enrollada de la col (*Cabbage leaf curl virus*, CaLCuV) en plantas de *A. thaliana*. Para realizar el estudio se usaron 273 líneas transposantes Mexican Gene Trap (MGT) y 233 Mexican Enhacer Trap (MET). Las plántulas se bombardearon con el clon infeccioso de CaLCuV, y después fueron teñidas histoquímicamente para la detección de la expresión del gen reportero *uidA* (GUS) a 1, 3, 5 y 7 d después de la infección. Uno de los genes identificados fue *PGM* que codifica para una fosfoglicerato/bifosfoglicerato mutasa y tiene una respuesta temprana y específica de tejido en la infección de *A. thaliana* con CaLCuV. Para evaluar la función del gen *PGM* durante la infección, se generó una línea sobreexpresante. Los resultados sugieren que la sobreexpresión de *PGM* favorece la velocidad de aparición de síntomas; sin embargo el porcentaje de infección es muy bajo. El empleo de trampas génicas permite un escrutinio masivo, tejido-específico y en tiempo

ABSTRACT

Transposable elements are used as insertional mutagenesis tools in plants, for example, the transposons of maize *Ac* (*Activator*) and *Ds* (*Dissociation*). These elements were modified to facilitate transposition in *Arabidopsis thaliana* with which gene tagging and cloning became possible. This tool is used mainly in biology of plant development, generating specific markers for tissues and cells. Its potential is broadening in studies of biotic stress caused by infection with phytopathogens such as geminivirus. The objective of this study was to use gene traps as a method to identify genes that respond to the infection of the geminivirus *Cabbage leaf curl virus*, CaLCuV, in *A. thaliana* plants. To carry out the study, 273 Mexican Gene Trap (MGT) and 233 Mexican Enhacer Trap (MET) transposant lines were used. Seedlings were bombarded with an infectious CaLCuV clone and then stained histochemically to detect expression of the reporter gene *Uida* (GUS) 1, 3, 5 and 7 d post infection (dpi). One of the genes identified was *PGM*, which codes for phosphoglycerate/biphosphoglycerate mutase and has an early tissue-specific response to the infection of *A. thaliana* by CaLCuV. To evaluate the function of the *PGM* gene during infection, an over-expressing line was generated. The results suggest that over-expression of *PGM* favors the rate of symptom appearance. However, the percentage of infection is very low. The use of gene traps enables massive, tissue-specific screening in real time during the infection, making it an alternative for initial identification of host genes involved in the response to geminivirus infection.

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: octubre, 2014. Aprobado: abril, 2015.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 49: 593-612. 2015.

Key words: Geminivirus, gene traps, plant-virus interaction, *Cabbage leaf curl virus*.

real durante la infección, por lo cual es una alternativa para la identificación inicial de genes del hospedero que responden a la infección por geminivirus.

Palabras clave: Geminivirus, trampas génicas, interacción planta-virus, *Cabbage leaf curl virus*, virus de la hoja enrollada de la col.

INTRODUCCIÓN

Las trampas génicas son una tecnología de mutagénesis insercional basada en el uso de construcciones que se integran al azar en el genoma de un organismo etiquetando genes con elementos reporteros (Bellen, 1999). Sus ventajas con respecto a las técnicas clásicas de mutagénesis son: 1) la identificación de genes se basa en la expresión de un gen reportero, la cual se puede observar en tejidos y células específicas o en diferentes estados de desarrollo; 2) no se necesita un fenotipo mutante para la identificación del gen; 3) permite la identificación de genes que tienen funciones redundantes; 4) si la trampa génica interrumpe un gen, el patrón de expresión y el fenotipo observado (si lo presenta) podrían sugerir la función de dicho gen.

Los elementos transponibles se emplean para inducir la mutagénesis insercional en plantas, por ejemplo, el sistema de transposones de maíz *Ac* (*Activator*) y *Ds* (*Dissociation*) (Fedoroff y Smith, 1993; Lawson *et al.*, 1994; Altmann *et al.*, 1995; Klimyuk *et al.*, 1995; Sundaresan *et al.*, 1995). Estos elementos se modificaron para que puedan hacerse transponer a frecuencias suficientemente altas en *Arabidopsis thaliana* como para permitir el etiquetamiento y la clonación de genes (Dean *et al.*, 1992; Long *et al.*, 1993; Aarts *et al.*, 1993; Lawson *et al.*, 1994). Los elementos *enhancer trap* (ET) y *gene trap* (GT) se caracterizaron como sistema de mutagénesis. El sistema ET tiene un gen reportero fusionado a un promotor mínimo derivado del promotor 35S del Virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) cuya expresión no se detecta por sí sola. Cuando el elemento se inserta en la proximidad de un gen, es posible que el gen reportero se exprese debido a la interacción del promotor mínimo con los potenciadores vecinos cercanos (Figura 1A) (Sundaresan *et al.*, 1995). En el elemento *gene trap* (GT), el gen reportero no tiene promotor, por ello su transcripción depende del promotor del gen cromosomal en el sitio de inserción. Río arriba

INTRODUCTION

Gene traps are an insertional mutagenesis technology based on the use of constructs that randomly integrate gene-tagging and reporter elements in the genome of an organism (Bellen, 1999). Their advantages over classical mutagenesis techniques are the following: 1) gene identification is based on the expression of a reporter gene, which can be observed in specific tissues and cells or at different stages of development; 2) a mutant phenotype is not necessary for identification of the gene; 3) the technique enables identification of genes that have redundant functions; 4) if the gene trap disrupts a gene, the pattern of expression and the phenotype observed (if present) could suggest the function of that gene.

Transposable elements are used to induce insertional mutagenesis in plants, for example, the systems of maize transposons *Ac* (*Activator*) and *Ds* (*Dissociation*) (Fedoroff and Smith, 1993; Lawson *et al.*, 1994; Altmann *et al.*, 1995; Klimyuk *et al.*, 1995; Sundaresan *et al.*, 1995). These elements were modified so that they can transpose themselves in *Arabidopsis thaliana* at high frequencies to permit tagging and cloning of genes (Dean *et al.*, 1992; Long *et al.*, 1993; Aarts *et al.*, 1993; Lawson *et al.*, 1994). The elements *enhancer trap* (ET) and *gene trap* (GT) were characterized as mutagenetic systems. The ET system has a reporter gene fused to a minimal promoter derived from the 35S promoter from *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) whose expression is not detected by itself. When the element is inserted near a gene, expression of the reporter gene is possible as the result of the interaction between the minimal promoter and the closely neighboring enhancers (Figure 1A) (Sundaresan *et al.*, 1995). In the *gene trap* (GT) element, the reporter gene does not have a promoter, and therefore, its transcription depends on the promoter of the chromosomal gene at the insertion site. Upstream from the start codon of the reporter, intronic sequences (splicing acceptors) have been fused to facilitate the production of fusion proteins by integration of the reporter gene into an intron of the plant gene; in this way processing acceptors exist in each of the gene reading frames (Figure 1B). In this type of element, the reading frame of the reporter gene would have to be oriented in the same direction as the reading frame of the gene

del codón de inicio del reportero se fusionaron secuencias intrónicas (aceptores de *splicing*) para facilitar la producción de proteínas de fusión mediante la integración del gen reportero en un intrón del gen vegetal, de forma tal que existan aceptores de procesamiento en cada uno de los marcos de lectura génica (Figura 1B). En este tipo de elementos el marco de lectura del gen reportero tendrá que estar en la misma orientación que el marco de lectura del gen en el cual ocurrió el evento de inserción (Sundaresan *et al.*, 1995).

in which the insertion event occurred (Sundaresan *et al.*, 1995).

The gene trap method is not considered exhaustive since generating a collection that includes all the genes of an organism would be a very long and costly process. Moreover, tagging of some genes may cause a deleterious or lethal mutation and prevent recovery of the progeny of that line. However, in some studies, this method has probability of detecting genes that are not detected by other methods. For example, gene traps were used as an important tool in the study of

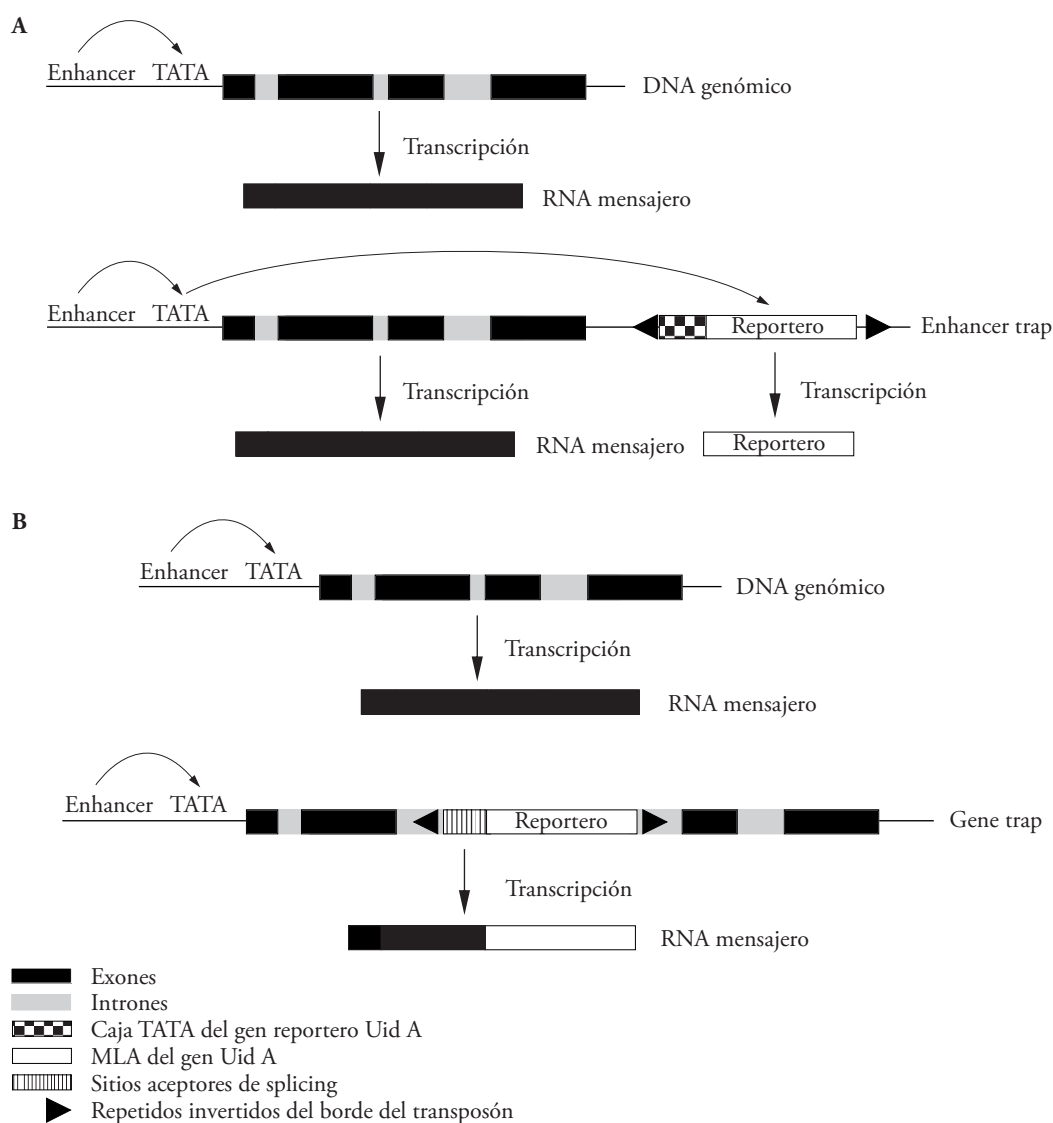


Figura 1. A, diagrama que muestra la estructura y expresión del elemento *enhancer trap* (ET). B, diagrama que muestra la estructura y expresión del elemento *gene trap* (GT).

Figure 1. A, diagram that shows the structure and expression of the element *enhancer trap* (ET). B, diagram that shows the structure and expression of the element *gene trap* (GT).

La metodología de las trampas génicas no se considera exhaustiva ya que generar una colección que incluya todos los genes de un organismo sería un proceso muy tardado y costoso. Además, es posible que el etiquetado de algunos genes genere una mutación deletérea o letal y no se pueda recuperar progenie de tal línea. Sin embargo, en algunos estudios, esta metodología tiene probabilidades de detectar genes que pasan desapercibidos con otros métodos; por ejemplo, las trampas génicas se usaron como herramienta importante en la biología del desarrollo de plantas (Campisi *et al.*, 1999; He *et al.*, 2001; Acosta-García y Vielle-Calzada, 2004). Su contribución fue importante en la generación de marcadores específicos de tejidos y células. Hasta ahora hay poca investigación con esta herramienta acerca de los genes que responden a patógenos y menos aún a geminivirus.

Los geminivirus son una familia de patógenos de plantas que causan grandes pérdidas en cultivos importantes en México (Méndez-Lozano *et al.*, 2001; Morales y Anderson, 2001; Méndez-Lozano *et al.*, 2003; Rentería-Canett *et al.*, 2011). Los geminivirus, aunque no codifican para una ADN polimerasa (Stenger *et al.*, 1991), pueden infectar y replicarse en el tejido diferenciado, donde la maquinaria de replicación ya no está activa. Estos virus dependen de los factores celulares para iniciar su ciclo infectivo y la expresión de algunos de los genes del hospedero se altera de manera temporal o espacial (Nagar *et al.*, 1995; Lucy *et al.*, 1996; Bass *et al.*, 2000; Fondong, 2013).

El objetivo de este estudio fue usar trampas génicas como herramienta para identificar genes que responden a la infección del geminivirus de la hoja enrollada de la col (*Cabbage leaf curl virus*, CaLCuV) en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Con esta metodología identificamos algunos genes con respuesta específica a virus. Uno de ellos fue el gen *PGM* que codifica para una fosfoglicerato/bifosfoglicerato mutasa y manifiesta una respuesta temprana y específica de tejido en la infección con el virus CaLCuV en *A. thaliana*. Para identificar más genes con respuesta específica a geminivirus es necesario continuar con el escrutinio exhaustivo de las líneas MET y MGT.

plant development biology (Campisi *et al.*, 1999; He *et al.*, 2001; Acosta-García and Vielle-Calzada, 2004). Its contribution was important in generating tissue- and cell-specific markers. Until now, little research has been done with this tool on genes that respond to pathogens and even less on those that respond to geminivirus.

Geminiviruses are a family of plant pathogens that cause major losses in crops that are important in Mexico (Méndez-Lozano *et al.*, 2001; Morales and Anderson, 2001; Méndez-Lozano *et al.*, 2003; Rentería-Canett *et al.*, 2011). Geminiviruses, although they do not encode for a DNA polymerase (Stenger *et al.*, 1991), can infect and replicate in differentiated tissue where the replication machinery is no longer active. These viruses depend on cellular factors and the expression of some of the host genes is altered temporally or spatially (Nagar *et al.*, 1995; Lucy *et al.*, 1996; Bass *et al.*, 2000; Fondong, 2013).

The objective of this study was to use gene traps as a tool to identify genes in *Arabidopsis thaliana* plants that respond to infection by the geminivirus *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV). With this method, we identified some genes with specific response to geminivirus. One of them was the *PGM* gene that encodes for a phosphoglycerate/biphosphoglycerate mutase and shows an early tissue-specific response to infection by the CaLCuV virus in *A. thaliana*. To identify more genes with a geminivirus-specific response, it is necessary to continue exhaustive scrutiny of the MET and MGT lines.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and growth conditions

For this study, transposant lines of *A. thaliana* generated in the Laboratory of Reproductive Development and Apomixis, at Cinvestav Irapuato (Dr. Vielle-Calzada) were used. For the generation of these lines, two types of gene traps were used. The first type is called "Mexican enhancer trap" (MET), and the expression of the reporter gene of β -glucuronidase, *UidA*, is driven by the minimal promoter 35S of the virus CaMV. The second type was denominated "Mexican gene trap" (MGT); the reporter gene *UidA* does not have a promoter and its expression can be observed as blue coloring

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Para este estudio se usaron líneas transposantes de *A. thaliana* generadas en el Laboratorio de Desarrollo Reproductivo y Apomixis del Cinvestav Irapuato (Dr. Vielle-Calzada) y para la generación de estas líneas se usaron dos tipos de trampas génicas. El primer tipo se denomina “Mexican enhancer trap” (MET) y la expresión del gen reportero de la β -glucuronidasa, *Uida*, se dirige por el promotor mínimo 35S del virus CaMV. El segundo tipo se denomina “Mexican gene trap” (MGT), el gen reportero *Uida* no tiene promotor y su expresión puede observarse como una coloración azul mediante tinción histoquímica para la β -glucuronidasa (GUS) (Ranjan *et al.*, 2012). Ambos tipos de trampas génicas cuentan además con el gen de selección que confiere resistencia a la kanamicina (Km^R). Las semillas transposantes germinaron en medio Murashige y Skoog (MS) más $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de kanamicina (Km). Las semillas se estratificaron por 3 d a 4°C y se incubaron en una cámara de crecimiento (Percival Perry, Iowa) a 22°C con un fotoperiodo de 8 h luz y 16 h oscuridad por dos semanas. Las plántulas resistentes a Km se trasplantaron a un sustrato de Mix3-Sunshine (SunGro, Bellevue, WA, EUA), vermiculita y perlita (3:1:1 v/v/v) conteniendo 1.84 kg m^{-3} de fertilizante Osmocote 14-14-14 (N-P-K) y se incubaron en las mismas condiciones mencionadas.

Para seleccionar las plantas transformantes con las construcciones de sobreexpresión las semillas T0 se sembraron en el sustrato mencionado, se estratificaron 3 d a 4°C e incubaron en una cámara en las condiciones mencionadas. Las plántulas en un estadio de 4 hojas verdaderas se asperjaron con una solución del herbicida BASTA (AgrRvo, Montvale, NJ, EUA) en una concentración 0.05 % (v/v); el compuesto activo del herbicida es el glufosinato de amonio. Las plántulas transgénicas seleccionadas con el tratamiento con herbicida se trasplantaron a suelo nuevo para obtener las semillas T1, las cuales se seleccionaron en medio MS conteniendo glufosinato de amonio 10 mg mL^{-1} y se trasplantaron al sustrato bajo las mismas condiciones anteriores. Como testigo se usaron semillas silvestres (wt) de *A. thaliana* germinadas en medio MS sin glufosinato de amonio.

Germinación de semillas en medio MS

Las semillas de *Arabidopsis* transgénicas se desinfectaron 2 min con una solución de etanol 70 %, después con una solución de cloro al 10 % por 10 min, se enjuagaron con

throughout histochemical staining for β -glucuronidase (GUS) (Ranjan *et al.*, 2012). Both types of gene traps also have the selection gene that confers resistance to kanamycin (Km^R). Transposant seeds were germinated in Murashige and Skoog (MS) medium plus $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ kanamycin (Km). Seeds were stratified for 3 d at 4°C then incubated in a growth chamber (Percival Perry, Iowa) at 22°C with a photoperiod of 8 h light and 16 h darkness for two weeks. The seedlings resistant to Km were transplanted to a substrate composed of Mix3-Sunshine (SunGro, Bellevue, WA, USA), vermiculite and perlite (3:1:1, v/v/v), containing 1.84 kg m^{-3} Osmocote 14-14-14 (N-P-K) fertilizer, and incubated under same conditions as stated above.

To select the transformed plants with the over-expression constructs, T0 seeds were planted in the described substrate, stratified 3 d at 4°C and incubated in the chamber with the conditions mentioned above. The seedlings at the four-true-leaf stage were sprayed with a solution of the herbicide BASTA (AgrRvo, Montvale, NJ, USA) at a concentration of 0.05 % (v/v); the active compound of this herbicide is ammonium glufosinate. The transgenic seedlings selected with the herbicide treatment were transplanted to new soil to obtain T1 seeds, which were selected in MS medium containing 10 mg mL^{-1} ammonium glufosinate and transplanted to the substrate under the same conditions as before. Wild type (wt) *A. thaliana* seeds germinated in MS medium without ammonium glufosinate were used as the control.

Seed germination in MS medium

The transgenic *Arabidopsis* seeds were disinfected with a 70 % ethanol solution for 2 min, then in a 10 % chlorine solution for 10 min. They were rinsed with sterile water and placed in MS medium containing 50 mg mL^{-1} Kanamycin. The seeds were stratified for 4 d at 4°C and placed in a growth chamber at 22°C with a photoperiod of 16 h light/8 h darkness to measure germination.

Biolistic inoculation of *A. thaliana* plants

For the biolistic tests, the protocol of Carrillo-Tripp *et al.* (2007) was used. The *A. thaliana* plants in the stage of eight true leaves were inoculated with a manual low-pressure gun designed and constructed in Cinvestav Irapuato and described by Carrillo-Tripp *et al.* (2007). Plants were bombarded with gold particles (0.5 microns, BioRad) coated with both components of the virus genome. The viral DNA (cloned in the pBluescript plasmid) for bombardment was prepared by mixing 0.2 mg of each viral component to inoculate six plants (six shots).

agua estéril y se colocaron en medio MS con 50 mg mL⁻¹ de Kanamicina. Las semillas se estratificaron 4 d a 4 °C y se colocaron en una cámara de crecimiento a 22 °C con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad para medir la germinación.

Inoculación por biobalística de plantas de *A. thaliana*

Para las pruebas de biobalística se usó el protocolo de Carrillo-Tripp *et al.* (2007). Plantas de *A. thaliana* en estadio de ocho hojas verdaderas se inocularon con una pistola manual de baja presión diseñada y construida en el Cinvestav Irapuato y descrita por Carrillo-Tripp *et al.* (2007). El bombardeo se hizo con partículas de oro (0.5 micrones, BioRad) cubiertas con ambos componentes del genoma viral. El ADN viral (clonado en el plásmido pBluescript) para el bombardeo se preparó mezclando 0.2 mg de cada componente viral para inocular seis plantas (seis disparos). Con un filtro acoplado a la pistola, el disparo se dirigió hacia toda la roseta, a una distancia de 2 cm y a una presión de 50 psi. Para los disparos en hojas individuales se usó la pistola de punta para dirigir el disparo a hojas específicas (Carrillo-Tripp *et al.*, 2007). Las construcciones hemidiméricas de los componentes virales las donó la Dra. Dominique Robertson de la Universidad Estatal de Carolina del Norte (NCSU). La construcción del componente A (pCPCbLCVA.007) contiene una delección en el gen de la CP y tiene repetida la secuencia de la región intergénica (RI) y una parte del gen *Rep*. La construcción del componente B (pCPCbLCVB.002) tiene repetida su RI correspondiente y el marco de lectura completo del gen *MP* (Movement protein). Para seleccionar líneas con expresión del gen reportero GUS en respuesta al virus se bombardearon 10 plántulas por línea. Para el análisis de expresión del gen *PGM* se inocularon 10 plantas para cada tiempo (1, 3, 5 y 7 dpi).

Aislamiento de ADN y análisis de TAIL-PCR

Para identificar los genes etiquetados por las trampas génicas se usó la técnica de TAIL-PCR (Liu *et al.*, 1995). Para obtener el ADN total las rosetas completas de cinco plantas se congelaron y se trituraron con nitrógeno líquido. El ADN se obtuvo con el método CTAB (Murray y Thompson, 1980). Para cada análisis se usaron 5 ng de ADN por cada muestra. Los productos de PCR seleccionados se clonaron en el vector pGEM-Teasy (Promega) o en el vector pCRII-TOPO (Invitrogen), se secuenciaron y compararon contra el genoma de *Arabidopsis*.

With a filter coupled to the gun, shooting was directed toward the entire rosette at a distance of about 2 cm at 50 psi pressure. For the shots on individual leaves, the pointed gun was used to direct the shot to specific leaves (Carrillo-Tripp *et al.*, 2007). Dr. Dominique Robertson of North Carolina State University (NCSU) donated the hemidimeric constructs of the viral components. The construct of component A (pCPCbLCVA.007) contains a deletion in the CP gene, and the sequence of the intergenic region (IR) and part of the *Rep* gene are repeated. The construct of component B (pCPCbLCVB.002) has its corresponding IR and the complete reading frame of the *MP* (Movement protein) gene repeated. To select the lines with the GUS reporter gene expression in response to the virus, 10 seedlings per line were bombarded. For the analysis of the expression of the *PGM* gene, 10 plants for each period (1, 3, 5 and 7 days post inoculation, dpi) were used.

Isolation of DNA and TAIL-PCR analysis

To identify the genes tagged by the gene traps, the TAIL-PCR technique (Liu *et al.*, 1995) was used. To obtain total DNA, intact rosettes of five plants were frozen and ground with liquid nitrogen. DNA was obtained with the CTAB method (Murray and Thompson, 1980). For each analysis, 5 ng of DNA were used per sample. The selected PCR products were cloned in the vector pGEM-Teasy (Promega) or in the vector pCRII-TOPO (Invitrogen), sequenced and compared against the *Arabidopsis* genome.

CaMV35S::Rep, CaMV35S::TrAP and CaMV35S::REn Constructs

To generate the constructs of over-expressing virus genes *Rep* (CaMV35S::Rep), *TrAP* (CaMV35S::TrAP) and *REn* (CaMV35S::REn), the respective open reading frames (ORF) were amplified by PCR from component A of cloned CaLCuV in the vector pBluescript. The amplified fragments were cloned initially in vector pCRII-TOPO (Invitrogen) following the specifications of the manufacturer and later subcloned separately in a vector containing the CaMV 35S promoter (courtesy of Rosa María Rangel-Cano, Cinvestav Irapuato). The sequences of the primers used for the amplifications are the following: Rep (1075 pb), sense 5'-ATTATTTACAAAAATGCCACGG-3', antisense 5'-CAGCTCTCCTTTTAGCAATC-3'; TrAP (410 pb), sense 5'-ACTACCAAAAAATGCAAAATT-3', antisense 5'-GGCATTGTAATCTACTTAA-3'; REn (417 pb), sense 5'-TTGAGCTACTAATGGATTTC-3', antisense 5'-CGATTTCGATAACAAATTAATAA-3'.

Construcciones CaMV35S::Rep, CaMV35S::TrAP y CaMV35S::REN

Para generar las construcciones de sobreexpresión de los genes virales *Rep* (CaMV35S::Rep), *TrAP* (CaMV35S::TrAP) y *REN* (CaMV35S::REN), los respectivos marcos de lectura abierta (MLA) se amplificaron por PCR a partir del componente A de CaLCuV clonado en el vector pBluescript. Los fragmentos amplificados se clonaron inicialmente en el vector pCRII-TOPO (Invitrogen) según las especificaciones del fabricante y después se subclonaron por separado en un vector conteniendo el promotor 35S CaMV (cortesía de QBP Rosa María Rangel Cano, Cinvestav Irapuato). Las secuencias de los iniciadores usados para las amplificaciones son las siguientes: *Rep* (1075 pb), sentido 5'-ATTATTTACAAAAATGCCACGG-3', antisentido 5'-CAGCTCTCCTTTTAGCAATC-3'; *TrAP* (410 pb), sentido 5'-ACTACCAAAAAATGCAAAATT-3', antisentido 5'-GGCATTGAATCTACTTAA-3'; *REN* (417 pb), sentido 5'-TTGAGCTACTAATGGATTTC-3', antisentido 5'-CGATTCGATAACAAATTAATAA-3'.

Construcciones CaMV35S-PGM

Para generar la construcción de sobreexpresión del gen fosfoglicerato mutasa (PGM) (CaMV35S-PGM), el marco de lectura del gen se amplificó por RT-PCR. Para sintetizar la primera cadena de cADN se usó 1 µg de ARN total proveniente de rosetas de plantas silvestres y la enzima transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen). Para la reacción de PCR se usó 1 µL de la síntesis de la primera cadena de cADN. El producto de PCR se clonó en el vector pCRII-TOPO (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los iniciadores fueron: PGM-sentido 5'-CGTCTAGAGGCGCGCCATGGATTGCAAGATTCTTG-3' al cual se adicionaron los sitios de restricción *XbaI* y *AscI*; PGM-antisentido 5'-CGGGATC-CATTTAAATTCAATTCTCCGTAG ATGA-3' con los sitios *BamHI-SwaI*. El fragmento amplificado tiene un tamaño de 694 pb.

El fragmento conteniendo el MLA de *PGM* se digirió con *AscI-XbaI* y subclonó en el vector pFGC5941 (Kerschen *et al.*, 2004) (GeneBank No. AY310901) (http://www.chromdb.org/order_vectors.html) río abajo del promotor 35S del virus CaMV, reemplazando el intrón de la *Chalcona sintasa-A* (*ChsA*).

Construcciones Promotor::uidA

Para generar las construcciones de *promotor::uidA*, la secuencia promotora del gen *PGM* (AT1G09935) se amplificó con la técnica de PCR. Para la amplificación se usaron

CaMV35S-PGM Constructs

To generate the over-expression construct of the phosphoglycerate mutase gene (PGM) (CaMV35S-PGM), the reading frame of the gene was amplified by RT-PCR. For synthesis of the first cDNA strand, 1 µg of total RNA from the rosettes of wild type (wt) plants and the enzyme reverse transcriptase Superscript II (Invitrogen) were used. For the PCR reaction, 1 µL of the synthesis of the first cDNA strand was used. The PCR product was cloned in the vector pCRII-TOPO (Invitrogen) following the instructions of the manufacturer. The primers were PGM-sense 5'-CGTCTAGAGGCGCGCCATGGATTGCAAGATTCTTG-3', to which the restriction sites *XbaI* and *AscI* were added, and PGM-antisense 5'-CGGGATC-CATTTAAATTCAATTCTCCGTAG ATGA-3', with the *BamHI-SwaI* sites. The amplified fragment has a size of 694 pb.

The fragment containing the open reading frame of *PGM* was digested with *AscI-XbaI* and subcloned in the vector pFGC5941 (Kerschen *et al.*, 2004) (GeneBank No. AY310901) (http://www.chromdb.org/order_vectors.html) downstream from the promoter 35S of the CaMV virus, replacing the intron of the *Chalcone synthase-A* (*ChsA*).

Promoter::Uida constructs

To generate the *promoter::Uida* constructs, the promoter sequence of the *PGM* (AT1G09935) gene was amplified with the PCR technique. For this amplification, 0.5 µg total DNA from the rosettes of wt plants were used. The PCR product (1515 pb) was cloned in the vector pCRII-TOPO (Invitrogen) following the instructions of the manufacturer. The sequence was subcloned in the pBI 101.3 vector. The *A. tumefaciens* strain PGV2260 was transformed by electroporation with the generated constructs. The sequence of the primers for amplifying the promoter region is the following: pPGM-sense 5'-AATAAAGCTTTGCGTTTCGAAAC-3' with *HindI* site, pPGM-antisense 5'-CAAGTTCTAGATTTTACAGCTC 3' with *XbaI* site.

Plant transformation

Transformation of *A. thaliana* ecotype plants Columbia (Col-0) was carried out with the *floral dipping* method described by Clough and Bent (1998).

RNA isolation and quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was isolated from tissue collected from 5 intact rosettes, frozen and ground with liquid nitrogen, following the

0.5 μ g de ADN total de rosetas de plantas silvestres. El producto de PCR (1515 pb) se clonó en el vector pCRII-TOPO (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuencia se subclonó en el vector pBI 101.3. La cepa PGV2260 de *A. tumefaciens* se transformó por electroporación con las construcciones generadas. La secuencia de los iniciadores para amplificar la región promotora es la siguiente: pPGM-sentido 5'-AATAAAGCTTTGCGTTCGAAAC-3' con sitio *HindIII*, pPGM-antisentido 5'-CAAGTTCTAGATTTTACAGCTC-3' con sitio *XbaI*.

Transformación de plantas

La transformación de plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) se realizó mediante el método de inmersión floral (*floral-dipping*) descrito por Clough y Bent (1998).

Aislamiento de ARN y análisis RT-PCR cuantitativo

El ARN total se aisló de tejido de 5 rosetas completas congeladas y trituradas con nitrógeno líquido siguiendo el protocolo de Trizol (Invitrogen). Las rosetas se recolectaron a los 1, 3, 5 y 7 d después de la inoculación viral. Para el análisis RT-PCR, 1 μ g de ARN total se trató con la enzima DNase I (Invitrogen) por 20 min, e inactivada con una incubación a 65 °C por 20 min. Para sintetizar la primera cadena de cADN se usó 1 μ g de ARN total de rosetas de plantas silvestres, 10 U de la enzima transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen) y 1 μ L (10 mM) del iniciador (dT₁₈). Para la reacción de PCR cuantitativo se usaron 10 μ L del reactivo Platinum SYBR Green qPCR Super Mix UDG (Invitrogen, 2X), con una concentración final de fluoresceína de 10 nM según las recomendaciones del fabricante. Se usaron 0.5 μ L de cADN (12.5 ng) para reacciones de 20 μ L de volumen final. A la mezcla se agregó 1 μ L de cada iniciador (10 μ M cada uno). Se asumió una máxima eficiencia de amplificación en el umbral elegido durante la fase log de la curva para todas las muestras. Curvas de disociación se hicieron para descartar amplificaciones inespecíficas para cada par de oligos usados en cada experimento. Los datos se normalizaron con los resultados de la amplificación del gen de referencia 16S de la misma muestra. La cuantificación relativa se hizo con la fórmula $T = X2^{CT}$, donde T es el umbral en unidades de fluorescencia, X es el número de copias iniciales y CT es el número de ciclo donde la muestra cruza al umbral (Carrillo-Tripp *et al.*, 2007). Para calcular las unidades relativas se usó la muestra con la más alta concentración como parámetro de estandarización. Para la cuantificación relativa del virus CaLCuV se usó el mismo cADN usado para calcular los mensajeros de *PGM*. Las secuencias de los

protocolo of Trizol (Invitrogen). The rosettes were collected 1, 3, 5 and 7 d after viral inoculation. For the RT-PCR analysis, 1 μ g of total RNA was treated with the enzyme DNase I (Invitrogen) for 20 min and inactivated by incubation at 65 °C for 20 min. For synthesis of the first cDNA strand, 1 μ g of total RNA from rosettes of wt plants, 10 U of reverse transcriptase Superscript II (Invitrogen) enzyme and 1 μ L (10 mM) of the oligo (dT₁₈) were used. For the quantitative PCR reaction, 10 μ L of the reagent Platinum SYBR Green qPCR Super Mix UDG (Invitrogen, 2X) was used with a final fluorescein concentration of 10 nM following the recommendations of the manufacturer. For reactions of 20 μ L final volume, 0.5 μ L cDNA (12.5 ng) were used. To this mixture, 1 μ L of each primer (10 μ M each) was added. Maximum amplification efficiency was assumed at the selected threshold during the log phase of the curve for all samples. Dissociation curves were constructed to discard non-specific amplifications for each pair of primers used in each experiment. The data were normalized with amplification results of the reference gene 16S of the same sample. Relative quantification was performed with the formula $T = X2^{CT}$, where T is the threshold in fluorescence units, X is the number of initial copies and CT is the cycle number where the sample crosses the threshold (Carrillo-Tripp *et al.*, 2007). Relative units were calculated using the sample with the highest concentration as the standardization parameter. To calculate the relative quantity of the virus CaLCuV, we used the same cDNA used for quantifying *PGM* transcripts. The sequences of the primers used are the following: PGM-sense 5'-GTAGCCCTCCCATTGTCAC-3', PGM-antisense 5'-CTGAGAGAAATCGATGGTGG-3'; 16S-sense 5'-TGAGAATGGATAAGAGGCTC-3', 16S-antisense 5'-TGTGTGTTCCCCTCCCAAGGG-3'. TrAPF 5'-ACTACAAAATGCAAAATT-3', Rep-R 5'-CAGCTCTCCTTTTAGCAATC-3'.

Determination of total chlorophyll

To determine chlorophyll, rosette leaves were cut into pieces (0.25 g), placed in tubes with 5 mL of 80 % acetone and incubated 10-12 h at -20 °C. Chlorophyll was measured in a spectrophotometer using 80 % acetone as blank. Optical density readings of all samples were done at 645 nm and 663 nm. To obtain the total amount of chlorophyll, the values were substituted in the equation: Chlorophyll concentration = $(20.2 \times (OD\ 645\ nm)) + (8.02 \times OD\ 663\ nm)$ (Arnon, 1949).

Rosette diameter measurement

To obtain rosette diameter, rosettes of 10 plants from each of five 35S-*PGM* lines were measured with a Vernier calibrator

iniciadores usados son las siguientes: PGM-sentido 5'-GTA-GCCCTCCCATTGTCAC-3', PGM-antisentido 5'-CT-GAGAGAAATCGATGGTGG-3'; 16S-sentido 5'-TGAGA-ATGGATAAGAGGCTC-3', 16S-antisentido 5'-TGTGTG-TTCCCCTCCCAAGGG-3'. TrAPF 5'-ACTACCAAAAT-GCAAATT-3', Rep-R 5'-CAGCTCTCCTTTTAGCA-ATC-3'

Determinación de clorofila total

Para la determinación de clorofila se cortaron pedazos de hojas de roseta (0.25 g), se colocaron en tubos con 5 mL de acetona al 80 % y se incubaron 10-12 h a -20 °C. Las mediciones de clorofila se hicieron en un espectrofotómetro usando como blanco acetona al 80 %. Las lecturas de la densidad óptica de todas las muestras se realizaron a 645 nm y 663 nm. Para obtener la cantidad total de clorofila, los valores se sustituyeron en la ecuación: Concentración de clorofila = $(20.2 \times (OD_{645nm}) + (8.02 \times (OD_{663nm}))$ (Arnon, 1949).

Medición del diámetro de la roseta

Para obtener el diámetro de la roseta, las rosetas de 10 plantas de cinco líneas *35S-PGM* se midieron con un calibrador Vernier 45 d después de la germinación. Cada roseta fue medida dos veces formando un cuadrante X-Y porque la forma de cada roseta no es homogénea. Los datos fueron analizados y graficados en el programa Microsoft® Excel®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de genes de respuesta a la infección por virus

Las trampas génicas se usan para estudiar los patrones de expresión y la identificación de nuevos genes, especialmente aquellos difíciles de identificar en escrutinios de pérdida de función (Fridborg *et al.*, 2004). Además, se usan para identificar genes cuya expresión está asociada al desarrollo del gametofito femenino en plantas de *Arabidopsis*, en procesos de senescencia y germinación y en genes regulados en la falta de oxígeno (Liu *et al.*, 1995; Campisi *et al.*, 1999; He *et al.*, 2001; Baxter-Burrell *et al.*, 2003; Acosta-García y Vielle-Calzada, 2004). Sin embargo, esta herramienta se usa poco para identificar genes que respondan a infecciones de patógenos, específicamente a geminivirus.

45 days after germination. Because rosette shape is not homogeneous, an X-Y quadrant was formed, and each rosette was measured twice. The data were analyzed and plotted in Microsoft™ Excel®.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of genes responsive to the virus infection

Gene traps are used to study expression patterns and to identify new genes, especially those that are difficult to identify in lost function screenings (Fridborg *et al.*, 2004). Besides, they are used to identify genes whose expression is associated with the development of the female gametophyte in *Arabidopsis* plants, in processes of senescence and germination and in genes regulated by lack of oxygen (Liu *et al.*, 1995; Campisi *et al.*, 1999; He *et al.*, 2001; Baxter-Burrell *et al.*, 2003; Acosta-García and Vielle-Calzada, 2004). However, this tool is not often used to identify genes that respond to infection by pathogens, specifically geminivirus.

To identify genes that respond to infection by the geminivirus CaLCuV, a screening was carried out on collections of transposing lines of *A. thaliana* of both types: ET (*enhancer trap*) and GT (*gene trap*). In this screening, the lines of interest were those that exhibited activity of the reporter gene only and exclusively in the plants inoculated with the viral DNA.

The analyzed lines were 506: 273 of the MGT type and 233 of the MET type. Of these lines, 60 % had no detectable activity of the reporter gene after viral inoculation. This result suggests that the gene traps in these lines were not integrated in regulator elements of any open reading frame (ORF), or otherwise, they were integrated in elements that do not respond to viral infection.

A third of the lines (168) exhibited reporter gene activity in both inoculated tissue and in the non-inoculated controls, suggesting that the gene trap tagged regulator elements or ORF with a constitutive expression that is not altered by the presence of the virus. Another 4.3 % of the evaluated lines (22) showed reporter gene activity as the result of the inoculation method (biolistic); that is, they responded to the mechanical damage caused by bombardment with particles with and without viral

Para identificar genes que responden a la infección del geminivirus CaLCuV, se realizó un escrutinio en colecciones de líneas transposantes de *A. thaliana* de ambos tipos: ET (*enhancer trap*) y GT (*gene trap*). En este escrutinio, las líneas de interés fueron aquellas que mostraron actividad del gen reportero única y exclusivamente en las plantas inoculadas con el ADN viral.

Las líneas analizadas fueron 506: 273 del tipo MGT y 233 del tipo MET. El 60 % de esas líneas (306) no mostró actividad detectable del gen reportero después de la inoculación viral. Este resultado sugiere que las trampas génicas en esas líneas no estaban integradas en elementos reguladores de algún marco de lectura abierto (MLA) o bien, estaban integradas en elementos que no responden a la infección viral.

Un tercio de las líneas (168) mostró actividad del reportero tanto en tejido inoculado con el virus como en los controles sin inocular, sugiriendo que la trampa génica etiquetó elementos reguladores o MLAs con una expresión constitutiva que no es alterada por la presencia viral. El 4.3 % de las líneas evaluadas (22) mostró actividad del gen reportero como resultado del método de inoculación (balística), es decir, respondieron de manera similar al daño mecánico ocasionado por el bombardeo con partículas con y sin ADN viral. Finalmente, el 2.3 % de las líneas evaluadas (11) mostró una actividad del gen reportero en respuesta a la inoculación viral, indicando que la trampa génica etiquetó elementos que respondieron a la infección por el virus.

De las 11 líneas con respuesta específica al virus CaLCuV se identificaron 8 genes, ninguno de los cuales está relacionado con patogénesis usando otras herramientas como microarreglos o análisis cADN-AFLP (Cooper, 2001; Golem y Culver, 2003; Whitham *et al.*, 2003; Ascencio-Ibañez *et al.*, 2008). La comparación de las secuencias de los 8 genes mostró gran diversidad en la naturaleza de los genes etiquetados por las trampas génicas. Se encontró una proteína similar a aquellas en el complejo de transcripción CCR4, dos proteínas hipotéticas, dos con repetidos ricos en leucina, una proteína similar a receptores de membrana, un pseudogen, y una desaturasa de ácidos grasos (Cuadro 1). La función en la infección viral de dos de los genes identificados en el cuadro 1 fue estudiada y se presentan los datos del gen *PGM*. Trejo-Saavedra *et al.* (2009) presentó la información relacionada con el gen *CRL* (*Crumpled*

DNA in a similar way. Finally, 2.3 % of the lines evaluated (11) showed activity of the reporter gene in response to the viral inoculation, indicating that the gene trap tagged elements that responded to the viral infection.

Of the 11 lines with specific response to the CaLCuV virus, eight genes were identified, none of which is related to the pathogenesis using other tools such as microarrays or cDNA-AFLP (Cooper, 2001; Golem and Culver, 2003; Whitham *et al.*, 2003; Ascencio-Ibañez *et al.*, 2008). Comparison of the sequences of the eight genes revealed broad diversity in the nature of the genes tagged by gene traps. We found a protein similar to those in the CCR4 transcription complex, two hypothetical proteins, two with repeats rich in leucine, a protein similar to membrane receptors, a pseudogene, and a desaturase of fatty acids (Table 1). The function in the viral infection of two of the genes identified in Table 1 was studied, and data related to the *PGM* gene are presented. Trejo-Saavedra *et al.* (2009) reported information related to the *CRL* (*Crumpled leaf*) gene involved in morphogenesis and plastid division, but they did not previously associate it to the process of plant-pathogen interaction.

The fact that the genes identified in our study have not been reported in other studies on differential expression in plant-virus interaction consolidates the use of transposant lines as an important tool in the search for genes associated with response to geminivirus. This methodology has important advantages. For example, it can detect genes whose differential expression occurs in a very specific tissue or period. The techniques based on direct detection of RNA (microarrays, RNAseq) often fail to detect genes that express differentially only in a few cells or during a very specific period due to an effect of RNA dilution at the moment of extraction. Moreover, because of their cost, these methods tend to be very time-specific (photographic moment), and if a gene has differential expression at another moment, it is very likely that it will go undetected. Analysis of the entire plant with histochemical tests at any point of its development increases the likelihood of finding genes not detected in other systems.

Viruses affect the transcriptional stage of the infected cells, according to Cooper (2001), Golem

Cuadro 1. Estructura del gen etiquetado y localización de la trampa génica, indicando el sitio de inserción, el número de identificación de cada gen y el número de línea de donde fue seleccionado. El esquema de los genes fue realizado respecto a la base de datos del Laboratorio de Análisis Genómicos del Instituto SALK (<http://www.arabidopsis.org/>). Los iconos en rojo muestran la localización de la trampa génica y las flechas en azul la orientación del gen reportero UidA.

Table 1. Structure of the tagged gene and location of gene trap, indicating insertion site, identification number of each gene and number of line from which it was selected. The gene schema was accomplished with regard to the database of the SALK Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://www.arabidopsis.org/>). The icons in red show the location of the gene trap. Blue arrows indicate the orientation of the UidA reporter gene.

Localización de la trampa génica	Gen etiquetado	Número de línea
	Proteína LRR AT2G34580	MGT 221
	Pseudogen AT3G21985	MGT 643
	FAD 7 AT3G11170	MGT 699
	CRL AT5G1020	MGT 208
	Proteína hipotética del complejo de transcripción CCR4 AT5G22250	MGT 208
	PGM AT1G09935	MGT 209
	Proteína de embrión AT3G61210	MGT 210
	PGP AT3G28380	MGT 210

leaf) involucrado en morfogénesis y división de plásmidos, pero que no estaba asociado al proceso de interacción planta patógeno.

El hecho de que los genes identificados en este estudio no estén reportados en estudios de expresión diferencial en la interacción planta-virus, consolida el uso de las líneas transposantes como una herramienta importante para la búsqueda de genes asociados a la respuesta a geminivirus. Esta metodología presenta ventajas importantes; por ejemplo, puede detectar genes cuya expresión diferencial ocurre en un tejido o periodo muy específico. Las técnicas basadas en la detección directa de ARN (microarreglos, RNAseq) frecuentemente fallan en detectar genes que solo se expresan diferencialmente en unas cuantas células o durante un periodo muy específico debido a un efecto de dilución del ARN en el momento de la extracción. Además, debido a los problemas de costos, estos métodos tienden a ser

and Culver (2003) and Trinks *et al.* (2005). But it is still difficult to discern genes that modify their expression as a specific response to viral infection from those that are part of a more overall response to any other type of stress. These alterations represent the direct and indirect effects of virus replication or movement (Cooper, 2001; Golem and Culver, 2003; Huang *et al.*, 2005). There are changes in the expression of genes during the first few days of the infection in *Arabidopsis* infected by caulimovirus (CaMV) (Cecchini *et al.*, 1997), cucumovirus (CMV), tobamovirus (TVCV), potexvirus (PVX), potyvirus (PVY) (Whitham *et al.*, 2003), and by geminivirus (Ascencio-Ibañez *et al.*, 2008). These changes are related to processes that reflect biochemical and physiological changes involved in the development of the disease (Cooper, 2001; Golem and Culver, 2003; Whitham, 2003).

análisis puntuales en el tiempo (fotografía del momento) y si un gen tiene su expresión diferencial en otro momento, es muy probable que no se detecte. El analizar toda la planta con pruebas histoquímicas y en cualquier momento de su desarrollo aumenta la probabilidad de encontrar genes no detectados en otros sistemas.

Los virus afectan el estado transcripcional de la células infectadas, según Cooper (2001), Golem y Culver (2003) y Trinks *et al.* (2005). Pero aún no es fácil discernir entre los genes que modifican su expresión como una respuesta específica a la infección viral y aquellos que son parte de una respuesta más global a cualquier tipo de estrés. Esas alteraciones representan los efectos directos e indirectos de la replicación o movimiento viral (Cooper, 2001; Golem y Culver, 2003; Huang *et al.*, 2005). Hay cambios en la expresión de genes durante los primeros días de la infección en plantas de *Arabidopsis* infectadas con caulimovirus (CaMV) (Cecchini *et al.*, 1997), cucumovirus (CMV), tobamovirus (TVCV), potexvirus (PVX) potyvirus (PVY) (Whitham *et al.*, 2003) y por geminivirus (Ascencio-Ibañez *et al.*, 2008). Esos cambios están relacionados con procesos celulares que reflejan los cambios bioquímicos y fisiológicos involucrados en el desarrollo de la enfermedad (Cooper, 2001; Golem y Culver, 2003; Whitham, 2003).

Análisis de expresión del gen *PGM*

La selección del gen *PGM* se basó en que este gen no está reportado como involucrado en la interacción planta-patógeno usando otras herramientas ya mencionadas (microarreglos, cADN AFLP) (Cooper, 2001; Golem y Culver, 2003; Whitham *et al.*, 2003; Ascencio-Ibañez *et al.*, 2008). Por medio de PCR cuantitativo se comparó la expresión del gen *PGM* de plantas de *Arabidopsis* Col-0 sin infectar, de plantas infectadas con el virus CaLCuV y de plantas inoculadas con partículas pero sin ADN viral (inoculación mock). Los resultados indican que la expresión del gen *PGM* aumenta a las 24 h después de la inoculación con virus (1 dpi) y disminuye drásticamente los siguientes días (Figura 2).

Para obtener más información de la expresión del gen *PGM*, una región de 1515 pb río arriba del codón de inicio se amplificó y se usó como promotor, y esta secuencia se fusionó al gen reportero *Uida* que

Analysis of *PGM* gene expression

The *PGM* gene was selected because is not reported as involved in the interaction plant-pathogen using other tools already mentioned (microarrays, cDNA AFLP) (Cooper, 2001; Golem and Culver, 2003; Whitham *et al.*, 2003; Ascencio-Ibañez *et al.*, 2008). By quantitative PCR, expression of the *PGM* gene from uninfected *Arabidopsis* Col-0 was compared with that of CaLCuV-infected plants and with that of plants inoculated with particles without viral DNA (mock inoculation). The results indicate that expression of the *PGM* gene increases 24 h after inoculation with the virus (1 dpi) and decreases drastically in the following days (Figure 2).

To obtain more information on *PGM* expression, a 1515 bp region upstream from the start codon was amplified and used as a promoter. This sequence was fused to the reporter gene that codes for β -glucuronidase (*GUS*). With this construct, *A. thaliana* Col-0 plants were transformed. The transgenic lines (*pPGM::GUS*) were analyzed with a histochemical assay of *GUS* to determine its specific tissue expression. In all of the lines, expression of the *GUS* gene was observed up to 21 d post germination (dpg) (Figure 3C). Because all the lines showed the same expression pattern as the reporter gene *GUS*, some of them were selected randomly. The selected lines were inoculated with the CaLCuV virus and analyzed with *GUS* histochemical tests. Expression of the reporter was not intense; however, with more detailed analysis of the inoculated tissue, isolated cells were observed with *GUS* expression on the entire leaf on the first and third dpi (Figure 3A, CaLCuV). These results are consistent with those obtained in the quantitative PCR analysis, in which the amount of the messenger RNA increases on the first day after inoculation and decreases during the following days (Figure 2).

To analyze whether the change in expression of the *PGM* gene was due to the presence of the virus or to a specific response to some viral protein, the open reading frames (ORFs) of the Rep, TrAP and REn genes of the A component were cloned under the 35S promoter of the CaMV virus. These genes are involved in virus replication, modification of the cell cycle and the transactivation of genes that are important for the infective cycle of the virus (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013). These constructs

codifica para la β -glucuronidasa (GUS). Con esta construcción se transformaron plantas de *A. thaliana* Col-0. Las líneas transgénicas (*pPGM::GUS*) se analizaron por una prueba histoquímica de GUS para determinar su expresión específica de tejido. En todas las líneas la expresión del gen *GUS* se observó hasta los 21 d post germinación (dpg) (Figura 3C). Debido a que todas las líneas mostraron el mismo patrón de expresión del gen reportero *GUS*, algunas de ellas se seleccionaron al azar. Las líneas seleccionadas se inocularon con el virus CaLCuV y se analizaron por pruebas histoquímicas de GUS. La expresión del reportero no fue tan intensa; sin embargo, al analizar con más detalle el tejido inoculado, se observaron células aisladas con expresión de GUS en toda la hoja al primer y tercer dpi (Figura 3A, CaLCuV). Estos resultados son consistentes con los obtenidos en el análisis de PCR cuantitativo, donde la cantidad del mensajero aumenta el primer día y disminuye los siguientes días después de la inoculación (Figura 2).

Para analizar si el cambio de expresión del gen *PGM* fue debido a la presencia del virus o a una respuesta específica hacia alguna proteína viral, los marcos de lectura abierta (MLAs) de los genes *Rep*, *TrAP* y *REn* del componente A se clonaron bajo el promotor 35S del virus CaMV. Estos genes están involucrados en la replicación viral, modificación del ciclo celular y la transactivación de genes importantes para el ciclo infeccioso viral (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013). Estas construcciones se inocularon de manera independiente en las plantas *pPGM::GUS*. La prueba histoquímica se realizó a los 1, 3, 5 y 7 dpi y solo se pudo observar la expresión del reportero con las construcciones *CaMV35S-Rep* y *CaMV35S-REn* durante el periodo de 1 a 5 dpi (Figura 3A). En ninguno de los casos analizados se observó expresión del reportero GUS a los 7 dpi. Además, la expresión inducida por la presencia individual de las proteínas virales fue más baja que la observada en los experimentos con el virus completo. Estos resultados sugieren que el cambio de expresión observado en la infección con el virus completo se debe a la conjunción de la acción de los genes *Rep* y *REn*. Sin embargo, no se descarta que alguno de los genes del componente B o la proteína de la cápside (CP) o ambos, también influyan.

Para determinar una posible función del gen *PGM* en el proceso de infección por CaLCuV se examinó el efecto de la ganancia de función de este gen. Para esto se generaron construcciones de

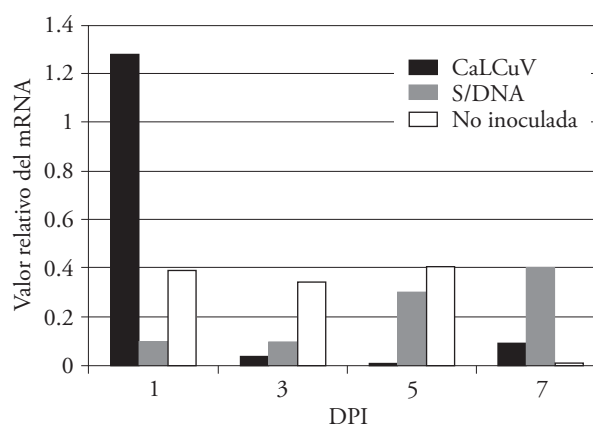


Figura 2. Análisis de expresión del gen *PGM* por medio de PCR cuantitativo en plantas de *Arabidopsis* Col-0 inoculadas con CaLCuV. El valor de cada barra es el correspondiente al ARN extraído de un lote combinado de cinco plantas para cada caso.

Figure 2. Analysis of *PGM* gene expression by quantitative PCR in *Arabidopsis* Col-0 plants inoculated with CaLCuV. The value of each bar corresponds to RNA extracted from a combined batch of five plants for each case.

were inoculated independently in the *pPGM::GUS* plants. The histochemical test was carried out 1, 3, 5 and 7 dpi, and expression of the reporter could be observed only with the constructs *CaMV35S-Rep* and *CaMV35S-REn* during the period 1-5 dpi (Figure 3A). In none of the analyzed cases was expression of the GUS reporter observed 7 dpi. Moreover, the expression induced by the presence of individual viral proteins was lower than that observed in the experiments with the complete virus. These results suggest that the change in expression observed in infection by the complete virus is due to the concerted action of the *Rep* and *REn* genes. However, we cannot rule out the possibility that one gene of the B component or the capsid protein (CP), or both, also has an influence.

To determine a possible function of the *PGM* gene in the CaLCuV infection process, a gain-of-function experiment was carried out with this gene. To this end, over-expression constructs were generated using the vector pFGC5941 (<http://www.chromdb.org/rnai/order-vectors.html>). With the generated constructs, *A. thaliana* Col-0 ecotype plants were transformed using *A. tumefaciens*. Fifty-six *CaMV35S-PGM*T1 lines were obtained, of which 44 (78.5 %) exhibited a phenotype with rolled leaves and additional stems (Figure 4B, whereas the other

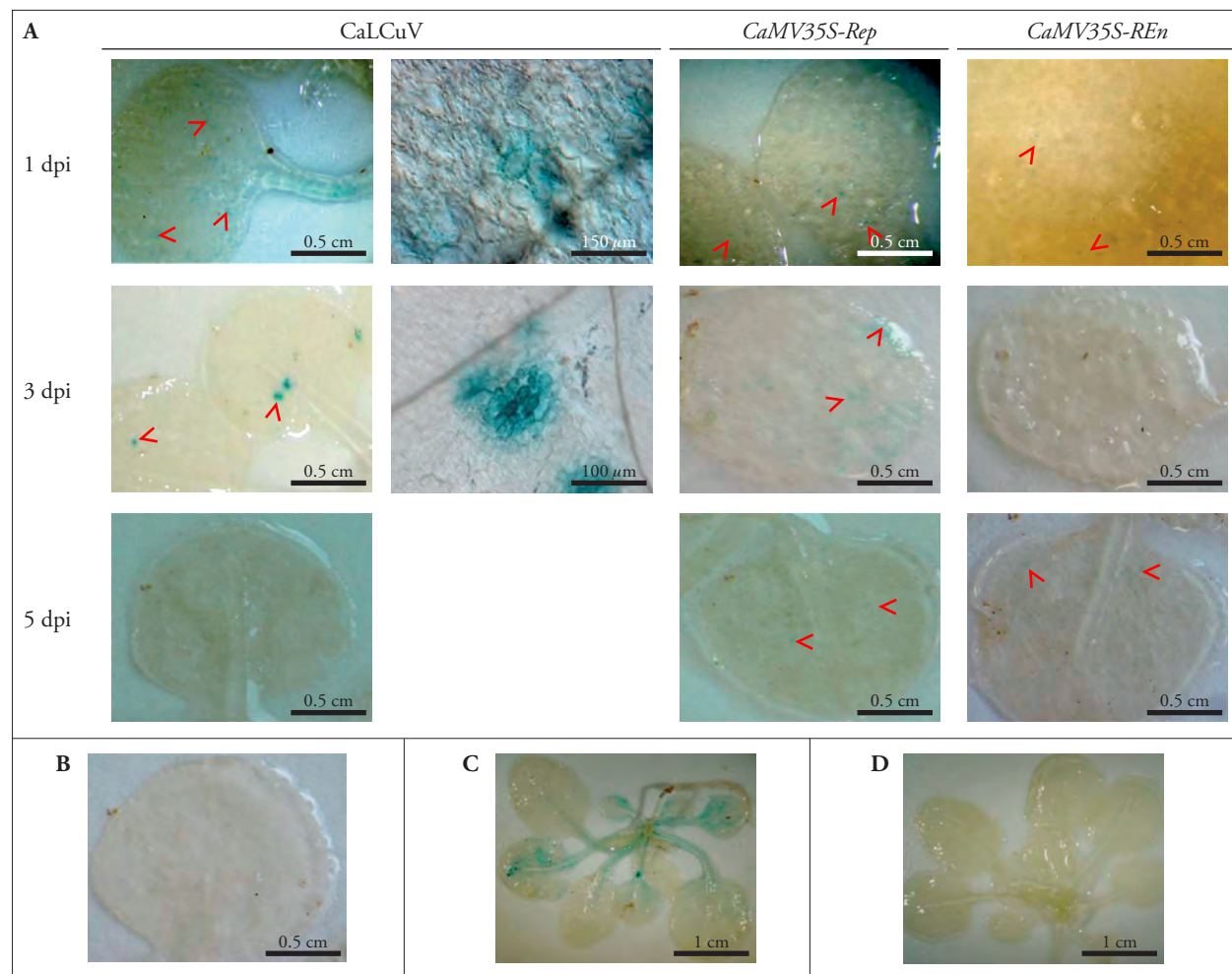


Figura 3. Expresión del gen reportero *UidA* bajo el control del promotor del gen *PGM*. A, cambio de expresión del gen reportero fusionado al promotor *pPGM* en la línea *pPGM7::GUS* por inoculación de *CaMV35S-Rep*, *CaMV35S-REn* y *CaLCuV*. B, tejido testigo que no muestra expresión del gen reportero. C, expresión del gen *GUS* en hojas verdaderas de la roseta de las plantas transgénicas con la construcción *pPGM::GUS* a los 21 dpd. D, control Mock, planta bombardeada con partículas sin ADN viral. Las puntas de flecha rojas indican la zona de expresión observada al microscopio.

Figure 3. Expression of the reporter gene *UidA* under control of the *PGM* gene promoter. A, change in expression of the reporter gene fused to the *pPGM* promoter in line *pPGM7::GUS* by inoculation with *CaMV35S-Rep*, *CaMV35S-REn* and *CaLCuV*. B, control tissue that does not exhibit expression of the reporter gene. C, expression of the *GUS* gene in true leaves of the rosette of transgenic plants with the construct *pPGM::GUS* 21 dpi. D, mock control, plant bombarded with particles with no viral DNA. Red arrowheads indicate the area of expression observed under microscope.

sobreexpresión usando el vector pFGC5941 (http://www.chromdb.org/rnai/order_vectors.html). Con las construcciones generadas se transformaron plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 utilizando *A. tumefaciens*. Se obtuvieron 56 líneas *CaMV35S-PGM* T1 de las cuales 44 (78.5 %) mostraron fenotipo de hojas enrolladas y generación de tallos adicionales (Figura 4B) mientras que las otras 12 líneas (21.5 %) no mostraron fenotipo. La cantidad

12 líneas (21.5 %) did not exhibit a phenotype. The relative quantity of transcript was determined by RT-PCR, revealing that line *CaMV35S-PGM* T2-8 has more *PGM* messenger RNA than a wt line (Figure 4E).

To rule out differences in development, phenotypical analyses were conducted using both wt and transgenic line plants. The results show that values for transgenic line plants are not significantly

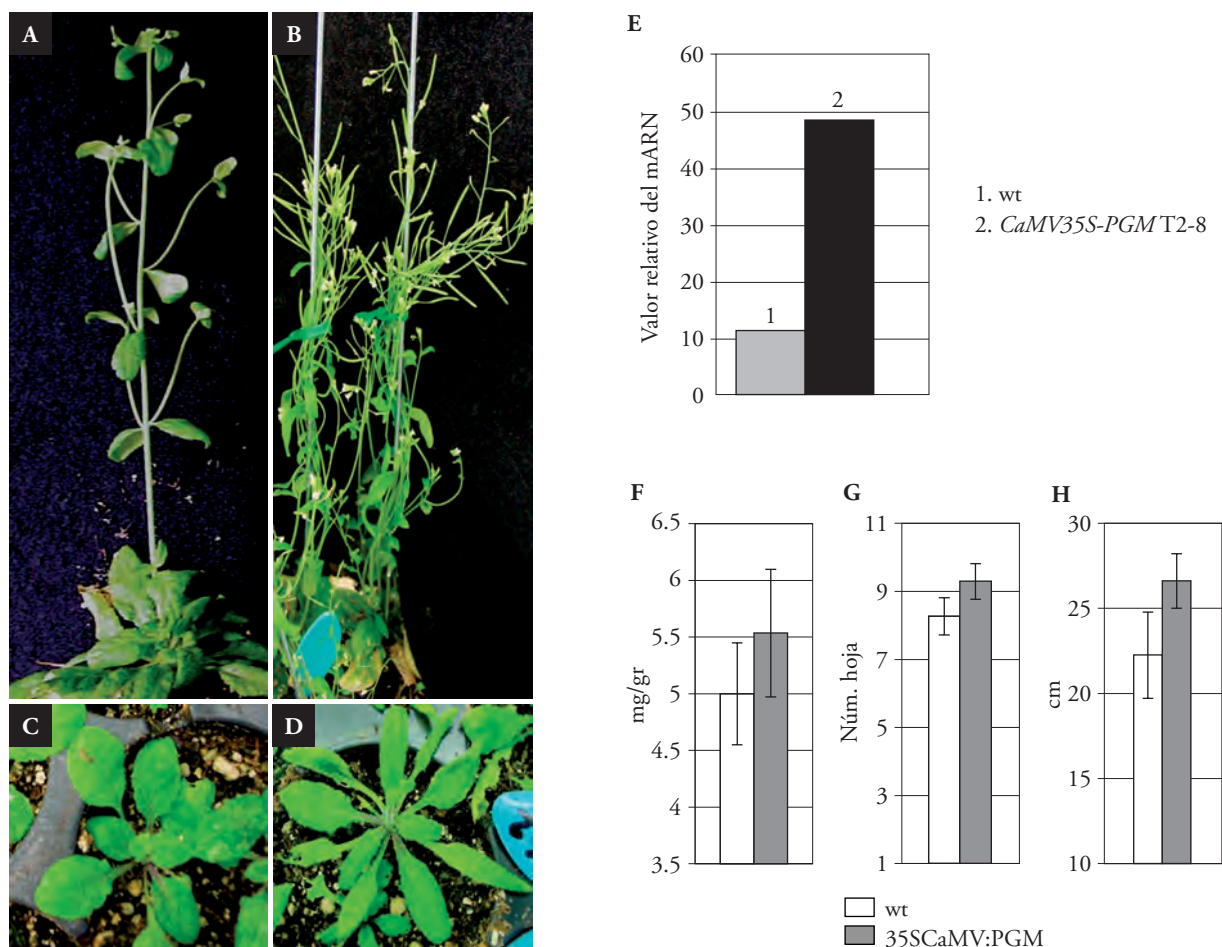


Figura 4. Caracterización fenotípica de las líneas transgénicas con sobreexpresión de *PGM* (*CaMV35S-PGM*). A, planta silvestre (wt) adulta; B, planta *35S-PGM* adulta; C, roseta de una wt; D, roseta de una planta *35S-PGM*. En todos los casos se muestran fotografías de las plantas representativas. E, cuantificación relativa del transcrito de la línea *CaMV35S-PGM T2-8*; F, concentración de clorofila total en las líneas *35S-PGM* y wt; G, medición del número de hojas en las líneas *35S-PGM* y wt a los 45 dpg; H, medición del diámetro de la roseta en las líneas *35S-PGM*, y wt a los 45 dpg.

Figure 4. Phenotypic characterization of the transgenic lines that over-express *PGM* (*CaMV35S-PGM*). A, adult wild type (wt) plant; B, adult *35S-PGM* plant; C, wt plant rosette; D, *35S-PGM* plant rosette. In all cases, photographs are of representative plants. E, relative quantification of the *CaMV35S-PGM T2-8* line transcript; F, total chlorophyll concentration in *35S-PGM* and wt lines; G, measurement of number of leaves in *35S-PGM* and wt lines 45 dpg; H, measurement of rosette diameter in *35S-PGM* and wt lines 45 dpg.

relativa del transcrito fue cuantificada por RT-PCR, mostrando que en la línea *CaMV35S-PGM T2-8* hay mayor cantidad de ARN mensajero del gen *PGM* con respecto a la línea wt (Figura 4E).

Para descartar alguna diferencia de desarrollo se realizaron análisis fenotípicos en las plantas silvestres y en las líneas transgénicas. Los resultados muestran que las plantas de las líneas transgénicas y las plantas silvestres presentan valores no significativamente diferentes en la cantidad de clorofila, el número de hojas, y el diámetro de la roseta (Figura 4F, G, H).

different from those of wt plants in terms of quantity of chlorophyll, number of leaves and rosette diameter (Figure 4F, G, H). However, differences in number of stems and leaf shape were observed between the transgenic and non-transgenic lines (Figure 4A, B, C and D).

Expression of the *PGM* gene in *A. thaliana* plants infected with CaLCuV is induced drastically on the first dpi but decreases notably during the following days. When transgenic plants with the *PGM* promoter fused with the *Uida* reporter gene were

Sin embargo, se observaron diferencias en el número de tallos y la forma de las hojas entre las líneas transgénicas y las no transgénicas (Figura 4A, B, C y D).

La expresión del gen *PGM* en plantas de *A. thaliana* infectadas con CaLCuV, se induce drásticamente al primer dpi pero disminuye notablemente en los días posteriores. Al analizar las plantas transgénicas que tienen fusionado el promotor de *PGM* con el gen reportero *UidA*, se detectó la expresión de GUS en tallos hasta los 21 dpv y en inflorescencias. Estas plantas al ser inoculadas con el virus CaLCuV, muestran expresión de GUS al primer dpi. Estos resultados fueron similares a los observados en el RT-PCR cuantitativo, donde también se detecta una fuerte expresión del mensajero de *PGM* al primer dpi en plantas wt.

El gen identificado en este estudio (At1G09935) codifica para una proteína similar a las PGM/bPGM. Este gen presenta 49 % de similitud con el gen *AtPGM* (Mazarei *et al.*, 2003). Además, muestra el motivo fosfohistidina típico de las dPGM: (LIVM)-x-R-H-G-(EQ)-x-(3)-N el cual sería esencial para la actividad de la proteína (Todd *et al.*, 2002).

Las proteínas PGM tienen una actividad central en la glicólisis. En plantas, esta ruta es solo parte de una compleja red de rutas del metabolismo de carbohidratos, las cuales se distribuyen en diferentes compartimientos celulares (Bourgis *et al.*, 2005). Dos familias de enzimas poseen actividad de PGM: una donde las PGM son dependientes de cofactores (dPGM), y otra en la cual estas proteínas no requieren ninguna proteína adicional como cofactor (iPGM) (Jedrzejewski, 2000). Aunque ambos tipos de PGM catalizan la misma reacción, no hay similitud en la secuencia de aminoácidos entre ambas enzimas (Jedrzejewski, 2000). En el genoma de *Arabidopsis* hay al menos 15 posibles genes con homología a las PGM, de los cuales no se sabe si todos son expresados (Bourgis *et al.*, 2005). Múltiples isoenzimas de las iPGM están presentes en plantas. Algunas están exclusivamente en el citosol (Westram *et al.*, 2002), otras en plastidios y en citosol (Botha y Dennis, 1986), y una más en el núcleo (Wang *et al.*, 1996). Esta distribución sugiere que estas proteínas tienen diferentes funciones en la célula a pesar de pertenecer a la misma familia. En este sentido, una iPGM modifica la fotosíntesis y el crecimiento (Westram *et al.*, 2002).

analizada, expresión de GUS was detected in stems up to 21 dpv and in inflorescences. These plants, when inoculated with the CaLCuV virus, exhibit expression of GUS on the first dpi, similar to results observed in the quantitative RT-PCR, where strong expression of the *PGM* messenger was detected on the first dpi in wt plants.

The gene identified in this study (At1G09935) encodes for a protein similar to PGM/bPGM. This gene has 49 % similarity with the gene *AtPGM* (Mazarei *et al.*, 2003). It also shows the typical phosphohistidine motif of the dPGM: (LIVM)-x-R-H-G-(EQ)-x-(3)-N, which would be essential for protein activity (Todd *et al.*, 2002).

PGM proteins have a central role in glycolysis. In plants, this pathway is only part of a complex network of carbohydrate metabolism routes, which are distributed in different cell compartments (Bourgis *et al.*, 2005). Two families of enzymes possess PGM activity: one where the PGM are dependent on cofactors (dPGM) and the other in which the proteins do not require any additional protein as cofactor (iPGM) (Jedrzejewski, 2000). Although both types of PGM catalyze the same reaction, they are not similar in terms of the amino acid sequence (Jedrzejewski, 2000). In the *Arabidopsis* genome, at least 15 genes are possibly paralogs to PGM, but it is not known whether all of these are expressed (Bourgis *et al.*, 2005). Multiple isoenzymes of the iPGM are present in plants. Some are located exclusively in the cytosol (Westram *et al.*, 2002); others are found in plastids and cytosol (Botha and Dennis, 1986). Another was observed in the nucleus (Wang *et al.*, 1996). This distribution suggests that these proteins have different functions in the cell even though they belong to the same family. In this regard, an iPGM modifies photosynthesis and growth (Westram *et al.*, 2002).

Mazarei *et al.* (2003) identified the *AtPGM*-like gene in a soybean library and later in *Arabidopsis*. The promoter of this gene directs the expression of reporter gene (GUS), only in stems and apical meristems. When these plants are infected with nematodes, the expression is observed in callus-type structures induced by the feeding pathogens. Moreover, the promoter was regulated negatively by abscisic acid and hydroxyurea. On the contrary, it was induced by sucrose, oryzalin and auxin. This expression is typical of genes that have a function in meristematic cells

Mazarei *et al.* (2003) identificaron el gen AtPGM en una librería de soya y después en *Arabidopsis* y este gen dirige la expresión del gen reportero GUS solo en tallos y en meristemos apicales. Al infectar estas plantas con nematodos, la expresión se observa en las estructuras tipo callo inducidas por estos patógenos para alimentarse. Además, el promotor fue regulado negativamente por ácido abscísico e hidroxiurea; por el contrario, fue inducido por sacarosa, orizalina y auxina. Esta expresión es típica de los genes que tienen una función en células meristemáticas donde la maquinaria de replicación de ADN está activa. Este es el primer informe de la posible función de las PGM/bPGM en la fisiología de la planta en interacciones planta-patógeno.

Las líneas que sobreexpresan el gen *PGM* presentan una mayor susceptibilidad a la infección por CaLCuV

Para evaluar si la sobreexpresión del gen *PGM* afectaba la susceptibilidad de las plantas de *Arabidopsis* a la infección por CaLCuV (expresada como tiempo de aparición y tipo de síntomas), 20 plantas de la línea transgénica *35S:PGM* T2-8 y de la wt fueron infectadas con el virus CaLCuV. Las variables evaluadas fueron porcentaje de plantas infectadas, periodo de latencia o tiempo de aparición y tipo o severidad de síntomas. El porcentaje de la infección a los 12 dpi en las plantas *CaMV35S-PGM* T2-8 fue 50 %, mientras que el porcentaje obtenido con las plantas wt fue 90 % (Figura 5A). A pesar de que la eficiencia de la infección fue alterada en las plantas transgénicas, no hubo diferencia en los síntomas (deformación foliar, arrugamiento y moteados cloróticos) producidos por el virus CaLCuV en ambas líneas (Figura 5B). Resultados similares fueron obtenidos con otra línea que tuvo 35 % menos de niveles de mensajero que la línea *CaMV35S-PGM* T2-8 (datos no mostrados).

En los análisis de infección viral las plantas sobreexpresantes produjeron síntomas 3 d antes que las wt. Es posible que esta *PGM* tenga una función similar a la reportada por Mazarei *et al.*, (2003), pues su expresión es específica de tejido infectado donde se necesita la maquinaria de replicación activa para iniciar el ciclo infectivo viral. Este resultado sugiere que *PGM* probablemente facilite de alguna

where the DNA replication machinery is active. This is the first report of a possible role of PGM/bPGM in plant-pathogen interactions.

Overexpressing *PGM* lines are more susceptible to infection by CaLCuV

To determine whether over-expression of the *PGM* gene affected susceptibility of *Arabidopsis* plants to infection by CaLCuV (expressed as time to appearance and type of symptoms), 20 wt plants and of the *35S:PGM* T2-8 transgenic line were infected with the CaLCuV virus. The variables evaluated were percentage of infected plants, period of latency or time to appearance and symptom type or severity. Infection 12 dpi in *CaMV35S-PGM* T2-8 plants was 50 %, while in wt plants infection was 90 % (Figure 5A). Although infection efficiency was altered in transgenic plants, symptoms (leaf deformation, crumpling and chlorotic mottle) produced by the CaLCuV virus were not different between lines (Figure 5B). Similar results were obtained with another line that had 35 % fewer levels of messenger than the *CaMV35S-PGM* T2-8 line (data not shown).

In the analyses of viral infection, the over-expressing plants developed symptoms 3 d before the wt plants. This suggests that *PGM* has a possible function similar to that reported by Mazarei *et al.* (2003) since its expression is specific to infected tissue where active replication machinery is necessary to start the viral infection cycle. This result also suggests that *PGM* probably facilitates, in some way, the establishment of the infection. Moreover, this expression may be part of a general defense response of the plant, or perhaps other *PGM* proteins with similar activity indirectly alter the virus infection cycle. However, despite the experimental data obtained for its characterization evidence is still insufficient to define a specific function for this protein.

CONCLUSIONS

Gene traps are a tool for identification of genes that respond to geminivirus infection. Using this method, we identified that expression of the *PGM* (phosphoglycerate mutase) gene is altered in *Arabidopsis* during viral infection. Analysis of the

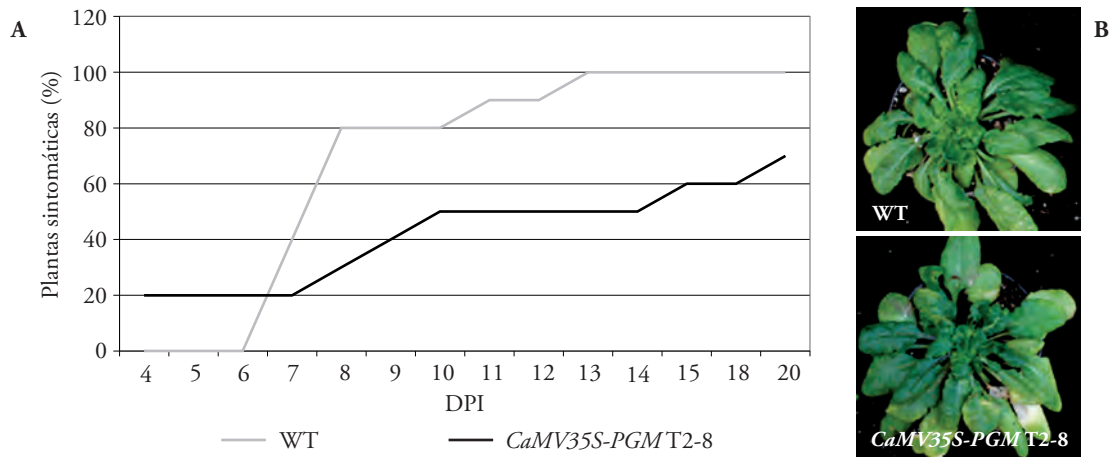


Figura 5. A, prueba de infectividad del virus CaLCuV con plantas silvestres (Columbia-0) y plantas de la línea sobreexpresante *CaMV35S-PGMT2-8*. Los valores muestran el porcentaje de las plantas con síntomas a diferentes días después de la inoculación (dpi). B, comparación de la sintomatología obtenida en las líneas transgénicas *CaMV35S-PGMT2-8* con la silvestre Col-0 a los 20 dpi.

Figure 5. A, Infectivity test of the CaLCuV virus with wt plants (Columbia-0) and plants of the over-expressing line *CaMV35S-PGMT2-8*. The values are percentages of plants exhibiting symptoms on different days post inoculation (dpi). B, Symptomatology obtained in the transgenic lines *CaMV35S-PGMT2-8* compared with that in the wt Col-0 line 20 dpi.

manera el establecimiento de la infección. Además, esta expresión puede ser parte de una respuesta de defensa general de la planta o quizá hay otras proteínas *PGM* con actividad similar que alteren de manera indirecta el ciclo infeccioso viral. Sin embargo, a pesar de los datos experimentales obtenidos para su caracterización, no hay todavía evidencias suficientes para definir una función específica de esta proteína.

CONCLUSIONES

Las trampas génicas son una herramienta para identificar genes que responden a la infección por geminivirus. Con esta metodología se identificó que la expresión del gen *PGM* (fosfoglicerato mutasa) se altera durante la infección viral en *Arabidopsis*. La determinación de la expresión del gen *PGM* de manera precisa en tiempo y espacio durante la infección con geminivirus sería muy complicada con otras metodologías, por ejemplo, ensayos tipo Northern blot o RNAseq, ya que su expresión diferencial sería muy difícil de detectar debido al efecto de dilución por muy baja proporción de células expresantes sobre un número mayor de células sin expresión de ese gen en particular.

time— and tissue-specific expression of the *PGM* gene during infection by geminivirus would be very complicated with other methodologies, such as Northern blot type assays or RNAseq, since its differential expression would be very difficult to detect because of the dilution effect resulting from the combination of a very low proportion of expressing cells and a large number of cells that do not express this particular gene.

According to the results, *PGM* protein may facilitate the establishment of viral infection. But there is very little information about the basic function of this gene in plant metabolism, which prevents establishing more clearly its function in the process of infection by geminivirus.

—End of the English version—



De acuerdo con los resultados la proteína *PGM* pudiera facilitar el establecimiento de la infección viral. Pero hay muy poca información sobre la función básica de este gen en el metabolismo de la planta, lo cual impide establecer más claramente su función en la infección por geminivirus.

LITERATURA CITADA

- Aarts, M. G. M., W. M. Dirkse, W. J. Stiekema, and A. Pereira. 1993. Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis*. *Nature* 363: 715-717.
- Acosta-García, G. and J. P. Vielle-Calzada. 2004. A classical arabinogalactan protein is essential for the initiation of female gametogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2614-2628.
- Altmann, T., G. Felix, A. Jesson, A. Kauschmann, U. Uwer, H. Peña-Cortés, and L. Willmitzer. 1995. Ac/Ds transposon mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: mutant spectrum and frequency of Ds insertion mutant. *Mol. General Genet.* 247: 646-652.
- Arnon, D. I. 1949 Copper enzymes in isolated chloroplasts and polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-15.
- Ascencio-Ibañez, J. T., R. Sozzani, T. J. Lee, T. M. Chu, R. D. Wolfinger, R. Cella, and L. Hanley-Bowdoin. 2008. Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiol.* 148: 436-454.
- Bass, H. W., S. Nagar, L. Hanley-Bowdoin, and D. Robertson. 2000. Chromosome condensation induced by geminivirus infection of mature plant cell. *J. Cell Sci.* 113: 1149-1160.
- Baxter-Burrell, A., R. Chang, P. Springer, and J. Bailey-Serres. 2003. Gene and enhancer trap transposable elements reveal oxygen deprivations regulated genes and their complex patterns of expression in *Arabidopsis*. *Ann. Bot.* 91: 129-141.
- Bellen, H. J. 1999. Ten years of enhancer detection: lessons from the fly. *Plant Cell* 11: 2271-2281.
- Bourgis, F., F. C. Botha, S. Mani, F. N. Hiten, D. J. Rigden, and N. Verbruggen. 2005. Characterization and functional investigation of an *Arabidopsis* cDNA encoding a homologue to the d-PGMase superfamily. *J. Exp. Bot.* 56: 1129-1142.
- Botha, F. C. and D. T. Dennis. 1986. Isozymes of phosphoglyceromutase from the developing endosperm of *Ricinus communis*: isolation and kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 245: 96-103.
- Campisi, L., Y. Yang, Y. Yi, E. Heiling, B. Herman, A. J. Cassita, H. Xiang, and T. Jack. 1999. Generation of enhancer trap lines in *Arabidopsis thaliana* and characterization of expression pattern in the inflorescence. *Plant J.* 17: 699-707.
- Carrillo-Tripp, J., E. Lozoya-Gloria, and R. F. Rivera-Bustamante. 2007. Symptom remission and specific resistance of pepper plants after infection by Pepper golden mosaic virus. *Phytopathology*. 97: 51-59.
- Cecchini E, Z. H. Gong, C. Geri, S. N. Covey, and J. J. Milner. 1977. Transgenic *Arabidopsis* lines expressing gene VI from cauliflower mosaic virus variants exhibit a range of symptom-like phenotypes and accumulate inclusion bodies. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 1094-1101.
- Clough, S. J. and A. J. Bent. 1988. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743.
- Cooper, B. 2001. Collateral gene expression changes induced by distinct plant viruses during the hypersensitive resistance reaction in *Chenopodium amaranticolor*. *Plant J.* 26: 339-349.
- Dean, C. S. C., T. Page, J. Jones, and C. Lister. 1992. Behaviour of the maize transposable element Ac in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2: 69-81.
- Fedoroff, N. V. and D. L. Smith. 1993. A versatile system for detecting transposition in *Arabidopsis*. *Plant J.* 3: 273-289.
- Fondong, V. N. 2013. Geminivirus protein structure and function. *Mol. Plant Path.* 14: 635-649.
- Fridborg, I., A. Williams, A. Yang, S. MacFarlane, K. Coutts, and S. Angell. 2004. Enhancer trapping identifies TRI, an *Arabidopsis* gene up-regulated by pathogen infection. *Mol. Plant Microbe Int.* 17: 1086-1094.
- Golem, S. and J. N. Culver. 2003. Tobacco mosaic virus induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Int.* 16: 681-688.
- Hanley-Bowdoin, L., E. R. Bejarano, D. Robertson, and S. Mansoor. 2013. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Rev. Microbiol.* 11: 777-788.
- He, Y. H., W. N. Tang, J. D. Swain, A. L. Green, T. P. Jack, and S. S. Gan. 2001. Networking-senescence regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiol.* 126: 707-716.
- Huang, Z., J. M. Yeakley, E. W. García, J. D. Holdridge, J. B. Fan, and S. A. Whitham. 2005. Salicylic acid-dependent expression of host genes in compatible *Arabidopsis*-virus interactions. *Plant Physiol.* 137: 1147-1159.
- Jedrzejas, M. J. 2000. Structure, function, and evolution of phosphoglycerate mutases: comparison with fructose-2,6-bisphosphatase, acid phosphatase, and alkaline phosphatase. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 73: 263-287.
- Kerschen, A., C. A. Napoli, R. A. Jorgensen, and A. E. Muller. 2004. Effectiveness of RNA interference in transgenic plants. *FEBS Lett.* 566: 223-228.
- Klimyuk, V. I., L. Nussaume, K. Harrison, and J. D. G. Jones. 1995. Novel GUS expression patterns following transposition of an enhancer trap Ds element in *Arabidopsis*. *Mol. General Genet.* 249: 357-365.
- Lawson, E. J. L., S. R. Scofield, C. Sjodin, J. D. G. Jones, and C. Dean. 1994. Modification of the 5' untranslated leader region of the maize Activator element leads to increased activity in *Arabidopsis*. *Mol. General Genet.* 245: 608-615.
- Liu, Y. G., N. Mitsukawa, Y. Oosumi, and R. F. Whittier. 1995. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* 8: 457-463.
- Long, D., M. Martin, E. Sundberg, J. Swinburne, P. Puangsomlee, and G. Coupland. 1993. The maize transposable element system Ac/Ds as a mutagen in *Arabidopsis*: Identification of an albino mutation induced by Ds insertion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 10370-10374.
- Lucy, A. P., M. I. Boulton, J. W. Davies, and A. J. Maule. 1996. Tissue specificity of *Zea mays* infection by Maize streak virus. *Mol. Plant Microbe Int.* 9: 22-31.
- Mazarei M, K. A. Lennon, D. P. Puthoff, S. R. Rodermeil, and T. J. Baum. 2003. Expression of an *Arabidopsis* phosphoglycerate mutase homologue is localized to apical meristems, regulated by hormones, and induced by sedentary plant-parasitic nematodes. *Plant Mol. Biol.* 53: 513-530.
- Méndez-Lozano, J., R. F. Rivera-Bustamante, C. M. Fauquet, and R. de La Torre-Almaráz. 2001. Pepper huasteco virus and Pepper golden mosaic virus are geminiviruses affecting tomatillo (*Physalis ixocarpa*) crops in Mexico. *Plant Dis.* 85: 1291.

- Méndez-Lozano, J., I. Torres-Pacheco, C. M. Fauquet, and 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.
- Morales, F. J., and P. K. Anderson. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch. Virol.* 146: 415-441.
- Murray, M. G., and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
- Nagar, S., T. J. Pedersen, K. M. Carrick, L. Hanley-Bowdoin, and D. Robertson. 1995. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cell. *Plant Cell* 7: 705-719.
- Ranjan R., S. Patro, B. Pradhan, A. Kumar, I. B. Maiti, and N. Dey. 2012. Development and functional analysis of novel genetic promoters using DNA shuffling, hybridization and a combination thereof. *PLoS ONE* 7: 31931.
- Rentería-Canett, I., B. Xoconostle-Cazares, R. Ruiz-Medrano, and R. F. Rivera-Bustamante. 2011. Geminivirus mixed infection on pepper plants: synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virol. J.* 8: 104.
- Stenger, D. C., G. N. Revington, M. C. Stevenson M. C., and 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. U. S. A.* 88: 8029-8033.
- Sundaresan, V., P. Springer, T. Volpe, S. Haward, J. Jones, C. Dean, H. Ma, and R. Martienssen. 1995. Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Gene Dev.* 9: 1797-1810.
- Todd A. E., C. A. Orengo, and J. M. Thornton. 2002. Sequence and structural differences between enzyme and nonenzyme homologues. *Structure* 10: 1435-1451.
- Trejo-Saavedra D. L., J. P. Vielle-Calzada, and R. F. Rivera-Bustamante. 2009. The infective cycle of Cabbage leaf curl virus (CaLCuV) is affected by CRUMPLED LEAF (CRL) gene in *Arabidopsis thaliana*. *Virology J.* 6: 169.
- Trinks, D., R. Rajeswaran, P. V. Shivaprasad, R. Akbergenov, E. J. Oakeley, K. Veluthambi, T. Hohn, and M. M. Pooggin. 2005. Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J. Virol.* 2517-2527.
- Wang, J. L., L. L. Walling, G. Y. Jauh, Y. Q. Gu, and E. M. Lord. 1996. Lily cofactor-independent phosphoglycerate mutase: purification, partial sequencing, and immunolocalization. *Planta* 200: 343-352.
- Westram, A., J. R. Lloyd, U. Roessner, J. W. Riesmeier, and J. Kossmann. 2002. Increases of 3-phosphoglyceric acid in potato plants through antisense reduction of cytoplasmic phosphoglycerate mutase impairs photosynthesis and growth, but does not increase starch contents. *Plant Cell Environ.* 25: 1133-1143.
- Whitham, S. A., S. Quan, H. S. Chang, B. Cooper, B. Estes, T. Zhu, X. Wang, and Y. Hou. 2003. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J.* 33: 271-283.