

Maniok-assoziierte Begomoviren in Indien - Biodiversität, Gewebelokalisation und Funktionsanalyse

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von
Dirk Rothenstein
aus Ludwigsburg

Hauptberichter: Prof. Dr. H. Jeske

Mitberichter: Prof. Dr. D. H. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 24. August 2004

Biologisches Institut
Abt. Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen
2004

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des von der Europäischen Union geförderten *International Scientific Cooperation Project* „Improved screening of cassava against selected systemic arboviruses“ durchgeführt. Das Projekt untersucht die ökologische Bedeutung von Geminiviren als Pflanzenpathogene in Südindien und Zentralafrika. Geminiviren befallen wichtige Nutzpflanzen, wie Maniok, Mais, Zuckerrübe, Bohne und Tomate und führen zu teilweise enormen Ernteverlusten. In den letzten Jahrzehnten stieg die Zahl von Virusinfektionen an, einerseits durch die Verbreitung der Weißen Fliege (*Bemisia tabaci*, Genn.), den für die Übertragung verantwortlichen Vektor, andererseits durch die schnelle Anpassung der Viren an Umweltbedingungen und Wirtspflanzen durch verschiedene molekulargenetische Mechanismen, wie Mutation, Rekombination und Pseudorekombination. Der Maniokanbau in den von der Maniok Mosaikkrankheit (engl. Cassava mosaic disease CMD) betroffenen Regionen Afrikas brach vollständig zusammen und erholte sich erst nach Jahren wieder langsam. Untersuchungen über die Biodiversität von CMD-auslösenden Begomoviren in Indien sind bisher unvollständig. Diese Lücke wurde mit der vorliegenden Arbeit geschlossen, in der die biologische Varianz Maniok-infizierender Begomoviren in Südindien untersucht wurde.

Die Ergebnisse zeigen, dass neben dem schon bekannten *Indian cassava mosaic virus* (ICMV) auch das bisher nur in Sri Lanka nachgewiesene *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) in Indien weitverbreitet auftritt. Um Neuzüchtungen von Manioksorten auf Resistenz prüfen zu können, wurden Maniok-infektiöse Begomoviren kloniert. Aus einer künstlich infizierten Tabak-Pflanze wurden beide DNA Komponenten des bipartiten ICMV isoliert und kloniert. Dieser Klon induzierte sowohl in experimentell verwendeten *Nicotiana*-Spezies als auch im natürlichen Wirt Maniok systemische und symptomatische Infektionen.

Die Gewebelokalisation von ICMV in systemisch infiziertem Maniok und Tabak wurde durch *in situ* Hybridisierungsstudien als phloemlimitiert bestimmt.

Um den Infektionsverlauf zu beobachten und die Funktion einzelner Offener Leserahmen (engl. *open reading frame*, ORF) zu bestimmen, wurden ICMV-Chimären erstellt, die anstelle des Kapsidprotein (engl. *coat protein*, CP) Gens das *green fluorescence protein* (GFP) Gen exprimierten. Damit konnte das Virus durch Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* nachgewiesen und die betroffenen Gewebe bestimmt werden. Die Phloemlimitierung von ICMV konnte dadurch bestätigt werden.

Die Funktion des ORF AV2, der nur in Alte-Welt-Begomoviren auftritt, wurde mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen analysiert. Neben der Expression des Fusionsproteins im viralen Hintergrund wurde ein GFP-AV2-Fusionsprotein unter der Kontrolle des konstitutiven *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S Promotors erstellt. Beide Konstrukte wurden in *Nicotiana benthamiana* exprimiert, entweder transient, in isolierten Blättern oder systemisch, in Pflanzen. Fusionsproteine beider Konstrukte ergaben dieselbe zelluläre Verteilung. Mikroskopische Analysen zeigten eine mögliche Assoziation von AV2 mit Plasmodesmata und eine Funktion beim viralen Zell-zu-Zell Transport. Demnach kann AV2 die Funktion eines redundanten Transportproteins haben, obwohl ICMV DNA B noch zusätzliche Transportproteine beisteuert. Möglich ist, dass AV2 ein genetisches Relikt eines monopartiten Begomovirus ist.

Summary

This work was part of the International Scientific Cooperation Project „Improved screening against selected systemic arboviruses“ financed by the European Union. The project investigated the growing ecological importance of geminiviruses in South India and Central Africa. Important crops, such as cassava, maize, beet, bean and tomato, are infected by geminiviruses, leading to enormous loss of yield. During the last decades infection rates of geminiviruses raised, either by the increased dissemination of whiteflies (*Bemisia tabaci*, Genn.), which functions as transfer vector for geminiviruses, and fast adaptation of viruses to environment and host plants, by mutation, recombination and pseudorecombination. Cassava production nearly broke down in parts of Africa, affected by cassava mosaic disease (CMD), and recovered only years later.

Investigations on biodiversity of CMD-causing begomoviruses in India are incomplete so far. This gap should be closed by this work, investigating the diversity of cassava-associated begomoviruses in South India. The results demonstrate, that beside the *Indian cassava mosaic virus* (ICMV), the *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV), is widely distributed on the Indian subcontinent. To challenge new CMD-resistant cassava cultivars for infection, cassava-infectious ICMV clones were established. ICMV DNA A and DNA B components were isolated and cloned from an experimentally infected tobacco plant. This clone induces CMD in experimentally used *Nicotiana spec.* as well as in the natural host cassava.

The tissue tropism of ICMV in systemically infected tobacco and cassava plants was determined to be phloem-limited using *in situ* hybridisation.

To monitor the progress of infection and to analyse the function of selected open reading frames (ORF), ICMV-chimeras were generated with the coat protein (CP) gene replaced by the *green fluorescence protein* (GFP) gene. Using these chimera, the virus could be detected in affected plant tissues *in vivo* by fluorescence microscopy. The phloem-limitation was confirmed using microscopic analysis of GFP-expressing chimera.

The function of ORF AV2, only present in Old World begomoviruses, was analysed using AV2-GFP fusion proteins. Therefore two constructs were established. One expressing the fusion protein within the viral background, the other construct was driven by the constitutive 35S promoter of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), expressing the fusion protein in the absence of any other viral proteins. Both

constructs were expressed in *Nicotiana benthamiana*, either transiently in detached leaves or systemically in plants. Fusion proteins, expressed from both constructs, were similarly distributed within plant cells. AV2 protein was probably associated with plasmodesmata and cell-to-cell movement. Therefore AV2 may function as a redundant movement protein, though ICMV DNA B provides additional movement proteins. A possible explanation would be that AV2 is a genetic relict from a monopartite begomovirus.