

УДК 578.274.8;57.083.22

БЕТАСАТЕЛЛИТ КУРЧАВОСТИ ЛИСТЬЕВ ХЛОПКА МУЛЬТАНА КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЛОКАЛИЗАЦИИ ГЕМИНИВИРУСОВ В РАСТЕНИЯХ¹

© 2021 г. Z. Iqbal^{a, *, **}, M. N. Sattar^b, M. Khurshid^c

^aCentral Laboratories, King Faisal University, Al-Ahsa, 31982 Kingdom of Saudi Arabia

^bDepartment of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture and Food Sciences, King Faisal University, Al-Ahsa, 31982 Kingdom of Saudi Arabia

^cInstitute of Biochemistry and Biotechnology, University of the Punjab, Quaid-e-Azam Campus, Lahore, 54590 Pakistan

*e-mail: zafar@kfu.edu.sa

**e-mail: zafariqbal2009@gmail.com

Поступила в редакцию 11.03.2020 г.

После доработки 30.04.2020 г.

Принята к публикации 27.05.2020 г.

Бетасателлит курчавости листьев хлопка Мультана (CLCuMB) – распространенный бетасателлит, который обычно встречается вместе с бегомовирусами, ассоциированными с заболеванием курчавости листьев хлопка (CLCuD), в Старом Свете. Этот бетасателлит имеет малоизбирательный характер репликации и транс-реплицируется широким кругом геминивирuсов. Бетасателлит CLCuMB кодирует единственную открытую рамку считывания (ORF) β C1, расположенную в комплементарном направлении, продукт которой определяет патогенность, выраженность симптомов и подавляет пост-транскрипционный и транскрипционный сайленсинг генов. Бетасателлит успешно используют в качестве вектора для доставки генов путем замены гена β C1 на целевой ген. В представленной работе для замены гена β C1 на ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) использован этот же подход и рассмотрено возможное применение полученного конструктора в качестве репортерного вектора, позволяющего изучать локализацию геминивирuсов *in planta*. С этой целью рекомбинантный CLCuMB, продуцирующий GFP (CLCuMB-GFP), был использован для совместного заражения растений *Nicotiana benthamiana* либо только вирусом курчавости листьев хлопка Кохрана (cotton leaf curl Kokharan virus, CLCuKoV), либо в комбинации с бетасателлитом CLCuMB дикого типа. Показано, что CLCuKoV поддерживал репликацию и системное распространение CLCuMB-GFP как сам по себе, так и в сочетании с CLCuMB дикого типа. Наличие CLCuMB-GFP было четко показано методами ПЦР и Саузерн-блотинга. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что модифицированный бетасателлит CLCuMB может быть использован как удобный инструмент для изучения локализации геминивирuсов *in planta*.

Ключевые слова: клеточная локализация, CLCuKoV, CLCuMB, экспрессионный вектор, зеленый флуоресцентный белок

DOI: 10.31857/S0026898421010079

ВВЕДЕНИЕ

Бетасателлиты (род *Betasatellite*, семейство *Tolecusatellitidae*) – это кольцевые одноцепочечные сателлиты, геном которых представлен молекулой ДНК длиной около 1.3 т.н. Бетасателлиты часто ассоциированы с геминивирuсами (особенно с бегомовирусами). Впервые бетасателлиты описаны в 1999 году [1], а к настоящему времени

охарактеризован 61 вид и около 1 300 их полно-размерных изолятов из 37 стран (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>) [2]. Бетасателлиты не относятся к типичным сателлитным ДНК-вирусам и используют вирус-помощник для распространения, размножения и упаковки [3]. Все функции бетасателлитов реализованы в единственной комплементарной открытой рамке считывания

¹ Текст представлен авторами на английском языке.

Сокращения: CLCuKoV (cotton leaf curl Kokharan virus) – вирус курчавости листьев хлопка Кохрана; CLCuMB (cotton leaf curl Multan betasatellite) – бетасателлит курчавости листьев хлопка Мультана; $S\beta^{C1-GFP+}$ – рекомбинантный вектор CLCuMB-GFP; GFP (green fluorescent protein) – зеленый флуоресцентный белок; Ko – ДНК CLCuKoV; C β – ДНК CLCuMB; п.о. – пары оснований.

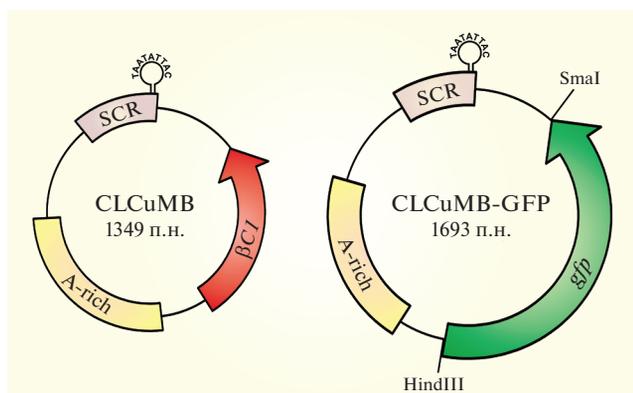


Рис. 1. Организация генома и примерный размер молекул CLCuMB и CLCuMB-GFP. Молекула CLCuMB кодирует ген единственного продукта, $\beta C1$, в комплементарном направлении, который заменили на ген белка GFP (*gfp*) с получением конструкции CLCuMB-GFP. Сайты рестрикции (*SmaI* и *HindIII*) для замены гена $\beta C1$ на ген *gfp* введены с помощью специального набора праймеров. SCR – консервативная область сателлитов; A-rich – обогащенная по аденину область.

(ORF), кодирующей продукт $\beta C1$ (рис. 1), который способствует повышенному накоплению вируса-помощника в растениях [4, 5], проявлению симптомов [1, 4, 6] и подавлению транскрипционного и посттранскрипционного сайленсинга генов в ответе растения-хозяина [7]. Белок $\beta C1$ локализован по периферии клетки и в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), предположительно участвуя в передвижении вируса [8]. Он также регулирует уровни микроРНК, что играет роль в процессах развития [9], связывается с ДНК и РНК [10], взаимодействует с факторами растения-хозяина [11], подавляет выработку жасмоновой кислоты [12], взаимодействует с белком PsbP, нарушая противовирусный ответ хозяина [13], а также взаимодействует с белком snRK1 [14].

Бетасателлит курчавости листьев хлопка Мультана (cotton leaf curl Multan betasatellite, CLCuMB) – единственный из бетасателлитов, часто встречающийся в Азии при заболевании курчавости листьев хлопка (cotton leaf curl disease, CLCuD), ассоциированном с бегомовирусом. CLCuMB транс-реплицируется с разнообразными геминивирусами, в том числе с вирусом курчавости листьев капусты (cabbage leaf curl virus, CabLCV) [15], вирусом курчавости листьев хлопка Кохрана (cotton leaf curl Kokharan virus, CLCuKoV) [5], вирусом курчавости листьев хлопка Гезиры (cotton leaf curl Gezira virus, CLCuGeV) [16], вирусом курчавости листьев хлопка Мультана (cotton leaf curl Multan virus, CLCuMuV), вирусом желтой курчавости листьев томата (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV), вирусом желтой скрученности бамии (okra yellow crinkle virus, OYCrV) [17], вирусом курчавости то-

мата Бангалора (tomato leaf curl Bangalore virus, ToLCBaV) [18], вирусом деформирующей курчавости листьев бамии (okra enation leaf curl virus, OELCuV) [19], вирусом курчавости листьев томата (tomato leaf curl virus, ToLCV) [20, 21], вирусом курчавости верхушки свеклы (beet curly top virus, BCTV) [22], вирусом курчавости листьев томата Нью-Дели (tomato leaf curl New Delhi virus, ToLCNDV) [23, 24] и вирусом хлоротической карликовости нута (chickpea chlorotic dwarf virus, CrCDV) [25]. Кодируемый хелперным вирусом белок Rep обеспечивает транс-репликацию бетасателлита после связывания с 9-нуклеотидной последовательностью ТААТАТТАС, которая является единственной гомологичной последовательностью, общей для бетасателлита и вируса-помощника [26]. Малоизбирательный характер репликации CLCuMB разнообразными геминивирусами указывает на то, что бетасателлит соответствует “гипотезе универсального итерона” и имеет уникальную последовательность, которая имитирует последовательности итеронов и допускает связывание с Rep [27]. Эта способность CLCuMB позволяет считать его чрезвычайно полезным инструментом в молекулярной биологии, который можно использовать в качестве экспрессионного вектора для изучения локализации белков *in planta*. К настоящему времени бетасателлит CLCuMB уже успешно модифицируют для продукции генов животных в растениях и для индуцированного вирусами сайленсинга генов путем замены ORF гена $\beta C1$ на целевой ген [22, 28, 29].

Бегомовирусы (род *Begomovirus*, семейство Geminiviridae) представляют серьезную угрозу для двудольных растений, как для травянистых, так и для деревьев. Бегомовирусы переносятся белокрылкой; их геном, либо представленный одной молекулой (и тогда называемый монопартичным), либо состоящий из двух компонентов (и называемый бипартичным), упакован в капсид двояной формы и представлен одноцепочечной молекулой ДНК размером около 2800 нуклеотидов [30]. Ассоциированные с вирусами одноцепочечные молекулы ДНК-сателлитов были обнаружены для подавляющего большинства монопартичных бегомовирусов и лишь для некоторых бипартичных бегомовирусов и мастревирусов (род *Mastrevirus*). К настоящему времени для геминивирусных инфекций охарактеризованы три различных типа одноцепочечных ДНК-сателлитных молекул: альфасателлиты, бетасателлиты и дельтасателлиты (обнаруживаемые как по отдельности, так и в различных комбинациях) [25, 31, 32].

Понимание и изучение роли бетасателлитов стало важной областью исследований в вирусологии растений за последние два десятилетия. Видоизменение и использование векторов на основе вирусов растений стало многообещающим ин-

струментом молекулярной биологии для экспрессии целевых генов в растениях. Вирусные векторы уже широко используются при продукции полезных белков в коммерческих масштабах, при доставке генетического материала, в генной инженерии, генной терапии и в производстве вакцин [33–35].

В представленной работе ORF гена βCI бетасателлита CLCuMB мы заменили на ген *gfp* для изучения клеточной и субклеточной локализации вируса CLCuKoV в присутствии и в отсутствие бетасателлита CLCuMB дикого типа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Производство инфекционных клонов. Геном CLCuMB (регистрационный номер #AJ298903) был использован для замены гена βCI на ген *gfp* без нарушения рамки считывания. Для создания рекомбинантного бетасателлита CLCuMB, экспрессирующего белок GFP (CLCuMB-GFP), был разработан специальный набор праймеров к фланкирующей области гена βCI , которые содержали сайт для эндонуклеазы HindIII в прямом праймере и сайты HindIII и SmaI в обратном (табл. 1). Продукт, полученный с использованием этих праймеров, клонировали в вектор pTZ57R/T, используя набор InsTAclone PCR cloning kit (“Thermo Fisher Scientific, Inc.”, США), секвенировали, обрабатывали эндонуклеазой рестрикции HindIII, очищали электрофоретически, лигировали для получения кольцевой молекулы и, наконец, использовали в качестве матрицы для амплификации остова CLCuMB (несущего введенные сайты рестрикции) с праймерами $\beta 01/\beta 02$ [36]. Продукт амплификации клонировали в вектор pTZ57R/T с получением конструкции pTZC β^{BC1-} . Область с частичными повторами длиной около 200 п.о. (включающая ориджин репли-

кации), полученную из плазмиды pTZC β^{BC1-} , клонировали в бинарный вектор pGreen0029 по сайтам BamHI и KpnI. Затем фрагмент длиной около 1000 п.о., полученный из pTZC β^{BC1-} , встраивали по сайтам KpnI с получением tandemных повторов (pGNC $\beta^{BC1-1.2}$). Ген белка GFP (фрагмент около 700 п.о.), обладающего сильным флуоресцентным сигналом [37], амплифицировали с использованием специфичных праймеров (табл. 1) и клонировали в вектор pGNC $\beta^{BC1-1.2}$ по сайтам HindIII и SmaI с получением конструкции C $\beta^{BC1-/GFP+}$ (рис. 1). Инфекционные клоны CLCuKoV (регистрационный номер # AJ496286) и CLCuMB описаны ранее [38].

Инfiltrация растений *Nicotiana benthamiana*.

Все конструкции в бинарных векторах использовали для трансформации агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* (штамм LBA 4404) и инfiltrации растений *N. benthamiana* на 06–08 стадии развития листьев, как описано ранее [39]. Растения выдерживали в климатической камере при отсутствии насекомых [5]. Растения ежедневно осматривали, проводили фотосъемку и регистрацию симптомов на 20 сутки после инокуляции (dpi). Производство белка GFP в обработанных растениях анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа LAS AF (“Leica”, Германия). Образцы листьев отбирали на 25 dpi для выделения геномной ДНК, чтобы определить наличие введенных вирусных компонентов с помощью ПЦР и Саузерн-блотинга.

Анализ инфекционности CLCuKoV методами ПЦР и гибридизации Саузерн-блот. Выделенные экстракты геномов [40] анализировали методами диагностической ПЦР и гибридизации Саузерн-блот. Для определения ДНК CLCuKoV (Co), CLCuMB (C β) и CLCuMB-GFP (C $\beta^{BC1-/GFP+}$) были использованы праймеры к гену белка оболочки CP (CLCKCP35sF/CLCKCP35sR), праймеры

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Праймер	Последовательность 5' → 3'	Примечание ^a
CLCK CP 35sF CLCK CP 35sR	GGTCGACGAATTATGTCGAAGCGACCAG GGATCCAATTC AATATCTATTAATTTGTCACG	Амплификация CP CLCuKoV
BETA GFP F BETA GFP R	GATAAGCTTATGAGTAAAGGAGAAG GGCCCGGGTTATTTGTATAGTTCATC	Клонирование и детекция <i>gfp</i>
BetaC1 F BetaC1 R	ATAAATCGATATGACAACGAGCGGAACAAA TGTTCCCGGGTTAAACGGTGAACCTTTTATT	Детекция C β
CBBF CBBR	TCGGAAGCTTTTCTGCTTATTTGATGGAAATG ATAAAAGCTTCACCCCGGGATTCCAAACAC AAACCAGCAATGCAT	Амплификация остова C β (без βCI)
$\beta 01$ $\beta 02$	GGTACCACTACGCTACGCAGCAGCC GGTACCTACCCTCCAGGGGTACA	Детекция и амплификация C β

^a Сокращения: C β – геном CLCuMB; CP – ген белка оболочки; *gfp* – ген GFP.

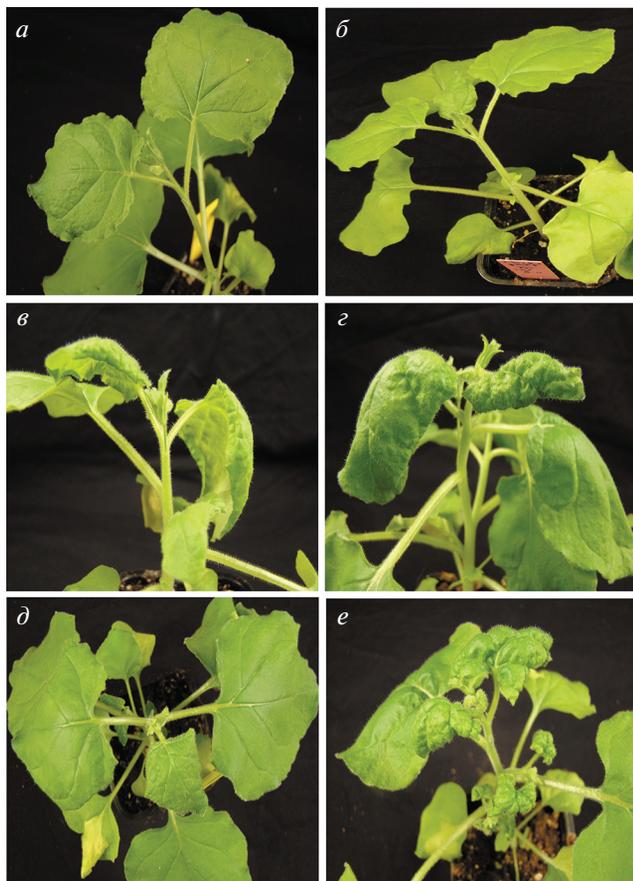


Рис. 2. Фенотип растений *N. benthamiana*, инокулированных вирусом CLCuKoV и конструкцией CLCuMB-GFP, в отсутствие и в присутствии бетасателлита CLCuMB. Необработанные (здоровые; а) и обработанные контрольным раствором (б), инокулированные Ко (в), Ко и Сβ (г), Ко и Сβ^{βC1-/GFP+} (д) или Ко, Сβ и Сβ^{βC1-/GFP+} (е). Растения сфотографированы на 25 сутки после инокуляции (dpi).

β01/β02 и праймеры ВЕТА GFP F/R (табл. 1) соответственно. Наблюдаемое *in vivo* наличие GFP в случае Сβ^{βC1-/GFP+} было подтверждено как в обработанных, так и в системно пораженных листьях с использованием праймеров, специфичных к гену *gfp* (ВЕТА GFP F/R; табл. 1). Для детекции Ко, Сβ и Сβ^{βC1-/GFP+} была использована гибридизация Саузерн-блот, как описано ранее [5]. ДНК GFP детектировали с помощью амплифицированного методом ПЦР радиоактивно меченного зонда к гену *gfp*, содержащего α-[³²P]dCTP. Для детектирования сигнала гибридизации использовали прибор Phosphor imager (Personal Molecular Imager FX; “Bio-Rad”, США).

Визуализация GFP. Продукцию белка GFP в обработанных растениях *N. benthamiana* сначала анализировали с помощью ручной УФ-лампы, а затем использовали флуоресцентный микроскоп

LAS AF (“Leica”) для наблюдения за флуоресценцией в обработанных и системно заразившихся листьях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ инфекционности и симптомов, ассоциированных с вирусом CLCuKoV, в отсутствие или в присутствии бетасателлита CLCuMB

Заражение вирусом CLCuKoV (ДНК-конструкция Ко) методом агробактериальной инфильтрации вызывало скручивание листьев и утолщение жилок у растений *N. benthamiana* на 12 dpi (рис. 2, табл. 2). Впоследствии степень выраженности фенотипа, ассоциированного с заражением, усиливалась и рост этих растений замедлялся по сравнению с необработанными (рис. 2). Наличие инфекции подтверждено с помощью как ПЦР, так и гибридизации Саузерн-блот (рис. 3а).

У растений *N. benthamiana*, обработанных одновременно ДНК-конструкциями Ко и Сβ, латентный период сокращался до 10 суток, а заражение выражалось в закручивании листьев книзу, задержке роста и утолщении жилок (рис. 2, табл. 2). У этих растений выраженность симптомов нарастала с течением времени и развивался хлороз (пожелтение листовых пластинок), чего не наблюдалось в случае обработки растений только конструкцией Ко (рис. 2). Методом гибридизации Саузерн-блот в листьях растений выявлены как Ко, так и Сβ, при этом уровень Ко был выше, чем в растениях, обработанных только Ко (рис. 3а, б).

Анализ инфекционности и симптомов, ассоциированных с вирусом CLCuKoV, в присутствии CLCuMB-GFP

Совместная обработка Ко и Сβ^{βC1-/GFP+} приводила к ослаблению фенотипических проявлений по сравнению с растениями, обработанными только конструкцией Ко. У всех обработанных растений *N. benthamiana* на 12 dpi проявлялся фенотип некоторой скрученности листьев и утолщения жилок (рис. 2, табл. 2). Диагностика методом ПЦР показала, что Ко успешно транс-реплицирует бетасателлитную конструкцию Сβ^{βC1-/GFP+} и формирует жизнеспособный комплекс (хотя ген βC1 отсутствует), причем обе конструкции обнаружены во вновь появляющихся системно зараженных листьях (табл. 2). Методом Саузерн-блотинга показано, что накопление Ко в этом случае сравнимо с таковым для растений, инокулированных только Ко (рис. 3а, в). Хотя конструкт Сβ^{βC1-/GFP+} достоверно детектировали методом ПЦР, по данным Саузерн-блотинга уровень Сβ^{βC1-/GFP+} был очень низким (рис. 3в).

Анализ инфекционности и симптомов, ассоциированных с CLCuKoV, в присутствии CLCuMB и CLCuMB-GFP

По сравнению с растениями, обработанными Ко и Сβ^{βC1-/GFP+}, у растений *N. benthamiana*, инокулированных одновременно Ко, Сβ и Сβ^{βC1-/GFP+}, были более выражены следующие симптомы: закручивание листьев книзу, уменьшение размера листьев и утолщение жилок (рис. 2, табл. 2). По сравнению же с растениями, обработанными только Ко, в присутствии Сβ сокращался латентный период (который составлял 10 суток), а степень выраженности симптомов усиливалась вплоть до начала цветения и развивался хлороз, чего не наблюдалось у растений, инокулированных только Ко. Транс-репликация Сβ и Сβ^{βC1-/GFP+}, жизнеспособность и стабильность Сβ^{βC1-/GFP+} подтверждены методом ПЦР. Показано, что Сβ^{βC1-/GFP+} сохраняется вплоть до 25 dpi (данные не приведены). Саузерн-блот-анализ выявил более высокое накопление Ко и Сβ (рис. 3а, б), в то время как Сβ^{βC1-/GFP+} накапливался на более низком уровне (рис. 3в).

Флуоресценция GFP в растениях N. benthamiana

Для всех растений, инокулированных *gfp*-содержащей конструкцией, флуоресценцию белка GFP в сайтах инокуляции наблюдали сначала при помощи УФ-лампы, а затем методом флуоресцентной микроскопии. В необработанных (системно зараженных) листьях с помощью УФ-лампы флуоресценция не детектировалась. Впоследствии как инокулированные, так и неинокулированные ли-

стья исследовали методом флуоресцентной микроскопии. Во всех инокулированных листьях детектировали заметный уровень флуоресценции GFP по сравнению с фрагментами ложно обработанного листа (рис. 4). Тем не менее, в системно зараженных листьях выявлены лишь разрозненные участки флуоресценции GFP в растениях, обработанных конструкцией CLCuMB-GFP совместно с Ко или Ко + CLCuMB (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Геминивирuсы реплицируются с помощью интермедиатной двухцепочечной ДНК в ядрах инфицированных клеток растений [26, 41]. Много усилий было приложено для того, чтобы установить точную локализацию геминивирuсов в клетках растения-хозяина. Уже показано, что ДНК геминивирuсов локализуется исключительно в ядре зараженной клетки хозяина. Например, в ходе инфекции вирусом золотистой мозаики томата (tomato golden mosaic virus; TGMV) растений *N. benthamiana* вирионы аккумулировались в виде паракристаллических скоплений в ядрах – как в клетках сосудистой системы, так и в других клетках [42]. Конденсация хроматина и изменения в структуре ядра, наблюдаемые при заражении TGMV, также были обусловлены присутствием вирусной ДНК в ядре [43]. Кроме того, исследования гибридизации *in situ* как монопартирных [44, 45], так и бипартирных [46, 47] геминивирuсов показали, что вирусная ДНК накапливается в ядрах инфицированных клеток, но обычно ограничивается тканями проводящей системы. До на-

Таблица 2. Анализ инфекционной способности и выраженности симптомов, вызванных вирусом CLCuKoV, в присутствии и в отсутствие CLCuMB и CLCuMB-GFP

Инокулянт ^а	Анализ инфекционности									Симптомы ^с	Латентный период, сутки
	ПЦР-диагностика (инфицированные растения/инокулированные растения)						Саузерн-блотинг ^б				
	эксперимент I			эксперимент II			Ко	Сβ	Сβ ^{βC1-/GFP+}		
	Ко	Сβ	Сβ ^{βC1-/GFP+}	Ко	Сβ	Сβ ^{βC1-/GFP+}					
Ко	3/3	-/-	-/-	3/3	-/-	-/-	(+)	-/-	n.t.	LC и VT	12
Ко + Сβ	5/5	5/5	-/-	5/5	5/5	-/-	(+)	(+)	n.t.	DLC, VT и ST	10
Ко + Сβ ^{βC1-/GFP+}	5/5	-/-	5/5	5/5	-/-	5/5	(+)	n.t.	(+)	LC и VT	12
Ко + Сβ + Сβ ^{βC1-/GFP+}	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	(+)	(+)	(+)	SLC, VT и ST	10
Контроль	0/3	-/-	-/-	0/3	-/-	-/-	(-)	(-)	(-)	NS	

^а Ко – ДНК вируса CLCuKoV, Сβ – ДНК бетасателлита CLCuMB, Сβ^{βC1-/GFP+} – конструкция на основе Сβ, экспрессирующая GFP. ^б Детекция Ко, Сβ and Сβ^{βC1-/GFP+} гибридизацией Саузерн-блот обозначена как позитивная (+), негативная (-) или неанализированная (n.t.). ^с LC – скручивание листьев, DLC – закручивание листьев книзу, SLC – сильное закручивание листьев, VT – утолщение жилок, ST – отставание в росте, NS – отсутствие симптомов.

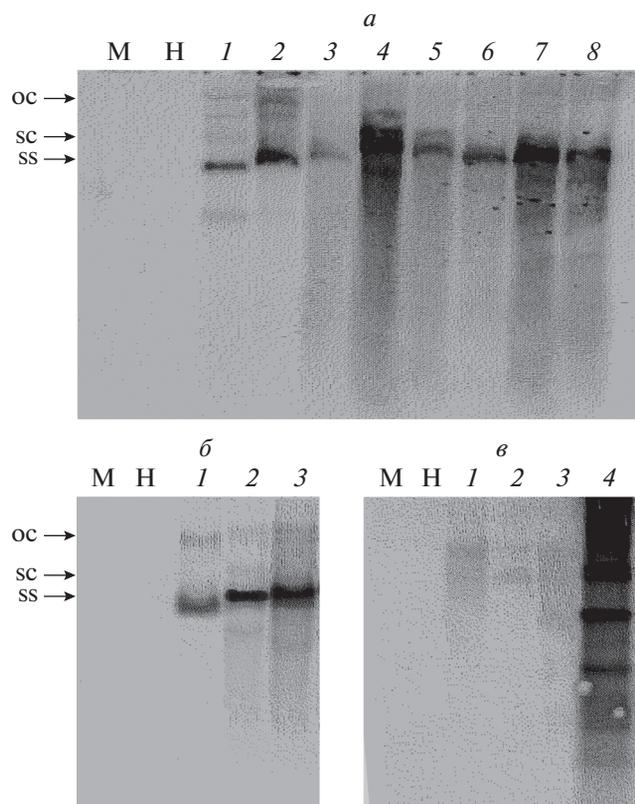


Рис. 3. Детекция ДНК CLCuKoV, CLCuMB, и CLCuMB-GFP гибридизацией Саузерн-блот. ДНК CLCuKoV обнаруживали с помощью радиоактивно меченного ампликона гена *CP*, ДНК CLCuMB – с использованием радиоактивно меченного ампликона гена βCI , а ДНК GFP – с помощью амплифицированного методом ПЦР радиоактивно меченного гена *gfp*. Все зонды содержали радиоактивную метку α -[^{32}P]dCTP. Образцы ДНК, нанесенные на гель, были получены из верхних листьев ложнообработанных (контрольных) растений (дорожка М), либо необработанных растений (Н). *a* – ДНК CLCuKoV (0.5 нг) нанесена как положительный контроль (дорожка 1), далее нанесены образцы ДНК, выделенные из растений, обработанных Ко (дорожки 2 и 3), Ко и С β (дорожка 4), Ко и С $\beta^{BC1-/GFP+}$ (дорожки 5 и 6), а также одновременно Ко, С β и С $\beta^{BC1-/GFP+}$ (дорожки 7 и 8). *б* – ДНК CLCuMB (0.5 нг) нанесена как положительный контроль (дорожка 1), Ко и С β (дорожка 2), Ко, С β и С $\beta^{BC1-/GFP+}$ (дорожка 3). *в* – Ко и С $\beta^{BC1-/GFP+}$ (дорожка 1), Ко, С β и С $\beta^{BC1-/GFP+}$ (дорожки 2 и 3), ДНК С $\beta^{BC1-/GFP+}$ (1 нг) в качестве положительного контроля (дорожка 4). Репликативные формы вирусной ДНК обозначены как SS – одноцепочечная, SC – суперскрученная, OC – открытая кольцевая.

стоящего времени в исследованиях по локализации белков с использованием GFP его ген присоединяли к отдельным генам бегомовируса или бетасателлита, таким как *V2*, *CP*, *C4* или βCI [48–50], с целью выяснить роль этих генов в перемещении вируса или в его локализации. До настоящего момента не было исследований, в которых для выяснения локализации бегомовируса в растении-хозяине кодируемая вирусом ORF была бы заменена на ген *gfp*.

Геминивирусы реплицируются самостоятельно с очень высокой скоростью, тем самым обеспечивая эффективную амплификацию любого гена, клонированного в их геном [51]. Однако замена вирусного гена на чужеродный может повлиять на основные функции вируса, а встраивание дополнительного гена приведет к увеличению размера вирусного генома, что может нарушить про-

цесс сборки вирионов. Но эти проблемы можно обойти, если использовать в качестве носителя гена ДНК-сателлиты [52, 53].

Бетасателлит CLCuMB использован нами для экспрессии гена *gfp* вместо βCI (рис. 1). Полученный рекомбинантный CLCuMB-GFP успешно реплицировался и системно перемещался по растению с помощью родственного хелперного бегомовируса CLCuKoV. Ранее CLCuMB был использован с близким бегомовирусом CLCuMuV и неродственным куртовivirusом BCTV для сайленсирования гена *GUS* и экспрессии гена петунии *ChsA*, причем тоже путем замены ORF βCI [28]. В результате этого исследования было показано, что совместное введение рекомбинантного бетасателлита CLCuMB и хелперного вируса приводит к сайленсированию гена *GUS* в растениях петунии, а в трансгенных растениях табаках была достигнута гиперпродук-

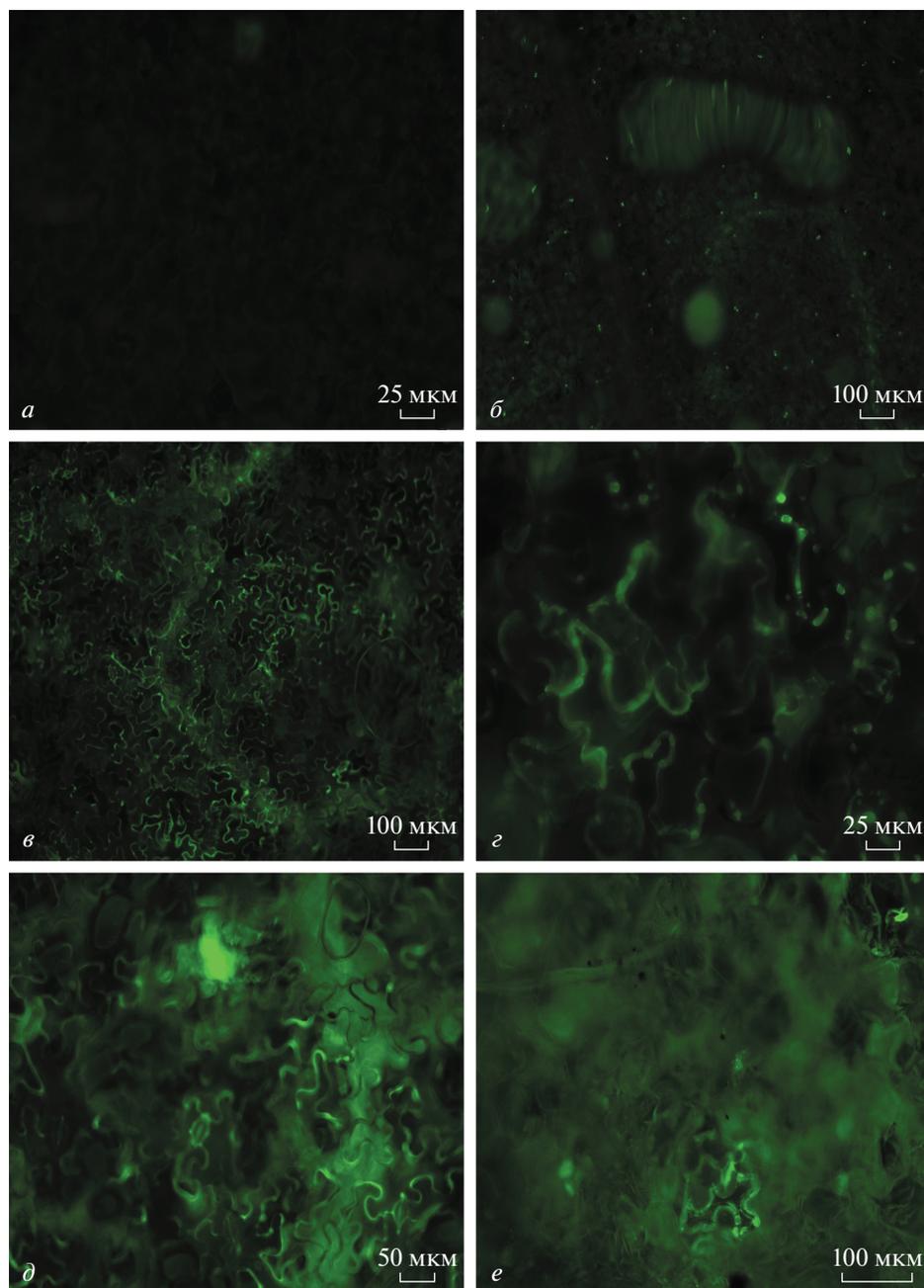


Рис. 4. Анализ флуоресценции GFP в листьях растений *N. benthamiana*. Листья ложно инфильтрованы (*a*), инокулированы конструкцией $C\beta^{\beta C1}/GFP+$ (*b*) или $Ko + C\beta + C\beta^{\beta C1}/GFP+$ (*c, e*); системно зараженные листья растений, инокулированных $Ko + C\beta^{\beta C1}/GFP+$ (*d*) или $Ko + C\beta + C\beta^{\beta C1}/GFP+$ (*e*).

ция белка ChsA. Полученные нами результаты согласуются с этими данными. Таким образом, бетасателлит CLCuMB может быть использован как инструмент для эффективной доставки целевых генов в растения. В аналогичном исследовании авторы использовали возможности CLCuMB для доставки гена В-клеточной лимфомы-2 (*Bcl-2*) наряду с двумя генами оболочки ВИЧ-1, *gag* и *p24*, в растения *N. benthamiana* и *N. glutinosa*, в резуль-

тате показав успешную экспрессию генов *p24* и *Bcl-2* в растениях [22, 54]. Бетасателлит CLCuMB использовали и для развития у растений устойчивости к желперным бегомовирусам. Для этого ген барназы разрезали и встраивали во фланкирующие области CLCuMB таким образом, чтобы он активировался белком Rep, который кодируется желперным бегомовирусом. Когда растения, обладающие кассетой с бетасателлитом и разделен-

ным геном барназы, заражали вирусом ToLCV, молекулы бетасателлита реплицировались, приводя к экспрессии активного гена барназы, что в свою очередь приводило к разрушению инфицированной клетки [55].

Известно несколько исследований, в которых определяли характер локализации белка β С1 в растительной клетке путем создания химерного белка β С1 и репортерных генов [11, 56–59]. В них показано, что белок β С1 формирует мультимерные комплексы: точечные или гранулярные тельца – и локализуется по периферии клетки и в ядре. Изучению различных бетасателлитов уделяется большое внимание с целью понять их роль в развитии геминивиральных инфекций. Несмотря на это, только в одной работе описана локализация бегомовируса в присутствии бетасателлита, что удалось выявить методом гибридизации *in situ* [21]. Поскольку CLCuMB транс-реплицируется разными геминивиралами, использование GFP-продуцирующей конструкции на основе этого бетасателлита позволит выяснить как локализацию геминивирала в различных тканях растения, так и лучше понять механизм их репликации.

Обработка растений одновременно рекомбинантной конструкцией CLCuMB-GFP, вирусом CLCuKoV и бетасателлитом дикого типа CLCuMB приводила к более выраженной симптоматике по сравнению с растениями, инокулированными CLCuKoV и CLCuMB. Ранее сообщалось, что делеция А-обогащенного участка китайского бетасателлита желтой курчавости листьев томата приводила к смягчению симптомов у растений *N. benthamiana* [60]. Следовательно, серьезность симптомов, вероятно, может быть связана с наличием двух А-богатых участков, один из которых содержится в конструкции CLCuMB-GFP, а второй – в бетасателлите CLCuMB дикого типа. Однако эту гипотезу еще предстоит подтвердить.

В листьях системно зараженных геминивиралом растений *N. benthamiana*, инокулированных конструкцией CLCuMB-GFP, флуоресценцию наблюдали только в отдельных участках листа. Возможно, это определяется паттерном локализации геминивирала, так как их репликация ограничена флоэмой и они остаются связанными с тканями проводящей системы [46]. С этими данными согласуются полученные нами результаты: методом гибридизации Саузерн-блот выявлен очень низкий уровень продукта CLCuMB-GFP. Кроме того, раньше показано, что CLCuMB локализован в клетках флоэмы и не способен высвободить монопартичный бегомовирус из этих клеток, в отличие от некоторых бипартичных бегомовирусов [21]. Низкое содержание GFP может быть связано и с размером конструкции CLCuMB-GFP, так как она содержит почти на 350 нуклеотидов больше, чем CLCuMB дикого типа. Хотя

нет прямых сведений относительно влияния размера на продуктивность ДНК-сателлитов, ранее показано, что при введении вставки в геномную последовательность вируса полосатости кукурузы или африканского вируса мозаики маниока сильно снижается эффективность заражения [61, 62], а увеличенный в размере вирусный геном не выдерживает давления отбора на упаковку и транспорт вирусных частиц. Логично предположить, что это справедливо и в случае CLCuMB-GFP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Используя световую микроскопию, мы исследовали транс-репликацию CLCuMB-GFP с геминивиралом CLCuKoV. На основании полученных результатов можно рассматривать конструкцию CLCuMB-GFP в качестве перспективного репортерного вектора для исследования локализации геминивирала *in planta*. В дальнейшем планируется продолжить это исследование с использованием конфокальной микроскопии, что позволит выявить новые возможности CLCuMB-GFP и расширить наши знания по локализации геминивирала в клетках растения.

Авторы выражают искреннюю благодарность Деканату научных исследований Университета им. Короля Фейсала, Королевство Саудовская Аравия (Deanship of Scientific Research, King Faisal University, Kingdom of Saudi Arabia) за публикацию этой исследовательской работы в рамках гранта Nasher track Grant No. 186401.

Статья не содержит исследований с участием людей или животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Концепция предложена и экспериментально реализована Z.I. Саузерн-блот-гибридизацию проводили Z.I. и M.N.S, они же подготовили первую рукопись. Корректурa выполнена М.К. Окончательный вариант манускрипта прочитан и одобрен всеми авторами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saunders K., Stanley J. (1999) A nanovirus-like component associated with yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. *Virology*. **264**, 142–152.
2. Silva J.C.F., Carvalho T.F.M., Basso M.F., Deguchi M., Pereira W.A., Sobrinho R.R., Vidigal P.M.P., Brustolini O.J.B., Silva F.F., Dal-Bianco M., Fontes R.L.F., Santos A.A., Zerbini F.M., Cerqueira F.R., Fontes E.P.B. (2017) Geminivirus data warehouse: a database enriched with machine learning approaches. *BMC Bioinf.* **18**, 240–240.
3. Briddon R.W., Bull S.E., Amin I., Idris A.M., Mansoor S., Bedford I.D., Dhawan P., Rishi N., Siwatch S.S., Ab-

- del-Salam A.M., Brown J.K., Zafar Y., Markham P.G. (2003) Diversity of DNA β , a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology*. **312**, 106–121.
4. Briddon R.W., Mansoor S., Bedford I.D., Pinner M.S., Saunders K., Stanley J., Zafar Y., Malik K.A., Markham P.G. (2001) Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease. *Virology*. **285**, 234–243.
 5. Iqbal Z., Sattar M.N., Kvarnheden A., Mansoor S., Briddon R.W. (2012) Effects of the mutation of selected genes of cotton leaf curl Kokhran virus on infectivity, symptoms and the maintenance of cotton leaf curl Multan betasatellite. *Virus Res.* **169**, 107–116.
 6. Qazi J., Amin I., Mansoor S., Iqbal J., Briddon R.W. (2007) Contribution of the satellite encoded gene β C1 to cotton leaf curl disease symptoms. *Virus Res.* **128**, 135–139.
 7. Zhou X. (2013) Advances in understanding begomovirus satellites. *Ann. Rev. Phytopathol.* **51**, 357–381.
 8. Saeed M. (2007) The role of geminiviral DNA β -satellite in viral pathogenicity and movement. In: *School of Agriculture, Food and Wine*. University of Adelaide: Urbrac.
 9. Amin I., Patil B.L., Briddon R.W., Mansoor S., Fauquet C.M. (2011) A common set of developmental miRNAs are upregulated in *Nicotiana benthamiana* by diverse begomoviruses. *Virol. J.* **8**, 143.
 10. Cui X., Li G., Wang D., Hu D., Zhou X. (2005) A begomovirus DNA β -encoded protein binds DNA, functions as a suppressor of RNA silencing, and targets the cell nucleus. *J. Virol.* **79**, 10764–10775.
 11. Cheng X., Wang X., Wu J., Briddon R.W., Zhou X. (2011) β C1 encoded by tomato yellow leaf curl China betasatellite forms multimeric complexes *in vitro* and *in vivo*. *Virology*. **409**, 156–162.
 12. Zhang T., Luan J.B., Qi J.F., Huang C.J., Li M., Zhou X.P., Liu S.S. (2012) Begomovirus–whitefly mutualism is achieved through repression of plant defences by a virus pathogenicity factor. *Mol. Ecol.* **21**, 1294–1304.
 13. Gnanasekaran P., Ponnusamy K., Chakraborty S. (2019) A geminivirus betasatellite encoded β C1 protein interacts with PsbP and subverts PsbP-mediated antiviral defence in plants. *Mol. Plant Pathol.* **20**, 943–960.
 14. Kamal H., Minhas F.U.A., Farooq M., Tripathi D., Hamza M., Mustafa R., Khan M.Z., Mansoor S., Pappu H.R., Amin I. (2019) *In silico* prediction and validations of domains involved in *Gossypium hirsutum* SnRK1 protein interaction with cotton leaf curl Multan betasatellite encoded β C1. *Front. Plant Sci.* **10**.
 15. Nawaz-ul-Rehman M.S., Briddon R.W., Fauquet C.M. (2012) A melting pot of Old World begomoviruses and their satellites infecting a collection of *Gossypium* species in Pakistan. *PLoS One*. **7**, e40050.
 16. Tahir M.N., Amin I., Briddon R.W., Mansoor S. (2011) The merging of two dynasties – identification of an African cotton leaf curl disease-associated begomovirus with cotton in Pakistan. *PLoS One*. **6**, e20366.
 17. Sattar M.N., Lighthart M., Kvarnheden A. (2019) Compatibility and interaction of begomoviruses and DNA-satellites causing leaf curl disease in Asia, Africa and Mediterranean Region. *Eur. J. Plant Pathol.* **155**, 111–124.
 18. Tiwari N., Padmalatha K., Singh V., Haq Q., Malathi V. (2010) Tomato leaf curl Bangalore virus (ToLCBV): infectivity and enhanced pathogenicity with diverse beta-satellites. *Arch. Virol.* **155**, 1343–1347.
 19. Hameed U., Zia-Ur-Rehman M., Herrmann H.-W., Haider M.S., Brown J.K. (2014) First report of okra enation leaf curl virus and associated cotton leaf curl Multan betasatellite and cotton leaf curl Multan alpha-satellite infecting cotton in Pakistan: a new member of the cotton leaf curl disease complex. *Plant Dis.* **98**, 1447–1447.
 20. Borah B., Cheema G., Gill C., Dasgupta I. (2010) A geminivirus-satellite complex is associated with leaf deformity of mentha (Mint) plants in Punjab. *Indian J. Virol.* **21**, 103–109.
 21. Eini O., Rasheed M., Randles J. (2017) *In situ* hybridization and promoter analysis reveal that cotton leaf curl Multan betasatellite localizes in the phloem. *Acta Virol.* **61**, 23–31.
 22. Kharazmi S., Ataie Kachoie E., Behjatnia S.A.A. (2016) Cotton leaf curl Multan betasatellite DNA as a tool to deliver and express the human B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) gene in plants. *Mol. Biotechnol.* **58**, 362–372.
 23. Saeed M. (2010) Tomato leaf curl New Delhi virus DNA A component and cotton leaf curl Multan betasatellite can cause mild transient symptoms in cotton. *Acta Virol.* **54**, 317–318.
 24. Iqbal Z., Shafiq M., Ali I., Mansoor S., Briddon R.W. (2017) Maintenance of cotton leaf curl Multan betasatellite by tomato leaf curl New Delhi virus-analysis by mutation. *Front. Plant Sci.* **8**, 2208.
 25. Hamza M., Tahir M.N., Mustafa R., Kamal H., Khan M.Z., Mansoor S., Briddon R.W., Amin I. (2018) Identification of a dicot infecting mastrevirus along with alpha- and betasatellite associated with leaf curl disease of spinach (*Spinacia oleracea*) in Pakistan. *Virus Res.* **256**, 174–182.
 26. Hanley-Bowdoin L., Settlege S.B., Orozco B.M., Nagar S., Robertson D. (2000) Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Plant Sci.* **35**, 105–140.
 27. Nawaz-ul-Rehman M.S., Mansoor S., Briddon R.W., Fauquet C.M. (2009) Maintenance of an Old World betasatellite by a New World helper begomovirus and possible rapid adaptation of the betasatellite. *J. Virol.* **83**, 9347–9355.
 28. Kharazmi S., Behjatnia S.A.A., Hamzehzarghani H., Niazi A. (2012) Cotton leaf curl Multan betasatellite as a plant gene delivery vector trans-activated by taxonomically diverse geminiviruses. *Arch. Virol.* **157**, 1269–1279.
 29. Kumar J., Gunapati S., Kumar J., Kumari A., Kumar A., Tuli R., Singh S.P. (2014) Virus-induced gene silencing using a modified betasatellite: a potential candidate for

- functional genomics of crops. *Arch. Virol.* **159**, 2109–2113.
30. Hanley-Bowdoin L., Bejarano E.R., Robertson D., Mansoor S. (2013) Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 777–788.
 31. Kumar J., Kumar J., Singh S.P., Tuli R. (2014) Association of satellites with a mastrevirus in natural infection: complexity of Wheat dwarf India virus disease. *J. Virol.* **88**, 7093–7104.
 32. Fiallo-Olivé E., Tovar R., Navas-Castillo J. (2016) Deciphering the biology of deltasatellites from the New World: maintenance by New World begomoviruses and whitefly transmission. *New Phytol.* **212**, 680–692.
 33. Rybicki E.P. (2009) Plant-produced vaccines: promise and reality. *Drug Discov. Today.* **14**, 16–24.
 34. Chung H.Y., Lee H.H., Kim K.I., Chung H.Y., Hwang-Bo J., Park J.H., Sunter G., Kim J.B., Shon D.H., Kim W., Chung I.S. (2011) Expression of a recombinant chimeric protein of hepatitis A virus VP1-Fc using a replicating vector based on Beet curly top virus in tobacco leaves and its immunogenicity in mice. *Plant Cell Rep.* **30**, 1513–1521.
 35. Baulcombe D.C., Chapman S., Santa Cruz S. (1995) Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J.* **7**, 1045–1053.
 36. Briddon R.W., Bull S.E., Mansoor S., Amin I., Markham P.G. (2002) Universal primers for the PCR-mediated amplification of DNA β : a molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Mol. Biotechnol.* **20**, 315–318.
 37. Siemering K.R., Golbik R., Sever R., Haseloff J. (1996) Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr. Biol.* **6**, 1653–1663.
 38. Mansoor S., Briddon R.W., Bull S.E., Bedford I.D., Bashir A., Hussain M., Saeed M., Zafar M.Y., Malik K.A., Fauquet C., Markham P.G. (2003) Cotton leaf curl disease is associated with multiple monopartite begomoviruses supported by single DNA β . *Arch. Virol.* **148**, 1969–1986.
 39. Hussain M., Mansoor S., Iram S., Zafar Y., Briddon R.W. (2007) The hypersensitive response to tomato leaf curl New Delhi virus nuclear shuttle protein is inhibited by transcriptional activator protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**, 1581–1588.
 40. Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**, 19–21.
 41. Gutierrez C. (2000) DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO J.* **19**, 792–799.
 42. Rushing A.E., Sunter G., Gardiner W.E., Dute R.R., Bisaro D.M. (1987) Ultrastructural aspects of tomato golden mosaic virus infection in tobacco. *Phytopathology.* **77**, 1231–1236.
 43. Bass H.W., Nagar S., Hanley-Bowdoin L., Robertson D. (2000) Chromosome condensation induced by geminivirus infection of mature plant cells. *J. Cell Sci.* **113**, 1149–1160.
 44. Morilla G., Krenz B., Jeske H., Bejarano E.R., Wege C. (2004) Tête à tête of tomato yellow leaf curl virus and tomato yellow leaf curl Sardinia virus in single nuclei. *J. Virol.* **78**, 10715–10723.
 45. Rojas M.R., Jiang H., Salati R., Xoconostle-Cázares B., Sudarshana M.R., Lucas W.J., Gilbertson R.L. (2001) Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, tomato yellow leaf curl virus. *Virology.* **291**, 110–125.
 46. Morra M.R., Petty I.T.D. (2000) Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *Plant Cell.* **12**, 2259–2270.
 47. Wege C., Saunders K., Stanley J., Jeske H. (2001) Comparative analysis of the tissue tropism of bipartite geminiviruses. *J. Phytopathol.* **149**, 359–368.
 48. Poornima Priyadarshini C.G., Ambika M.V., Tippeeswamy R., Savithri H.S. (2011) Functional characterization of coat protein and V2 involved in cell to cell movement of cotton leaf curl Kokhran virus-Dabawali. *PLoS One.* **6**, e26929.
 49. Chowda-Reddy R.V., Achenjang F., Felton C., Eta-rock M.T., Anangfac M.-T., Nugent P., Fondong V.N. (2008) Role of a geminivirus AV2 protein putative protein kinase C motif on subcellular localization and pathogenicity. *Virus Res.* **135**, 115–124.
 50. Teng K., Chen H., Lai J., Zhang Z., Fang Y., Xia R., Zhou X., Guo H., Xie Q. (2010) Involvement of C4 protein of beet severe curly top virus (family *Geminiviridae*) in virus movement. *PLoS One.* **5**, e11280.
 51. Hayes R.J., Petty I.T.D., Coutts R.H.A., Buck K.W. (1988) Gene amplification and expression in plants by a replicating geminivirus vector. *Nature.* **334**, 179–182.
 52. Scholthof H.B., Scholthof K.-B.G., Jackson A.O. (1996) Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* **34**, 299–323.
 53. Peretz Y., Mozes-Koch R., Akad F., Tanne E., Czosnek H., Sela I. (2007) A universal expression/silencing vector in plants. *Plant Physiol.* **145**, 1251–1263.
 54. Kachoie A.E., Behjatnia S.A.A., Kharazmi S. (2018) Expression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) coat protein genes in plants using cotton leaf curl Multan betasatellite-based vector. *PLoS One.* **13**, e0190403.
 55. Pakniat-Jahromy A., Behjatnia S.A.A., Dry I.B., Izadpanah K., Rezaian M.A. (2010) A new strategy for generating geminivirus resistant plants using a DNA beta-satellite/split barnase construct. *J. Virol. Methods.* **170**, 57–66.
 56. Kumar P.P., Usha R., Zrachya A., Levy Y., Spanov H., Gafni Y. (2006) Protein-protein interactions and nuclear trafficking of coat protein and β C1 protein associated with Bhendi yellow vein mosaic disease. *Virus Res.* **122**, 127–136.
 57. Saeed M., Y. Zafar Y., Randles J.W., Rezaian M.A. (2007) A monopartite begomovirus-associated DNA β satellite substitutes for the DNA B of a bipartite begomovirus to permit systemic infection. *J. Gen. Virol.* **88**, 2881–2889.

58. Sharma P., Ikegami M. (2010) Identification of the virulence factors and suppressors of posttranscriptional gene silencing encoded by Ageratum yellow vein virus, a monopartite begomovirus. *Virus Res.* **149**, 19–27.
59. Zhang S.C., Wege C., Jeske H. (2001) Movement proteins (BC1 and BV1) of abutilon mosaic geminivirus are cotransported in and between cells of sink but not of source leaves as detected by green fluorescent protein tagging. *Virology.* **290**, 249–260.
60. Tao X., Qing L., Zhou X. (2004) Function of A-rich region in DNA β associated with tomato yellow leaf curl China virus. *Chin. Sci. Bull.* **49**, 1490–1493.
61. Etesami P., Watts J., Stanley J. (1989) Size reversion of african cassava mosaic virus coat protein gene deletion mutants during infection of *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.* **70**, 277–289.
62. Shen W.-H., Hohn B. (1991) Mutational analysis of the small intergenic region of maize streak virus. *Virology.* **183**, 721–730.

COTTON LEAF CURL MULTAN BETASATELLITE AS A TOOL TO STUDY THE LOCALIZATION OF GEMINIVIRUSES IN PLANTS

Z. Iqbal^{1, *, **}, M. N. Sattar², and M. Khurshid³

¹Central Laboratories, King Faisal University, Al-Ahsa, 31982 Kingdom of Saudi Arabia

²Department of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture and Food Sciences, King Faisal University, Al-Ahsa, 31982 Kingdom of Saudi Arabia

³Institute of Biochemistry and Biotechnology, University of the Punjab, Quaid-e-Azam Campus, Lahore, 54590 Pakistan

*e-mail: zafar@kfu.edu.sa

**e-mail: zafariqbal2009@gmail.com

Cotton leaf curl Multan betasatellite (CLCuMB) is a ubiquitous betasatellite commonly found along with cotton leaf curl disease (CLCuD) associated begomoviruses in the Old World. It has a promiscuous replicative nature and trans-replicated by a diverse range of geminiviruses. CLCuMB encodes a single ORF, $\beta C1$, in the complementary direction and has pathogenicity, symptoms determinant, suppressor of post-transcription and transcription gene silencing functions. After substituting the $\beta C1$ gene with the target gene, it has been used successfully as a gene delivery vector. In the present study, the $\beta C1$ gene of CLCuMB was substituted with the green fluorescent protein (GFP) gene, and the resulting construct utilized as a reporter vector to decipher *in planta* localization of geminiviruses. The recombinant CLCuMB expressing GFP (CLCuMB-GFP) was co-inoculated to *Nicotiana benthamiana* plants either with Cotton leaf curl Kokharan virus (CLCuKoV) alone or in a combination with the wild type CLCuMB to investigate the objectives of the study. Results showed that CLCuKoV successfully supported the replication and systemic movement of CLCuMB-GFP either alone or in the presence of wild type CLCuMB. The presence of CLCuMB-GFP was readily detected with PCR and Southern blot hybridization. The modified CLCuMB may serve as a tool useful for *in planta* localization of geminiviruses.

Keywords: cellular localization, CLCuKoV, CLCuMB, expression vector, green fluorescent protein