

## Site-directed mutagenesis를 이용한 BCTV ORF L4의 기능 분석

박을용 · 이석찬\*

성균관대학교 생명자원과학대학 유전공학과

### Functional Analysis of BCTV ORF L4 by Site-directed Mutagenesis

Eul Yong Park and Suk Chan Lee\*

Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University,  
Suwon 440-746, Korea

**ABSTRACT:** Beet curly top virus (BCTV) mutant has been constructed in vitro that contain G-to-T transversions at nucleotide 2727 within overlapping open reading frames (ORFs) L1 and L4. The mutations introduce termination codon in ORF L4 without affecting the amino acid encoded by ORF L1. When agroinoculated into *Arabidopsis thaliana* the mutant caused mild stunting and stem curling, but not the callus induction and hyperplasia on infected tissues of Sei-O ecotype. However, this mutant was not infectious on Col-O. Levels of single stranded DNA forms were similar in mutant and wild type BCTV infections. The DNA quantitation data showed that the DNA of BCTV-L4 mutant virus was accumulated in shoot tips, infection origin and roots with similar levels to those of wild type virus infected. Three tissues of asymptomatic ecotype Col-O also had as much as virus DNA from wild type virus infections. In both ecotypes infected with BCTV-Logan and BCTV-L4 mutant, root tissues contained more virus DNA than any other tissues by the Southern hybridization data. The results suggest that ORF L4 encodes a functional protein that is a major determinant of pathogenesis that might affect the hyperplastic response of the host to BCTV infection.

**Key words:** Arabidopsis, BCTV, L4, site-directed mutagenesis.

Single stranded DNA(ssDNA)를 genome으로 갖는 beet curly top virus(BCTV)는 geminivirus group에 속하며 monopartite의 유전자를 가지며 유전자의 크기는 약 3 kb 이다(1,5). BCTV는 전형적인 icosahedral 모양의 외피단백질을 가지며 전자현미경 관찰시 twin-moon의 외부 형태를 보인다. BCTV는 1909년 Ball에 의하여 처음 발견된 뒤, 지금까지 BCTV-Logan을 비롯한 4개 분리주의 DNA 염기서열이 결정되었다(12, 14, 16). BCTV는 약 26여종이 속한 geminivirus group 중에서 기주범위가 가장 넓어 약 44개의 쌍자엽과(科)와 이들 과에 포함된 300 여종(種)의 식물을 감염시킬 수 있으며 감염된 식물에서 왜소증과 줄기의 비틀림 증상을 유도하여 식물의 생산성을 크게 떨어뜨린다(1, 15). 특히 BCTV는 주요작물들이 속한 십자화과, 가지과, 국화과, 명아주과와 콩과 등에 커다란 피해를 주고 있다. 1986년 BCTV-California 분리주의 DNA 염기서열이 처음 보고된 후 지난 10여년간 BCTV에 관한 연구는 주로 DNA 염기서열 분석에 따른 바이러스 유전자에 대한 기능 분석이었으며 이러한 연구를 통하여 BCTV 각각의 유전자 기능

이 조사되었다(2, 3, 8, 10, 11). 지금까지 보고된 연구결과를 종합하면 BCTV의 모든 분리주는 일반적으로 7개의 open reading frame(ORFs)를 가지고 있다. BCTV 유전자의 오른쪽 3개 ORFs 중 R1은 외피 단백질 유전자로서 바이러스의 이동에 관여하며, R2는 DNA 복제과정중 single stranded DNA에서 double stranded DNA로의 전환을 조절하고, R3는 R1과 같이 바이러스의 이동에 관여하며 감염증상의 발달에도 영향을 미치는 것으로 조사되었다. 왼쪽에는 4개의 ORFs가 있는데, L1은 바이러스 복제에, L2와 L3는 아직까지 그 기능이 분명하지는 않지만 transacting factor로 작용하는 것으로 보여진다. 그리고 최근에 BCTV L4 유전자의 기능이 BCTV-California 분리주에서 보고되었다. Stanley 등(1992)은 *Nicotiana benthamiana*를 이용한 연구에서 BCTV L4 돌연변이 바이러스는 hyperplasia와 같은 감염증상을 유도하지 않으면서 바이러스 증식에는 영향을 미치지 않아 L4 유전자 산물이 바이러스 감염증상 유도에 관여한다고 보고하였다.

BCTV를 *Arabidopsis*에 감염시키면 *Nicotiana benthamiana*에서 관찰되지 않는 새로운 감염 증상으로 callus 유도과 같은 증상이 나타나며 또한 *Arabidopsis*는

\*Corresponding author

ecotype에 따라 다양한 감염증상을 유도하여(6, 7), 본 연구에서는 바이러스 생활사 동안 BCTV L4 유전자를 site-directed mutagenesis 방법으로 돌연변이체를 만들어 바이러스의 증식 및 이동에 대하여 wild type BCTV와 비교함으로써 바이러스 생활사 동안 L4 유전자 산물의 기능을 분석하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**바이러스 균주 배양 및 접종.** 바이러스 BCTV-Logan 유전자는 미국 Ohio State University의 Dr. Davis로부터 분양 받았으며 BCTV-L4 돌연변이는 M13을 이용한 site-directed mutagenesis 방법으로 제작하였다. 바이러스의 감염은 agroinoculation 방법을 이용하였고 이를 위하여 BCTV-Logan 유전자와 BCTV-Logan L4 돌연변이 유전자를 binary vector인 pMON521에 dimer로 도입하였다. 이 plasmid를 disarmed plasmid인 pTiB6S3-SE가 들어 있는 *Agrobacterium tumefaciens*의 GV3111에 triparental mating으로 도입하였다. 이를 각각 pMLogan과 pM-L4이라 하였고 pMLogan과 pM-L4를 kanamycine, spectinomycin과 chloramphenicol이 첨가된 LB 배지에서 36시간 정도 배양한 뒤 4주 정도 자란 *Arabidopsis*의 꽃대를 자른 후 잎의 중앙부위에 곤충침을 이용하여 상처를 낸 뒤 감염시켰다(9).

**기주식물 및 식물 배양.** 실험에 사용한 기주식물로는 *Arabidopsis* ecotypes Sei-O와 Col-O를 이용하였다. 각각의 종자를 인조 흙(Metro Mix 200, Hummert Seed Co. USA)에 파종한 후 plastic cover를 씌워 3일 동안 4°C에서 저온 처리한 후 항온·항습실에 옮겨서 배양하였다. 항온·항습실내의 환경조건은 14시간의 명처리와 10시간의 암처리로 조정된 광주기하에서 온도는 18~22°C로, 상대습도는 50~80%로 유지되도록 조절하였다. 배양 약 2주 후면 싹이 나오는데, 이때 plastic cover를 제거하고 3~4일 마다 계속 수분상태를 점검하여 적절한 습도가 유지되도록 수시로 물과 비료를 공급하였다.

**BCTV-Logan L4 돌연변이 제작.** BCTV-Logan 유전자가 dimer로 들어 있는 pLogan으로부터(Fig. 1) 제한효소 *Sst*I을 이용하여 BCTV-Logan 유전자를 분리한 뒤 이를 M13mp18에 다시 subcloning 하였다. 이 M13mpLogan을 Bio-Rad Muta-Gene Kit을 이용하여 2727번 위치의 *Sal*I 제한효소내 G를 T로 치환하였다. 이 돌연변이 M13mpL4로부터 다시 *Sst*I 단편을 분리하여 pLogan에 subcloning 하였다. 이를 pMON502에 subcloning하고 이를 다시 *agrobacteria*에 도입하여 BCTV-L4 돌연변이주를 제작하였다.

**DNA 분리.** 바이러스 감염후 3주와 4주된 식물의 정단

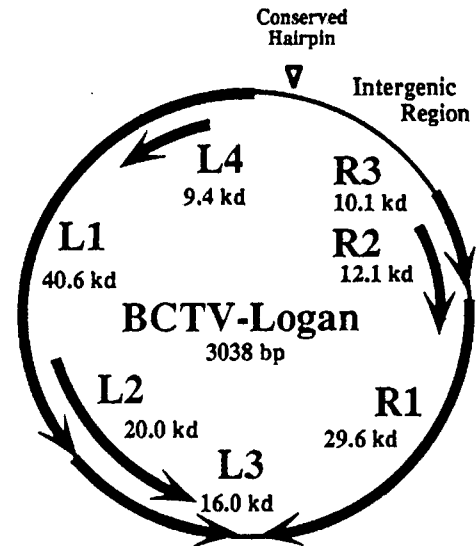


Fig. 1. Physical map of the BCTV-Logan genome. Solid arrows denote locations and polarity of conserved ORFs.

부위, 감염부위 그리고 뿌리 조직을 채취하고 냉동 보관하여 DNA 분리에 사용하였다. DNA 분리는 Junghans(4) 등의 방법을 이용하고, DNA의 양은  $A_{260}$ 에서 분광광도법에 의하여 측정하였다. 채취한 식물 시료를 액체 질소로 급속 냉동시키고, 막자사발에서 분쇄하고 phenol과 chloroform을 처리한 뒤 ethanol을 이용해 DNA를 침전시킨다. 침전된 DNA를 TE buffer(10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA)를 이용해 용해한 후, 37°C에서 RNase를 1시간 처리하여 RNA를 제거하였다. RNase는 다시 phenol과 chloroform을 이용해 제거한 다음 ethanol 처리로 DNA를 침전시켰다. 정제된 20 µg의 DNA를 ethidium bromide가 첨가된 1% agarose gel에서 전기영동법에 의해 분획하였다.

**Southern blot hybridization.** 전기영동한 agarose gel을 alkaline transfer solution(0.4 N NaOH, 1 M NaCl)을 사용하여 모세관법으로 DNA를 nylon membrane으로 전이하고, 전이된 DNA를 UV-crosslinker를 사용하여 nylon membrane에 공유결합 시켰다. Nylon membrane을 prehybridization solution(6X SSC, 5X Denhart's solution, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.5), salmon sperm DNA 100 µg/ml)이 들어 있는 hybridization bottle (65°C)에서 2시간 반응시켰다. Prehybridization solution에 ( $\alpha$ - $^{32}$ P) dCTP로 label 된 probe를 넣고 65°C에서 20시간 반응시킨 후 Nylon membrane를 plastic wrap으로 싸서 X-ray film에 24시간 노출시켰다. Southern blot hybridization에 사용한 probe는 BCTV 유전자가 dimer로 subcloning 되어 있는 pCLC을 이용하여 RTS rad-prime DNA labeling system(Gibco-BRL)으로 제작하였다.

결과 및 고찰

Site-directed mutagenesis를 이용한 BCTV-L4 돌연변이 바이러스 제작. BCTV ORF L4에 대한 기주식물내 기능을 분석하기 위하여 pLogan으로부터 site-directed mutagenesis 방법을 이용하여 L4 ORF 내 돌연변이를 유도하였다(Fig. 2). 제한효소 Sst1을 이용하여 BCTV-

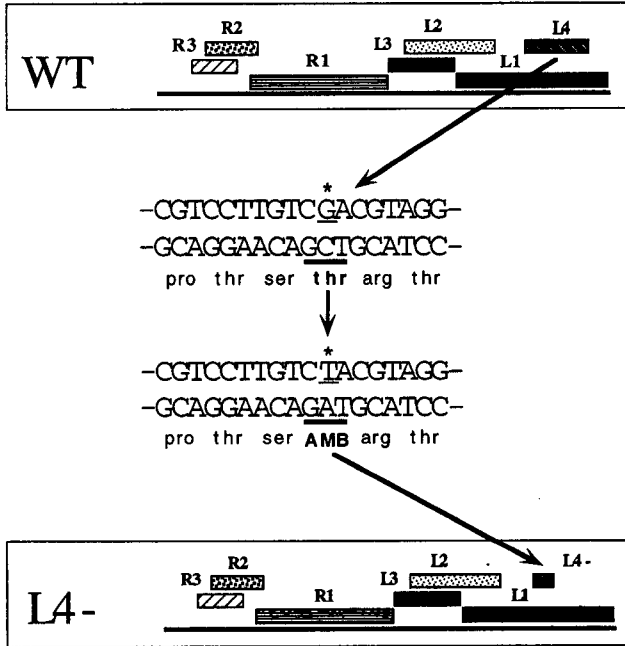


Fig. 2. Sequences surrounding the target site for the mutagenesis of BCTV L4 ORF. L4 mutant was constructed by G to T (marked by asterlikes) transversion at nucleotide 2727.

Logan 유전자를 분리한 뒤 Bio-Rad Muta-Gene Kit을 이용하여 2727번 위치의 G를 T로 치환하여 돌연변이를 유도하였다. 이 돌연변이에 의하여 2727번 위치의 제한효소 자리가 Sal1에서 SnaB1으로 치환되었고 그 자리에 종결 codon을 유도하였다. 이 때 L1 ORF의 단백질 서열은 Sal1이 SnaB1으로 치환되어도 전혀 이상을 주지 않음을 DNA Strider를 이용하여 확인하였다. 이 돌연변이 M13mpL4로부터 Sst1 단편을 분리한 뒤 처음 BCTV-Logan DNA 분리에 사용한 pLogan의 Sst1 단편과 치환하였다. 이 ORF L4 돌연변이 유전자가 포함된 BCTV 유전자를 dimer가 되도록 pMON502에 subcloning 하고 이 pMON-L4를 agrobacteria에 형질전환하여 BCTV-L4 돌연변이를 제작하였다.

바이러스에 감염된 식물의 병징특성. 4주정도 자란 *Arabidopsis thaliana*에 BCTV-Logan을 감염시키면 Sei-O 경우는 2주, Col-O는 3주 정도 후에 감염증상이 나타나기 시작하는데 바이러스에 감염된 식물에서 보이는 전형적인 감염증상인 stem curling, stunting 그리고 anthocyanin의 축적 등을 관찰할 수 있었다(Fig. 3B). 반면에 BCTV-Logan은 *Arabidopsis ecotype*에 따라 감염증상의 정도 차이를 보이는데 Sei-O에서는 BCTV-Logan에 대하여 hypersusceptible ecotype으로서 이제까지 어느 기주식물에서도 관찰되지 않은 독특한 감염증상인 줄기 정단부위의 callus 유도가 관찰되었다. Col-O에서는 *Nicotiana benthamina*나 sugar beet 등에서 관찰되는 잎과 줄기가 굽어지는 증상 등만이 관찰되었다.

Site-directed mutagenesis를 이용하여 제작된 BCTV-L4 돌연변이 바이러스는 Col-O에서 정상적인 BCTV-

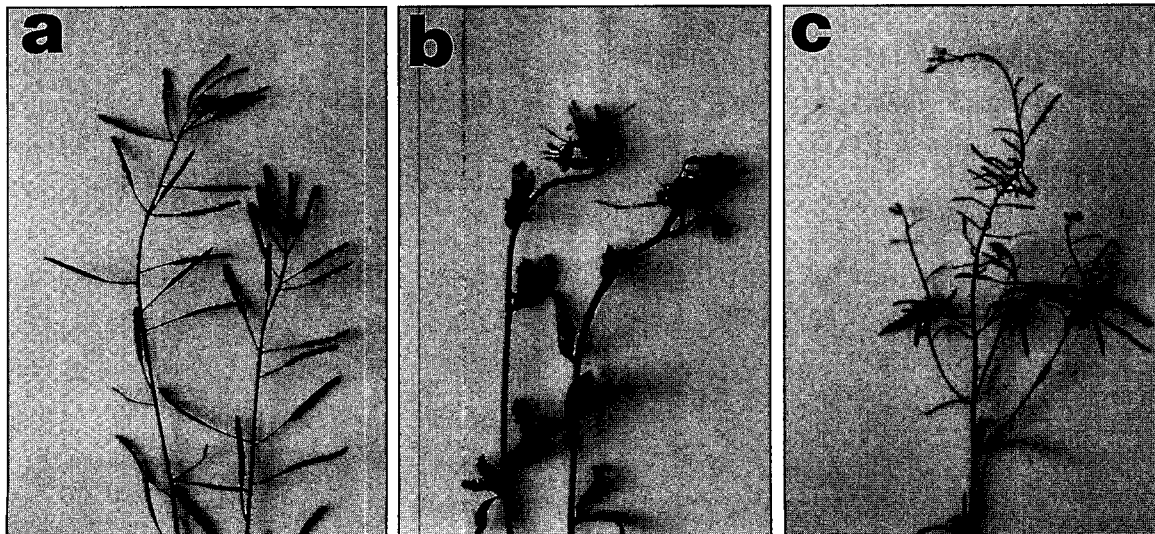


Fig. 3. Symptom development in shoot tips of (A) mock inoculated, (B) BCTV-Logan infected and (C) BCTV-L4 mutant infected. Shoot tips showing representative symptoms were taken from *Arabidopsis* Sei-O ecotype 4 weeks after inoculation.

**Table 1.** Infectivity and symptom severity in *A. thaliana* inoculated with BCTV-Logan and BCTV-Logan L4 mutant.

	BCTV-Logan			BCTV-Logan L4 mutant		
	<sup>a</sup> Infectivity		<sup>b</sup> Severity	Infectivity		Severity
Col-O	(28/31)	90%	++	(0/28)	0%	-
Sei-O	(25/25)	100%	++++	(13/22)	40%	+

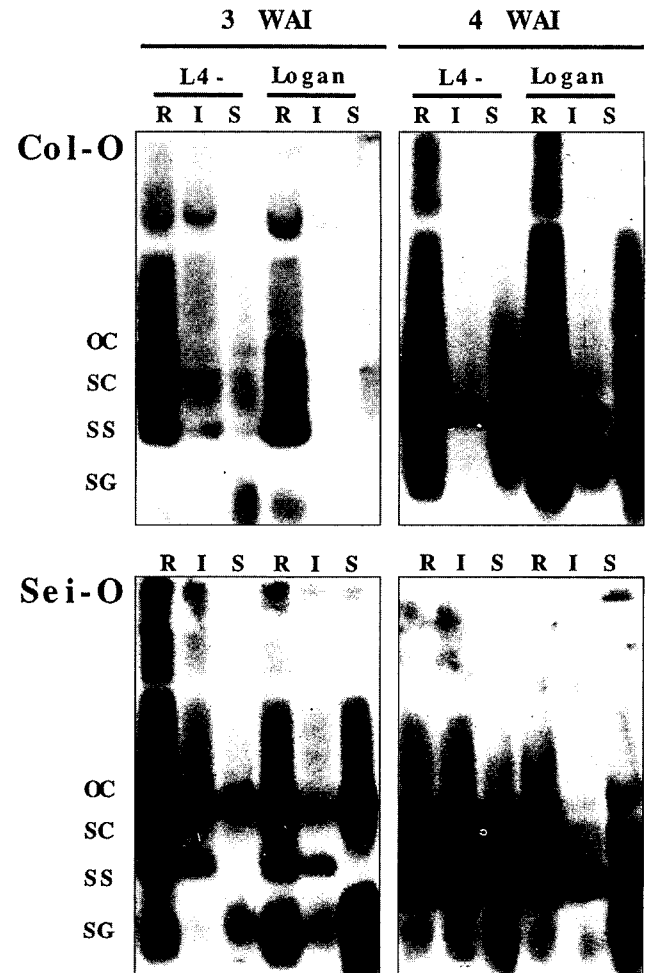
<sup>a</sup>Infectivity : Percentage of plants showing symptoms. Number in parenthesis represents the number of plants showing disease symptoms / total number of plants inoculated.

<sup>b</sup>Symptom severity : - no symptom; ++++ severe symptoms

Logan에 의해 유도되는 어떠한 감염증상도 관찰되지 않았다(data not shown). Hypersusceptible ecotype인 Sei-O에서 callus의 유도와 같은 감염증상은 관찰되지 않았지만(Fig. 3C), 줄기 정단부위에 stunting 현상이 심하게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3C). BCTV-Logan에 의해 감염된 Col-O와 Sei-O의 감염도는 감염증상의 정도에는 차이가 있으나 각각 90%와 100%로써 매우 높은 감염도를 보여주는데, BCTV-L4 돌연변이 바이러스는 Col-O에서는 전혀 감염증상을 나타내지 않고 Sei-O에서 약 40%의 감염 정도를 보여주었다(Table 1). 이로써 BCTV-L4 돌연변이 바이러스가 BCTV-Logan과 같이 바이러스 DNA의 복제 및 이동이 가능한 감염성 바이러스임을 알 수 있었다. 이와 같이 BCTV-L4 돌연변이 바이러스가 Arabidopsis 두 ecotype에서 각기 다른 결과를 보여주는 것은 Stanley (1992) 등에 의해 제작된 BCTV-California의 L4 돌연변이 바이러스가 *N. benthamiana*에서는 감염증상을 보이는 반면 sugar beet(*Beta vulgaris*)에서는 감염증상을 유도하지 않은 결과와 같은 양상을 보여주었다(10). 이는 한 종(種) 내에서도 바이러스 유전자의 차이를 구별할 수 있다는 측면에서 Arabidopsis와 BCTV 사이의 상호작용을 연구하는 본 연구 system이 기존의 BCTV 연구 system, 즉 BCTV와 *Nicotiana benthamiana* 사이의 연구 system 보다 더 많은 장점을 보유하고 있는 것으로 보인다.

이로써 BCTV ORF L4가 바이러스 생활사 동안 필요한 바이러스 단백질의 정보를 가지고 있음을 확인할 수 있었고 그 기능은 hyperplasia 유도 및 callus 유도와 직접적인 관련이 있는 것으로 보이며 이는 geminivirus에 속한 tomato leaf curl virus(8)와 BCTV-California(10)에서도 비슷한 결과가 보고되었다.

**Southern blot analysis.** Arabidopsis에서 BCTV-Logan과 BCTV-L4 돌연변이 바이러스의 감염도 분석 및 감염증상의 분석으로 BCTV L4 단백질이 식물의 감염증상 발달에 관여하고 있다는 것을 유추할 수 있으나, 바이러스 생활사의 어느 단계에서 BCTV L4 단백질이 작용하는지를 조사하기 위하여 Southern hybridization을 수행하였다. 바이러스의 이동이나 DNA 복제과정에



**Fig. 4.** Southern blot analysis of BCTV-Logan DNA forms in Arabidopsis Col-O and Sei-O agroinoculated with BCTV-Logan and BCTV-L4 mutant virus. Equal amounts of total DNA isolated from three organs (R: roots, I: infection origins and S: shoot tips) of Col-O and Sei-O infected with BCTV-Logan and BCTV-Logan L4 mutant on 3 and 4 weeks after inoculation(WAI) were loaded in each lane (20 µg). DNA was separated on 1% agarose gel containing ethidium bromide, blotted onto nylon membrane and probed with <sup>32</sup>P-labeled, BCTV genome (pCLC). The position of open circular (OC), supercoiled (SC), single stranded (SS) and subgenomic (SG) DNAs are indicated.

BCTV L4 단백질이 어떠한 작용을 하는지를 분석하고자 바이러스 감염 후 3주와 4주에 각각 Arabidopsis의 정단부위, 접중부위 그리고 뿌리 조직에서 각각 DNA를 분리하여 BCTV 유전자를 probe로 이용하여 바이러스 DNA를 분석한 결과 BCTV-Logan과 BCTV-Logan L4 돌연변이를 감염한 Col-O와 Sei-O에서 모두 전형적인 BCTV 유전자의 band 양상을 확인할 수 있었다(Fig. 4). BCTV-L4 돌연변이 바이러스가 감염된 Col-O와 Sei-O의 모든 조직에서 바이러스 유전자가 검출되었다는 것은 BCTV ORF L4가 바이러스의 복제와 이동에 관여하지 않음을 알 수

있었다. BCTV-L4 돌연변이 바이러스가 감염된 Sei-O에서 바이러스 DNA의 양이 Col-O 보다 더 많은 것은 분자 수준에서도 Sei-O가 BCTV-Logan 이나 BCTV-L4 돌연변이 바이러스에 대하여 hypersusceptible임을 확인할 수 있었다.

또한 BCTV-Logan 이나 BCTV-L4 돌연변이 바이러스가 감염된 Arabidopsis의 조직별 바이러스 DNA의 양을 비교해 보면 전체적으로 뿌리 조직에서 많은 바이러스 DNA가 관찰되었다(Fig. 4). BCTV-Logan과 BCTV-L4 돌연변이주 모두 Arabidopsis에 감염 후 3주와 4주 후에 관찰한 뿌리조직에서 감염부위나 줄기 정단부위보다 약 20~30배 정도 많은 바이러스 DNA를 포함하고 있으며 특히 시간이 진행함에 따라서 줄기 정단부위에서 ssDNA가 증가하는 양상을 볼 수 있었다. 또한 바이러스 감염 후 시간이 경과함에 따라서 바이러스 subgenomic DNA의 양이 늘어나는 것으로 조사되었는데 아직까지 이 subgenomic DNA의 기능 및 생성기작에 대해서는 그 원인이 명확하지 않다. 이와 같은 연구결과는 바이러스의 이동에 관여하는 것으로 조사된 ORF R1에 site-directed mutagenesis를 이용해 제작한 BCTV-R1 돌연변이 바이러스의 실험 결과와도 동일한 양상을 보여주었다(data not shown). BCTV-R1 돌연변이주 역시 바이러스가 감염된 Arabidopsis의 줄기와 잎에서는 바이러스 DNA가 검출되지 않은 반면 뿌리에서는 BCTV-Logan에 감염된 뿌리보다는 적지만 많은 양의 바이러스 DNA가 검출되었다. 이와 같은 연구 결과를 종합하면 뿌리 조직 특이적인 바이러스 이동이나 바이러스 복제와 관련이 있는 것으로 보이며 이러한 연구 결과는 아직까지 보고된 바 없어 이 분야에 대한 세포학적인 그리고 분자생물학적인 연구가 필요하다.

결과적으로 BCTV-L4 돌연변이 바이러스에 감염된 Col-O와 Sei-O의 감염증상 및 바이러스 DNA 분석에 의하면 BCTV-L4 돌연변이 바이러스는 접종부위로부터 줄기의 정단부위와 뿌리 방향으로 바이러스가 이동하는 것으로 보이며 줄기보다는 뿌리쪽에서 복제가 활발히 이루어졌다. 이처럼 BCTV-L4 돌연변이 바이러스가 BCTV-Logan과 비교하여 바이러스 이동 및 복제에는 차이가 거의 없는데 반해 이 돌연변이 바이러스에 감염된 Arabidopsis에서 세포분열 유도과 같은 독특한 감염증상이 관찰되지 않는 것은 BCTV L4 단백질이 바이러스의 이동이나 DNA 복제에는 직접적으로 관여하지 않고 감염된 식물에서 바이러스 감염증상 유도에 매우 큰 영향을 주고 있는 것으로 보인다. BCTV-Logan의 L4 단백질을 기능분석을 위한 보다 직접적인 연구를 위해서는 BCTV L4 유전자를 식물체 내에서 발현한 뒤 이 L4 단백질에 의해 유도되는 형질전환 식물체의 새로운 형질을 비교하고 또 이 L4 단백질이 기관, 조직 그리고 세포내

존재위치를 확인함으로써 정확한 기능을 분석할 수 있을 것으로 보인다.

## 요 약

BCTV-L4 돌연변이 바이러스를 ORF L1과 L4가 중첩되어 있는 2727 위치의 G를 T로 치환하는 방법을 이용하여 제작하였다. 이 돌연변이 바이러스는 L1 ORF의 아미노산 서열에는 영향을 미치지 않고 L4 단백질내 종결 codon을 새로이 만드는 방법으로 제작되었다. 이 돌연변이 바이러스를 *Arabidopsis thaliana*에 감염시켰을 때 Sei-O ecotype에서 완화된 감염증상을 유도하였으며 callus나 hyperplasia 유도와 같은 증상은 관찰되지 않았다. 그러나 Col-O에서는 전혀 감염증상이 관찰되지 않았다. 바이러스 외가닥 DNA의 축적 정도는 wild type 바이러스와 비슷하였다. 바이러스 DNA 정량분석에 의하면 BCTV-L4 돌연변이 바이러스는 줄기 정단, 접종부위 그리고 뿌리 모두에서 정상바이러스의 경우와 비슷한 양으로 바이러스 DNA가 축적되었다. 감염증상을 나타내지 않는 Col-O의 경우도 바이러스 DNA는 Sei-O의 경우와 같이 세 조직에서 모두 관찰이 되었다. 두 ecotype에서 모두 뿌리조직이 가장 많은 바이러스 DNA를 포함하고 있었다. 이러한 결과는 ORF L4가 BCTV-Logan의 기능을 갖는 단백질로서 ORF L4는 hyperplasia와 같은 바이러스 감염증상 유도에 관여하는 중요한 단백질임을 보여준다.

## 감사의 말씀

본 연구는 1997년도 한국과학재단 핵심전문 연구비(과제번호 971-0501-001-2)지원에 의해 일부 수행되었으며, 본 연구를 위해 BCTV-Logan 유전자를 친절하게 분양하여 주신 미국 오하이오 주립대학교의 Davis 교수님께 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Bennett, C. W. 1971. The curly top disease of sugarbeet and other plants. *Monograph No. 7*: 1-81.
2. Briddon, R. W., Watts, J., Markham, P. G., and Stanley, J. 1989. The coat protein of beet curly top virus is essential for infectivity. *Virology* 172: 628-633.
3. Hormuzdi, S. G., and Bisaro, D. M. 1993. Genetic analysis of beet curly top virus: Evidence for three virion sense genes involved in movement and regulation of single- and double-stranded DNA levels. *Virology* 193: 900-909.
4. Junghans, H., and Melzlaff, M. 1990. A simple and rapid method for the preparation of total plant DNA. *Bio Techniques* 8: 176.

5. Lazarowitz, S. G. 1992. Geminivirus: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11: 327-349.
6. Leisner, S. M., and Howell, S. H. 1992. Symptom variation in different *Arabidopsis thaliana* ecotypes produced by cauliflower mosaic virus. *Phytopathology* 82: 1042-1046.
7. Lee, Sukchan. 1995. Genetic and molecular analysis of interactions between *Arabidopsis* and beet curly top virus. In Ph.D Dissertation. (The Ohio State University).
8. Rigden, J. E., Krake, L. R., Rezaian, M. A., and Dry, I. B. 1994. ORF C4 of Tomato Leaf Curly Geminivirus is a determinant of symptom severity. *Virology*: 204, 847-850.
9. Rochester, D.R., Kosiratana, W., and Ceachy, R. N. 1990. Systemic movement and symptom production following agroinoculation with a single DNA of tomato yellow leaf curl geminivirus. *Virology* 178: 520-526.
10. Stanley, J., and Latham, J. R. 1992. A symptom variant of beet curly top geminivirus produced by mutation of open reading frame C4. *Virology* 190: 506-509.
11. Stanley, J., and Latham, J. R., Pinner, M. S., Bedford, I., and Markham, P. G. 1992. Mutational analysis of the monopartite geminivirus beet curly top virus. *Virology* 191: 396-405.
12. Stanley, J., Markham, P. G., Callis, R. J., and Pinner, M. S. 1986. The nucleotide sequence of an infectious clone of the geminivirus beet curly top virus. *The EMBO J.* 5: 1761-1767.
13. Stenger, D. C., Revington, G. N., Stevenson, M. C., and Bisaro, D. M. 1991. Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: Evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *PNAS* 88: 8029-8033.
14. Stenger, D. C. 1994. Complete nucleotide sequence of the hypervirulent CFH strain of beet curly top virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7: 2211-2215.
15. Stenger, D. C. 1995. Genotypic variability and the occurrence of less than genome length viral DNA forms in a field population of beet curly top geminivirus. *Phytopathology.* 85: 1316-1322.
16. Stenger, D. C., Carbonaro, D., and Duffus, J. E. 1990. Genomic characterization of phenotypic variants of beet curly top virus. *J. Gen. Virol.* 71: 2211-2215.

(Received September 9, 1998)