

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

***“Caracterización de nuevas especies y cepas de
geminivirus por un método molecular que optimiza la
detección de infecciones mixtas”***

Tesis que presenta

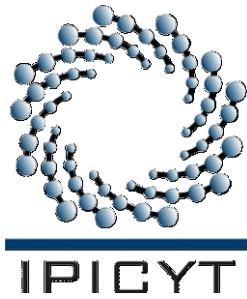
M. en C. Jorge Armando Mauricio Castillo

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Gerardo R. Argüello Astorga



San Luis Potosí, S.L.P., Marzo del 2011

Constancia de aprobación de la tesis

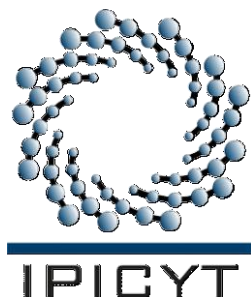
La tesis “**Caracterización de nuevas especies y cepas de geminivirus por un método molecular que optimiza la detección de infecciones mixtas**” presentada para obtener el Grado de Doctor (a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Jorge Armando Mauricio Castillo** y aprobada el 16 de Marzo del 2011 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de División la de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Gerardo R. Argüello Astorga
(Director de la tesis)

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Asesor Interno

Dr. Irineo Torres Pacheco
Asesor Externo

Dr. J. Sergio Casas Flores
Asesor Interno



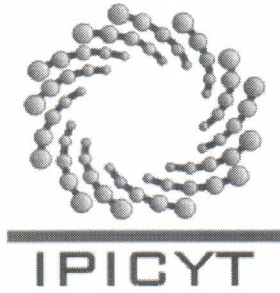
Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del **Dr. Gerardo R. Argüello Astorga**.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**No. 189634**) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

El trabajo de investigación descrito en esta Tesis fue financiado con recursos otorgados al Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga por FOMIX- San Luis Potosí

(Proyecto Clave FMSLP 2008-CO1- 86994)



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 031 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 16 días del mes de marzo del año 2011, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Presidente	IPICYT
Dr. Irineo Torres Pacheco	Secretario	UAQ
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Sinodal	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Jorge Armando Mauricio Castillo

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización de nuevas especies y cepas de geminivirus por un método molecular que optimiza la detección de infecciones mixtas

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:25 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 16 días del mes de marzo de 2011.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico




Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Página en Blanco que se va a utilizar para colocar la copia del acta de examen.

DEDICATORIA

Por lo que hemos vivido y por todo lo que aún nos falta:

A mi ejemplo:

Mi Padre (Armando Mauricio Aguayo)

A mi soporte:

Mi Madre (Carmen Elia Castillo Medina)

Mis cómplices:

Mis Hermanas (Berenice, Rubí y Yazmín).

Mis sobrinos: Renata, Jimena, Israel y los que vienen...

A la Familia Salas-Muñoz et al. Por su apoyo constante e incondicional

Y finalmente a TI, Silvia Salas por tu amor y comprensión en los momentos más difíciles, que este sea el primero de muchos logros juntos.

AGRADECIMIENTOS

- **A Dios por guiarme siempre por el camino correcto.**
- **A mis padres y hermanas por su apoyo y por ofrecerme día con día esa pequeña dosis de sencillez que me hizo no perder el suelo.**
- **Al Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga por la dirección de esta tesis y por su apoyo incondicional aun en los momentos difíciles.**
- **A los Drs. Sergio Casas Flores, Ángel G. Alpuche Solís e Irineo Torres Pacheco por sus enseñanzas, sugerencias y colaboración en la revisión de esta tesis.**
- **A el biólogo Salvador Ambríz Granados por sus sugerencias y colaboración durante el desarrollo de este trabajo pero, principalmente por su amistad y paciencia.**
- **Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado para el desarrollo de este trabajo.**
- **Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado.**
- **A Pablo Delgado, Omar Patiño y Arturo Hernández por siempre estar ahí cuando más los necesito.**
- **A todos mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas y al laboratorio del Dr. Francisco J. Bremont por su amistad y buen trato.**

ÍNDICE

	Página
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	xi
Lista de figuras	xii
Abreviaturas	xiii
Resumen	xvii
Abstract	xviii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Geminivirus (Generalidades)	1
1.2 Taxonomía y Organización genómica de los geminivirus	2
1.2.1 Mastrevirus	3
1.2.2. Curtovirus	5
1.2.3. Topocuvirus	7
1.2.4. Begomovirus	7
1.3. Genomas satélites	13
1.3.1. α - Satélites	14
1.3.2. β - Satélites	14
1.4. Replicación de los geminivirus	16
1.5. Los geminivirus en México	19
1.6. Geminivirus del nuevo mundo y sus vectores	20
1.6.1. Chicharritas saltadoras (Genero <i>Circulifer</i>)	20
1.6.2. La mosquita blanca (<i>Bemisia tabaci</i>)	21
II. Aislamiento y caracterización de nuevas especies de begomovirus y detección de infecciones mixtas	23
2.1. ANTECEDENTES	23
2.2. OBJETIVOS	25

2.2.1. OBJETIVO GENERAL	25
2.2.2. OBJETIVO GENERAL	25
2.2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
2.3. MATERIALES Y METODOS	26
2.3.1. Colecta en campo y manejo de muestras	26
2.3.2. Extracción de ADN	26
2.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
2.3.4. Caracterización mediante patrones de restricción (RFLPs por sus siglas, en ingles) de los fragmentos amplificados y clonas obtenidas	28
2.3.5. Clonación y secuenciación	28
2.3.6. Transformación por el método de CaCl ₂	28
2.3.7. Transformación por el método de electroporación	29
2.3.8. Preparación de las partículas de tungsteno usadas para la transformación por biobalística	30
2.3.9. Obtención de clonas infectivas de begomovirus	30
2.3.10. Recubrimiento de las partículas de tungsteno con el ADN viral y transformación mediante biobalística (6 reacciones)	32
2.3.11. Inoculación por biobalística de los genomas virales clonados	33
2.4. RESULTADOS	34
2.4.1. Selección de oligonucleótidos universales	34
2.4.2. Aislamiento y caracterización de begomovirus presentes en el estado de Sinaloa, México	36
2.4.2.1. Caracterización biológica de <i>RhMSinV</i>	39
2.4.2.2. <i>Sida mosaic Sinaloa virus (SiMSinV)</i> , una nueva especie de begomovirus presente en el estado de Sinaloa, México	42
2.4.3. Una nueva especie de begomovirus infectando cultivos de Okra en los estados de Guerrero y Morelos, México	44
2.4.4. Identificación de begomovirus que infectan cultivos de interés agrícola en el estado de San Luis Potosí	48
2.5. DISCUSIÓN	53
III. Caracterización biológica y molecular de nuevos Curtovirus	64

aislados en los estados de San Luis Potosí, Zacatecas y Nuevo Mexico (E.U.A.)	
3.1. ANTECEDENTES	64
3.2. OBJETIVOS	66
3.2.1. OBJETIVO GENERAL	66
3.2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	66
3.3. MATERIALES Y METODOS	67
3.3.1. Colecta en campo y manejo de muestras	67
3.3.2. Diseño de iniciadores universales	67
3.3.3. Evaluación de los iniciadores universales	68
3.3.4. Extracción de ADN	68
3.3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	68
3.3.6. Caracterización mediante patrones de restricción (RFLPs por sus siglas, en ingles) de los fragmentos amplificados y clonas obtenidas	68
3.3.7. Clonación y secuenciación	69
3.3.8. Preparación de las partículas de tungsteno usadas para la transformación por biobalística	69
3.3.9. Obtención de clonas infectivas de begomovirus	69
3.3.10. Recubrimiento de las partículas de tungsteno con el ADN viral y transformación mediante biobalística (6 reacciones)	70
3.3.11. Inoculación por biobalística de los genomas virales clonados	71
3.4. RESULTADOS	72
3.4.1. Diseño y evaluación de los iniciadores universales	72
3.4.2. <i>Pepper curly top virus (PepCTV)</i> una nueva especie de curtovirus aislada en Nuevo México, E.U.	75
3.4.2.1. Caracterización biológica de <i>PepCTV</i>	79
3.4.3. Caracterización biológica y molecular de curtovirus presentes en los estados de San Luis Potosí y Zacatecas	83
3.4.3.1. Caracterización biológica de <i>Beet mild curly top virus-Mexico</i>	86
3.4.4. Nuevas variantes de <i>Beet mild curly top virus-Mexico</i>	89

3.5. DISCUSIÓN	95
3.7. LITERATURA CITADA	105

LISTA DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Clasificación taxonómica establecida por el ICTV para Geminivirus	3
2	Oligonucleótidos específicos diseñados y utilizados durante este trabajo para producir clonas virales infectivas de <i>RhMSinV</i> , <i>SiMSinV</i> y <i>OYMMV</i> .	32
3	Oligonucleótidos utilizados en este estudio para amplificar los genomas A o B de Begomovirus.	36
4	Porcentaje de identidad obtenido al comparar el genoma A completo y las secuencias codificantes de <i>RhMSinV</i>	38
5	Porcentaje de identidad obtenido al comparar el genoma A completo y las secuencias codificantes de <i>SiMSinV</i>	44
6	Porcentaje de identidad obtenido al comparar el genoma A completo y las secuencias codificantes de <i>OYMMV</i>	46
7	Oligonucleótidos específicos diseñados para identificar la presencia de Curtovirus en extractos vegetales y la obtención de la clona infectiva de <i>PepCTV</i>	73
8	Comparación del porcentaje de identidad de las secuencias codificantes de <i>PepCTV</i> con sus homólogos presentes en las especies del genero Curtovirus	79
9	Comparación del porcentaje de identidad de las secuencias codificantes de <i>BMCTV-Mexico</i> con sus homólogos presentes en las especies del genero Curtovirus	84

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Organización genómica de los cuatro géneros pertenecientes a la familia Geminiviridae	13
2	Representación lineal de la organización genómica de los α -satélites es comparada con el arreglo genómico de los β -satélites y del componente C2 del nanovirus	16
3	Origen de replicación de un geminivirus típico	18
4	Comparación entre plantas sanas y los síntomas observados en plantas de <i>Nicotiana bentamiana</i> , <i>Rhynchosia minima</i> y <i>Glycine max, Merr.</i> infectadas por <i>RhMSinV</i>	41
5	Comparación entre el número y arreglo de los iterones presentes en, <i>SiMSinV</i> , <i>TYLCV-Sardina</i> y <i>SACMV</i>	43
6	Comparación entre el número y arreglo de los iterones presentes en, <i>OYMMV</i> , <i>OYMIV</i> y <i>AYVV</i>	47
7	Genoma de un curtovirus mostrando las regiones complementarias a los iniciadores universales utilizados para obtener la secuencia completa de curtovirus	74
8	Productos de PCR amplificados a partir del extracto de chile infectado con curtovirus colectado en Nuevo Mexico (E.U.)	75
9	La secuencias repetidas (iterones) presentes en el origen de replicación de <i>PepCTV</i> , <i>BSCTV-Cfh</i> , <i>BCTV</i> , <i>BMCTV-Worland</i> , y <i>SCTV</i>	78
10	Comparación entre plantas de acelga sanas e infectadas con <i>PepCTV</i>	82
11	Comparación entre el número y arreglo de los iterones presentes en <i>BMCTV-Mexico</i> , <i>BMCTV-Worland</i> , <i>BMCTV-W4</i> y <i>BSCTV-Cfh</i>	85
12	Síntomas observados en plantas de chile variedad Anaheim sintomáticas infectadas con <i>BMCTV-Mexico</i>	88
13	Comparación entre el número y arreglo de los iterones presentes en <i>BMCTV-SLP1</i> , <i>BMCTV-SLP2</i> y <i>BMCTV-Mexico</i>	90
14	Síntomas observados en plantas de chile variedad Anaheim sintomáticas infectadas con <i>BMCTV-SLP1</i>	92

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µl	Microlitros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AYVV	<i>Ageratum yellow vein virus</i>
AYVV	<i>Ageratum yellow vein virus</i>
BCaMV	Bean calico mosaic virus
BCTV	<i>Beet curly top virus</i>
BGYMV	<i>Bean golden yellow mosaic virus</i>
BMCTV	<i>Beet mild curly top virus</i>
BMCTV - W	Beetmild curly top virus - Worland
BMCTV-Mex	Beetmild curly top virus - Mexico
BSCTV	<i>Beet severe curly top virus</i>
C	Complementaria
<i>C. tenellus</i>	<i>Circulifer tenellus</i>
CaLCuV-Jam	<i>Cabbage leaf curl virus - Jamaica</i>
CbLCuV	<i>Cabbage leaf curl virus</i>
CdTV	<i>Chino del tomato virus</i>
CdTV-IC	<i>Chino del tomato virus – IC</i>
CdTV-Sinaloa	<i>Chino del tomato virus - Sinaloa</i>
CINVESTAV	Centro de Investigación y estudios Avanzados
CLCuV	<i>Cotton leaf curl virus</i>
CLEs	Elementos tardíos conservados por sus siglas en inglés
CoYSV	<i>Corchorus yellow spot virus</i>
CP	Proteína de la cápside
E. U.	Estados Unidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético por sus siglas en inglés
EYVV	<i>Eupatorium yellow vein virus</i>

For	En sentido del virión “Forward”
GRS	Cuarto dominio conservado en la proteína Rep
<i>HrCTV</i>	<i>Horseradish curly top virus</i>
<i>IBCTV</i>	<i>Irán Beet curly top virus</i>
<i>ICTV</i>	<i>Comité internacional para la taxonomía de virus por sus siglas en ingles</i>
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
IPICYT	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
IPTG	
MM	Mala mujer
mm	milimetro
MP	Proteína del movimiento
<i>MSV</i>	<i>Maize streak virus</i>
<i>MYMM</i>	<i>Mungbean Yellow Mosaic Virus</i>
N	Amino
NaCl	Cloruro de sodio
No.	Numero
OH	Grupo Oxidrilo
<i>OYMMV</i>	<i>Okra Yellow Mosaic Mexico Virus</i>
<i>OYMoIV</i>	<i>Okra yellow mottle Iquala virus</i>
pb	Bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en ingles
<i>PepCTV</i>	<i>Pepper Curly top virus</i>
<i>PepGMV</i>	<i>Pepper golden mosaic virus</i>
<i>PepGMV-Gto 2</i>	<i>Pepper golden mosaic virus – Guanajuato 2</i>
<i>PeYDV</i>	<i>Pepper yellow dwarf virus</i>
pH	Potencial de Hidrogeno
<i>PHYVV</i>	<i>Pepper Huastec yellow vein virus</i>
psi	Libras de presión por pulgada cuadrada
<i>PYMV</i>	<i>Potato yellow mosaic virus</i>

Rb	Retinoblastoma
REn	Proteína potenciadora de la replicación
Rep	Proteína de la replicación
Rev	Reverso
RFLP	Restriction fragment large polimorphism
<i>RhGMV</i>	<i>Rhynchosia golden mosaic virus</i>
<i>RhMSinV</i>	<i>Rhynchosia mosaic Sinaloa Virus</i>
<i>RhYMYucV</i>	<i>Rhynchosia yellow mosaic Yucatán</i>
S. L. P.	San Luis Potosí
SACMV	<i>South Áfricam Cassava mosaic virus</i>
SCTV	<i>Spinach curly top virus</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
<i>SiGMHV</i>	<i>Sida golden mosaic Honduras virus</i>
<i>SiMSinV</i>	<i>Sida mosaic Sinaloa virus</i>
<i>SiYMYucV</i>	<i>Sida yellow mosaic Yucatan virus</i>
<i>SiYVV</i>	<i>Sida yellow vein virus</i>
SLCV	<i>Squash leaf curl virus</i>
SSCTV	<i>Spinach severe curly top virus</i>
TCTV	<i>Turnip curly top virus</i>
TGMV	<i>Tomato golden mosaic virus</i>
<i>ToChBCSV</i>	<i>Tomato chino Baja California Sur virus</i>
<i>ToChLPV</i>	<i>Tomato chino La Paz virus</i>
<i>ToMoV</i>	<i>Tomato mottle virus</i>
<i>ToSLCV</i>	<i>Tomato severe leaf curl virus</i>
<i>ToYCrV-Cuba 2007</i>	<i>Tobacco yellow crinkle virus – Cuba 2007</i>
<i>ToYLCVV</i>	<i>Tomato yellow leaf curl Vietnam virus</i>
<i>ToYLYSV</i>	<i>Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i>
TPCTV	<i>Tomato pseudo curly top virus</i>
TrAP	Proteína trans activadora y represora del silenciamiento
TYLCV	<i>Tomato virus yellow leaf curl</i>

UASLP

Universidad Autónoma de San Luis Potosí

V

Virión

X-gal

5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

Los geminivirus son patógenos de plantas que causan graves daños a la agricultura en todas las regiones tropicales y subtropicales del planeta. Poseen un genoma constituido por una o dos moléculas circulares de ADN de cadena sencilla, y son transmitidos a las plantas por insectos homópteros. La familia Geminiviridae se divide en cuatro subgrupos entre los que destaca el género *Begomovirus* por la extraordinaria diversidad de sus miembros, su amplia distribución geográfica y su gran importancia económica. Estos virus son transmitidos por la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) y sus genomas suelen tener dos componentes, el DNA-A y el DNA-B. Debido a la enorme importancia de los begomovirus como agentes causales de enfermedades agrícolas severas, se han desarrollado diversos métodos moleculares para el diagnóstico e identificación precisa de los mismos, que se basan en la amplificación por PCR o por RCA (“rolling-circle amplification”) de segmentos del DNA viral presente en los tejidos vegetales infectados. En nuestro laboratorio se ha desarrollado un método basado en la técnica de PCR que emplea una combinación de iniciadores “universales” y “específicos de linaje”, el cual es extremadamente efectivo para detectar infecciones múltiples por begomovirus, y para caracterizar el genoma completo de los virus que coexisten en las plantas infectadas. En el trabajo que es el antecedente inmediato del presente proyecto (Mauricio-Castillo, tesis de Maestría, 2006) iniciamos la caracterización molecular de varias nuevas especies y cepas (“strains”) de begomovirus, las cuales fueron aisladas de plantas con infecciones mixtas colectadas en los estados de San Luis Potosí, Sinaloa, Morelos y Guerrero. En la primer parte de este estudio concluimos la caracterización molecular de todos esos begomovirus, y realizamos la caracterización biológica completa de una nueva especie, *Rhynchosia mosaic Sinaloa virus*, que posee un módulo de replicación muy peculiar y de gran interés desde el punto de vista evolutivo. También llevamos a cabo un amplio escrutinio de los begomovirus presentes en el estado de San Luis Potosí, en el que encontramos cinco especies, dos de las cuales, *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) y *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) fueron predominantes en las áreas agrícolas de todo el Estado, generalmente co-infectando las plantas examinadas. La segunda parte de este proyecto de tesis estuvo orientada al desarrollo de un método molecular para la identificación y caracterización genómica de curtovirus en infecciones monovirales o mixtas, análogo al desarrollado previamente para los begomovirus. Los curtovirus son un subgrupo de los geminivirus que se caracterizan por ser transmitidos por chicharritas del género *Circulifer*, y por su capacidad para infectar a una gran variedad de plantas dicotiledóneas, incluyendo varios cultivos agrícolas importantes. Al iniciar este proyecto no se había demostrado la existencia de curtovirus en nuestro país, pese a que casi todos los virus conocidos de este

grupo se han aislado en Estados Unidos. En el curso de nuestro estudio caracterizamos varios aislados de una nueva cepa de la especie *Beet mild curly top virus* (BMCTV) que encontramos en cultivos de chile en el Altiplano Potosino y en cultivos de frijol en Zacatecas. Esta nueva cepa, denominada BMCTV-Mexico, es el único curtovirus reportado en nuestro país hasta el momento. Adicionalmente, descubrimos y caracterizamos una nueva especie de curtovirus aislada de una planta de chile colectada en New Mexico, y que denominamos *Pepper curly top virus* (PepCTV), la cual fue oficialmente reconocida en el 2009 por el International Committee of Taxonomy of Viruses (ICTV) como la séptima especie de este género de los Geminiviridae. PepCTV es un virus de claro origen recombinante, y ha proporcionado pistas muy importantes para trazar la historia evolutiva de los curtovirus.

ABSTRACT

The geminiviruses are plant pathogens that have emerged as major threats to food and fiber crop production throughout the world. These viruses have a circular, single-stranded DNA (ssDNA) genome, and are transmitted by insects of the Order Homoptera. Geminiviruses are classified into four genera, based on their genome organization, plant host range, and insect vector. Members of the most diversified genus, Begomovirus, are transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci*, infect a wide range of dicotyledonous plant species, and generally have bipartite genomes, composed by two ssDNA molecules named DNA-A and DNA-B. Because of the enormous economic importance of the begomoviruses, a number of molecular methods for their precise identification have been developed in the last years, most of them based on the amplification, by either PCR or RCA, of segments of viral DNA contained in the plant tissues. Recently a new molecular method have been developed in our laboratory which is very efficient to detect begomovirus mixed infections and makes feasible the isolation and molecular characterization of all the genomic components of viruses co-existing in the tissues from doubly infected plants. In a early work we made a preliminary characterization of several new species and strains of begomoviruses isolated from plants coinfecting with two or more viruses, which were collected in several states of Mexico: San Luis Potosi, Sinaloa, Morelos and Guerrero (Mauricio-Castillo, 2006). In the first part of this research we completed the molecular characterization of all those begomoviruses; in addition, we carried out the biological characterization of one of them, namely, *Rhynchosia mosaic Sinaloa virus* (RhMSinV), a new begomovirus species displaying an atypical replication module that is very interesting from the evolutionary viewpoint. We also carried out an extensive scrutiny of agricultural lands in the San Luis Potosi state looking for begomoviruses in order to assess their regional diversity. Five species were found, two of them being the predominant viruses in all the SLP state, namely, *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) and *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), which were frequently found co-infecting pepper, tomato, and tomatillo (*Physalis ixocarpa*) plants. This doctoral research involved a second, distinct project aimed to develop a molecular method for identify and characterize curtoviruses involved in either single or mixed infections, analogous to the abovementioned method for detection of begomovirus mixed infections. Curtoviruses are a subgroup of geminiviruses that are transmitted to plants by leafhoppers belonging to the genus *Circulifer* and typically have a wide range of plant hosts. When this research started, none curtovirus had been described in Mexico. During our research we found and characterized several isolates from a new strain of *Beet mild curly top virus* (BMCTV), that infected pepper and bean in San Luis Potosi and Zacatecas. This new strain, termed BMCTV-Mexico, is the only one curtovirus described in our country (Mexico)

nowadays. Finally, we discover and characterized by our method a new curtovirus species isolated from a pepper plant collected in New Mexico, which was named *Pepper curly top virus* (PepCTV). In 2009 this virus was officially accepted by the International Committee for the Taxonomy of Viruses (ICTV) as a new, distinct curtovirus species. PepCTV is a recent recombinant between BSCTV and a yet-undescribed curtovirus far related to other known members of this *Geminiviridae* genus, and the analysis of its nucleotide sequence has provided important clues to reconstruct the evolutionary history of the curtoviruses.

1. INTRODUCCIÓN

La mayor parte de los virus que infectan plantas se encuentran agrupados en familias que poseen un genoma formado por ácido ribonucleico (ARN) monocatenario de sentido positivo, mientras que son muy pocas las familias de virus fitopatógenos cuyos genomas están compuestos por ácido desoxirribonucleico (ADN). Lo anterior contrasta con lo observado en procariontes, y en animales invertebrados y vertebrados, los cuales son infectados por una amplia gama de virus que en su mayor parte poseen genomas constituidos por ADN. Dentro de los virus fitopatógenos cuyo genoma es de ADN se reconocen dos clases: 1) los que contienen ADN circular de doble cadena, como los caulimovirus y badnavirus, cuyo mecanismo de replicación se basa en la transcripción reversa, y 2) los virus que contienen ADN circular de cadena sencilla, como los nanovirus y los geminivirus, los cuales se replican por el mecanismo de círculo rodante (Londoño *et al.* 2010).

Los virus de ADN de cadena sencilla tienen genomas monopartitas o multipartitas, lo cual puede representar diferentes estrategias evolutivas para el desarrollo de infecciones productivas. Unos de los parámetros utilizados para determinar si un virus es exitoso desde un punto de vista evolutivo (“adaptativo”) es evaluando el impacto económico que estos tienen sobre la producción agrícola, y con base en ese criterio las cuatro familias de virus fitopatógenos cuyo genoma está compuesto por ADN son consideradas como exitosas (Rojas *et al.* 2005).

1.1. GEMINIVIRUS (Generalidades)

Los geminivirus son un grupo de virus fitopatógenos cuyas partículas virales semejan dos poliedros idénticos fusionados por una de sus caras (Bird y Maramorosch 1978). El genoma de todos los geminivirus está constituido por una o dos moléculas de ADN circular de cadena sencilla con un tamaño de 2.5 a 3.0 Kb (Lazarowitz *et al.* 1992). Son transmitidos por insectos del orden Homóptera (mosquitas blancas y chicharritas) e infectan un amplio rango de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, produciendo síntomas como, mosaicos, moteados, estriados amarillos, deformaciones foliares, enanismo, amarillamientos y

clorosis en las plantas infectadas, que ocasionan grandes pérdidas económicas, incrementando las condiciones de pobreza particularmente en países del Tercer Mundo.

A pesar de no conocerse el posible agente causal, la primera descripción de síntomas producidos por un virus en plantas fueron plasmadas en un poema japonés que data del siglo ocho D.C. y en el cual se describe un amarillamiento de las venas de la planta *Eupatorium*, que ahora se sabe es causado por un geminivirus y su ADN satélite (Saunders *et al.* 2003). A finales del siglo XIX se publicaron los primeros reportes sobre enfermedades causadas por geminivirus sobresaliendo el mosaico de la yuca en el Este de África (Harrison 1985), el enchinamiento de la remolacha en los Estados Unidos, Turquía e Irán (Bennett 1971), el estriado del maíz en el Viejo Mundo, y mosaicos foliares en plantas de algodón en Brasil (Costa, año?).

Aunque la correlación entre la presencia de los insectos vectores y la aparición de las enfermedades en los cultivos fue un paso importante, la identificación de los agentes causales demoró muchos años, entre otras razones por las dimensiones ultramicroscópicas de los geminivirus, las dificultades que representa su purificación a partir de tejidos infectados, y la restricción de muchos de estos virus al floema de las plantas. En 1977 iniciaron formalmente los estudios sobre geminivirus, al reportarse la caracterización de un virus que infectaba frijol y estaba compuesto por DNA de cadena sencilla y no por RNA como la mayoría de los virus vegetales reportados hasta entonces (Goodman 1977), y poco después se establecieron con precisión las características morfológicas y genómicas de los geminivirus.

1.2. Taxonomía y Organización genómica de los geminivirus

Actualmente el ICTV reconoce cuatro subgrupos o Géneros dentro de la familia Geminiviridae (Tabla 1), y esta clasificación se basa principalmente en los siguientes criterios: la organización genómica (arreglo y número de genes, componentes genómicos únicos o pareados), tipo de planta hospedera (dicotiledóneas y/o monocotiledóneas) y la especie o grupo taxonómico de los

insectos vectores (Fauquet *et al.* 2008). Para cada uno de los cuatro géneros se definió un “virus-tipo” para caracterizarlo y establecer su nomenclatura.

Genero	Miembro tipo	Tipo de hospedante	Vector (Familia)	Genoma
<i>Mastrevirus</i>	MSV	Monocotiledóneas y Dicotiledóneas	Chicharritas (<i>Cicadellidae</i>)	Monopartita
<i>Curtovirus</i>	BCTV	Dicotiledóneas	Chicharritas (<i>Cicadellidae</i>)	Monopartita
<i>Begomovirus</i>	BGYMV	Dicotiledóneas	Mosquita blanca (<i>Aleyrodidae</i>)	Bipartita o Monopartita
<i>Topocuvirus</i>	TPCTV	Dicotiledóneas	Escamas (<i>Membracidae</i>)	Monopartita

Tabla 1. Clasificación taxonómica establecida por el ICTV para geminivirus basada en hospederos naturales, insecto vector y organización genómica.

MSV = *Maize streak virus*, BCTV = *Beet curly top virus*, BGYMV= *Bean golden yellow mosaic virus* y, TPCTV= *Tomato pseudo curly top virus*.

1.2.1 Mastrevirus

El virus tipo para este género es *Maize streak virus* (MSV), tienen un genoma monopartita, son transmitidos por varias especies de chicharritas (*Cicadellidae*) e infectan tanto plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, incluyendo entre estas últimas al frijol, al tabaco, y al garbanzo (Mumtaz *et al.* 2011). Su distribución geográfica abarca varios continentes pero se restringe al Viejo Mundo.

Los virus pertenecientes al género *Mastrevirus* poseen genomas monopartitas que contienen cuatro ORFs, dos de ellos (V2/MP y V1/CP) se transcriben en el sentido del virión, y dos más (C1 y C2) que son transcritos en el sentido complementario; presentan además dos regiones intergénicas, una corta y una larga, siendo ésta última la que contiene el origen de replicación de la cadena positiva, y la mayor parte de los elementos responsables de regular en *cis* la expresión génica del virus. Como característica distintiva de los mastrevirus se

observa la presencia de dos genes que codifican a las proteínas Rep y RepA, que tienen un dominio N-terminal idéntico, pero que poseen propiedades funcionales diferentes. Rep es producida mediante un mecanismo de “splicing” entre los genes C1 y C2, mientras que la segunda proteína, Rep A, es generada por la transcripción y traducción directa del gen C1, también conocido como *repA* (Hefferon *et al.* 2006; Gutiérrez 2004). Otra característica distintiva de los mastrevirus es que dentro de la cápside se empaquetan juntos el ADN viral y un oligonucleótido de aproximadamente 80-nt que es complementario a la región intergénica corta y funciona como un iniciador o “primer” para la generación de la cadena complementaria durante la replicación viral, que tiene lugar poco después de la infección primaria y el desensamble del virión. A continuación se describen las funciones y características de cada uno de los genes presentes en los genomas de los mastrevirus.

Gen Rep A (C1)

La proteína codificada por este gen es denominada Rep A, a la que se le atribuye la capacidad de trans-activar los genes localizados en el sentido del virión (Hefferon *et al.* 2006) y de interactuar con la proteína Retinoblastoma para interferir el ciclo celular del huésped (Gutierrez 2004). La proteína Rep, en cambio, se genera a partir de un transcrito que abarca la región completa de los genes C1+C2 mediante un mecanismo de “splicing”, y el mRNA resultante se traduce en una proteína que a pesar de tener en su secuencia el dominio de unión a la proteína Retinoblastoma (con el motivo LXCXE) no es capaz de interactuar con ese regulador del ciclo celular. Las funciones principales de Rep son iniciar la replicación viral por el mecanismo de CR y reclutar factores del huésped para la elongación de la cadena resultante (Gutierrez 2004). Adicionalmente, se ha identificado en esta proteína un dominio de localización nuclear que está ausente en Rep A (Hefferon *et al.* 2006).

Genes V1 (MP) y V2 (CP)

Las proteínas del movimiento y de la cápside son codificadas por los genes V1 y V2 respectivamente lo cual no concuerda con la nomenclatura establecida para los otros tres géneros de geminivirus en donde el gen que codifica a la proteína de la cápside es nombrado AV1 o V1. Cabe resaltar las múltiples funciones que lleva a cabo la proteína de la cápside, entre las que se encuentran la encapsidación del ADN viral, la importación y exportación nuclear del ADN viral, y su participación en el movimiento sistémico del virus (Liu *et al.* 2001). La proteína del movimiento no tiene la capacidad de unirse al ADN pero interactúa con la proteína de la cápside. El modelo de interacción entre ambas proteínas establece que la proteína del movimiento favorece el movimiento del complejo ADN-CP del núcleo hacia la periferia de la célula donde regula su paso a través del plasmodesmo (Liu *et al.* 2001).

1.2.2. Curtovirus

Beet curly top virus (BCTV) es el virus tipo para este género, tienen un genoma monopartita e infectan plantas dicotiledóneas y sus insectos vectores son chicharritas del género *Circulifer*. Las 6 especies de curtovirus que son reconocidas por el Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas, en inglés) en su emisión más reciente (2009) son las siguientes: *Beet curly top virus* (BCTV), *Beet mild curly top virus* (BMCTV), *Beet severe curly top virus* (BSCTV), *Horseradish curly top virus* (HrCTV), *Spinach curly top virus* (SCTV) y *Beet curly top Iran virus* (BCTIV) [<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>], las cuales se han aislado e identificado en dos regiones geográficas muy distantes, Estados Unidos e Irán (Briddon *et al.*, 1998; Heydarnejad *et al.* 2007, Fauquet *et al.*, 2008). En años recientes se han propuesto dos nuevas especies de curtovirus, una aislada en New Mexico, *Pepper yellow dwarf virus* (PepYDV, Lam *et al.* 2009), y otra en Arizona, *Spinach severe curly top virus* (SSCTV, Hernández y Brown. 2010). Una especie viral de filiación incierta pero lejanamente relacionada a los curtovirus, *Turnip curly top virus* (TCTV) se describió recientemente en Irán (Briddon *et al.*, 2010). Aunque la diversidad conocida de los curtovirus es muy limitada en

comparación a la de otros subgrupos de los Geminiviridae, como los begomovirus (más de 200 especies reconocidas), su capacidad para infectar una amplia variedad de plantas agrupadas en 44 familias de dicotiledóneas, es un claro ejemplo de su alto nivel de adaptación (Hernandez y Brown 2010; Briddon *et al.* 2010, Nhan *et al.* 2009; Bennett 1971).

La organización genómica de la mayoría de los curtovirus (ver Figura 1) incluye cuatro genes presentes en el sentido de la cadena complementaria que están claramente relacionados a los genes en la región genómica equivalente de los begomovirus (Baliji 2004); en contraste, los tres genes localizados en el sentido del virión que codifican a la proteína de la cápside (V1), y proteínas aparentemente relacionadas con el movimiento de los curtovirus (V2 y V3) parecen ser homólogos a los genes V1 y V2 de los mastrevirus (Heydarnejad *et al.* 2007). Con base en lo anterior se ha establecido como una hipótesis aceptada que los curtovirus se originaron a partir de un evento de recombinación entre un begomovirus y un mastrevirus ancestral (Varsani *et al.*, 2009).

Con respecto a las proteínas producidas por los curtovirus y sus funciones podemos señalar a la proteína Rep (codificada por el gen C1) como la encargada de iniciar la replicación viral y alterar el ciclo celular del huésped (revisado por Jeske 2009). Un factor importante para aumentar el nivel de replicación viral es la proteína REn (codificada por el gen C3) y lo hace mediante su interacción con las proteínas Rep y la proteína Retinoblastoma de la planta (Settlage *et al.* 2005). Por otra parte, el gen C2 codifica para la proteína TrAP que, a diferencia de la proteína homóloga de begomovirus, no parece ser capaz de transactivar la expresión de los genes tardíos del huésped, pero actúa inhibiendo el mecanismo de silenciamiento del huésped que se activa frente a las infecciones virales, ya que se ha confirmado su interacción con quinasas celulares implicadas en los mecanismos de defensa de las plantas (Surendranath *et al.* 2006). El cuarto gen presente en el sentido de la cadena complementaria es C4 y a partir de él se produce la proteína del mismo nombre que funciona como un determinante de la patogenicidad, ya que se ha observado que plantas transgénicas que sobre-expresan C4 presentan fenotipos similares a plantas infectadas. Estudios basados en mutaciones y análisis de complementación también

han sugerido la participación de la proteína C4 en la regulación transcripcional, la inhibición del silenciamiento y el transporte intercelular (Teng *et al.* 2010 y Piroux *et al.* 2007).

Las proteínas CP y del movimiento son codificadas por los genes CP (V1) y MP (V3) respectivamente y ambas están implicadas en el movimientos del virus, la proteína del movimiento se encarga del transporte del virus del núcleo a la periferia de la célula y la proteína de la cápside es la responsable del movimiento a larga distancia. Por ultimo, la proteína V2 (gen V2) cuya función parece ser la de regular los niveles de ADN de cadena sencilla y de cadena doble, por lo que al infectar plantas con virus mutados en este gen se presentan síntomas atenuados (Jeske 2009).

1.2.3. Topocuvirus

Este género contiene solo a un miembro, *Tomato pseudo curly top virus* (*TPCTV*), que posee un genoma monopartita, infecta plantas dicotiledóneas, y es transmitido por la chicharrita saltadora *Micrutalis malleifera* (Familia Membracidae). Las características de su organización genómica y la función de cada unos de sus genes sugieren que se trata de un virus producto de la recombinación entre un begomovirus y un mastrevirus ancestral (Briddon *et al.* 1996). Es por eso que *TPCTV* puede trans-complementar el movimiento de componentes A de begomovirus bipartitas en ausencia del genoma B (Briddon y Markham, 2001).

1.2.4. Begomovirus

Este género es el más diversificado y ampliamente distribuido de todos los geminivirus. Su virus tipo es *Bean golden yellow mosaic virus* (*BGYMV*). Presentan un genoma que puede ser monopartita o bipartita, son transmitidos a plantas dicotiledóneas por la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*). Para el caso de los begomovirus bipartitas las moléculas que comprenden la totalidad de su genoma se conocen como DNA A (componente A) y DNA B (componente B) cada uno con un

tamaño de 2.5 a 2.8 Kb. La transcripción de los genes contenidos en ambos genomas se lleva a cabo de manera divergente, en sentido del virión (V) y en sentido de la cadena complementaria (C). Aunque se trate de la misma especie viral los componentes genómicos son totalmente diferentes en su secuencia excepto en una región que mide aproximadamente 200 pares de bases (pb) de longitud denominada “región común” en donde se localizan los elementos en *cis* necesarios para la replicación y transcripción viral (Rojas *et al.* 2005)

Los cinco genes contenidos en el genoma A codifican para las proteínas encargadas de la replicación y la encapsidación del virus (revisado por Gutiérrez 2002). El gen CP se localiza en el sentido del virión y codifica para la proteína de la cápside (CP), que protege al genoma viral en su paso por el vector, es la proteína mas abundante durante la infección, y determina la especificidad para la transmisión por el insecto vector (Briddon *et al.* 1990). Adicionalmente, CP está involucrada en la introducción del DNA viral al núcleo de la célula huésped (Kunik *et al.* 1999), presenta homología con la proteína BV1 de bipartitas, y es esencial para movimiento del DNA viral en el caso de begomovirus monopartitas como TYLCV (Gronenborn, 2007).

Los cuatro genes localizados en la cadena complementaria del genoma A de los begomovirus se describen a continuación:

1.- Gen AL1 o AC1. El producto codificado por este gen es una proteína multifuncional denominada Rep, que realiza la función esencial de iniciar la replicación viral por el mecanismo de CR en los núcleos de las células infectadas. Se cree que la mayoría de las proteínas Rep de los virus y plásmidos que se replican por el mecanismo de CR tienen un ancestro común, y una prueba de ello es la presencia de motivos conservados los cuales les confieren la capacidad de unirse específicamente a secuencias de ADN (Londoño *et al.* 2010). Entre las funciones de Rep destacan su actividad de topoisomerasa, ligasa (Laufs *et al.* 1995; Orozco *et al.* 1996), helicasa (Gorbalenya y Koonin 1993, Pant *et al.* 2001), interactúa con el homólogo en plantas de la proteína de Retinoblastoma para interferir el ciclo celular

(Arguello-Astorga *et al.* 1994), se oligomeriza en solución e interactúa también con la potenciadora de la replicación (REn o AL3) (Hanley *et al.* 199; Orozco *et al.* 1998).

La comparación de secuencias entre diferentes proteínas Rep virales muestra 3 motivos conservados. El motivo 1 parece estar involucrado en la unión a DNA, el motivo 2 está relacionado con la unión a iones metálicos, mientras que el motivo 3 contiene una tirosina conservada implicada en el corte del DNA (Ilyina y Koonin 1992). Muy recientemente, y mediante experimentos basados en mutaciones puntuales utilizando como modelo a la proteína Rep de *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) se ha identificado un cuarto motivo conservado presente en la región N terminal de todos los geminivirus, denominado motivo GRS. Mutantes en el motivo GRS disminuyeron su capacidad infectiva y la replicación viral (Nash *et al.* 2011).

2.- El gen AC2 o AL2 codifica para la proteína TrAP, implicada en la transactivación de los genes “tardíos” CP, BC1 y BV1 (Sunter y Bisaro 1992; Sunter y Bisaro 1991) mediante el reconocimiento de blancos funcionales en los promotores de los mismos, uno de los cuales parece ser el llamado “elemento tardío conservado” (CLE, por sus siglas en inglés), presente en muchos, pero no todos los promotores de genes tardíos de estos virus (Ruiz-Medrano *et al.* 1999). Otra de las características principales de la proteína TrAP es su capacidad como un supresor de la respuesta de silenciamiento de las plantas, favoreciendo la infección no solo de otros geminivirus sino de virus cuyo genoma está constituido por RNA (Sunter *et al.* 2001, Voinnet *et al.* 1999). De modo interesante experimentos realizados en plantas de tabaco transgénicas expresando el gen AL2 de Mungbean Yellow Mosaic Virus (MYMM) indican que la expresión de TrAP puede provocar toxicidad y que los tres dominios conservados presentes en TrAP, uno básico, otro tipo dedos de zonc y un tercer dominio predominantemente ácido, están implicados en este efecto (Rajeswaran *et al.* 2007).

3.- El gen AL3 o AC3 tiene como producto a la proteína REn. Se ha observado en el caso de infecciones con mutantes REn que la replicación viral disminuye de manera considerable (hasta 50 veces) y parte de la explicación de este efecto reside en el hecho de que REn interactúa con la proteína Rep y con la

proteína homóloga a retinoblastoma (PRb) de la planta (Settlage *et al.* 2001) favoreciendo las condiciones para iniciar la replicación viral. Se ha determinado que Rep y la proteína pRB de la planta se unen a REn en regiones similares (Settlage *et al.* 2001). Aun es necesario elucidar más sobre el significado real de estas interacciones y encontrar el mecanismo por medio del cual la replicación viral se ve favorecida.

4- El gen AC4 o AL4 produce la proteína con el mismo nombre, y a pesar de que existen estudios sobre su función en curtovirus para el caso de los begomovirus aun no se le atribuye una función específica.

Genes localizados en el genoma B de begomovirus.

Las funciones del movimiento viral a través de la planta recae en dos genes localizados en el genoma B de los begomovirus, el primero de ellos, el gen BV1 se localiza en el sentido del virión (Yedida y Bernard 2002) y produce la proteína BV1 o NSP. La proteína BV1 tiene afinidad por ADN de cadena doble y sencilla (Rojas *et al.* 1998) teniendo la capacidad de transportarlo del núcleo al citoplasma y del citoplasma al núcleo gracias a los dominios de localización y exportación nuclear con los que cuenta (Hehnle *et al.* 2004).

El segundo gen presente en el genoma B de begomovirus denominado BC1 se localiza en sentido de la cadena complementaria y codifica para la proteína del movimiento o BC1 (Yedidya y Bernard 2002). Esta proteína es capaz de unirse al ADN de cadena sencilla o doble y está localizado en las fracciones de la membrana y pared celular (Rojas *et al.* 1998 y Von-Armin *et al.* 1993) dándonos una idea clara de cómo se da el movimiento de los geminivirus a través de las células vegetales. Inicialmente la proteína BV1 entra al núcleo y se une al ADN de cadena sencilla y sale al citoplasma formando el complejo BV1-csDNA para después ser reconocido por la proteína BC1 y transportado hasta la pared celular y ahí a las células vecinas a través de los plasmodesmos provocando un desequilibrio en la comunicación celular al alterar su límite de exclusión (Hehnle *et al.* 2004).

Genes de los begomovirus monopartitas y sus diferencias con los presentes en los begomovirus bipartitas

Su genoma está constituido por una sola molécula de ADN la cual contiene todos los genes necesarios para llevar a cabo una infección completa. A diferencia de los geminivirus bipartitas que solo se encuentran dentro del género begomovirus, los monopartitas se clasifican dentro de los cuatro géneros en los que se divide la familia Geminiviridae (Mastrevirus, Curtovirus, Topovirus y Begomovirus). Los geminivirus monopartitas comparten muchas de las características presentes en el genoma A de los begomovirus como el hecho de que la expresión de sus genes se encuentra dirigida por una región promotora divergente, la secuencia palindrómica encargada de formar la estructura tallo asa y el acomodo de los genes presentes en el sentido de la cadena complementaria (Rep, TrAP, RE y C4) y los genes localizados en el sentido del virión (MP y CP).

Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) es el virus perteneciente a este grupo mejor caracterizado y lo que podemos observar es, que su genoma contiene seis diferentes marcos de lectura, cuatro en el sentido de la cadena complementaria (Rep, TrAP, RE y C4) y dos en el sentido del virión (CP y MP). Las características y funciones de cada una de las proteínas codificadas por estos genes se enuncian a continuación.

Proteína de la cápside (CP)

La proteína de la cápside es codificada por el gen CP y su peso molecular es de aproximadamente 30KD, es la encargada de encapsidar ADN de cadena sencilla y así formar los viriones, se localiza en el núcleo y también se ha observado en el nucléolo (Kunik 1999 y Rojas 1998) es una proteína esencial para la infectividad algo que no se observa en los begomovirus bipartitas (Wartig *et al.* 1997). Para contrarrestar la ausencia de las proteínas del movimiento codificadas por el genoma B de begomovirus bipartitas la proteína CP de TYLCV se une a DNA de cadena doble y sencilla transportándolos del núcleo al citoplasma y de ahí a través de los sistemas vasculares de la planta (Rojas *et al.* 1998) de esta forma se confirma

porque se considera un homólogo funcional de BV1. Como se ha establecido para todos los geminivirus la proteína CP tiene ingerencia directa en la especificidad a ser transmitido por su vector (Briddon 1990) ya que se ha identificado un “loop” expuesto que contiene los amino ácidos críticos para establecer una interacción con proteínas o factores implicados en la transmisión presentes en el insecto vector (Morin 2000).

Proteína del movimiento (MP)

La proteína del movimiento presenta un peso molecular de 13KDa y es obtenida a partir del gen MP. Además, mediante experimentos de micro inyección se ha observado que la proteína del movimiento incrementa el transporte de DNA viral del núcleo al citoplasma mediado por la proteína CP y que exhibe una limitada capacidad para el transporte ADN viral por el plasmodesmo (Rojas *et al.* 2001). Mutaciones en esta proteína producen una alteración entre las cantidades de ADN viral de cadena sencilla y doble reflejándose una alteración en la presentación de síntomas que va desde la disminución en la intensidad hasta la ausencia total de los mismos (Padidam *et al.* 1995, Rigden *et al.* 1993).

Las proteínas Rep y REn codificadas por los genes Rep y REn respectivamente mantienen exactamente la misma función y posición dentro del genoma que la descrita con anterioridad para begomovirus bipartitas. Con respecto a la proteína TrAP codificada por el gen TrAP de TYLCSV hay una diferencia con lo observado en la proteína TrAP de bipartitas pues dependiendo del huésped puede no ser necesaria para infectar plantas de *Nicotiana bentamiana* pero si es importante al tratar de infectar tomate (Wartig *et al.* 1997) lo cual esta asociado con los mecanismos de defensa de la planta. Por ultimo la proteína C4 codificada por el gen del mismo nombre ha demostrado ser un factor importante al momento de evaluar la patogenicidad de TYLCV (selth *et al.* 2004, Van wezel *et al.* 2002). Plantas transgénicas de *N. bentamiana* expresando la proteína C4 mostraban un fenotipo característico de síntomas virales (Krake *et al.* 1998) lo que no se observa en begomovirus bipartitas (Pooma *et al.* 1996).

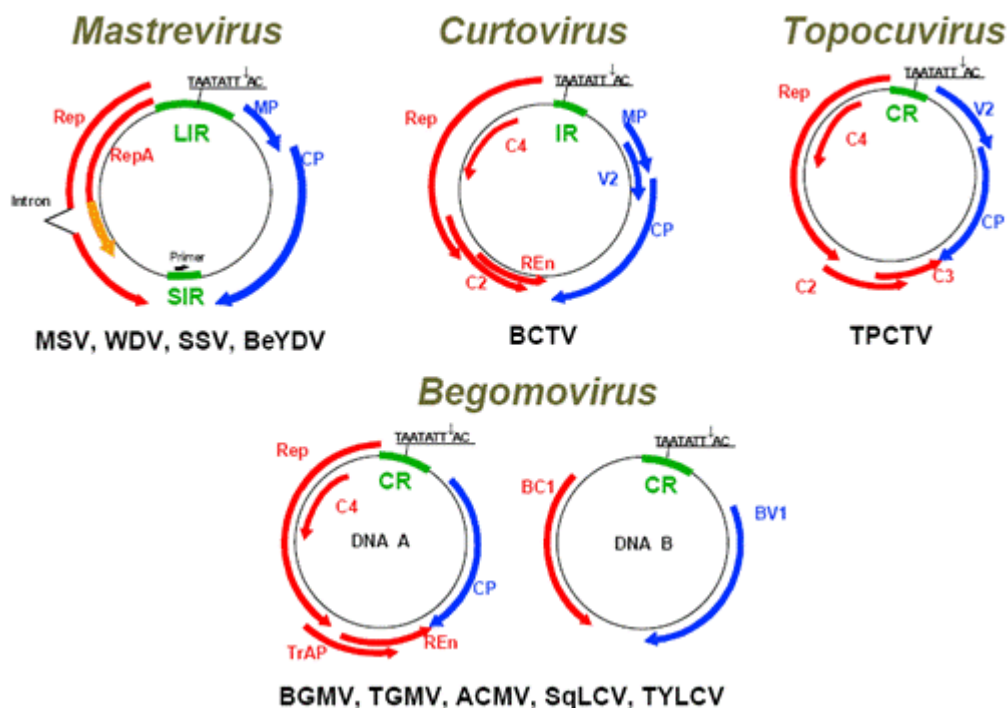


Figura 1.- Organización genómica de los cuatro géneros pertenecientes a la familia Geminiviridae. Los genes están representados por flechas de tal forma que las que apuntan en sentido de las manecillas del reloj corresponden a los genes en sentido del virión mientras las que apuntan en sentido contrario se tratan de los genes en sentido de la cadena complementaria. En verde se representan las diferentes regiones intergénicas correspondientes a cada género. (Modificada de Gutierrez *et al* 2001).

1.3. Genomas satélites

Como se ha descrito con anterioridad, a excepción de *TYLCV* todos los begomovirus monopartitas se encuentran restringidos al viejo mundo y como una constante se ha observado que su organización genética y funcional no son insuficientes para producir los síntomas característicos de su enfermedad tal es el caso de *Cotton leaf curl virus (CLCuV)*, *Ageratum yellow vein virus (AYVV)* y *Eupatorium yellow vein virus (EYVV)*. Para superar esta limitante se asocian a moléculas pequeñas de ADN de doble cadena conocidas como satélites (figura 2) que son capaces de modular el desarrollo de síntomas (Mansoor *et al.* 2003 y 1999). Actualmente se conocen dos tipos de satélites virales:

1.3.6.1 Alfa- satélites

Tienen un tamaño que va de los 1364 a los 1389 nucleótidos, y su asociación con begomovirus se ha dado en base a procesos de “captura” al momento de presentarse en la naturaleza infecciones simultaneas por begomovirus y nanovirus (Briddon *et al.* 2004). Están conformados por tres estructuras principales; a) Una región rica en adeninas, b) una estructura tallo-asa que incluye el origen de replicación presente en los virus que se replican por el mecanismo de circulo rodante y c) un gen en sentido del virión que codifica una proteína iniciadora de la replicación presente en los nanovirus, otra familia de virus de ADN de cadena sencilla que infectan plantas (Briddon *et al.* 2004). Como una excepción se han reportado los dos primeros casos de begomovirus bipartitas de origen americano encontrados en Brasil y que están asociados a ADN satélites tipo α (Paprotka *et al.* 2010). Los α Satélites son capaces de auto replicarse en las células del huésped (Saunders *et al.* 2002) pero requieren del begomovirus con el cual se asocian (patrocinador) para moverse a través de la planta y para su transmisión por el insecto vector ya que son encapsidados por la CP del patrocinador. Aparentemente parece no existir una influencia de los α - Satélites sobre los procesos de infección y presentación de síntomas en las plantas hospederas.

1.3.6.2. Beta –satélites

La longitud promedio de su cadena es de 1354 nucleótidos (Briddon *et al.* 2003). Uno de los primeros reportes de un begomovirus interactuando con un β – Satélite fue el de *Ageratum yellow vein virus* un monopartita originario del viejo mundo y aunque se ha observado que la mayoría de estas interacciones se dan entre begomovirus monopartitas causando un gran numero de enfermedades (Mansoor *et al.* 2003 y Briddon *et al.* 2001) ya se ha reportado la primer interacción entre el begomovirus bipartita originario del nuevo mundo, *Cabbage leaf curl virus* (*CbLCuV*) y un β – Satélite (Muhammad *et al.* 2009). Mas de 130 secuencias correspondientes a β – Satélites asociados a begomovirus monopartitas han sido

depositadas en el Gen Bank indicando que estas interacciones son mas una regla que la excepción (Briddon *et al.* 2003).

Entre las características principales de los β – Satélites sobresalen, a) Un marco de lectura altamente conservado denominado como β C1, que está localizado en el sentido de la cadena complementaria (Saunders *et al.* 2004, Briddon *et al.* 2003), b) Una región rica en adeninas, c) Una región conservada de aproximadamente 200 nucleótidos que contiene una estructura tallo asa probablemente implicada en la replicación (Briddon *et al.* 2003). La función de la región rica en adeninas aun no ha sido elucidada pues su ausencia no produce cambios en la replicación, encapsidación o desarrollo de síntomas (Tao *et al.* 2004). Por lo tanto, posiblemente su función es mantener un tamaño apropiado para que la molécula satelital sea reconocida por algunas proteínas o factores tanto del virus promotor como del huésped. De manera contrastante el marco de lectura que codifica a la proteína β C1 ha demostrado ser un importante factor que determina la intensidad de los síntomas ya que plantas transgénicas que expresan la proteína β C1 desarrollan un fenotipo igual a los síntomas virales y mutantes en β C1 pueden alterar dramáticamente la infectividad del virus patrocinator (Saeed *et al.* 2005).

En teoría los β – Satélites deberían de ser mas dependientes del virus promotor si tomamos en cuenta que no codifica alguna proteína encargada de la replicación pero aun no se sabe como es que se replican, debido a que no comparten con los begomovirus los elementos en Cis indispensables para llevar a cabo la replicación por circulo rodante.

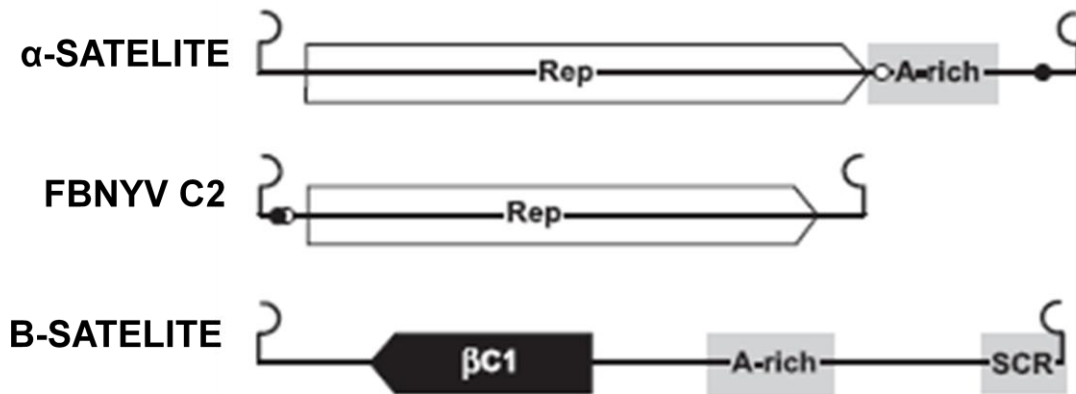


Figura 2. La representación lineal de la organización genómica de los α -satélites (Briddon *et al.* 2004) es comparada con el arreglo genómico de los β -satélites (Briddon *et al.* 2003) y del componente C2 del nanovirus Faba vein necrotic yellows virus (No. X80879; Katul *et al.* 1995) que codifica una proteína Rep maestra. La estructura tallo-asa se observa a partir del sitio de corte donde inicia la replicación. La posición y orientación de los marcos de lectura de las proteínas asociadas a la replicación (Reps de nanovirus y α -satélites) y del gen β C1 (β -satélites). Las cajas TATA se representan como puntos negros y las regiones de poliadenilación se observan como círculos en blanco. Imagen modificada de Briddon *et al.* 2004.

1.4. Replicación de los geminivirus

Actualmente se conocen tres mecanismos principales por medio de los cuales los geminivirus replican su genoma: replicación de la cadena complementaria, replicación dependiente de recombinación y la replicación mediante el mecanismo de círculo rodante (Erdmann *et al.* 2010), esta última es la más distribuida y mejor descrita debido a que es utilizada por una amplia gama de entidades genéticas cuyo genoma está constituido por ADN de cadena sencilla y entre las que destacan fagos como el Φ X174 (Eisenberg *et al.* 1977), fagos de bacteria gram positivas y virus que infectan plantas como los nanovirus (Londoño *et al.* 2010).

La replicación de ADN viral se realiza en el núcleo de las células vegetales infectadas utilizando como molde intermediarios de ADN de doble cadena (Revisado por Gutierrez 2002, Stenger 1991) y el factor indispensable para que esto se lleve a cabo es la presencia de la proteína de replicación, rep, en la cual se han identificado

residuos de aminoácidos conservados implicados en su unión a secuencias repetidas específicas de ADN conocidas como iterones, sugiriendo que las proteínas encargadas de iniciar la replicación por círculo rodante tienen un ancestro común (Londoño *et al.* 2010).

Los geminivirus replican su genoma en células vegetales que se encuentran en la fase G1 del ciclo celular y que por lo tanto, carecen de los niveles necesarios de polimerasas y factores relacionados con la replicación producidos por el huésped, es aquí en donde la proteína rep interactúa con una proteína homóloga a Retinoblastoma (Rb), a través de una región de aproximadamente 80 aminoácidos. (Kong *et al.* 2000) que contiene al dominio alfa-hélice 4, conservado entre las proteínas Rep de otros geminivirus.

La proteína homóloga a Rb regula el ciclo celular al interactuar con el factor transcripcional E2F (Sidle *et al.* 1996) reprimiendo la transcripción de genes que codifican proteínas necesarias para entrar a la fase S del ciclo celular (Lavia y Jansen 1999). Al final de la fase G1 del ciclo celular la fosforilación de la proteína Rb por cinasas ciclina-dependientes interrumpe su unión al factor E2F y permite la expresión de genes requeridos para entrar en la fase S del ciclo celular. La proteína de replicación viral (Rep) interactúa con la proteína Rb, evitando la interacción de esta última con el factor de transcripción E2F (Argüello *et al.* 2004).

Se han establecido varios esfuerzos para determinar si la proteína rep interactúa con la proteína rb mediante motivos conservados y como ejemplos claros se encuentra el caso del virus *TGMV*, en donde la proteína Rep contiene un residuo de leucina en la posición 148 cuya sustitución por cualquier otro aminoácido (excepto la metionina) afecta de manera negativa la interacción entre Rep y la proteína Rb y, el caso de *Cabbage leaf curl virus (CaLCuV)* en donde el residuo importante para la interacción con la proteína Rb se localiza en la posición 145, y corresponde a un residuo de leucina (Argüello *et al.* 2004).

Dentro de la región común de todos los geminivirus conocidos se encuentra el origen de replicación (figura 3) está formado por la estructura tallo-asa que incluye

un nanonucleótido (TAATATT/AC) altamente conservado en la mayoría de los geminivirus con excepción de BCTIV el cual pertenece a un nuevo grupo de curtovirus aislados en Oriente Medio y cuya horquilla de replicación contiene el nanonucleótido TAAGATT/CC (Bolak *et al.* 2008), además de secuencias itericas de 5 a 8 nucleótidos características de cada especie viral y que funcionan como determinantes de la replicación viral, y en la regulación transcripcional del gen Rep (Arguello *et al.* 1994).



Figura 3. Origen de replicación de un geminivirus típico. Se observan los sitios de unión específicos de las proteínas Rep (iterones), la estructura tallo-asa y el mecanismo de corte en el nanonucleótido TAATATT/AC para el iniciar la replicación.

El mecanismo de replicación por círculo rodante es el siguiente, después de la formación del intermediario de DNA de doble cadena, la proteína Rep reconoce los iterones presentes en la región común de ambos componentes e inicia la replicación, generando un corte endonucleolítico en la secuencia conservada presente en la horquilla de replicación. La tirosina 103 de la proteína Rep corta el enlace fosfodiéster entre las bases 7 y 8 del nonanucleótido conservado, produciendo un extremo 3' OH que sirve como punto de inicio de la síntesis de la cadena a partir de la cadena negativa, desplazando la cadena positiva. Rep permanece unida covalentemente al grupo fosfato del nucleótido 8, después realiza el corte de la cadena de DNA de cadena sencilla obtenida, y finalmente actúa como ligasa circularizando la molécula de DNA de cadena sencilla (Erdmann *et al.* 2010, Londoño *et al.* 2010 y Laufs *et al.* 1995).

1.5. Los geminivirus en México

Los primeros reportes sobre la presencia de grandes poblaciones de mosquita blanca en el estado de Sinaloa, México vinieron acompañados por la presencia de enchinamientos severos en las plantas de tomate y después de algunos años se identificó al Chino del tomate virus (CdTV) como el agente causal; desde ese momento y hasta la fecha se han identificado una amplia gama de geminivirus que provocan enfermedades serias a los cultivos, y en ocasiones epidemias devastadoras en algunas regiones del país. Entre las especies que representan una mayor afectación a los cultivos de interés económico se encuentran el *Squash leaf curl virus* (SLCV), *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), *Bean calico mosaic virus* (BCaMV), *Pepper Huasteco yellow vein virus* (PHYVV), *Tomato chino La Paz virus* (ToChLPV), *Tomato chino Baja California Sur virus* (ToChBCSV) (Holguín *et al.* 2004), y como resultado de una introducción en años recientes, el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), un begomovirus monopartita originario del Medio Oriente (Navot *et al.* 1991) que ha sido reportado desde la península de Yucatán (Ascencio *et al.* 1999) hasta la península de Baja California (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2010).

Si a lo anterior agregamos las malas técnicas de cultivo, la ausencia de una cultura fitosanitaria y la presencia cada vez mayor de infecciones mixtas tanto en malezas como cultivos de interés económico la probabilidad de padecer epidemias cada vez más agresivas está latente tal es el caso de los geminivirus *PHYVV* y *PepGMV* los cuales al coinfectar diferentes hospederos nos indican que existen ciertas interacciones que favorecen la presencia de estas mezclas en la naturaleza. Se ha observado que a nivel de síntomas, la mezcla generalmente produce un sinergismo no dependiente del huésped, ya que se ha observado en varias especies (Méndez *et al.* 2003).

Durante los últimos años se han intensificados los muestreos de plantas con síntomas de virosis presentes en la Península de Yucatán y como resultado esta región se ha establecido como una de las principales fuentes de diversidad genómica entre especies de begomovirus (Hernández *et al.* 2007 y García *et al.*

2006). La importancia de todo lo descrito con anterioridad es que los begomovirus que utilizan a las malezas como reservorios naturales ahora han sido identificados infectando frijol (Hernández *et al.* 2007), chile (Godínez *et al.* 2001) y tomate (Ascencio *et al.*,1999; Garrido *et al.*, 1998).

A mediados del 2010 se describió una nueva especie viral denominada *Rhynchosia yellow mosaic Yucatán virus* la cual a pesar de haber sido aislada a partir de malezas pertenecientes a la familia de las leguminosas, en un futuro se podría encontrar infectando otras leguminosas como frijol o soya (Hernández *et al.* 2010). En los últimos cuatro años el número de nuevas especies aisladas y caracterizadas en la península de Yucatán se ha incrementado drásticamente (Argüello-Astorga y Hernández-Zepeda., comunicación personal).

1.6. Geminivirus del Nuevo Mundo y sus vectores

1.6.1. Chicharritas saltadoras (Genero *Circulifer*)

Las chicharritas saltadoras (*Circulifer tenellus*) presentes en el continente americano son insectos pequeños que miden de 3.1 a 3.5 mm de largo y menos de 1 mm de ancho, son muy activos en climas áridos y semiáridos, se alimentan de la savia contenida en las plantas localizándola gracias a su capacidad de detectar los gradientes de pH diferenciando al parénquima ácido del floema alcalino. Cuando una chicharrita se alimenta de una determinada planta el daño que puede provocar por sí misma es mínimo o casi nulo, la causa por la cual se ha convertido en una limitante en la producción de cultivos de interés económico es su alta capacidad para transmitir agentes fitopatógenos a malezas y cultivos de interés económico entre los que destacan los Geminivirus pertenecientes al género curtovirus.

La distribución geográfica de este vector se ha establecido en casi toda la zona Occidental de los Estados Unidos (Creamer *et al.* 2003), algunas regiones del desierto Chihuahuense en México (Velásquez *et al.* 2008), parte del Mediterráneo y Medio Oriente (Bennett 1971). Reportes provenientes de Turquía e Irán nos indican que una segunda especie de chicharrita denominada *Circulifer haematoceps* es

capaz de transferir curtovirus inclusive con características ancestrales (Yazdi *et al.* 2008). La interacción entre el vector y los curtovirus inicia al momento de que la chicharrita se alimenta de una planta infectada por un curtovirus y este es ingerido, los viriones pasan a través del canal alimenticio y llegan al tracto digestivo en donde son absorbidos probablemente mediante un mecanismo de endocitosis mediado por un receptor (Nault *et al.* 1997) una vez que los viriones llegan a la hemolinfa son transportados a las glándulas salivales para después ser transmitidos a otra planta al momento de alimentarse. La detección del virus en cada uno de los órganos involucrados en la transmisión nos indica que se trata de una transmisión circulatoria persistente (Bennett 1971).

Experimentos realizados con *Beet mild curly top virus (BMCTV)* nos muestran que una chicharrita tarda en promedio de 1 a 2 minutos (Bennett 1971) en adquirir el virus al alimentarse y que después de una hora alimentándose la cantidad de virus adquirido por el vector es suficiente para una transmisión efectiva a nuevas plantas (Soto *et al.* 2002). La alta eficiencia mostrada para adquirir los viriones se explica por la facilidad para ubicar al floema y las altas cantidades de savia ingeridas (Soto *et al.* 2002). Se ha confirmado que el virus no se replica dentro del vector, solo es persistente aproximadamente por un mes y no hay transmisión trans ovárica (Soto *et al.* 2002).

1.6.2. La mosquita blanca (*Bemisia tabaci*).

La correlación entre la presencia de grandes poblaciones de mosquita blanca y la aparición de síntomas característicos de infección por geminivirus ha sido una constante desde finales del siglo XIX. Las condiciones climáticas y geográficas ayudaron en la distribución de los biotipos pertenecientes a este género de tal forma que en nuestro país se encontraba de manera predominante el biotipo A el cual tiene una tasa reproductiva limitada, un rango moderadamente limitado de hospederos y aunque era capaz de transmitir begomovirus las epidemias provocadas por los mismo se encontraban focalizadas a cultivos de hortalizas en regiones específicas del territorio nacional.

El ciclo infeccioso de los begomovirus es del tipo circulativo no persistente y tiene como etapas principales: la adquisición del virus por parte del vector después de alimentarse al menos por 15 minutos al alimentarse de una planta infectada y la posterior inoculación del virus al seguir alimentándose de plantas sanas (Hunter *et al.* 1998). A parte de transmitir begomovirus y algunos otros fitopatógenos provocan alteraciones en la estructura de la planta pues al alimentarse ingieren su savia y producen efectos fitotóxicos; los residuos de savia presentes en la lámina foliar favorecen la aparición de fumagina la cual es la acumulación de hongos que bloquean el proceso de la fotosíntesis. Siempre que se identifican infecciones severas causadas por begomovirus el primer paso y más importante era identificar y controlar al insecto vector mediante técnicas como: la liberación de machos estériles, uso de depredadores naturales, colocación de barreras biológicas, erradicación de malezas y obtención de variedades resistentes.

La apertura comercial a nivel mundial permitió el fácil y rápido intercambio de todo tipo de mercancías entre las que destacaron muestras vegetales infestadas con un nuevo biotipo de *Bemisia tabaci* conocido como biotipo B y que fueron introducidas en el continente americano vía República Dominicana para posteriormente diseminarse a gran parte del continente Americano.

La importancia del biotipo B desde el punto de vista económico radica en: su alta tasa de reproducción, un amplio rango de fuentes de alimento, alta voracidad y resistencia a insecticidas órgano- fosforados (Bedford *et al.* 1994). El biotipo B desplaza a las poblaciones de mosquitas blancas endémicas, estableciéndose con facilidad en regiones en donde antes no se encontraba, de tal forma que para finales de los años 80s se localizaba en todas las regiones agrícolas tropicales y subtropicales de América (Brown *et al.* 1995), y provocando en 1991 pérdidas económicas hasta por 500 millones de dólares en 1992 (Teuber *et al.* 1996). Muestreos realizados en plantas de *Euphorbia* para identificar por medio del análisis de ADN mitocondrial los biotipos de *Bemisia tabaci* presentes en Tucson, Arizona y se reportó la presencia de un nuevo biotipo denominado Q resistente a un amplio rango de insecticidas y que hasta la fecha había sido restringido al Viejo Mundo (Dennehy *et al.* 2010).

II. Aislamiento y caracterización de nuevas especies y cepas de begomovirus en infecciones mixtas

2.1. Antecedentes

Entre los begomovirus bipartitas presentes en el continente americano se distinguen dos grandes linajes: los begomovirus denominados “típicos” que incluyen numerosos linajes secundarios como el clado del *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) y el clado del *Abutilon mosaic virus* (ABMV), y por otra parte los virus pertenecientes al clado del *Squash leaf curl virus* (SLCV). Los virus pertenecientes a este último linaje se encuentran ampliamente distribuidos en los agroecosistemas de Norte- y Meso-américa donde causan graves enfermedades en cultivos de interés económico (Nakhla *et al.* 2005). Estos virus se distinguen de los begomovirus típicos por los primeros 140 aminoácidos de su proteína iniciadora de replicación y por el número y arreglo de sus iterones. El análisis de secuencias indica que el origen de los virus de clado SLCV se debe a la recombinación entre un begomovirus típico y un geminivirus ancestral cuyas características son por el momento un enigma. En la naturaleza se observan de manera común begomovirus pertenecientes a ambos linajes co-infectando tanto malezas como cultivos de interés económico. Sin embargo las técnicas de diagnóstico molecular basadas en uno o dos pares de iniciadores degenerados presuntamente “universales” por lo general favorecen la amplificación de los begomovirus típicos sobre los virus del clado del SLCV y es por eso que estos últimos con frecuencia no son detectados en plantas con infecciones dobles o múltiples.

En mi trabajo de tesis de Maestría participé en el desarrollo de un nuevo método molecular que combina el uso de iniciadores tanto “universales” como “específicos de linaje” para begomovirus el cual es muy eficiente para la detección de co-infecciones por virus de diferentes linajes. Además, al incluir un paso subsecuente de análisis por RFLPs, permite detectar también la co-existencia de dos o más virus de un mismo linaje en una planta infectada, de tal forma que es factible identificar prácticamente a todos los begomovirus que estén involucrados en una infección mixta natural o experimental. Como parte del mismo trabajo de tesis se

identificaron y caracterizaron de forma preliminar nuevas especies y cepas de begomovirus en muestras de campo provenientes de Sinaloa y San Luis Potosi, por lo que entre los objetivos principales de nuestro proyecto doctoral incluimos la caracterización molecular y biológica completa de algunos de esos begomovirus.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GENERAL

Utilizar las técnicas de diagnóstico molecular de begomovirus desarrolladas en el laboratorio de Biología Molecular de Plantas del IPICYT (Monreal-Vargas, 2005; Mauricio-Castillo, 2006; Bañuelos-Hernandez *et al.*, en preparación) para continuar el análisis de la diversidad de begomovirus presentes en los estados de San Luis Potosí, Sinaloa y Morelos, y realizar la caracterización molecular y biológica completa de algunos de los nuevos virus identificados en ese estudio.

2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Completar la caracterización molecular de las cepas de *Rhynchosia golden mosaic virus* aisladas de muestras de soya colectadas en Sinaloa e identificadas en mi trabajo de tesis previo (Mauricio-Castillo, 2006)
2. Realizar la caracterización biológica de las dos nuevas especies de begomovirus aisladas de malezas con infecciones mixtas, y caracterizadas molecularmente en mi trabajo previo: *Rhynchosia mosaic Sinaloa virus* (RhMSinV) y *Sida mosaic Sinaloa virus* (SiMSinV).
3. Caracterizar el segundo componente genómico (DNA-B) de *Okra yellow mosaic Mexico virus* aislada de muestras de campo colectadas en cultivos de Morelos y Guerrero.
4. Realizar un escrutinio amplio de cultivos agrícolas en el Estado de San Luis Potosí para identificar los begomovirus presentes en los mismos.

2.3 MATERIALES Y METODOS

2.3.1 Colecta en campo y manejo de muestras

Los muestreos se realizaron entre los años de 2005 y 2010 en cultivos de soya localizados en Guasave, Sinaloa; Chile, pepino y tomate presentes en las cuatro zonas del estado de San Luis Potosí (Altiplano, Centro, Huasteca y Media) y sembradíos de Okra en los municipios de Iguala y Mezatepec en los estados de Guerrero y Morelos respectivamente; En todas las regiones de muestreo se observaron plantas con síntomas de virosis asociados a la presencia de mosquitas blancas. Para la recolección de muestras, se realizaron muestreos de plantas (incluyendo malezas) presentes en cultivos de interés económico, el criterio de selección de muestras infectadas se realizó de acuerdo a la observación de sintomatología típica causada por geminivirus (Gabor y Wieve 1997, Blancard 1996, Jones *et al.* 1991). Las muestras colectadas fueron rotuladas y almacenadas en bolsas de plástico a -20°C para finalmente ser conservadas a -80°C y así evitar su descomposición.

2.3.2 Extracción de ADN

Se adoptó un protocolo de extracción de DNA genómico único para todas las muestras de tejido vegetal analizadas. Este se basó en una modificación del método de Della Porta, que utiliza nitrógeno líquido y el buffer de extracción "A" compuesto por Tris 100 mM- pH 8.0, NaCl 50mM- pH 8.0, EDTA 50mM- pH8.0 y agua destilada. El protocolo utilizado se describe a continuación.

- Se pesan 50 mg de tejido vegetal.
- Hacer molienda en Nitrógeno líquido.
- Agregar 480 µl de buffer de extracción A y moler suavemente.
- Adicionar 37.5 µl de SDS al 20% y mezclar invirtiendo los tubos.

- Calentar a por 5 minutos y enfriar a temperatura ambiente.
- Agregar 94 μl de Acetato de sodio 5 Molar y mezclar invirtiendo los tubos.
- Colocar en hielo 5 minutos.
- Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- Adicionar 600 μl de Fenol-Cloroformo y mezclar con vortex por 10 segundos.
- Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- Agregar 600 μl de cloroformo-Alcohol isoamílico y centrifugar a 13rpm por 5 minutos.
- Agregar 600 μl de Isopropanol e incubar en hielo 5 minutos.
- Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos y eliminar el sobrenadante.
- Lavar pastilla con 400 μl de Etanol al 70%.
- Centrifugar a 13000rpm por 3 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y secar.
- Resuspender en 40 μl de TE o agua.

2.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para todos los juegos de oligonucleótidos, la composición de la mezcla de reacción para PCR (50 μl volumen total) fue la misma y consistió en lo siguiente: Buffer *Taq* DNA polimerasa 1X, MgCl_2 1.5 mM, dNTPs 0.2mM, oligonucleótidos 1 μM , *Taq* polimerasa 2.5 UT, DNA 1 μg . Las condiciones para la amplificación del ADN viral fueron: desnaturalización inicial a 94°C/2min, y 35 ciclos conformados por una temperatura inicial de 94°C/1min, una temperatura de alineamiento de

55°C/1min (en caso de genomas completos la temperatura aumenta a 62°C) y una extensión a 72°C/1min (para amplificar genomas completos el tiempo aumenta a 2min), con una extensión final de 72°C/5min. Los productos amplificados fueron analizados por movilidad electroforética en geles de agarosa al 1.5 %.

2.3.4. Caracterización mediante patrones de restricción (RFLPs por sus siglas, en ingles) de los fragmentos amplificados y clonas obtenidas

Los productos de PCR y clonas, obtenidas a partir de extractos de ADN de plantas con probables síntomas de virosis, fueron sometidos a análisis de RFLP (Restriction Fragment Large Polimorphism) utilizando las enzimas *Msp1* y/o *Hha1* en combinación con la enzima *EcoR1* (New England BioLabs™) establecidas previamente por Monreal-Vargas y Mauricio-Castillo (manuscrito en proceso). Los productos digeridos se analizaron por movilidad electroforética en geles de agarosa al 2.0 %.

2.3.5. Clonación y secuenciación

Los productos de PCR obtenidos a partir de las muestras de campo se clonaron directamente en el plásmido PGEM-TEasy (Promega, Madison, WI), según las indicaciones del proveedor. La transformación de células competentes de *Escherichia coli* Top 10 se realizó por los métodos de electroporación y/o choque térmico, facilitando la selección de transformantes en base al color de las colonias crecidas (blancas / azules) en medio LB conteniendo ampicilina (marcador selectivo), IPTG y X-gal. Los protocolos de transformación se describen a continuación.

Transformación por el método de CaCl₂

- Descongelar las células competentes Top 10 en hielo (33 µl por tubo).
- Agregar 1 µl de la ligación (100 ng de ADN/µl).
- Colocar los tubos en hielo de 30 minutos.

- Colocar los tubos en baño María a 42°C por 1.5 minutos.
- Reposar los tubos en hielo por 10 minutos.
- Sacar los tubos del hielo y adicionar en campana 250 µl de medio LB.
- Incubar a 37°C durante 45 minutos con agitación constante.
- Sembrar 100µl de las células transformadas en una placa con medio LB sólido.
- Incubar de 24 horas a 37°C.

Transformación por el método de electroporación

- Descongelar las células competentes en hielo.
- Enfriar las celdas de electroporación.
- Una vez que las células competentes estén descongeladas adicionar
- 2 µl de la ligación.
- Pasar la mezcla a la celda de electroporación evitando la formación de burbujas de aire.
- Electroporar a 25 µFaradays; 200 homs y 2.5 Kvolts.
- Recuperar las células en un tubo eppendorf y agregar 450 µl de medio LB.
- Poner en agitación de 40 minutos a 37°C.
- Plaquear 25 y 50 µl de la mezcla de reacción en placas de medio LB sólido adicionado con un marcador de selección, Xgal e IPTG.
- Incubar de 24°C horas.

La extracción del ADN plasmídico se realizó de acuerdo al procedimiento modificado de Birnboim (Sambrook y Russell 2001). Los productos clonados fueron secuenciados en la Unidad de Secuenciación del CINVESTAV, Irapuato, y la secuencia nucleotídica obtenida en cada caso se comparó con secuencias disponibles en la base de datos del Gen Bank, utilizando los algoritmos BLAST y Clustal V (MegAlign, DNASTAR software, London).

2.3.6. Preparación de las partículas de tungsteno usadas para la transformación por biobalística

- Pesar 60 mg de partículas de Tungsteno (M10, BioRad).
- Resuspender en 2 ml de Acido nítrico (HNO₃) 0.1N y sonicar 20 minutos revisando que las partículas se mantengan resuspendidas.
- Centrifugar a 10,000 rpm por 2 minutos.
- Eliminar el sobrenadante, adicionar 2 ml de etanol absoluto y sonicar brevemente.
- Centrifugar a 10,000 rpm durante 2 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de agua desionizada estéril.
- Hacer cuatro alícuotas de 250ul y colocarlas en tubos limpios y secos.
- Agregar a cada tubo 750ul de agua desionizada estéril.
- La concentración final de tungsteno en cada tubo es de 15µg/µl.
- Almacenar a -20°C.

2.3.7. Obtención de clonas infectivas de begomovirus

Se extrajo el ADN total de las plantas con posibles síntomas de virosis recolectadas durante este trabajo. Con la combinación de oligonucleótidos RepMot-1 (5-GGATANGTRAGGAAATARTTCTTGGC-3) / pCP-70Rev (5-GAAGGSCCNTGYAAGGTNCAGTC-3), diseñados por Monreal-Vargas (Tesis Maestría, 2005) se confirmó la presencia de begomovirus sin importar su origen geográfico y/o filogenético. Posteriormente con la ayuda de los oligonucleótidos diseñados por Monreal - Vargas y Mauricio – Castillo (Tesis Maestría, 2006) se obtuvieron las secuencias genómicas completas de cada virus aislado y finalmente se inició la amplificación y clonación de los componentes genómicos completos mediante el siguiente método:

La obtención de clonas infectivas a partir de extractos de ADN genómico total fue mediante el diseño y uso de oligonucleótidos específicos para cada uno de los begomovirus estudiados durante este trabajo (Tabla 2). Dependiendo de la secuencia viral los oligonucleótidos fueron diseñados en regiones que incluyen sitios

de restricción únicos presentes en la secuencia viral. Para todos los juegos de oligonucleótidos, la composición de la mezcla de reacción para PCR (50 μ L volumen total) fue la misma y consistió en lo siguiente: Buffer *Taq* DNA polimerasa 1X, $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTPs 0.2mM, oligonucleótidos 1 μ M, *Taq* polimerasa 2.5 UT, DNA 1 μ g. Las condiciones para la amplificación del ADN viral fueron: desnaturalización inicial a 94°C/2min, y 35 ciclos conformados por 94°C/1min, 62°C/1min, 72°C/2.5min, con una extensión final de 72°C/8min. Los productos amplificados (2.5 a 2.7kb) fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % y clonados en el vector comercial pGEMTEasy (Promega) como lo establece el fabricante, a 3ul de producto de PCR se agregan 5ul de buffer de reacción, 1ul de ligasa y 1ul de vector pGEMTEasy; La mezcla de ligación se incubó durante 18 hrs a 4°C para posteriormente ser utilizada en la transformación de células competentes de *Escherichia coli*. Como marcador de selección se utilizó el bloqueo del gen que codifica la proteína β -galactosidasa mediante la inserción del ADN viral inhibiendo su actividad enzimática sobre el compuesto orgánico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) dando como resultado la presencia de colonias blancas y no azules como se esperaría. Los vectores recombinantes se aislaron de las células transformadas, se digirieron con la enzima *Eco R1* y se confirmó si el inserto tenía el tamaño esperado para posteriormente ser secuenciado. Los plásmidos que contenían el inserto esperado se utilizaron en análisis de inoculación por biobalística previa liberación del genoma viral al cortar en los sitios de restricción únicos incluidos en los iniciadores específicos diseñados para cada genoma viral.

Iniciadores en sentido del virión	Virus y genoma amplificados	Secuencia 5' – 3'
RhMSinV-A-For	RhMSinV-A	aatagtactgccactgtcaagaacgatc
RhMSinV-B-For	RhMSinV-B	cccggatccttagcgaaaagaatgac
SiMSinV-A-For	SiMSinV-A	caacatatgaatcgtagctgactgct
SiMSinV-B-For	SiMSinV-B	ctaaagcttaatagcgagcccaag
OYMMV-A-For	OYMMV-A	ctacatatgtatcgtagctgattgctggc
OYMMV-B-For	OYMMV-B	
Iniciadores en sentido complementario	Virus y genoma amplificados	Secuencia 5' – 3'
RhMSinV-A-Rev	RhMSinV-A	aatagtactgggttcgttatcgaacatg
RhMSinV-B-Rev	RhMSinV-B	cccggatccaattccatggaat
SiMSinV-A-Rev	SiMSinV-A	ccccatatgccaaggcgttgaatgcag
SiMSinV-B-Rev	SiMSinV-B	ccaagcttgctggcattaccaga
OYMMV-A-Rev	OYMMV-A	gggcatatgccaaggcgttgaatgcacgt
OYMMV-B-Rev	OYMMV-B	

Tabla 2. Oligonucleótidos específicos diseñados y utilizados durante este trabajo para producir clonas virales infectivas de *Rhynchosia mosaic Sinaloa virus* (*RhMSinV*), *Sida mosaic Sinaloa virus* (*SiMSinV*) y *Okra yellow mosaic Mexico virus* (*OYMMV*).

2.3.8. Recubrimiento de las partículas de tungsteno con el ADN viral y transformación mediante biobalística (6 reacciones)

- Poner en un tubo eppendorf el ADN a utilizar, un total de 12 µg (6 µg de ADN A y 6 µg de ADN B).
- Agregar 50 µl de partículas de tungsteno equivalente a 50 µg.
- Agregar 50 µl de cloruro de calcio (CaCl₂) 2.5M.
- Agregar 20 µl de espermidina 0.1 M.
- Sonicar brevemente hasta que las partículas se vean re suspendidas.
- Centrifugar a 10,000 rpm por 10 segundos.
- Tirar el sobrenadante y agregar 400 µl de etanol absoluto.
- Centrifugar nuevamente a 10,000 rpm por 10 segundos.
- Tirar el sobrenadante y resuspender en 60 µl de etanol absoluto.

- Cada reacción de bombardeo se hace con 10 µl de la solución.
- La técnica de bombardeo a baja presión (600 psi) se realizó conforme se establece en el manual de operaciones de la pistola de Helio BioRad.

2.3.9. Inoculación por biobalística de los genomas virales clonados

Se inocularon plántulas con cuatro hojas verdaderas (apicales) de *Nicotiana benthamiana*, Soya y *Rhynchosia minima*. Antes de la inoculación los ADN virales fueron liberados del plásmido pGEM-TEasy. Los controles negativos consistieron en plántulas bombardeadas con el vector pGEM-TEasy sin inserto. La técnica de bombardeo se realizó conforme lo establece el manual de operaciones de la pistola de bombardeo con gas Helio de BioRad a una presión de salida de 600 psi (lb/in²). Las plantas bombardeadas fueron mantenidas en cámaras de crecimiento durante un periodo de 4 a 16 semanas después de la inoculación y se evaluó la presencia o ausencia de síntomas virales en las plantas inoculadas. El ADN total fue aislado y evaluado por PCR utilizando oligonucleótidos universales RepMot-1 y pCP-70Rev.

2.4. RESULTADOS

2.4.1. Selección de oligonucleótidos universales

Para amplificar el genoma A de begomovirus típicos seleccionamos las siguientes combinaciones de iniciadores diseñados en nuestro laboratorio (Tabla 3): YMAC-for / DGRS-rev, cuyo amplicón de 1200pb incluye regiones parciales de los genes Rep, C4 y CP y la secuencia completa de los genes TrAP y REn mientras que el fragmento de 1685pb amplificado por la combinación YMAC-rev / WARfor incluye porciones de los genes Rep y CP así como la región intergénica en su totalidad. Los productos de PCR obtenidos con estas combinaciones abarcan la totalidad del genoma viral (Monreal-Vargas, 2005) y, se traslapan en una región de aprox. 300 pb lo cual facilita el ensamble del genoma en caso de infecciones mixtas.

Con respecto a los begomovirus pertenecientes al linaje del SLCV seleccionamos las combinaciones de oligonucleótidos prSL2060-for / YMAC-rev (fragmento amplificado de 1417pb) y prSL2200-rev / YMAC-for (amplicón de 1323pb). Ambos productos de PCR comprenden la totalidad del genoma A y se traslapan en una región de 140pb lo cual facilita el armado del genoma en caso de que se encuentre más de un virus (Mauricio-Castillo, 2006).

El fragmento de ADN amplificado utilizando el iniciador SL-2060-for en combinación con YMAC-rev comprenden segmentos de 132 codones del gen Rep, la región intergénica que es la región genómica más variable en secuencia nucleotídica (Padidam *et al.* 1995), y un fragmento de 216 codones del gen CP, que en conjunto proporcionan información suficiente para establecer la identidad de los begomovirus cuyas secuencias fueron amplificadas. Por otra parte, el segmento de ADN obtenido con los iniciadores SL-2200-rev / YMAC-for incluye la región genómica faltante para completar los genes Rep y CP, así como las secuencias completas de los genes TrAP y REn.

Por último seleccionamos dos combinaciones de oligonucleótidos universales capaces de amplificar el genoma B de begomovirus sin importar su origen geográfico o, a que clado pertenezcan. Estos iniciadores hibridan principalmente en el extremo 3' de regiones genómicas conservadas presentes en los genes que codifican para las proteínas BC1 y BV1 encargadas del movimiento viral a través de la planta.

La combinación BC1-290for / BR1-310rev amplificó un fragmento de 1480 pb que incluye 97 codones del gen BC1, la secuencia completa de la región intergénica y 103 codones del gen BV1. La combinación BC1-80rev/ BV1-310for amplificó un fragmento de 1300pb que incluye las secuencias restantes de los genes BC1 y BV1 (figura 6). Los productos de PCR obtenidos con estos pares de iniciadores comparten una región traslapada de 210pb lo cual resulta efectivo para identificar geminivirus coexistentes en infecciones mixtas o inclusive la presencia de pseudorecombinantes.

Iniciadores en sentido del Virión	Secuencia 5' – 3'	Posición en el genoma ^{A/B/C}
WAR-for	GCCCACATYGTYYTTNCCNGT	1802-1822 ^A
YMAC-for	CTAAGCTTGTAYATGGCATGTACNCATGC	882-902 ^A
SL-2060-for	CGGCGTTRRRTARACGTCGTC	2077-2098 ^B
BV1-310-for	GGWACNGTNAARATYGARCGTGT	734-756 ^C
BC1-290-for	GAGAARTAGTGGAGATCTATGTTRCAYCT	1826-1854 ^C
Iniciadores en sentido complementario	Secuencia 5' – 3'	Posición en el genoma ^{A/B/C}
DGRS-rev	CGGCAGATCWGCTAGAGGAGG	2118-2138 ^A
YMAC-rev	ACAAGCTTWGASGCATGNGTACATGCCA	887-913 ^A
SL-2200-rev	TTCGACMTYACTCACCC	2235-2251 ^B
BV1-310rev	CGTTCAATYTTNACNGTWCCYTTRAAACG	725-758 ^C
BC1-80rev	GAYGARTATCARYTDTNCATGA	2060-2082 ^C

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio para amplificar los genomas A o B de Begomovirus. Todos fueron diseñados y/o utilizados por Monreal-Vargas (2005) y Mauricio-Castillo (2006).

^A Se tomo como referencia el genoma A de *PHYVV* (No. de acceso NC001359)

^B La referencia fue el genoma A de *PepGMV* (No. de acceso NC004101)

^C Con referencia al genoma B de *PHYVV* (No. de cceso NC001369)

2.4.2. Aislamiento y caracterización de begomovirus presentes en el estado de Sinaloa, México

Como parte de una colaboración con el grupo de investigación del Dr. Jesús Mendez Lozano (CIIDIR, Sinaloa), que colectaron muestras de Soya (*Glycine max*, Merr.) y malezas en campos agrícolas del municipio de Guasave en Sinaloa, se nos proporcionaron extractos de ADN total de varias muestras de campo, incluida una proveniente de una planta del llamado “frijolillo silvestre” (*Rhynchosia minima*), que fueron analizados por medio de PCR utilizando las combinaciones de oligonucleótidos universales para amplificar el genoma A de begomovirus típicos.

Los productos amplificados fueron clonados en el vector pGEMTEasy, secuenciados, y finalmente se reporto un genoma de 2605 pb que según los criterios taxonómicos actuales (Faquet *et al.* 2008) correspondió a una nueva cepa de la especie *Rhynchosia golden mosaic virus (RhGMV)* denominada provisionalmente *RhGMV-Sinaloa*. Debido a que la especie en cuestión solo se había reportado en Centro América (Nakhla *et al.* 2005) y Chiapas (Ascensio-Ibañez *et al.* 2002) el aislado de frijolillo silvestre amplia la distribución geográfica de esta especie viral.

Con la finalidad de determinar la presencia de begomovirus pertenecientes al linaje del SLCV, se utilizaron las siguientes combinaciones de iniciadores universales: SL-2200rev / YMACfor; SL-2060for / YMACrev. Simultaneamente utilizamos las combinaciones de oligonucleótidos BC1-290for / BV1-310rev y BC180rev / BV1-310for para identificar los genomas B presentes en la muestra. Se reconstruyeron los genomas A (2578 pb) y B (2525 pb) de una nueva especie denominada *Rhynchosia mosaic Sinaloa virus (RhMSinV)*. La región intergénica de esta nueva especie fue analizada y comparada con las secuencias disponibles en el banco de datos del GenBank dando como resultado la presencia de iterones con una secuencia única (TGGAGGA) entre las especies de geminivirus reportadas hasta Mayo de 2006.

Durante este trabajo nos dimos a la tarea de complementar la caracterización filogenética y biológica de *RhMSinV*. La secuencia total del genoma A de *RhMSinV* fue comparada con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank mostrando una similitud del 85.5% con su pariente mas cercano, *Rhynchosia yellow mosaic Yucatan virus (RhYMYucV)* un virus reportado a mediados del año en curso (Hernández-Zepeda *et al.* 2010), mientras que *Cabbage leaf curl virus – Jamaica (CaLCV)* ha sido relegado al segundo puesto como el pariente más cercano a *RhMSinV* con un 84% (tabla 4).

VIRUS	GENOMA A COMPLETO	C1	C2	C3	C4	CP
<i>RhYMYucV</i>	85.5	88.9 (89.7)	93.3 (95.3)	95.7 (99.3)	86.7 (76.0)	90.2 (94.0)
<i>CaLCV-Jam</i>	84.0	86.9 (87.7)	87.2 (88.4)	87.2 (81.1)	86.0 (74.2)	86.8 (93.2)
<i>PepGMV-Mo</i>	79.6	78.2 (81.9)	84.6 (78.3)	84.9 (81.8)	N.D.	85.3 (92.0)
<i>PepGMV-Gto2</i>	79.6	79.0 (83.7)	83.8 (73.6)	83.2 (79.5)	N.D.	84.9 (92.0)
<i>TbYCrV-Cuba 2007</i>	76.6	68.0 (65.0)	90.3 (90.7)	90.5 (91.7)	44.2 (22.4)	86.4 (94.0)
<i>TbYCrV</i>	76.5	68.0 (65.0)	90.0 (90.7)	90.5 (90.9)	44.2 (22.4)	86.4 (93.6)

Tabla 4.- Porcentaje de identidad obtenido al comparar el genoma A completo y las secuencias codificantes de *Rhynchosia mosaic Sinaloa virus* (*RhMSinV*; No. acceso DQ406672) con las presentes en *Rhynchosia yellow mosaic Yucatan virus* (*RhYMYucV*; No. acceso EU021216), Cabbage leaf curl virus - Jamaica (*CaLCV-Jam*; No. de acceso DQ178612), *Pepper golden mosaic virus – Mo* (*PepGMV-Mo*; No. de acceso AY928512), *Pepper golden mosaic virus – Guanajuato 2* (*PepGMV-Gto 2*; No. acceso GU128149), *Tobacco yellow crinkle virus – Cuba 2007* (*ToYCrV-Cuba 2007*; No. acceso FJ222587) y *Tobacco yellow crinkle virus* (*ToYCrV*; No. No. acceso FJ213931), sus parientes más cercanos filogenéticamente. El porcentaje de identidad con respecto a las secuencia de amino ácidos se observa en paréntesis. ND = No disponible; En este caso *PepGMV-Mo* carece de gen C4.

El análisis comparativo entre la región intergénica de *RhMSinV* y las presentes en cada uno de los geminivirus reportados hasta la fecha nos indica que aun no existe geminivirus alguno con el que comparta la secuencia de sus iterones de tal forma que con base en los criterios establecidos por el comité internacional para la taxonomía de virus (ICTV por sus siglas, en ingles), que indica que un geminivirus se considera una especie separada si su genoma A completo presenta una similitud global menor al 88% con su pariente más cercano (Fauquet *et al.* 2008) *RhMSinV* sigue conservando todas las características necesarias para ser considerado como una nueva especie de geminivirus.

2.4.2.1. Caracterización biológica de *RhMSinV*

Cuando se hacen muestreos vegetales ya sea en invernadero o en campo debemos de tomar en cuenta que la mayoría de los síntomas observados en la planta enferma se pueden deber a una amplia variedad de factores entre los que destacan cuestiones nutrimentales, sequia, afectación por bacterias, hongos, virus, etc. Es por eso que para realmente confirmar que, él o los begomovirus identificados son los causantes de los síntomas observados en campo se recurre a infectar plántulas sanas que puedan servir como posibles hospederos sin olvidar incluir como modelo de estudio la planta a partir de la cual se aisló originalmente el virus en cuestión.

Diseñamos oligonucleótidos específicos que nos facilitaran amplificar y clonar los genomas A y B de *RhMSinV* (tabla 2), las clonas obtenidas se confirmaron por secuenciación y la caracterización biológica de *RhMSinV* fue hecha utilizando como método de inoculación la técnica de biobalística previa selección de plantas sanas que pueden servir como probables hospederos. La capacidad infectiva de *RhMSinV* se evaluó por medio de la aparición de síntomas, confirmando por PCR la presencia del virus inoculado en las hojas nuevas mediante el uso de oligonucleótidos específicos del linaje al que pertenece y finalmente la secuenciación de los amplicones clonados. Las plantas seleccionadas como modelos de estudio fueron: *Nicotiana bentamiana*, Frijolillo silvestre (*Rhynchosia minima*, huésped natural) y Soya (*Glycine max*, Merr.).

La viabilidad de *RhMSinV-A* y *RhMSinV-B* como posibles clonas infectivas fue evaluada inicialmente en plántulas de *Nicotiana bentamiana*; La detección de ADN viral por PCR a partir de extractos obtenidos de las plantas inoculadas se realizo hasta el momento en que se observaron síntomas característicos de virosis (de 2 a 14 semanas). La inoculación se hizo utilizando 5 plántulas sanas con un promedio de 4 hojas verdaderas y dos controles negativos todos por duplicado. Dos semanas después de la inoculación los primeros síntomas se observaron en *Nicotiana benthamiana* y un seguimiento de la infección nos mostro que *RhMSinV* induce la deformación foliar y la presencia de mosaicos dorados para finalmente interferir en la

floración provocando aborto de flor en todas las plantas infectadas caso contrario a lo observado en plantas control (figura 7).

Después de que confirmamos que las clonas *RhMSinV-A* y *RhMSinV-B* eran infectivas nos dimos a la tarea de inocular plantas de *Rhynchosia minima*, una maleza también conocida como frijolillo salvaje y que al momento de la colecta fungía como hospedero natural, los síntomas mostrados consistieron en deformación foliar, la aparición de mosaicos dorados intensos y retardo en la floración. Finalmente la idea de infectar plántulas de Soya surgió entre otras cosas como resultado de su importancia como cultivo de interés económico, su inclusión en el grupo de las leguminosas al que pertenece el hospedero natural y por ultimo a que las plantas de *Rhynchosia minima* que contenían al nuevo virus se encontraban alrededor de cultivos de soya que no mostraban síntomas de algún tipo. A las cinco semanas de inoculadas las plantas de soya mostraron una sintomatología moderada caracterizada por deformación foliar, amarillamiento de las venas, presencia de moteados dorados los cuales a los pocos días convergieron para formar mosaicos del mismo color y retraso severo en el proceso de floración.

Los síntomas observados para cada una de las plantas infectadas se resumen en la figura 4. Con respecto a los síntomas observados al inocular *Rhynchosia minima* con los genomas A y B de *RhMSinV* los resultados obtenidos concuerdan con los síntomas observados en campo al momento de la colecta.

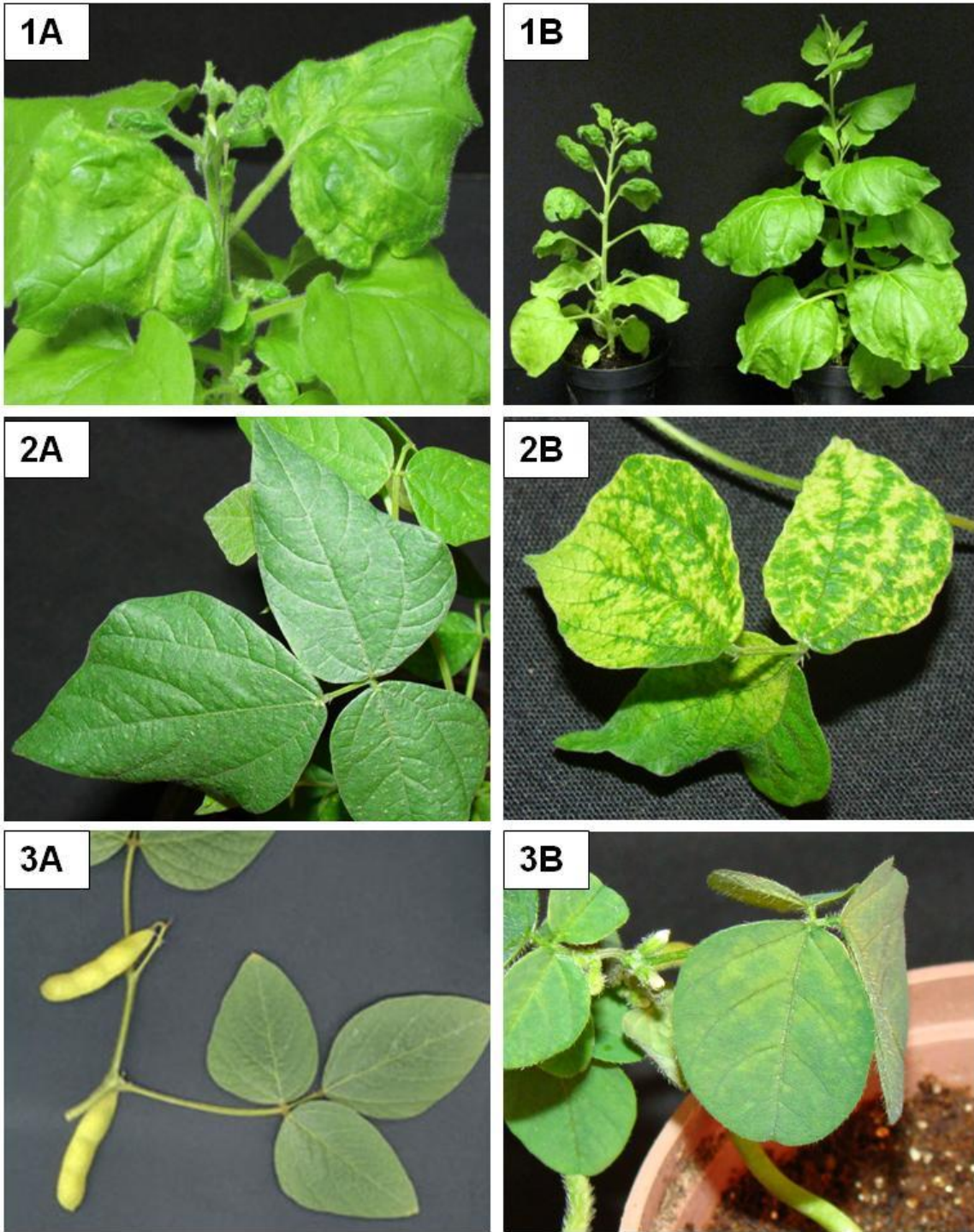


Figura 4. Comparación entre plantas sanas y los síntomas observados en plantas de *Nicotiana benthamiana* (1A y 1B); *Rhynchosia minima* (2A y 2B) y *Glycine max*, Merr. (3A y 3B) infectadas por *Rhynchosia mosaic Sinaloa virus*. En todos los casos se observan como principales características, la deformación foliar, retraso o ausencia de floración, la aparición inicial de moteados dorados y la posterior formación de mosaicos del mismo color.

2.4.2.2. *Sida mosaic Sinaloa virus (SiMSinV)*, una nueva especie de begomovirus presente en el estado de Sinaloa, México

Como resultado de los constantes muestreos en cultivos de soya presentes en regiones agrícolas de Guasave, Sinaloa se ha reportado la presencia de una maleza muy común perteneciente al género *Sida* (familia Malvaceae), la que presentaba síntomas característicos de virosis en forma de mosaicos amarillos. De la muestra antes mencionada se lograron amplificar dos begomovirus, el primero fue una nueva variante de la especie *Chino del tomato virus (CdTV)* y el segundo genoma viral correspondió a una nueva especie geminiviral perteneciente al género begomovirus denominada provisionalmente como *Sida mosaic Sinaloa virus (SiMSinV)*. Los análisis filogenéticos arrojaron una similitud relativamente cercana con virus pertenecientes a la especie *Chino del tomato virus* siendo *CdTV – [IC]* con un 84.4% el virus más cercano. Por último se aisló y caracterizó el genoma B de esta nueva especie geminiviral.

Durante este trabajo nos dimos a la tarea de actualizar los datos con respecto a la relación de *SiMSinV* con las nuevas especies de begomovirus reportadas hasta la fecha y como resultado observamos que su pariente más cercano a nivel filogenético sigue siendo *CdTV-[IC]* (tabla 5). Realizamos un análisis detallado de las iteraciones (TGGGGG) presentes en el origen de replicación de *SiMSinV* y mostraron que son idénticas a las presentes de otros geminivirus lejanamente relacionados, *Potato yellow mosaic virus (PYMV)* de Venezuela, *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus (ToYLYSV)* de Europa y *South African Cassava mosaic virus* de África (*SACMV*) lo cual a diferencia de lo observado con *RhMSinV* refleja que existe una convergencia evolutiva entre *SiMSinV* y las especies antes mencionadas (5).

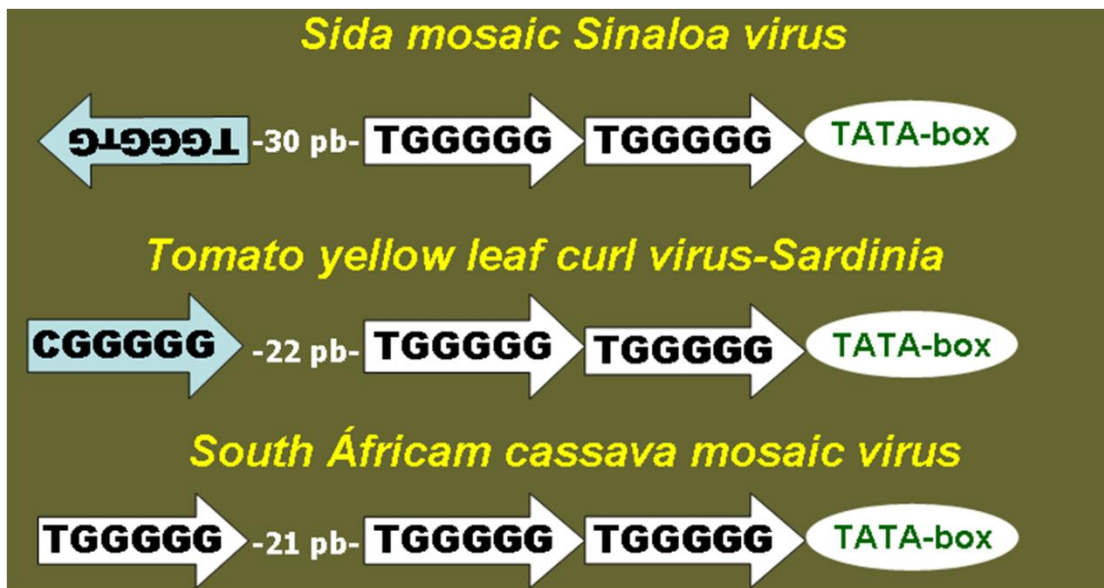


Figura 5. Comparación entre el número y arreglo de los iterones presentes en, *Sida mosaic Sinaloa virus* (*SiMSinV*; No. de acceso NC008059), *Tomato yellow leaf curl Virus-Sardina* (*TYLCV-Sardina*; No. de acceso X61153) y *South Africa cassava mosaic virus* (*SACMV*; No. de acceso AF155806)..

Por otra parte diseñamos oligonucleótidos específicos que nos permitieron amplificar la totalidad de los genomas A y B de *SiMSinV* (tabla 2) y posteriormente fueron clonados en el vector pGEMTEasy; Para confirmar que realmente los insertos clonados correspondían a los genomas A y B de *SiMSinV* todas las clonas obtenidas fueron secuenciadas y comparadas con la presentes en la base de datos del GenBank. Una vez confirmado lo anterior nos dimos a la tarea de evaluar el uso de tales genomas como posibles clonas infectivas al inocular mediante la técnica de biobalística plántulas de *Nicotiana bentamiana*.

A pesar de que las clonas parecían no tener problema alguno con respecto a la secuencia de los genomas clonados y a que la liberación del ADN viral y la calidad del mismo se dio de una manera satisfactoria no se logro infectar las plantas de *Nicotiana bentamiana* inoculadas lo cual se confirmo por PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para la especie viral analizada. Los resultados obtenidos nos llevan a la idea de que es necesario obtener y probar mas clonas con la finalidad de seleccionar las más óptimas y/o realizar las infecciones en otra

especie vegetal que resulte más sensible a la infección y, así completar la caracterización biológica de *SiMSinV*.

VIRUS	GENOMA A COMPLETO	C1	C2	C3	C4	CP
<i>CdTV-[IC]</i>	84.4	88.9 (89.2)	87.9 (85.3)	88.5 (84.1)	93.0 (84.7)	90.1 (96.8)
<i>CdTV-[RK]</i>	83.9	88.3 (88.6)	88.2 (85.3)	87.5 (82.6)	90.7 (78.8)	90.5 (96.8)
<i>CdTV-Sinaloa</i>	83.7	88.9 (88.1)	88.7 (83.7)	86.7 (80.3)	94.2 (85.9)	88.9 (94.8)
<i>OYMoIV</i>	82.5	88.1 (87.5)	86.9 (82.2)	87.0 (80.3)	90.3 (78.8)	84.4 (93.6)
<i>CoYSV</i>	82.2	81.8 (81.7)	88.5 (83.7)	85.5 (81.1)	86.0 (70.6)	89.3 (95.2)
<i>SiYMYucV</i>	80.5	81.7 (82.3)	88.7 (86.8)	87.7 (84.1)	90.3 (82.4)	88.4 (95.2)

TABLA 5.- Porcentaje de identidad obtenido al comparar el genoma A completo y las secuencias codificantes de *Sida mosaic Sinaloa virus (SiMSinV)* con las presentes en *Chino del tomato virus - [IC] (CdTV-[IC]; No. de acceso AF101476)*, *Chino del tomato virus - [RK] (CdTV-[RK] No. de acceso DQ 885456)*, *Chino del tomato virus - Sinaloa (CdTV- Sinaloa; No. de acceso DQ 347945)*, *Okra yellow mottle Iguala virus (OYMoIV; No. de acceso AY751753)*, *Corchorus yellow spot virus (CoYSV; No. de acceso DQ 875868)* y *Sida yellow mosaic Yucatan virus (SiYMYucV; No. acceso DQ875872)*, sus parientes mas cercanos filogenéticamente. El porcentaje de identidad con respecto a las secuencia de amino ácidos se observa en paréntesis.

2.4.3. Una nueva especie de begomovirus infectando cultivos de Okra en los estados de Guerrero y Morelos, México

La Okra (*Abelmoschus esculentus L. Moech*) es una hortaliza anual originaria del continente Africano y ampliamente consumida en los Estados Unidos de Norte América. La importancia nutricional de este fruto radica en sus altos niveles de vitaminas A, B1, B2, Niacina; Calcio, Magnesio y Fosforo (ASERCA 1999). En nuestro país y debido a la alta demanda por parte del vecino del norte se inicio con la siembra y producción de Okra con fines de exportación siendo los estados de

Guerrero, Michoacán, Morelos y Tamaulipas los principales productores (Díaz *et al.* 2007; Díaz y Leal. 1992).

Aunque las áreas destinadas al cultivo de Okra se han visto incrementadas llegando a 7,000 hectáreas anuales con una producción promedio de 10 ton Ha⁻¹ se conocen a la fecha 10 enfermedades infecciosas que afectan la producción de Okra en nuestro país de entre las cuales figura una enfermedad relacionada con la incidencia de altas poblaciones de mosquita blanca y cuyos síntomas en hoja son la aparición de moteados amarillos en hojas y frutos provocando que estos últimos sean desechados por no cumplir con la características organolépticas deseadas. Posteriormente se reporto que el agente causal de esta enfermedad es un begomovirus nombrado *Okra yellow mottle Iguala virus* [(OYMoIV) Dela Torre *et al.* 2004). La afectación provocada por la enfermedad del moteado de la Okra ha llegado a un punto en el que en algunas regiones de Guerrero y Morelos se ha optado por abandonar los cultivos de Okra lo cual conlleva a un impacto no solo económico si no también social.

Después del reporte de OYMoIV infectando cultivos de Okra en Morelos y Guerrero iniciamos un muestreo en colaboración con el Dr. Rodolfo De la Torre en los municipios de Iguala, en el estado de Guerrero y Mezatepec, en el estado de Morelos logrando identificar un nuevo síntoma caracterizado por la presencia de mosaicos amarillos en hojas y frutos. Las plantas de Okra colectadas fueron analizadas por medio de PCR con las combinaciones de oligonucleótidos que amplifican el genoma de begomovirus típicos y, se reporto la presencia de un genoma A (2612pb) que muestra un 85.5% de similitud con *SiYMYucV*, su pariente mas cercano. Los criterios taxonómicos actuales establecen que las variantes de un begomovirus cuyo genoma A presenta una identidad global menor al 88% con su pariente mas cercano se consideran especies separadas (Fauquet & Stanley, 2008). Por lo tanto, este primer virus aislado de *Okra* corresponde a una nueva especie nombrada provisionalmente como *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV).

Como parte de este trabajo analizamos las principales características filogenéticas presentes en el genoma A de OYMMV. La secuencia correspondiente

al genoma A completo de OYMMV fue comparada con las presentes en la base de datos del GenBank mediante el algoritmo Clustal V del programa computacional DNASTar mostrando un 85.5% de similitud global con *Sida yellow mosaic Yucatan virus* (SiYMYucV) su pariente mas cercano (tabla 6), también se obtuvo un 84.7 % de similitud con *CdTV – Sinaloa* y un 84.2% con respecto a *Okra yellow mottle Iguala virus* (OYMoIV) este ultimo previamente reportado en las zonas donde se hizo la colecta (De la torre *et al.* 2004).

VIRUS	GENOMA A COMPLETO	C1	C2	C3	C4	CP
<i>SiYMYucV</i>	85.5	86.1 (88.6)	92.1 (89.9)	90.2 (90.2)	86.0 (75.3)	91.1 (96.4)
<i>CdTV- Sinaloa</i>	84.7	83.6 (85.0)	92.3 (84.5)	89.5 (90.2)	87.6 (75.3)	89.7 (95.2)
<i>OYMoIV</i>	84.2	83.7 (85.6)	92.3 (86.8)	91.2 (91.7)	85.7 (72.9)	87.8 (93.6)
<i>CdTV-(IC)</i>	84.4	83.1 (85.9)	90.8 (85.3)	89.7 (90.9)	88.4 (75.3)	91.1 (96.4)
<i>CoYSV</i>	83.7	80.9 (83.4)	93.1 (88.4)	90.0 (91.7)	83.3 (65.9)	91.5 (96.4)
<i>SiMSinv</i>	81.3	82.4 (82.3)	89.0 (83.7)	86.7 (81.8)	87.2 (74.1)	89.6 (96.8)

Tabla 6.- Porcentaje de identidad obtenido al comparar el genoma A completo y las secuencias codificantes de *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV; No. acceso DQ022611) con las presentes en *Sida yellow mosaic Yucatan virus* (SiYMYucV No. de acceso DQ875872), *Chino del tomato virus - [Sinaloa]* (CdTV-[Sinaloa] No. de acceso DQ347945), *Okra yellow mottle Iguala virus* (OYMoIV; No. de acceso AY751753), *Chino del tomato virus – IC* (CdTV-IC; No. acceso AF101476), *Corchorus yellow spot virus* (CoYSV; No. acceso DQ875868) y *Sida mosaic Sinaloa virus* (SiMSinv; No. acceso DQ520944), sus parientes mas cercanos filogenéticamente. El porcentaje de identidad con respecto a las secuencia de amino ácidos se observa en paréntesis.

Nos dimos a la tarea de analizar las secuencias de los iterones presentes en el origen de replicación de OYMMV (GGTACACA) y encontramos que a pesar de la baja similitud filogenética (84.2%) observada entre los genomas A de OYMoIV y OYMMV las secuencias itericas presentes en ambos son idénticas, existiendo una

ligera diferencia en la posición de un iteron invertido localizado hacia el extremo 5' del origen de replicación de *OYMMV*; El análisis de la secuencias presentes en el GenBank nos llevo a identificar a *Ageratum yellow vein virus* (*AYVV*) como el begomovirus que contiene los iterones mas parecidos a los de *OYMMV* y *OYMoIV* aunque el arreglo de sus iterones es diferente (figura 6).

La proteína de replicación tiene un dominio de unión al ADN que incluye los primeros 120 aminoácidos de su extremo N-terminal. De las secuencias presentes en el GenBank, el dominio de unión al ADN de *Tomato yellow leaf curl Vietnam virus* (*ToYLCVV*) es el que muestra mayor similitud con el de *OYMMV* seguido de *Ageratum yellow vein virus* (*AYVV*), aunque se esperaría que por tener iterones idénticos, el dominio de unión al ADN de *OYMoIV* fuera idéntico al presente en *OYMMV*.

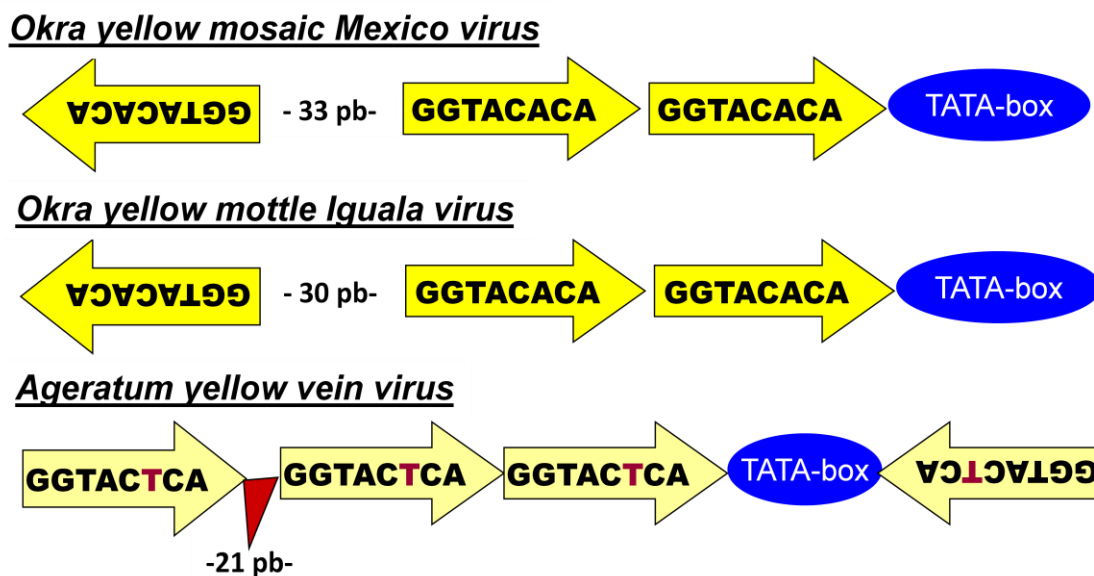


Figura 6. Comparación entre el número y arreglo de los iterones presentes en, *Okra yellow mosaic Mexico virus* (*OYMMV*; No. acceso DQ022611), *Okra yellow mottle Iquala Virus* (*OYMIV*; No. acceso AY751753) y *Ageratum yellow vein virus* (*AYVV*; No. de acceso AJ558120). De lo anterior se establece que los virus *OYMMV* y *OYMoIV* presentan una convergencia evolutiva con el virus de origen asiático *AYVV* a nivel de sus determinantes de especificidad replicativa tanto en cis como en trans.

Para obtener la secuencia completa correspondiente al genoma B de *OYMMV* amplificamos por PCR un fragmento de 1480pb que coincide con el esperado al usar la combinación de oligonucleótidos BC1-290For / BV1-310 Rev; Mientras que con la combinación BC1-80Rev / BV1-310For se genero un amplicón de 1300pb. A partir de ambos fragmentos se armo un genoma de 2,582pb que corresponde al genoma B de *OYMMV* (No acceso GU972604). El análisis de similitud filogenética entre las secuencias completas de los genomas B reportadas hasta la fecha y el genoma B de *OYMMV* indico que su pariente mas a cercano es el componente B de *Sida yellow vein virus* (No. acceso Y11100) con un 68.2%, seguido muy de cerca por el genoma B de *Sida Golden Mosaic Honduras virus* (No. acceso Y11098) con un 68.1%.

El análisis comparativo de las proteínas BC1 y BV1 nos indica que el componente B de *OYMMV* probablemente tiene un origen recombinante entre *SiGMHV* y *CLCrV* ya que la proteína BC1 de *OYMMV* es un 94.9% similar a la proteína BC1 codificada por el genoma B de *SiGMHV* y la proteína BV1 mostro un 82.8% de similitud con la BV1 de *CLCrV* [Mexico: Sonora]

Finalmente y con el objetivo de iniciar la caracterización biológica de *OYMMV* y así confirmar que realmente existe una diferencia entre los síntomas observados en plantas infectadas con *OYMoIV* y los identificados en plantas inoculadas con *OYMMV*, diseñamos oligonucleótidos específicos capaces de amplificar en su totalidad los genomas A y B de *OYMMV* (tabla 4). Los productos de PCR obtenidos fueron clonados en el vector pGEMTEasy para su posterior secuenciación; Las clonas que contienen el inserto de interés han sido almacenadas para ser evaluadas en un futuro mediante la técnica de biobalística y así confirmar en un primer paso su capacidad para infectar plántulas sanas de *Nicotiana bentamiana*, uno de los modelos mas susceptibles a ser infectados por begomovirus.

2.4.4. Identificación de begomovirus que infectan cultivos de interés agrícola en el estado de San Luis Potosí

Hasta hace pocos años la información sobre la presencia de begomovirus infectando cultivos de interés económico en nuestro país era muy limitada esto

debido en gran parte a que muchos de los posibles diagnósticos se basaban en el simple hecho de observar las sintomatologías presentes en las plantas enfermas. Como principal limitante tenemos que los síntomas observados en campo pueden ser producidos por una infinidad de factores tanto bióticos como abióticos lo que da como resultado la obtención de información sesgada que no dimensiona la problemática causada por begomovirus en cultivos tan importantes como chile, frijol, tomate, etc. El estado de San Luis Potosí no es la excepción pues la información relativa a la presencia de geminivirus se encontraba limitada a los boletines informativos publicados por instituciones como la Facultad de agronomía de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y, aunque en la gran parte de los casos se lograba identificar la presencia de geminivirus junto con la descripción de los síntomas en la mayoría de las ocasiones no se lograba aislar y caracterizar con éxito al agente causal. Con la introducción de técnicas como la PCR y la secuenciación cada vez es más fácil el aislamiento y caracterización filogenética de los begomovirus que infectan alguna planta o cultivo en particular.

Para tener una visión más amplia sobre que begomovirus son los que infectan cultivos de interés económico y malezas (reservorios) en el estado de S.L.P. nos dimos a la tarea de hacer muestreos programados a lo largo de las cuatro zonas geográficas en las que está dividido el estado, zona Altiplano, zona Centro, zona Media y zona Huasteca.

Cada uno de los extractos obtenidos a partir de plantas con probables síntomas de virosis fueron analizados por PCR con los juegos de oligonucleótidos que amplifican tanto begomovirus típicos como begomovirus pertenecientes al linaje del *SLCV* y encontramos que tal parece que las infecciones mixtas por begomovirus son más la regla que la excepción pues en la mayor parte de los casos analizados observamos que dos de las especies más caracterizadas y utilizadas como modelos experimentales en nuestro país (*PHYVV* y *PepGMV*) se encontraron infectando cultivos de Tomate, Chile serrano, Chile pasilla y chile poblano en los municipios de Moctezuma, Salinas de Hidalgo y Villa de Arista pertenecientes a la zona del altiplano; Chile piquín en la ciudad de S.L.P. localizada en la zona centro, en el

municipio de Rio verde se identificaron una infinidad de malezas entre las que destaca una planta conocida como “La mala mujer” (*Solanum rostratum*) por significarse como un importante reservorio de begomovirus, ya por ultimo también se aislaron en malezas perenes presentes en Tamuín y cultivos de Chile en Aquismón ambos municipios pertenecientes a la zona huasteca. En mas del 90% de las muestras vegetales en las que se encontró *PepGMV* también se aislaba a *PHYVV* esta constante indica un riesgo latente pues anteriormente ya se ha demostrado que la presencia de estos dos virus potencia la severidad de las infecciones y por lo tanto la presentación de síntomas (Méndez *et al.* 2003).

Unos de los pocos casos en lo que se identifico como único agente etiológico a *PepGMV* fueron los observados en dos cultivos de interés económico, pepino (*Cucumis sativus L.*) asintomático colectado en la comunidad del Refugio perteneciente al municipio de Rio Verde y en el municipio de Moctezuma en la zona del altiplano; el segundo cultivo del cual se aisló como único agente etiológico a *PepGMV* fueron muestras de tomatillo verde (*Physalis ixocarpa*). En las muestras de tomatillo verde se observaron los mosaicos dorados característicos de la enfermedad producida por *PepGMV*; Los resultados anteriores amplían el rango de hospederos naturales reportados para *PepGMV* ya que se creía limitado solo a *Solanáceas* y nos indica que los geminivirus están encontrando la forma de adaptarse e infectar nuevas especies de plantas.

Aunque desde hace poco tiempo existían registros sobre la presencia de *Tomato severe leaf curl virus (ToSLCV)* y *Tomato golden mottle virus (ToGMV)* infectando cultivos de tomate y malezas en áreas de cultivo pertenecientes al municipio de Rio Verde en la zona media del estado de S.L.P. Las muestras a partir de las cuales se aislaron los virus en cuestión fueron únicas y por lo tanto no significativas así que hicimos nuevos muestreos en cultivos de tomate para confirmar que no se trataba de casos aislados. Identificamos una maleza presente en todos los cultivos muestreados conocida como “La mala mujer” (*Solanum rostratum*) se colectaron diferentes muestras de esta maleza, se rotularon (MM1, MM2, etc.), se hizo la extracción de ADN genómico y se analizaron por medio de la técnica de la PCR utilizando por separado los iniciadores universales escogidos en

este estudio para amplificar el genoma A de begomovirus pertenecientes al linaje *SLCV* y los que amplifican el genoma homólogo de los Begomovirus típicos (Mauricio-Castillo, Tesis maestría 2006), y así comprobar o descartar la presencia de begomovirus coinfectantes en las muestras. Las secuencias de ADN aisladas fueron comparadas con las presentes en la base de datos del GenBank.

En la mayoría de las muestras de tomate y mala mujer logramos confirmar la presencia de begomovirus coinfectantes y el primer grupo de virus fue aislado mediante PCR con los oligonucleótidos utilizados en este estudio para amplificar begomovirus pertenecientes al clado del *SLCV*. Los dos genomas A identificados mostraban una similitud global del 97.1% para el primer aislado y del 97.3% para el segundo con respecto a su pariente más cercano, la especie *ToSLCV* (No. acceso AF130415) aislado previamente en Centro América (Nakhla *et al.* 2005). Las normas del ICTV establecen que un aislado es considerado como variante de una especie determinada cuando su similitud global a nivel de secuencia es mayor al 94%. De tal forma que los genomas aislados son variantes de *ToSLCV* y fueron nombrados de manera provisional como *ToSLCV - SLP1* (No. de acceso DQ347946) y *ToSLCV - SLP-2* (No. de acceso 347947). El segundo grupo de genomas coinfectantes fueron aislados con los oligonucleótidos usados para amplificar el genoma A de begomovirus típicos, al igual que con las variantes de *ToSLCV* se aislaron dos genomas A completos, el primero y segundo de ellos mostraron una similitud del 92.8 y 93.6% respectivamente con la especie *ToGMoV* (AF132852) su pariente más próximo. Tomando en cuenta que el ICTV establece que si un aislado presenta una similitud global a nivel de secuencia comprendida entre el 88 y el 93.9 % con su pariente más cercano tal aislado es considerado como una nueva cepa o “strain” de dicha especie; Los aislados de plantas de Mala mujer y Tomate son considerados como nuevas cepas de la especie *ToGMoV*. El primer aislado fue nombrado como *ToGMoV A* (No. de acceso DQ520943) y el segundo aislado lleva por nombre *ToGMoV-SLP2* (No. de acceso EF501976). Los resultados anteriores confirman que las infecciones previamente reportadas no fueron solo hechos aislados si no que se constituye como una amenaza constante a los cultivos presentes en la zona donde se llevaron a cabo los muestreos. Con respecto a *ToSLCV* hasta la fecha y a pesar de muchos esfuerzos no se ha logrado identificar la existencia de un genoma B para

esta especie viral lo cual concuerda con que siempre se encontraba formando parte de infecciones mixtas ya sea en malezas o cultivos de interés económico. Con las combinaciones de los oligonucleótidos BC1-290For / BV1-310Rev y BC1-80rev / BV1-310for armamos una secuencia viral de 2558pb que corresponde al genoma B de las cepas de *ToGMoV* aisladas durante este estudio (No. acceso NC008057) y completamos la caracterización genómica de esta especie viral ya que hasta la fecha no existían reportes sobre la existencia del genoma B de *ToGMoV*.

Un segundo lote de muestras de *solanum rostratum* fue analizado y con el uso de los iniciadores universales SL-2060For / YMACRev se amplificó un fragmento de aprox. 1400pb que mostro una gran similitud con las variantes de *ToSLCV* previamente aisladas y debido a que en ninguna de las muestras analizadas logramos encontrar a *ToSLCV* infectado por si solo hicimos una nueva reacción de PCR pero en esta ocasión utilizando las combinaciones de oligonucleótidos DGRSrev / YMACfor y WARfor / YMACrev que amplifican el genoma completo de begomovirus típicos, la secuencia resultante (2610pb) fue analizada y resulto tener un 94.5% de similitud global con su pariente mas cercano, la especie *Tomato chino La Paz virus (ToChLPV)* un virus aislado originalmente infectando cultivos de tomate en la Península de Baja California Sur (Holguín *et al.* 2005). El ICTV establece que, si un aislado comparte a nivel de secuencia una similitud mayor al 94% con respecto a una especie previamente descrita tal aislado es considerado una variante de dicha especie. Por lo tanto el aislado de Mala Mujer en S.L.P. corresponde a una nueva variante de la especie *ToChLPV* (No. de acceso AY339619) denominada provisionalmente *ToChLPV-MM1* (No. de acceso DQ347948). Una segunda variante que mostro un 95.1% de similitud global con *ToChLPV* (No. de acceso AY339619) fue aislada coinfectando con *TGMoV-Rio verde SLP2* (EF501976) durante este trabajo y se denominó provisionalmente *ToChLPV-MM4* (No. acceso DQ347949). Lo anterior expande la distribución geográfica y la lista de hospederos naturales para *ToChLPV* y establece como una constante la presencia de *ToSLCV* en infecciones mixtas. Hasta la fecha y a pesar de varios intentos no se ha logrado aislar el genoma B de *ToChLPV*.

2.5 DISCUSIÓN- Parte II

En el presente trabajo realizamos un análisis preliminar sobre la diversidad y distribución de los begomovirus presentes en los agro ecosistemas de los estados de Guerrero, Morelos, San Luis Potosí y Sinaloa. Utilizamos como herramientas moleculares los métodos de diagnóstico previamente reportados por Monreal-Vargas y Mauricio-Castillo de tal forma que al combinar lo mejor de ambos métodos logramos un sinergismo no antes visto con respecto a los métodos de diagnóstico reportados con anterioridad. Lo anterior nos permitió mediante la técnica de la PCR amplificar, aislar e identificar en su totalidad los genomas A y B de begomovirus a partir de muestras vegetales sin importar su origen geográfico o filogenético.

Los begomovirus presentes en nuestro país están divididos desde un punto de vista filogenético en begomovirus típicos que por lo general son los más numerosos figurando *PHYVV* como el más distribuido y estudiado en nuestro país mientras que los begomovirus pertenecientes al segundo grupo denominado del *SLCV* se diferencian de los begomovirus típicos en los primeros 140 aminoácidos de su proteína encargada de la replicación viral y en el arreglo y número de sus regiones iterativas. La combinación de oligonucleótidos utilizada inicialmente para amplificar el genoma A total de begomovirus típicos fue WARFor / YMACRev que amplifica porciones de los genes Rep y CP así como la totalidad de la región intergénica, esta última es la que incluye la mayor información acerca del virus aislado y a partir de eso establecemos si vale la pena amplificar el fragmento que corresponde a la combinación DGRSRev / YMACFor que comprende las porciones restantes de los genes Rep, CP y la totalidad de TrAP y REn con lo cual complementamos del genoma A.

Aunque el número de begomovirus correspondientes al grupo del *SLCV* es muy reducido en comparación con los begomovirus típicos, las afectaciones provocadas por los primeros suelen ser por lo regular más severas tal es el caso de *PepGMV*, este begomovirus perteneciente al clado *SLCV* es el más distribuido y estudiado en nuestro país y el norte de los Estados Unidos de Norte América. Con

los iniciadores SL2060For / YMACRev logramos amplificar parte de los genes Rep, CP y la región intergénica completa para después con la combinación SL2200Rev / YMACFor obtener un amplicón que incluye la secuencia genómica faltante. En la mayoría de los casos se precedió a amplificar el genoma B de todos y cada uno de los virus identificados en las muestras vegetales, lo anterior se logró con las combinaciones de oligonucleótidos BV1-310Rev / BC1-290For y BV1-310For / BC1-80Rev. Los productos de PCR obtenidos para cada caso en particular se traslapan en regiones que van de las 160 a las 300pb con la finalidad de evitar ambigüedades al momento de reconstruir los genomas.

Los constantes reportes sobre nuevas enfermedades en diversos cultivos de interés económico como chile, frijol, tomate, etc. en las principales regiones productoras de nuestro país; Así como la presencia de síntomas que apuntaban hacia una posible etiología viral nos llevo a pensar que no era suficiente con describir detalladamente las sintomatologías y que para combatir tales enfermedades es necesario establecer nuevas técnicas de diagnostico que nos faciliten la identificación del posible agente viral pues ya que no existe cura para las enfermedades virales es necesario diseñar estrategias de control que nos den información sobre el comportamiento del vector, distribución regional, mecanismo de transmisión, principales hospederos, diversificación y tasa de evolución viral. Aunque a la fecha se han reportado una cantidad considerable de begomovirus presentes en nuestro país aun queda mucho por hacer en esta área debido a que no hay información detallada sobre las poblaciones virales presentes en regiones específicas y mucho menos acerca de las pérdidas económicas producidas por begomovirus en el territorio Mexicano (Monreal-Vargas, Tesis Maestría 2005).

Al momento de programar los muestreos establecimos como una regla general coleccionar cualquier planta que presentara posibles síntomas virales incluyendo malezas. Las malezas forman parte del ciclo biológico del insecto vector ya que cuando las condiciones climáticas son desfavorables y/o los cultivos son abandonados, las malezas se convierten en las únicas fuentes de alimento y resguardo para los vectores de modo que al alimentarse se inicia la transmisión begomovirus y ahí es donde las malezas se convierten en reservorios eficientes

utilizados mientras las condiciones ambientales favorecen el regreso de los vectores a los cultivos con la consecuente transmisión de él o los begomovirus acumulados en las malezas.

Como resultado de muestreos realizados por Mauricio-Castillo *et al.* (Mauricio-Castillo, Tesis maestría 2006) en cultivos de soya presentes en Guasave, Sinaloa se reportaron dos especies diferentes de begomovirus, el primer genoma correspondía a una nueva cepa de la especie *Rhynchosia golden mosaic virus*, un begomovirus previamente reportado en Honduras infectando frijolillo salvaje (Nakhla *et al.* 2005) y en el estado de Chiapas, México infectando tabaco (Ascencio-Ibañez *et al.* 2002); Hasta ese momento el genoma A completo del segundo begomovirus mostró un 84.0% de similitud en secuencia con el genoma A de *CaLCuJamV - Jamaica*, su pariente más cercano (No. acceso DQ178612). El segundo aislado de *Rhynchosia minima* se considera una nueva especie begomoviral tomando en cuenta los criterios taxonómicos actuales establecidos por el ICTV (Fauquet *et al.* 2008) y a que el análisis de las secuencias itericas del nuevo virus (Arguello-Astorga *et al.* 1994) mostró que estas son únicas entre las especies de begomovirus conocidas, con lo que se confirma que el virus aislado en segunda instancia corresponde a una nueva especie perteneciente al linaje del SLCV denominada *Rhynchosia Mosaic Sinaloa Virus (RhMSinV*; GenBank acc. No. DQ406672).

Dado que el reporte de *RhMSinV* se dio hace varios años durante esta tesis doctoral actualizamos la caracterización filogenética de *RhMSinV* ya que a la fecha se han reportado nuevas especies de begomovirus, la comparativa entre el genoma A de *RhMSinV* y los genomas presentes en la base de datos del NCBI nos indica que *RhYMYucV* es actualmente su pariente mas cercano con un 85.5% de similitud global, siendo *CaLCuV-Jamaica* relegado al segundo puesto. El análisis de las secuencias itericas presentes en *RhMSinV* indica que a la fecha no se ha reportado algún virus que comparta esta característica única. A pesar de que se han reportado nuevas secuencias virales, *RhMSinV* sigue siendo considerado como el único miembro de esta nueva especie viral.

Posteriormente diseñamos oligonucleótidos específicos para amplificar los genomas A y B de *RhMSinV* y a partir de esto obtuvimos clonas infectivas que posteriormente fueron evaluadas por el método de biobalística en plántulas de *Nicotiana bentamiana*, uno de los modelos experimentales más susceptibles a la infección por begomovirus. La presentación de síntomas no es suficiente para establecer que un virus determinado es el causante de algún síntoma en particular así que en todas las plantas evaluadas se confirmó por PCR la presencia del virus inoculado. A las dos semanas post infección se comenzaron a observar mosaicos dorados acompañados por disminución y deformación foliar, enchinamiento severo para finalmente interferir con el proceso de floración. Posteriormente se inocularon plantas del huésped natural (*Rhynchosia minima*), los síntomas observados consistieron en una inicial deformación foliar acompañada de mosaicos dorados muy intensos y un retraso en la floración. Los resultados obtenidos fueron comparados con los reportados para su pariente más cercano *RhYMYucV* (No. acceso EU021216) un virus aislado de *Rhynchosia minima* y cuya caracterización biológica se reportó durante el año en curso. Con respecto a los síntomas producidos en *Nicotiana bentamiana* y *Rhynchosia minima* las únicas diferencias notables son que *RhMSinV* produce una disminución drástica de follaje en *Nicotiana bentamiana* e interfiere con los mecanismos de floración en ambas plantas datos que no reportados en plantas infectadas con *RhYMYucV*. Aunque las plantas de *Rhynchosia minima* infectadas por *RhMSinV* fueron colectadas en campos de soya y no se lograron identificar plantas de este último cultivo con síntomas característicos de virosis logramos infectar plantas de soya de manera experimental. La presentación de síntomas se dio hasta las cinco semanas post infección en forma de amarillamiento de las venas, deformación foliar, presentación de mosaicos tenues y la interferencia en la floración algo que puede afectar seriamente la producción de este cultivo de alto valor económico. Dentro de todos los síntomas observados en las plantas infectadas por *RhMSinV* el que más figura es la inhibición de la floración por sus posibles implicaciones en la producción. La caracterización tanto filogenética como biológica de *RhMSinV* ha sido completada durante este trabajo.

Continuamos con los muestreos de plantas con posibles síntomas de virosis presentes en los alrededores de cultivos de Soya localizados en Guasave, Sinaloa.

Entre todas las malezas presente logramos identificar una planta perteneciente a la familia de las Malvaceas llamada *Sida sp.* Esta planta se caracteriza por servir como un importante reservorio natural de begomovirus debido a que hasta la fecha se han identificado 14 especies infectando plantas de *Sida sp.*; En países como Brasil, China, Centro América, Estados unidos y recientemente México (Fauquet *et al.* 2008). Mediante la técnica de PCR se lograron aislar dos genomas A, el primero correspondió a una nueva variante de la especie *CdTV* mientras que el segundo genoma se trato de una posible nueva especie ya que al hacer los análisis filogenéticos correspondientes mostro una similitud del 84.4% con respecto a su pariente mas cercano, *CdTV-[IC]*. La caracterización genómica de *SiMSinV* se vio completada al aislar y reportar su genoma B.

Durante este trabajo actualizamos los datos correspondientes al porcentaje de similitud entre el genoma A de *SiMSinV* y los nuevos genomas A reportados hasta hoy en la base de datos del GenBank y observamos que aunque recientemente se reporto la presencia en nuestro país de una nueva especie denominada *Sida yellow mosaic Yucatan virus* (No. acceso DQ875872) la similitud global con respecto al genoma A de *SiMSinV* fue de solo el 80.5%, mientras que la similitud con respecto al genoma mas cercano (*CdTV - [IC]*) fue del 84.4%. El análisis de los iterones (TGGGGG) presentes en el origen de replicación mostró que son idénticos a los presentes de otros geminivirus lejanamente relacionados, *PYMV* de Venezuela, *ToYLYSV* de Europa y *SACMV* de África lo cual contrasta con lo reportado para *RhMSinV*, una nueva especie begomoviral con iterones únicos. Con respecto a *SiMSinV* la similitud entre sus secuencias itericas y las presentes en virus filogenéticamente lejanos se debe a una convergencia evolutiva entre *SiMSinV* y las especies antes mencionadas.

Para continuar con la caracterización biológica de esta nueva especie viral aislada de *Sida sp.* elaboramos oligonucleótidos específicos de genoma que nos permitieron amplificar los genomas A y B completos, la calidad del ADN y su confirmación por secuenciación nos ayudaron a seleccionar las que a nuestro parecer eran las mas optimas para realizar los ensayos de infección. Las clonas infectivas obtenidas fueron probadas mediante biobalística en plántulas de *Nicotiana*

bentamiana semanas después de la inoculación confirmamos la ausencia de ADN viral en la plantas problema y por lo tanto la no aparición de síntomas. Lo anterior se puede deber entre otros factores a que aunque se utilizo una enzima Taq polimerasa de alta fidelidad siempre se esta expuesto a mutaciones el las secuencias amplificadas, en algunas ocasiones los extractos contienen genomas de la misma especie viral que difieren entre si por muy poco y se pudo haber tomado como molde una que no fuera eficiente al momento de infectar. Lo mas recomendable en estos casos es obtener y probar varias clonas infectivas y así seleccionar las mas eficientes.

Durante este trabajo se reporta el aislamiento y caracterización de los genomas A y B de un begomovirus típico que infecta cultivos de Okra presentes en los estados de Guerrero y Morelos. El análisis filogenético del genoma A completo al compararlo con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank nos muestra una similitud de 85.5% en secuencia con *SiYMYucV*, su pariente mas cercano. El análisis de las secuencias itericas presentes en el origen de replicación muestra que estas son únicas en comparación con las presentes en los begomovirus hasta la fecha descritos, es por eso que con base en lo anterior consideramos al begomovirus aislado de cultivos de Okra presentes en los estados de Guerrero y Morelos como una nueva especie denominada provisionalmente como *Okra Yellow Mosaic México Virus (OYMMV; GenBank acc. No. NC014066)*.

Las secuencias itericas presentes en *OYMMV* (GGTACACA) son idénticas a las reportadas para *OYMoIV*, una especie begomoviral reportada con anterioridad infectando cultivos de Okra y con la cual solo comparte un 84.2% de similitud global. Un análisis mas a profundidad nos indica que *Ageratum yellow vein virus (AYVV)* a pesar de tener un arreglo de iterones diferente tiene las secuencia itericas mas parecidas a las reportadas para *OYMMV* y *OYMoIV*. *AYVV* es un virus originario del continente Asiático que presenta una convergencia evolutiva con los virus Americanos *OYMMV* y *OYMoIV* a nivel de sus determinantes de especificidad replicativa tanto en cis como en trans.

La porción N terminal de la proteína de replicación de *OYMMV* implicada en el reconocimiento y unión al ADN es muy similar al dominio presente en la proteína de replicación *Tomato yellow leaf curl Vietnam virus (ToYLCVV)* lo que no se esperaría pues *OYMoIV* tiene iterones idénticos en secuencia y arreglo a los presentes en *OYMMV* esto nos indica que los iterones pudieran no ser los únicos determinantes de especificidad replicativa.

Con lo que respecta al genoma B de *OYMMV* existe una muy baja similitud en secuencia con respecto a *SiYVV* su pariente mas cercano con un 68.2%. Sin embargo la idea sobre el posible origen recombinante del genoma B de *OYMMV* se ve favorecido gracias a que la proteína BC1 de *OYMMV* es un 94.9% similar a la proteína BC1 codificada por el genoma B de *SiGMHV* y la proteína BV1 mostro un 82.8% de similitud con la BV1 de *CLCrV [Mexico: Sonora]*.

Aunque el genoma A de *OYMMV* cumple con los requisitos necesarios para ser considerado como una nueva especie es importante establecer cuales son las implicaciones fitosanitarias que la infección por este virus puede causar, es por eso que se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar los genomas A y B completos de *OYMMV* y realizar la caracterización biológica para esta nueva especie viral de tal manera que podamos documentar los síntomas producidos en las plantas infectadas y diferenciarlos de los observados con anterioridad en plantas de Okra infectadas por *OYMoIV* localizadas cerca de los cultivos a partir de los cuales se aisló a *OYMMV*. Aun queda por establecerse la viabilidad de las posibles clonas infectivas obtenidas en este trabajo.

En relación a los begomovirus identificados durante este ensayo cabe resaltar el hecho de que solo dos de las muestras vegetales analizadas fueron infectadas por un solo begomovirus, tal fue el caso del *PepGMV* identificado por secuenciación en las muestras de Tomatillo y Pepino recolectadas en los municipios de Río verde y Moctezuma en el estado de San Luis Potosí. Por el porcentaje de similitud obtenido (97 y 98% para Tomatillo y Pepino respectivamente) con el genoma A de *PepGMV* se trata de variantes que corresponden a esta especie viral. El aislado de pepino en Río verde y Moctezuma; S.L.P. amplia el rango de hospederos antes restringido a

solanáceas y la distribución geográfica para esta especie viral. Los síntomas provocados por *PepGMV* cuando infecta una planta por si solo son mucho mas agresivos que cuando esta involucrado en infecciones mixtas de tal forma que la presencia de *PepGMV* infectando Tomatillo y pepino en el estado de S.L.P. nos advierte sobre la posibilidad de sufrir epidemias como las observadas rutinariamente en cultivos de tomate y chile presentes en el estado de Tamaulipas, México (Torres-Pacheco y col., 1996).

La distribución geográfica de *ToSLCV* se limitaba a Centro América en donde se encontraba produciendo infecciones mixtas (Nakhla *et al.* 2005) o pseudorecombinantes debido a que no ha sido posible amplificar su genoma B (Nakhla y col., 2005). Aunque existían reportes sobre la presencia de *ToSLCV* y *TGMoV* coinfectando cultivos en la zona media del estado de S.L.P. estos se manejaban como hechos aislados hasta que a partir de colectas programadas logramos identificar como una constante a ambas especies virales coinfectando plantas de tomate y una maleza conocida como “la mala mujer” la cual funciona como un reservorio eficaz. Los genomas de *ToSLCV* aislados durante este trabajo corresponden a variantes que mostraban porcentajes de similitud superiores al 97% con respecto a *ToSLCV* – [Guatemala 96-1] y que fueron nombradas provisionalmente como *ToSLCV-Rioverde SLP1*(DQ347946) y *SLP2* (DQ347947). Con respecto a los aislados de *ToGMoV*, los dos genomas aislados correspondieron a cepas o strains pertenecientes a esta especie viral y llevan por nombre *ToGMoV A* (DQ520943) y *ToGMoV-SLP2* (DQ347947). Las afectaciones a los cultivos de tomate por parte de *ToSLCV* y *TGMoV* se han visto incrementadas debido a los casi nulos programas de control fitosanitario y a la falta de muestreos y métodos oportunos de diagnostico. Con los datos obtenidos confirmamos que la presencia de *ToSLCV* y *TGMoV* en cultivos del estado de San Luis Potosí no son hechos aislados tomando en cuenta que nuestro grupo ha logrado identificarlos en repetidas ocasiones no solo en las zonas antes muestreadas sino en estados como Colima, México.

El análisis de un lote de muestras vegetales correspondientes a la maleza denominada mala mujer (*Solanum rostratum*) mediante el uso de los

oligonucleótidos universales que amplifican al ADN de begomovirus pertenecientes al grupo de *ToSLCV* logramos aislar secuencias virales que correspondían a variantes de la especie *ToSLCV* y con el uso rutinario de los oligonucleótidos universales que amplifican el genoma de los begomovirus considerados como típicos se identificó una variante correspondiente a la especie *Tomato chino La Paz Virus (ToChLPV)* previamente reportado infectando cultivos de tomate en la Paz Baja California Sur reiterando la presencia de *ToSLCV* en infecciones mixtas. Esta nueva variante denominada *ToChLPV-MM1* no fue la única pues aislamos una segunda variante (95,1% de similitud con *ToChLPV*; No. acceso AY339619) que coinfectaba con *ToGMoV-Rioverde SLP2* muestras de un segundo lote de *Solanum rostratum* y a la cual nombramos *ToChLPV-MM4*. La ausencia aparente del genoma B de *ToChLPV* incrementa las dudas sobre como se lleva a cabo el mecanismo de movimiento junto con *ToSLCV* ya que aunque sabemos que la proteína CP puede estar involucrada en el movimiento para el caso de begomovirus no se ha confirmado que tan eficiente puede resultar este mecanismo de movimiento alterno. Ampliamos el rango de hospederos naturales y la distribución geográfica de *ToSLCV* y *ToGMoV* al ser aislados de *Solanum rostratum* y reportados por primera vez en nuestro país ya que su distribución se limitaba a cultivos de tomate presentes en Centro América. Con respecto a *ToChLPV* se amplió su rango de hospederos y distribución geográfica a S.L.P. al infectar *Solanum rostratum* la cual resultó funcionar como un reservorio viral altamente eficiente; La presencia de *ToChLPV* en el estado de S.L.P. nos indica que a pesar de las grandes distancias la distribución de las diferentes especies virales se puede dar rápidamente es por eso que su descubrimiento infectando malezas cercanas a cultivos de tomate y tomatillo en la zona media de S.L.P. implica un alto riesgo ya que muy probablemente en poco tiempo podría afectar la producción de estos cultivos y de algunas otras solanáceas de alto interés económico como ya se ha reportado en el estado de B.C.S.

Los begomovirus aprovechan su genoma bipartita y mediante los mecanismos de recombinación y pseudorecombinación evolucionan emergiendo como begomovirus con una alta capacidad infectiva (Hou y Gilbertson. 1996) que inclusive les facilita ampliar sus rango de hospederos naturales. La variabilidad génica observada en los miembros de la familia *geminiviridae* es generada por tres mecanismos:

1. Las mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o inserciones son consideradas la principal fuente de diversidad genómica (Harrison y Robinson., 1999). Para el caso del *CdTV* se ha demostrado que pequeñas mutaciones puntuales en uno o dos nucleótidos dentro de la secuencia del gen que codifica para la proteína Rep aumentan o reducen significativamente la expresión de síntomas en plantas infectadas (Brown *et al.*, 2000).
2. La Pseudorecombinación, se lleva a cabo por el re arreglo del ADN del componente A y B de aislamientos del mismo virus e inclusive entre especies geminivirales poco relacionadas (Hou y Gilberson., 1996). Los pseudorecombinantes estables son begomovirus bipartitas compuestos por el genoma A de un Begomovirus bipartita y el genoma B de otro begomovirus con el que se encuentra relacionado de una manera cercana o distante y pueden provocar síntomas en plantas infectadas.
3. La recombinación es un proceso favorecido por la presencia de infecciones mixtas (Umaharan *et al.* 1998), los altos niveles de replicación viral (Accotto *et al.*; 1993) y la capacidad del biotipo B de Bemisia tabaci para alimentarse de una gran cantidad de plantas convirtiéndolas en hospederos potenciales para geminivirus. Existen dos tipos de recombinación:
 - La recombinación homóloga, factible entre aislados pertenecientes a una misma especie viral de tal forma que si esta se da entre dos cepas defectuosas se puede producir una nueva cepa viral viable.
 - La recombinación no homóloga es el mecanismo clave para la aparición de nuevas formas de virus debido a que facilita el re arreglo y la inserción de genes pertenecientes a otros virus y/o células, facilitando la adaptabilidad biológica de pseudorecombinantes derivadas de especies íntimamente relacionadas y así mantener el flujo de material genético entre los diferentes begomovirus presentes en una misma región.

Actualmente, el riesgo de sufrir epidemias devastadoras en el continente Americano como las reportadas en algodón en Pakistán (Harrison *et al.*; 1997), tomate en Trinidad y Tobago (Umaharan *et al.*; 1998), España e Italia (Noris *et al.* 1994), Cassava en Uganda (Deng *et al.* 1997) y Tanzania (Ndunguru *et al.* 2005), etc. producidas por virus recombinantes se ha incrementado por la presencia del TYLCV, un begomovirus monopartita, aislado en Israel (Navot *et al.* 1991) de manera que su probable interacción con begomovirus endémicos puede dar lugar al surgimiento de variantes virales altamente virulentas.

Durante este trabajo utilizamos las técnicas de diagnóstico molecular reportadas por Mauricio-Castillo y Monreal-Vargas para amplificar, aislar y caracterizar begomovirus pertenecientes al grupo del SLCV y al grupo de los begomovirus comunes. Reportamos el descubrimiento de nuevas variantes, cepas y especies begomovirales como producto del esfuerzo por establecer un registro sobre las poblaciones geminivirales presentes en nuestro país. La caracterización de estos nuevos virus aporta información relevante sobre su distribución, capacidad infectiva, la interacción virus – vector y sus mecanismos evolutivos todo con la finalidad de establecer nuevos modelos fitosanitarios necesarios para disminuir los efectos de las enfermedades producidas por geminivirus. Otro punto importante es el identificar elementos de regulación genética con potencial biotecnológico.

III. Caracterización biológica y molecular de Nuevos curtovirus aislados en los Estados de San Luis Potosí, Zacatecas y Nuevo Mexico (E.U.A.)

3.1. Antecedentes

Dentro de la familia Geminiviridae, el género *Curtovirus* es uno de los menos diversos, y en el 2008 el Comité Internacional para la taxonomía de virus (ICTV por sus siglas, en inglés) reconocía apenas cinco especies que eran: *Beet curly top virus* (BCTV), *Beet mild curly top virus* (BMCTV), *Beet severe curly top virus* (BSCTV), *Horseradish curly top virus* (HrCTV) y *Spinach curly top virus* (SCTV) (Fauquet *et al.* 2008).

Los primeros reportes de enfermedades causadas por curtovirus datan del año 1888 en cultivos de remolacha azucarera del estado de Nebraska, en los Estados Unidos, que produjeron grandes pérdidas; Los síntomas caracterizados por enrollamiento de la punta de las hojas e hinchazón y distorsión de venas se fueron extendiendo a lo largo de todas las regiones productoras de remolacha presentes en el Oeste de los Estados Unidos. Y aunque en ese tiempo no era posible establecer el agente causal de esta enfermedad, durante la primera década del siglo XX se estableció una clara correlación entre la presencia de un insecto vector, la chicharrita saltadora (*Circulifer tenellus*) y la aparición de la enfermedad (revisado por Bennett. 1971).

En el año de 1955 se observaron densas poblaciones de *Circulifer tenellus* en el 35% de los cultivos de remolacha azucarera de Turquía con síntomas muy similares a los observados en los Estados Unidos, y a los pocos años estos síntomas se expandieron a cultivos del mismo tipo presentes en Irán en donde se reportaron hasta en el 90% de cultivos de remolacha presentes en la zona; La principal diferencia observada en Medio oriente con respecto a lo observado en los cultivos de remolacha afectados en América es que se identificaron dos vectores, el primero corresponde a la misma especie, *Circulifer tenellus*, reportada previamente en Estados Unidos, mientras que el segundo vector es *Circulifer opacipennis*, una especie endémica del medio oriente (revisado por Bennett. 1971).

En las últimas dos décadas, con el uso de técnicas moleculares, se han logrado identificar los virus causantes de la enfermedad de la remolacha azucarera, y se ha establecido que estos curtovirus infectan plantas pertenecientes a 44 familias y 300 especies. de dicotiledóneas, lo cual indica que a pesar de que los miembros de este género de los Geminiviridae son poco diversos, poseen sin embargo un rango de huéspedes superior a los virus de otros subgrupos de esa familia viral.

Entre los cultivos afectados por los curtovirus se encuentran el tomate, chile, betabel, calabaza, tabaco, etc., en los que provoca síntomas como enanismo, amarillamiento, deformación foliar, amarillamiento, enchinamiento de las hojas, puntas rizadas y secreción de sábila (Stanley *et al.* 2005, Creamer *et al.* 2003 y Bennett 1971). La diseminación de los curtovirus a través de los campos agrícolas de Norte América incluyendo nuestro país (Velásquez *et al.* 2008) se debe a diversos factores, entre ellos la comercialización de explantes infectados, el aumento de áreas con monocultivos, aumento en el rango de hospederos susceptibles a la infección por curtovirus, el uso inadecuado de insecticidas, y la falta de técnicas de diagnóstico apropiadas, etc. La emergencia de nuevas enfermedades puede deberse algunas veces a la interacción entre curtovirus diferentes que coinfectan a la misma planta, lo cual además favorece el surgimiento de virus recombinantes.

El creciente número de curtovirus y enfermedades agrícolas asociadas con su presencia crea la necesidad de diseñar mejores técnicas de diagnóstico para curtovirus, que hagan factible el aislamiento y caracterización genómica de los mismos, aún y cuando se encuentren formando parte de una infección mixta. En este subproyecto de tesis nos propusimos diseñar y probar experimentalmente una serie de iniciadores específicos para curtovirus que permitieran hacer lo antes mencionado. Como resultado de esto identificamos dos nuevos curtovirus, cuya caracterización molecular y biológica describiremos en lo que sigue.

3.2. OBJETIVOS.

3.2.1. OBJETIVO GENERAL.

Desarrollar una metodología molecular integral para la identificación y caracterización genómica de curtovirus, que sea altamente eficiente para detectarlos incluso en infecciones mixtas.

3.2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Diseñar y probar iniciadores degenerados (“universales”) para amplificar el genoma de curtovirus a partir de muestras de campo.
- Realizar un escrutinio de plantas cultivadas y malezas en el estado de San Luis Potosí y regiones vecinas para detectar la presencia de curtovirus
- Realizar la caracterización molecular y biológica de los curtovirus identificados en este trabajo.

3.3. MATERIALES Y METODOS

3.3.1. Colecta en campo y manejo de muestras

Los muestreos se realizaron entre los años 2007 y 2010 en cultivos de Chile presentes en el municipio de Villa de Arista localizado en la región Altiplano del estado de San Luis Potosí. También se colectaron plantas de frijol localizadas en el municipio de Calera en el estado de Zacatecas. En todas las regiones de muestreo se observaron plantas con síntomas de virosis asociados con la presencia de chicharritas saltadoras. Para la recolección de muestras, se realizaron muestreos de plantas (incluyendo malezas) presentes en cultivos de interés económico, el criterio de selección de muestras infectadas se realizó de acuerdo a la observación de sintomatología típica causada por geminivirus (Jones *et al.* 1991, Blancard 1996, Gabor y Wieve 1997). Las muestras colectadas fueron rotuladas y almacenadas en bolsas de plástico a -20°C para finalmente ser conservadas a -80°C y así evitar su descomposición

3.3.2. Diseño de iniciadores universales

Los oligonucleótidos (“iniciadores”) universales utilizados en el presente trabajo fueron diseñados en el laboratorio de Biología Molecular de Plantas del IPICYT, bajo la asesoría del Dr. Gerardo R. Argüello Astorga. Los iniciadores universales utilizados para amplificar el genoma de curtovirus se diseñaron a partir de secuencias altamente conservadas en los genomas de las 5 especies pertenecientes al género en cuestión y que fueron identificadas por medio del programa MegAlign (DNASTAR Software, London). Se seleccionaron secuencias nucleotídicas altamente conservadas de 20 a 30pb. A partir de las secuencias nucleotídicas altamente conservadas se definieron las características necesarias de los oligonucleótidos susceptibles de uso como iniciadores universales, adicionando a cada uno de ellos un sitio de restricción para que los productos amplificados por PCR se pudiesen insertar en vectores de clonación convencionales. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por la compañía Sigma.

3.3.3. Evaluación de los iniciadores universales

Los oligonucleótidos universales diseñados para amplificar el genoma de curtovirus fueron evaluados utilizando como control positivo un extracto vegetal previamente evaluado por la doctora Rebeca Creamer de la Universidad de Nuevo Mexico, E.U.

3.3.4. Extracción de ADN

Se adoptó el protocolo de extracción de ADN genómico descrito en el punto 2.3.2. De esta tesis, único para todas las muestras de tejido vegetal analizadas.

3.3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para todos los juegos de oligonucleótidos, la composición de la mezcla de reacción para PCR (50 μ l volumen total) fue la misma y consistió en lo siguiente: Buffer *Taq* DNA polimerasa 1X, $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTPs 0.2mM, oligonucleótidos 1 μ M, *Taq* polimerasa 2.5 UT, DNA 1 μ g. Las condiciones para la amplificación del ADN viral fueron: desnaturalización inicial a 94°C/2min, y 35 ciclos conformados por una temperatura inicial de 94°C/1min, una temperatura de alineamiento de 62°C/1.5min (en caso de genomas completos la temperatura se mantiene en 62°C) y una extensión a 72°C/1.5min (para amplificar genomas completos el tiempo aumenta a 2.5min), con una extensión final de 72°C/5min. Los productos amplificados fueron analizados por movilidad electroforética en geles de agarosa al 1.5 %.

3.3.6. Caracterización mediante patrones de restricción (RFLPs por sus siglas, en ingles) de los fragmentos amplificados y clonas obtenidas

Los productos de PCR y clonas, obtenidas a partir de extractos de ADN de plantas con probables síntomas de virosis, fueron sometidos a un análisis de RFLP (Restriction Fragment Large Polimorphism) como se describe en la sección 2.3.4. De este escrito.

3.3.7. Clonación y secuenciación

Los productos de PCR obtenidos a partir de las muestras de campo se clonaron y secuenciaron según el método establecido en la sección 2.3.5. de esta tesis.

3.3.8. Preparación de las partículas de tungsteno usadas para la transformación por biobalística

Esta metodología es la misma que la descrita para begomovirus en la sección 2.3.6.

3.3.9. Obtención de clonas infectivas de begomovirus

Se extrajo el ADN total de las plantas con posibles síntomas de virosis recolectadas durante este trabajo. Con la combinación de oligonucleótidos CurtoV3-175For / CurtoCP450Rev (tabla 9), se confirmó la presencia de begomovirus sin importar su origen geográfico y/o filogenético. Posteriormente con la ayuda de las combinaciones de oligonucleótidos RepQWEEFor / CurCP-450Rev y CurV2Gen910For / CurRep2GQRev (tabla 9) se obtuvieron las secuencias genómicas completas de cada virus y, finalmente se inició la amplificación y clonación de los componentes genómicos completos mediante los siguientes métodos:

- A)** Para el caso de los extractos de Chile provenientes de Nuevo México posiblemente infectadas con curtovirus, la amplificación de segmentos específicos del genoma viral y la obtención de clonas infectivas a partir del extracto de ADN genómico total fue mediante el diseño y uso de oligonucleótidos específicos para los curtovirus reportados durante este trabajo (tabla 9). Tomando como molde la secuencia viral los oligonucleótidos fueron diseñados en regiones que incluyen el sitio de restricción identificado como único en la secuencia viral. El producto amplificado de aproximadamente 3.0kb fue analizado por electroforesis en

gel de agarosa al 1.5 % y clonados en el vector comercial pGEMTEasy (Promega) como lo establece el fabricante, a 3ul de producto de PCR se agregan 5ul de buffer de reacción, 1ul de ligasa y 1ul de vector pGEMTEasy; La mezcla de ligación se incubó durante 18 hrs a 4°C para posteriormente ser utilizada en la transformación de células competentes de *Escherichia coli*. Los vectores recombinantes se aislaron de las células transformadas, se digirieron con la enzima Eco R1 y se confirmo si el inserto tenía el tamaño esperado para posteriormente ser secuenciado. Los plásmidos que contenían el inserto esperado se utilizaron en análisis de inoculación por biobalística previa liberación del genoma viral al cortar en el sitio de restricción único incluido en los iniciadores específicos diseñados para este genoma viral.

B) La obtención de clonas infectivas de los curtovirus presentes en las muestras colectadas en la región del Altiplano Potosino se realizo con una técnica conocida como TempliPhi (GE Healthcare) la cual mediante una reacción isotérmica aprovecha las características de la polimerasa del fago Φ 129 para amplificar plasmidos o genomas virales que se replican mediante el mecanismo de circulo rodante produciendo largas copias de ADN continuas conocidas como concameros (Haible *et al.* 2006). Los ADNs obtenidos mediante la técnica de TempliPhi a partir de las muestras vegetales fueron digeridos en sitios de restricción únicos para cada genoma viral produciendo monómeros virales lo cuales fueron clonados en vectores PBS SK⁺ digeridos previamente con la enzima correspondiente para cada genoma viral.

3.3.10. Recubrimiento de las partículas de tungsteno con el ADN viral y transformación mediante biobalística (6 reacciones).

El procedimiento fue el mismo que el descrito en el apartado 2.3.8. de este trabajo.

3.3.11. Inoculación por biobalística de los genomas virales clonados

Se inocularon plántulas con cuatro hojas verdaderas (apicales) de chile, betabel y acelga. Antes de la inoculación los ADN virales fueron liberados del plásmido pGEMTEasy. Los controles negativos consistieron en plántulas bombardeadas con los vectores pGEMTEasy o PBS K⁺ sin inserto dependiendo del caso. La técnica de bombardeo se realizó conforme lo establece el manual de operaciones de la pistola de bombardeo con gas Helio de BioRad a una presión de salida de 600 psi (lb/in²). Las plantas bombardeadas fueron mantenidas en cámaras de crecimiento durante un periodo de 4 a 14 semanas después de la inoculación y se evaluó la presencia o ausencia de síntomas virales en las plantas inoculadas. El ADN total fue aislado y evaluado por PCR utilizando oligonucleótidos universales CurtoV3-175For / CurtoCP-450Rev.

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Diseño y evaluación de los iniciadores universales

Se diseñaron seis oligonucleótidos degenerados y dos específicos de especie, todos flanqueados por diferentes sitios de restricción, para amplificar el genoma de geminivirus pertenecientes al género de los curtovirus. Estos iniciadores hibridan con secuencias conservadas localizadas en los genes C1, V1 y V3 de todos los curtovirus reconocidos hasta la fecha.

Los iniciadores fueron designados por conveniencia con el prefijo “Curto”, añadiendo el nombre del gen donde se localiza la secuencia viral conservada y en algunos casos un número que los diferencia y que indica la posición dentro del genoma viral la secuencia nucleotídica con la que hibridan, así como un indicador de la orientación del iniciador con respecto a la dirección de replicación del virus, que se indica con los identificadores “For” y “Rev” (tabla 9).

En la tabla 9, se describen los iniciadores universales que fueron diseñados y utilizados en este estudio, indicando además los sitios de restricción introducidos en cada uno de ellos. Con el uso de estos oligonucleótidos degenerados se pueden identificar tres regiones, la primera (660pb) amplificada con la combinación CurtoV3-175For / CurtoCP-450Rev (utilizada en fitodiagnóstico) comprende regiones parciales de los genes V1, V2 y V3, la segunda (1760pb) obtenida con la combinación RepQWEFor / CurCP-450Rev que incluye la totalidad de la región intergénica, los genes V2, V3 y porciones de los genes C1 y V1, mientras que la tercer región corresponde a un amplicón de 1850pb, obtenido con los iniciadores CurV2Gen-910For / CurRep2GQRev e incluye las secuencias restantes de los genes C1, V1 y la totalidad de los genes C2 y C3 (figura 10).

Iniciadores en sentido del Virión	Virus y Genoma amplificado	Sitio clonado	Secuencia 5' – 3'
CurtoV3-175For	<i>Curtovirus</i>	<i>Sca I</i>	CAAGTACTACARGTGGTGTAT ACTAGGTATCC
RepQWE-For	<i>Curtovirus</i>		GACAGATCTCCRAARTAAGM ATCRGCCCAYTCTTG
<i>CurV2Gen-910For</i>	<i>Curtovirus</i>	<i>Sal I</i>	ATGTCGACGAAGCATTGAAG TTTGATATGGC
<i>PepCTV-For</i>	<i>PepCTV</i>	<i>Eco R1</i>	ATGGAATTCGTCGCTTGTTGC AGCG
Iniciadores en sentido de la complementaria	Virus y Genoma amplificado	Sitio clonado	Secuencia 5' – 3'
CurCP-450Rev	<i>Curtovirus</i>		GGTCAGGCTATGCCGTCTACT CGAGGAC
<i>CurRep2GQRev</i>	<i>Curtovirus</i>	<i>Bgl II</i>	AGCCGTCTGYTGRCTCCKCG WGCAGATCTTC
<i>PepCTV-Rev</i>	<i>PepCTV</i>	<i>Eco R1</i>	ATTGAATTCATACCCGTGGC TTTGG

Tabla 7. Oligonucleótidos específicos diseñados y utilizados durante este trabajo identificar la presencia de curtovirus en extractos vegetales y la obtención de la clona infectiva correspondiente al genoma de *Pepper Curly top virus (PepCTV)*. Las regiones subrayadas corresponden al sitio de restricción presente en cada oligonucleótido.

La evaluación de los iniciadores universales diseñados en este trabajo se realizó amplificando el genoma de un curtovirus contenido en un extracto de chile cedido amablemente por la Dra. Rebeca Creamer de la Universidad de Nuevo Mexico como parte de una colaboración con el IPICYT, el cual se utilizó además como una entidad de referencia para establecer el tamaño de los productos de PCR obtenidos con cada combinación de iniciadores. Los análisis de secuenciación indicaron que todas las combinaciones evaluadas mostraron ser efectivas para amplificar regiones específicas del genoma de curtovirus (figura 11). Los fragmentos amplificados con las combinaciones RepQWEFor / CurCP-450Rev y CurV2Gen910For / CurRep2GQRev abarcan la totalidad del genoma de curtovirus (figura 10).

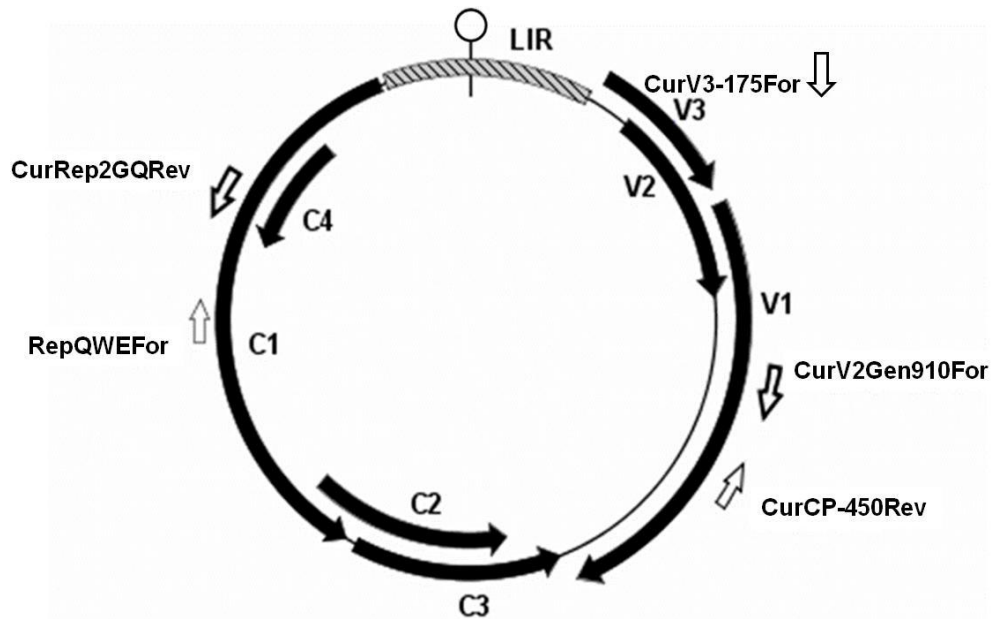


Figura 7. Genoma de un curtovirus mostrando las regiones complementarias a los iniciadores universales utilizados para obtener la secuencia completa de curtovirus presentes en muestras vegetales, todos diseñados en el presente estudio. Las flechas indican el sentido del iniciador con respecto a la dirección de replicación del virus, “For” (en sentido de las manecillas del reloj) y “Rev” (en sentido contrario a las manecillas del reloj).

Seleccionamos las combinaciones RepQWEFor / CurCP-450Rev y CurV2Gen910For / CurRep2GQRev porque los productos de PCR obtenidos a partir de estas combinaciones comprenden la totalidad del genoma de geminivirus pertenecientes al género curtovirus y, se traslapan en una región de aproximadamente 250pb para el caso del gen Rep y 450pb para el gen CP, lo cual facilita el ensamble correcto de los genomas completos en el caso de infecciones mixtas.

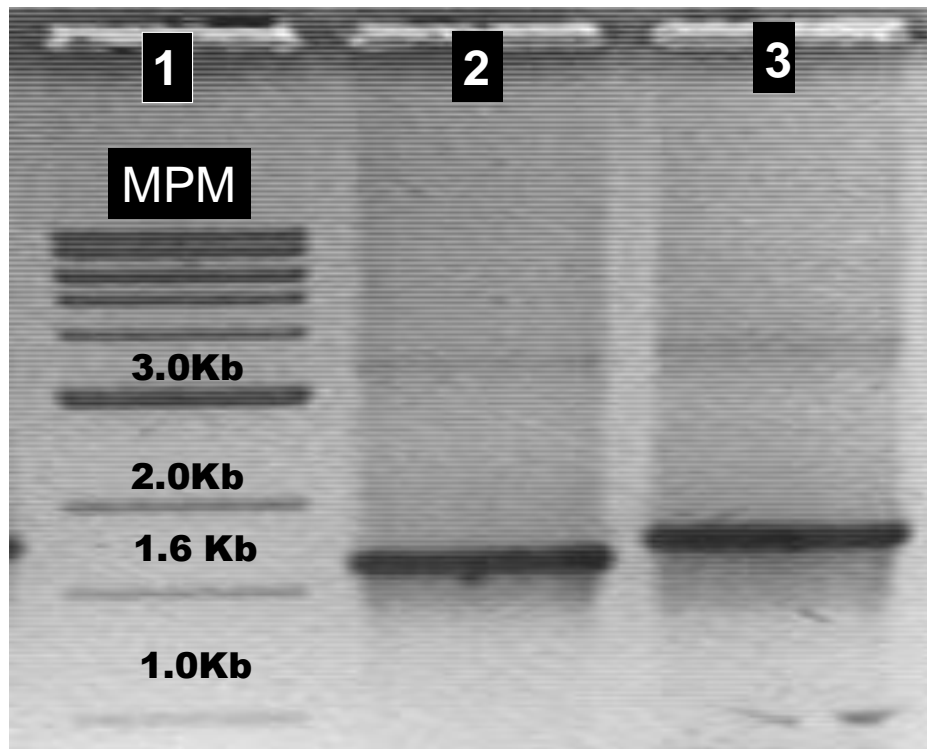


Figura 8. Productos de PCR amplificados a partir del extracto de chile infectado con curtovirus colectado en Nuevo Mexico (E.U.) con las combinaciones: 1) Marcador de Peso molecular (MPM) 1Kb, 2) CurV2Gen910For / CurRep2GQRev 3) RepQEWFFor / CurCP450Rev. Los dos amplicones obtenidos abarcan la totalidad del genoma viral y se traslapan en regiones pertenecientes a los genes CP y Rep.

3.4.2. *Pepper curly top virus (PepCTV)* una nueva especie de curtovirus aislada en Nuevo México, E.U.

Durante la última década se han reportado cultivos de chile presentes en el Sur de Nuevo Mexico infectados por BCTV debido en gran parte a que las poblaciones de su insecto vector se han incrementado de forma alarmante. En 2001 se reportaron pérdidas de alrededor del 12% tan solo en las regiones productoras de chile (NASS-USDA, 2003). Las plantas infectadas presentan como síntomas característicos clorosis intensa y grave retraso del crecimiento dando como resultado la ausencia o mala calidad de los frutos (Creamer *et al.* 2003).

Como parte de una colaboración con la doctora Rebeca Creamer de la universidad de Nuevo México, E.U. se recibieron extractos vegetales de muestras de chile colectadas en las regiones del Sur de Nuevo México en donde con anterioridad se había reportado la presencia de grandes poblaciones de *C. tenellus* y de síntomas asociados con la presencia de curtovirus. Por medio de la técnica de hibridación y PCR se confirmó la presencia de curtovirus en las muestras. Una muestra positiva fue enviada al laboratorio de biología molecular de plantas del IPICYT, en donde iniciamos el aislamiento y caracterización del curtovirus presente en la muestra de campo.

Confirmamos la presencia de curtovirus mediante la técnica de PCR con la combinación de oligonucleótidos CurtoV3-175For / CurtoCP-450Rev, los productos de PCR obtenidos fueron del tamaño esperado (660pb). Una vez que se confirmó la presencia de curtovirus continuamos con el análisis por PCR pero ahora con las combinaciones RepQWEFor / CurCP-450Rev y CurV2Gen910For / CurRep2GQRev las cuales nos permitieron amplificar la totalidad del genoma(s) contenidos en las muestras problema.

Los amplicones obtenidos fueron del tamaño esperado y se clonaron en el vector pGEMTEasy, las clonas que contenían la región amplificada con los oligonucleótidos RepQWEFor / CurCP-450Rev son las que dan la mayor información sobre la identidad de cualquier curtovirus y es por eso que fueron sometidos a un análisis de RFLP con la enzima *Eco RI* en combinación con *Hinf I* o *Msp I*, los productos de cada digestión fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% en busca de bandas polimórficas que nos indicaran la presencia de más de un virus. Se analizaron diez clonas independientes y todas mostraron los mismos patrones de restricción tanto para *Eco RI / Hinf I* como *Eco RI / Msp I* confirmando la presencia solo un curtovirus.

Las secuencias obtenidas comparten regiones traslapadas en los genes Rep y CP que van de las 250 a las 450pb respectivamente lo que permite verificar que ambos productos fueron amplificados a partir de la misma secuencia viral y, facilita la reconstrucción de los genomas aislados; Tales secuencias fueron analizadas

mediante el programa computacional DNASTar y con los datos obtenidos se ensambló el genoma de un curtovirus de 2931pb cuya secuencia fue analizada y comparada con las secuencias disponibles en el banco de datos del GenBank mostrando un 82.6% de similitud con *BSCTV-Cfh*, su pariente más cercano (tabla 8).

En base a los resultados obtenidos del análisis de secuencias y los criterios establecidos por el comité internacional para la taxonomía de virus (ICTV por sus siglas en inglés), que indican que un geminivirus se considera una especie separada si su genoma A completo presenta una similitud global menor al 88% con su pariente más cercano (Fauquet *et al.* 2008), se estableció que el virus aislado de los extractos de Chile provenientes de Nuevo México corresponde a una nueva especie de Geminivirus perteneciente al género Curtovirus y cuyo posible origen se debe a una recombinación entre *BSCTV-Cfh* y un virus no identificado previamente. Para confirmar lo anterior, se analizó el origen de replicación del nuevo virus y como resultado observamos que contiene iterones idénticos a los presentes en *BSCTV-Cfh*, *BMCTV*, *BCTV* y *SCTV* (figura 9). En base en los criterios taxonómicos actuales (Fauquet *et al.* 2008) el nombre tentativo para este nuevo geminivirus fue: *Pepper curly top virus* (*PepCTV*, No. acceso NC009518).

PepCTV, BSCTV-Cfh, BCTV, BMCTV y SCTV.

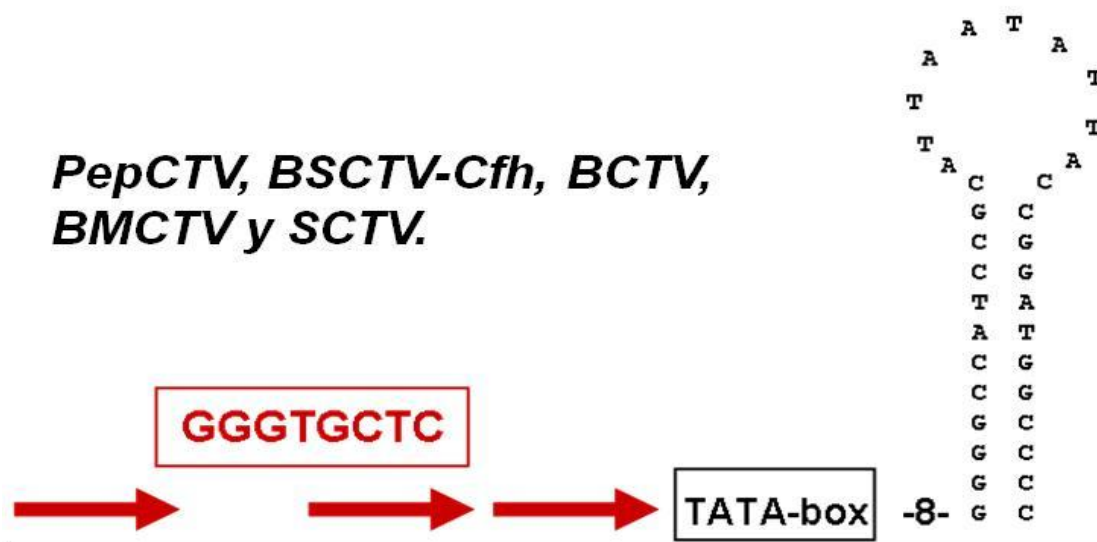


Figura 9. Las secuencias repetidas (iterones) presentes en el origen de replicación de *Pepper curly top virus* (*PepCTV*, No. acceso NC009518) son idénticas a las presentes en la mayoría de los curtovirus reportados hasta la fecha; *Beet severe curly top virus-Cfh* (*BSCTV-Cfh*, No. acceso UO2311); *Beet curly top virus* (*BCTV*, No. de acceso M24597); *Beet mild curly top virus- Worland* (*BMCTV-Worland*, No. de acceso U56975) y *Spinach curly top virus* (*SCTV*, No. de acceso NC005860).

Virus	Genoma Completo	V1	V2	V3	C1	C2	C3	C4
<i>BCTV- Cal / Logan</i>	65.8	78.3 (85.8)	70.1 (54.0)	76.0 (67.0)	67.9 (70.9)	72.3 (60.0)	67.6 (64.7)	68.6 (47.1)
<i>BMCTV- Worland4</i>	73.5	79.3 (87.0)	71.7 (56.3)	77.5 (68.2)	77.5 (79.7)	76.6 (64.6)	73.2 (71.3)	67.4 (49.4)
<i>BMCTV- Worland</i>	73.7	79.9 (87.0)	70.3 (54.0)	76.0 (67.0)	77.5 (80.2)	76.8 (65.3)	73.5 (71.3)	66.7 (48.2)
<i>BSCTV- Cfh</i>	82.6	78.8 (86.6)	70.6 (55.6)	76.4 (68.2)	98.0 (98.3)	92.9 (89.3)	82.2 (81.6)	99.6 (98.9)
<i>HrCTV</i>	48.3	70.9 (77.1)	62.2 (50.4)	72.3 (58.0)	46.3 (51.2)	23.0 (11.9)	ND	37.9 (16.1)
<i>SCTV</i>	74.3	75.0 (80.7)	66.7 (55.6)	74.5 (69.3)	84.9 (87.3)	73.0 (60.5)	71.0 (73.5)	96.5 (95.3)
<i>IBCTV</i>	38.8	68.9 (73.7)	50.8 (43.8)	65.2 (55.7)	22.8 (21.2)	ND	ND	ND
<i>BMCTV- Mexico</i>	70.5	79.2 (87.4)	70.1 (57.1)	75.7 (67.0)	76.2 (78.8)	74.5 (63.9)	70.8 (66.9)	65.5 (48.2)
<i>BMCTV- SLP1</i>	70.9	78.7 (88.6)	69.3 (55.6)	73.0 (68.2)	76.9 (79.4)	76.1 (64.6)	71.8 (69.1)	67.4 (51.8)
<i>BMCTV- SLP2</i>	70.4	79.3 (88.2)	70.1 (57.1)	74.5 (67.0)	75.8 (77.7)	75.7 (64.6)	72.0 (69.1)	65.9 (47.7)
<i>TCTV</i>	42.1	40.0 (31.0)	21.7 (13.6)	ND	64.7 (65.3)	49.1 (31.9)	43.8 (39.0)	78.3 (70.6)
<i>PepYDV</i>	72.5	77.8 (84.6)	70.9 (54.8)	76.8 (67.0)	79.2 (79.9)	82.9 (76.2)	78.6 (77.2)	69.8 (49.4)

Tabla 8. Comparación del porcentaje de identidad de las secuencias codificantes de *Pepper curly top virus (PepCTV)* con sus homólogos presentes en las especies del genero curtovirus reportadas hasta la fecha. El porcentaje de identidad con respecto a las secuencias de aminoácidos se muestra en paréntesis.

3.4.2.1. Caracterización biológica de *PepCTV*

La mayoría de los síntomas observados en cultivos de interés económico se pueden deber a factores tanto bióticos como abióticos de modo que la caracterización filogenética del posible agente causal no es suficiente para conocer los riesgos y consecuencias debido de su presencia en una zona determinada. Para confirmar que, la nueva especie de curtovirus identificada durante este trabajo es responsable de los síntomas observados en cultivos de Chile del estado de Nuevo Mexico se infectaron plantulas sanas que puedan servir como posibles hospederos sin olvidar incluir como modelo de estudio la planta a partir de la cual se aisló originalmente el virus en cuestión.

Diseñamos oligonucleótidos específicos que nos facilitaran amplificar y clonar el genoma de *PepCTV* (tabla 9) en el vector pGEMTeasy, las clonas obtenidas fueron secuenciadas y la caracterización biológica de *PepCTV* se realizó con la técnica de biobalística previa selección de plantas sanas que pueden servir como probables hospederos. La capacidad infectiva de *PepCTV* se evaluó por medio de la aparición de síntomas y/o confirmando por PCR la presencia del virus inoculado en las hojas nuevas mediante el uso de oligonucleótidos específicos del linaje al que pertenece (CurtoV3-175For / CurtoCP-450Rev) y finalmente la secuenciación de los amplicones clonados. Las plantas seleccionadas como modelos de estudio fueron: Chile variedad Anaheim y Pasilla (*Capsicum annuum*), Betabel (*Beta vulgaris L.*) y Acelga (*Beta vulgaris L. variedad Cicla*).

Las primeras inoculaciones de *PepCTV* se hicieron utilizando como modelo de estudio plantulas de Chile con un promedio de cuatro hojas verdaderas todas pertenecientes a las variedades Anaheim y Pasilla, se utilizaron dos controles negativos inoculados con el vector pGEMTeasy y para todos los casos cada experimento se realizó por duplicado. Para evaluar la capacidad infectiva de las clonas utilizadas, al momento de observar la presencia de posibles síntomas se hicieron extractos de ADN genómico de las plantas inoculadas y con la técnica de PCR confirmamos la presencia o ausencia de *PepCTV*. Aun y cuando no se observara la aparición de síntomas con el paso del tiempo, los extractos de las plantas inoculadas también eran analizadas para confirmar la presencia o ausencia de *PepCTV* previendo posibles infecciones asintomáticas.

De las cinco plantas de Chile variedad Anaheim analizadas solo en dos se identificó la presencia de síntomas y se logró identificar a *PepCTV* indicándonos que la infección sí se llevó a cabo. Los síntomas observados en Chile variedad Anaheim fueron arrugamiento leve de la lámina foliar (enaciones) y mal formación severa de las hojas (epinastía). En el caso de las cinco plantas de Chile variedad Pasilla inoculadas con *PepCTV* ninguna mostró diferencias a nivel de síntomas con respecto al control negativo. A las cuatro semanas post inoculación se obtuvieron extractos de las plantas inoculadas y en dos de las cinco plantas de Chile Pasilla analizadas se confirmó por PCR y secuenciación la presencia de *PepCTV* en las

hojas nuevas. Ya que confirmamos la capacidad de la clona infectiva de *PepCTV* para replicarse en Chile se inocularon plantas de betabel y acelgas ambas consideradas como más susceptibles a la infección por curtovirus.

Con respecto a las cinco plántulas de betabel inoculadas, *PepCTV* no fue capaz de establecer una infección ya que la falta de síntomas y la confirmación por PCR de su ausencia en los extractos vegetales nos confirma lo anterior. Mientras tanto de las cuatro plantas de acelga inoculadas, a las cuatro semanas post inoculación se observaron posibles síntomas provocados por *PepCTV* caracterizados por: falta de rigidez y deformación foliar (figura 10). Finalmente por PCR y secuenciación se confirmó la presencia de *PepCTV* en los extractos de las plantas sintomáticas y su ausencia en las asintomáticas. Los resultados preliminares nos indican que la clona infectiva analizada en este trabajo puede replicarse en algunas de las plantas inoculadas pero es incapaz de producir síntomas claros y reproducibles lo cual establece la necesidad de obtener y probar nuevas clonas infectivas capaces de producir una infección que a la larga desencadene en la presencia de síntomas reproducibles.

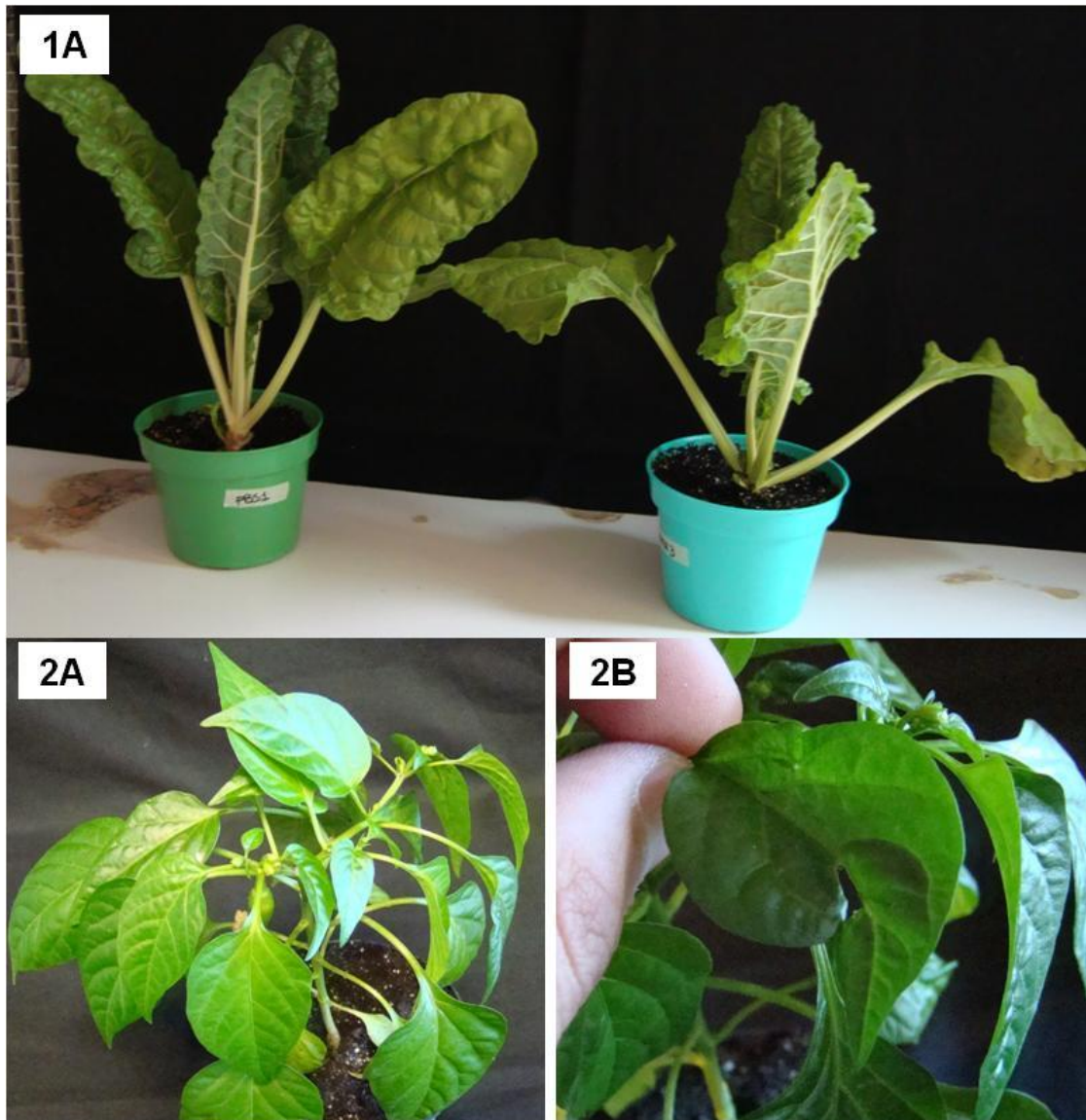


Figura 10. Comparación entre plantas sanas y plantas infectadas con *PepCTV*. 1A) Planta de acelga sana (izquierda) y los síntomas observados en una planta infectada con *PepCTV* (derecha). Los síntomas observados son, la deformación foliar y la falta de rigidez ya que los tallos se debilitan. 2A) Se observan las hojas de una planta de chile variedad Anaheim sana en comparación con una planta de la misma variedad infectada con *PepCTV* (2B).

3.4.3. Caracterización biológica y molecular de curtovirus presentes en los estados de San Luis Potosí y Zacatecas

El desierto Chihuahuense es el desierto biológicamente más diverso del Hemisferio oeste. Comprende 70 millones de hectáreas ocupando gran parte de los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Zacatecas, Durango y San Luis Potosí, así como parte de Texas y Nuevo Mexico en los Estados Unidos. El desierto de Chihuahua presenta una altitud que varía entre los 600 a los 1675 metros de altura sobre el nivel medio del mar y como consecuencia su clima es mas templado con respecto al encontrado en el desierto de Sonora, ubicado al Oeste, aunque, las temperaturas oscilan entre los 30 y 40°C durante el día siendo la noche cuando las temperaturas bajan dependiendo la región y la altitud de la misma; La vegetación consiste en matorrales y pastizales los cuales se ven favorecidos por las abundantes precipitaciones pluviales presentes durante la temporada de monzón al final de cada verano.

Tomando en consideración que las condiciones climáticas de algunas zonas de nuestro país pertenecientes al desierto Chihuahuense son muy similares a las reportadas en las principales zonas afectadas por curtovirus en los estados de Texas y Nuevo México en los Estados Unidos en donde se reporta constantemente la presencia de *Circulifer tenellus*. Con la asesoría del M.C. Miguel Ángel Silva Flores nos dimos a la tarea de hacer muestreos programados en regiones productoras de Chile localizadas en el Altiplano Potosino en busca del insecto vector (*C. tenellus*) y / o plantas con síntomas característicos de infección por curtovirus.

A mediados del año 2007 localizamos cultivos de Chile en sus variedades serrano, pasilla y poblano con síntomas como enanismo, deformación foliar y enchinamiento de las hojas en forma de cuchara localizados en el municipio de Villa de Arista a 97 Km de la ciudad de San Luis Potosí. Las muestras colectadas fueron analizadas por PCR para confirmar o descartar la presencia de begomovirus con la combinación de oligonucleótidos RepMot-1 / pCP-70Rev obteniendo resultados negativos. Posteriormente proseguimos a hacer una nueva reacción de PCR pero en esta ocasión con los oligonucleótidos CurV3-175For / CurCP-450Rev, diseñados

durante este trabajo para diagnosticar la presencia o ausencia de curtovirus en cualquier extracto vegetal. Los resultados obtenidos fueron positivos y como parte del protocolo utilizamos las combinaciones de oligonucleótidos RepQWEFor / CurCP-450Rev y CurV2Gen910For / CurRep2GQRev las cuales nos permitieron amplificar la totalidad del o los genomas contenidos en la muestras problema.

Al analizar la secuencia de los fragmentos de PCR amplificados a partir de las muestras de Chile variedad serrano logramos armar un genoma de 2955pb el cual fue comparado por medio del algoritmo computacional Clustal V (MegAlign; DNASTar) con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank y obtuvimos una similitud del 88.1% con *BMCTV-Worland*, su pariente mas cercano (tabla 9).

Virus	Genoma Completo	V1	V2	V3	C1	C2	C3	C4
<i>BCTV- Cal / Logan</i>	70.8	90.5 (94.9)	91.6 (86.5)	92.9 (92.0)	68.1 (65.4)	67.1 (52.1)	63.7 (62.5)	61.6 (40.0)
<i>BMCTV-Worland4</i>	87.8	91.4 (96.1)	92.7 (88.9)	95.1 (94.3)	92.9 (93.9)	89.6 (81.0)	86.4 (83.8)	94.2 (87.1)
<i>BMCTV-Worland</i>	88.1	91.0 (96.1)	92.4 (88.1)	94.0 (92.0)	93.3 (93.9)	89.4 (81.0)	86.9 (83.8)	95.3 (89.4)
<i>BSCTV-Cfh</i>	75.1	91.0 (95.7)	92.1 (88.9)	93.6 (92.0)	76.5 (79.4)	71.2 (59.3)	65.2 (64.0)	65.9 (49.4)
<i>HrCTV</i>	46.2	74.7 (79.1)	68.3 (63.2)	76.0 (71.6)	47.7 (51.2)	21.2 (12.7)	ND	43.4 (21.2)
<i>SCTV</i>	69.3	77.8 (84.6)	78.0 (72.2)	86.9 (85.2)	73.3 (77.4)	71.2 (58.5)	70.1 (69.1)	66.3 ()
<i>IBCTV</i>	40.1	68.2 (73.7)	62.6 (58.7)	72.2 (64.0)	24.3 (22.4)	ND	ND	ND
<i>PepCTV</i>	70.5	79.2 (87.4)	70.1 (57.1)	75.7 (67.0)	76.2 (78.8)	74.5 (69.3)	70.8 (66.9)	65.5 (48.2)
<i>BMCTV-SLP1</i>	93.8	96.9 (98.8)	97.1 (95.2)	97.9 (95.7)	96.2 (98.0)	94.6 (90.5)	94.9 (90.4)	97.3 (92.9)
<i>BMCTV-SLP2</i>	95.5	98.4 (98.8)	98.2 (96.0)	99.3 (98.9)	97.8 (97.2)	97.3 (95.9)	97.6 (95.6)	98.8 (97.6)
<i>TCTV</i>	43.6	42.2 (35.4)	24.6 (11.2)	ND	59.7 (62.0)	47.7 (29.8)	41.8 (35.3)	66.7 (45.9)
<i>PepYDV</i>	81.6	86.5 (91.3)	93.2 (89.7)	95.1 (94.3)	86.4 (88.5)	82.0 (72.1)	80.0 (76.5)	87.6 (81.2)

Tabla 9. Comparación del porcentaje de identidad de las secuencias codificantes de *Beet mild curly top virus-Mexico* (*BMCTV-Mexico*; No. de acceso EU 193175) con sus homólogos presentes en las especies del genero curtovirus reportadas hasta la fecha. El porcentaje de identidad con respecto a las secuencias de aminoácidos se muestra en paréntesis.

Los criterios taxonómicos actuales establecen que los aislados de un geminivirus cuyo genoma A presenta una identidad global del 89 al 93% se consideran cepas (“strains”) de la misma especie (Fauquet, 2008). Pero en el caso del curtovirus aislado de Chile variedad serrano el 88.1% de similitud con su pariente mas cercano lo define como una especie muy cercana a *BMCTV-Worland* (Fauquet *et al.* 2008). Para confirmar si este nuevo aislado se trata de una nueva especie muy cercana a *BMCTV-Worland* o de una nueva cepa nos dimos a la tarea de analizar el origen de replicación del nuevo aislado y como resultado observamos que contiene iterones cuya secuencia es casi idéntica a los presentes en *BMCTV-Worland* con excepción de una Adenina de mas localizada en el segundo iteron rio arriba de la caja TATA (figura 11).

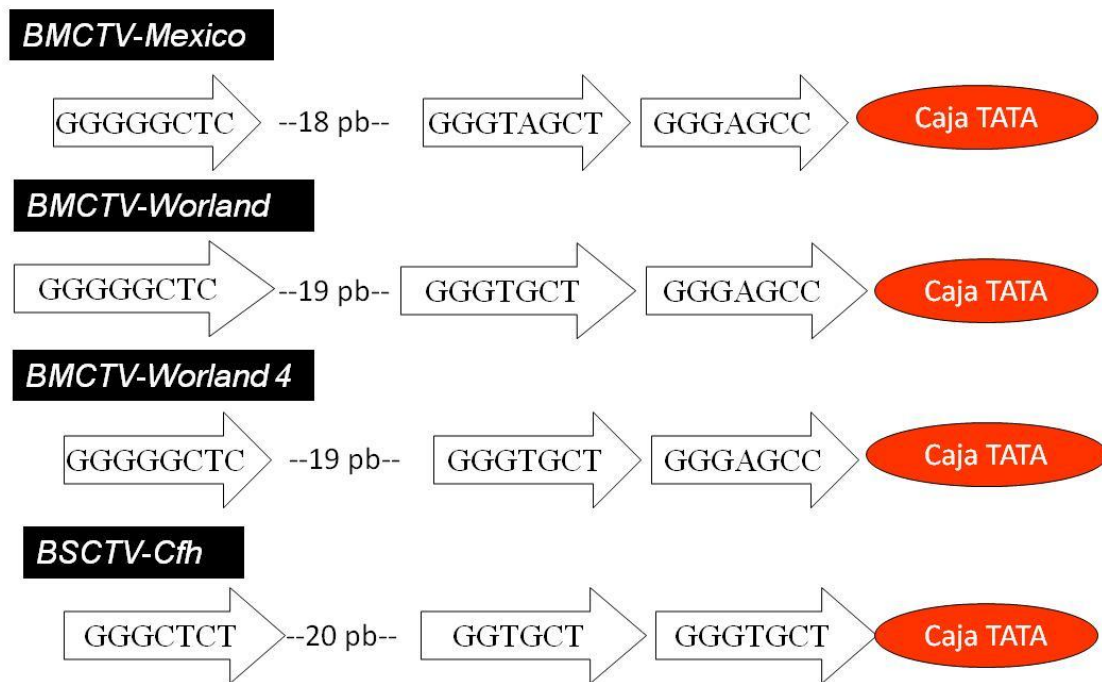


Figura 11. Comparación entre el numero y arreglo de los iterones presentes en, *Beet mild curly top virus* (*BMCTV-Mexico*; No. de acceso EU 193175), *Beet mild curly top virus-Worland* (*BMCTV-Worland*; No. de acceso U56975), *Beet mild curly top virus-Worland 4* (*BMCTV-W4*; No. de acceso NC004753) y como virus de referencia, *Beet severe curly top virus-Cfh* (*BSCTV-Cfh*; No. de acceso UO2311).

La alta similitud observada entre los determinantes de especificidad replicativa presentes en el aislado de chile serrano y *BMCTV-W* aunado a que la diferencia a nivel filogenético no fue lo suficientemente amplia nos da la certeza de que, el curtovirus aislado de *Chile serrano* corresponde a una nueva cepa de la especie *BMCTV-Worland* denominada tentativamente: *Beet mild curly top virus-Mexico* (*BMCTV-Mexico*; No. Acceso EU193175); Siendo este el primer reporte sobre la presencia de *BMCTV* en nuestro país y amplía notablemente la distribución geográfica de esta especie viral hasta la fecha restringida a los Estados Unidos.

3.4.3.1. Caracterización biológica de *Beet mild curly top virus-Mexico*

Siendo este el primer reporte sobre la presencia de *BMCTV* en nuestro país es de vital importancia describir las características epidemiológicas de la nueva cepa aislada en cultivos de chile serrano durante este trabajo. Uno de los principales puntos es el evaluar de manera experimental su capacidad para infectar plantas pertenecientes a diferentes familias y registrar el grado de severidad de los síntomas presentados en las plantas enfermas.

Para el caso de *BMCTV-Mexico* y los demás virus aislados en territorio Potosino, la obtención de clonas infectivas se realizó mediante el uso de una técnica relativamente nueva conocida como TempliPhi (GE Healthcare) la cual mediante una reacción isotérmica aprovecha las características de la polimerasa del fago Φ 129 para amplificar plásmidos o genomas virales que se replican mediante el mecanismo de círculo rodante produciendo largas copias de ADN continuas conocidas como concameros (Haible *et al.* 2006). Con el uso del programa Map Draw (DNASStar) nos dimos a la tarea de identificar sitios de restricción únicos presentes en el genoma de *BMCTV-Mexico*, finalmente la largas secuencias de ADN viral obtenidas mediante la técnica de TempliPhi a partir de las muestras vegetales fueron digeridos con la enzima *Xba* I de manera que después de una digestión total obtuvimos monómeros virales que posteriormente fueron clonados en el vector viral PBS SK⁺ digerido previamente con la enzima *Xba* I.

Las inoculaciones se hicieron por duplicado utilizando como modelo de estudio plantulas con un promedio de cuatro hojas verdaderas para el caso de chile variedad Anaheim y de tres semanas de crecimiento para acelgas y betabel, se utilizaron dos controles negativos inoculados con el vector pGEMTeasy y para todos los casos cada experimento se realizo por duplicado. Para evaluar la capacidad infectiva de las clonas utilizadas, al momento de observar la presencia de posibles síntomas se hicieron extractos de ADN genómico de las plantas inoculadas y con la técnica de PCR confirmamos la presencia o ausencia de *BMCTV-Mexico*. Aun y cuando no se observara la aparición de síntomas con el paso del tiempo, los extractos de las plantas inoculadas también eran analizadas para confirmar la presencia o ausencia de *BMCTV-Mexico* previendo posibles infecciones asintomáticas.

Inicialmente se inocularon cinco plantas de chile variedad Anaheim de las cuales cuatro mostraron el desarrollo de síntomas entre las tres y cuatro semanas post inoculación y que al mismo tiempo resultaron positivas para *BMCTV-Mexico* al ser analizadas por PCR con los oligonucleótidos CurV3-175For y CurCP450Rev. Los síntomas observados consistieron el retroceso en el crecimiento, deformación foliar (epinastía), enaciones en la lamina foliar, acucharamiento leve de las hojas, debilidad en la arquitectura de la planta, hojas nuevas deformes (figura 12).

De las cinco plantas de acelga inoculadas con *BMCTV-Mexico* logramos identificar la presencia de síntomas a las cuatro semanas post inoculación y se confirmo la infección mediante la técnica de PCR. Los síntomas identificados fueron deformación foliar grave en forma de acucharamiento de la hoja hacia arriba, retraso en el crecimiento en forma de enanismo y la aparición de tallos muy delgados afectando severamente la arquitectura de la planta (figura 12).

Finalmente se utilizo la clona infectiva de *BMCTV-Mexico* para inocular cinco plantas de betabel de tal forma que en cuatro de ellas logramos confirmar por PCR la presencia de *BMCTV-Mexico* a las cuatro semanas post infección junto con la aparición de síntomas tales como, retraso en el desarrollo, hojas pequeñas,

deformación foliar severa en forma de acucharamiento hacia arriba, enaciones de las hojas y debilitamiento de los tallos (figura 15).

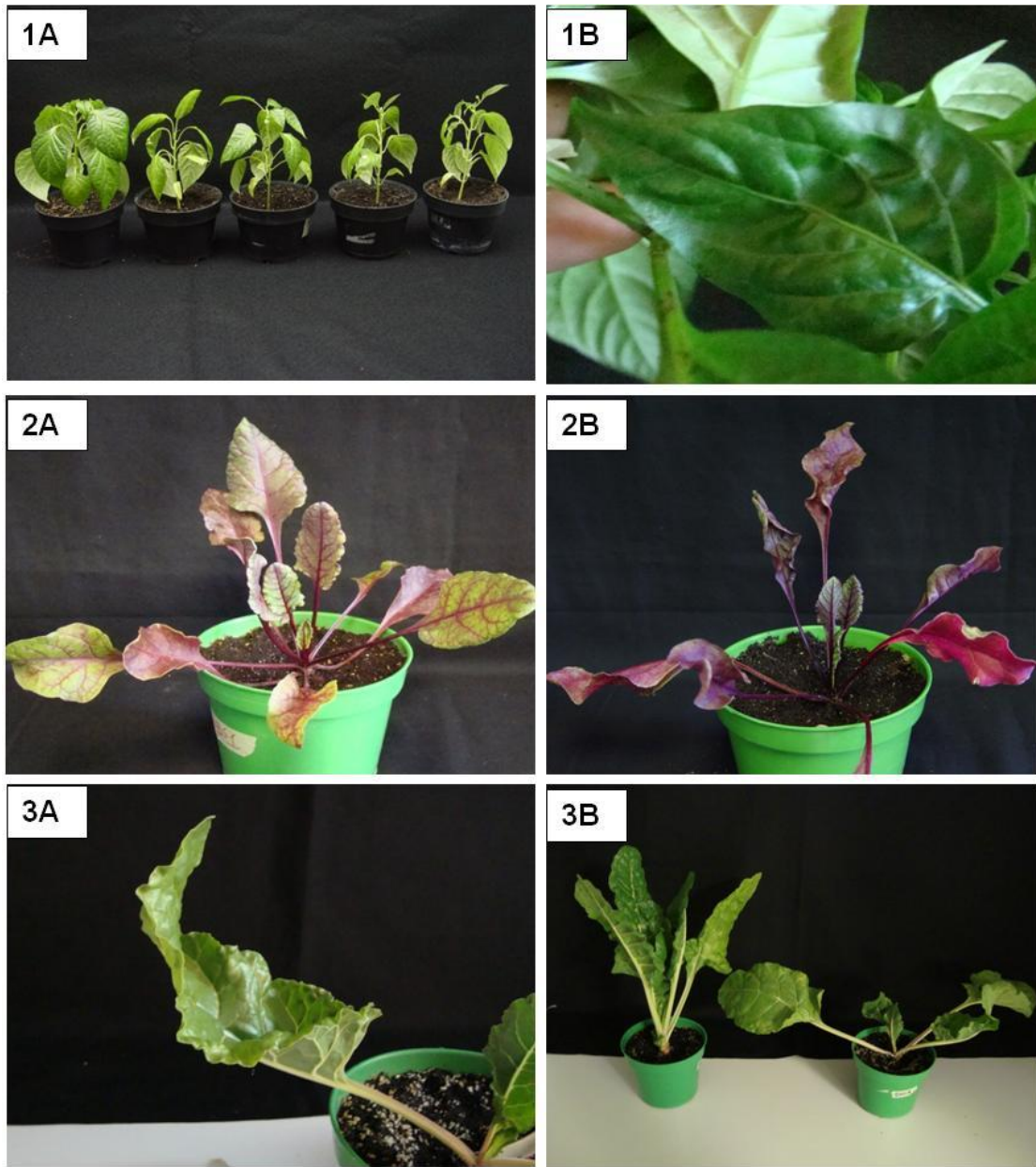


Figura 12. Síntomas observados en plantas sintomáticas infectadas con *BMCTV-Mexico*. 1A) Comparación entre una planta de chile var. Anaheim sana (Izq.) y los síntomas observados en plantas de la misma variedad afectadas por *BMCTV-Mexico* (centro-derecha); 1B) Arrugamiento foliar en plantas de chile var. Anaheim enfermas. 2A) Betabel sano. 2B) Betabel con arrugamiento y deformación foliar severos. 3A) Hoja de acelga con deformación foliar severa en forma de “garra”. 3B) Comparativa entre una planta de acelga sana (izq.) y una enferma con *BMCTV-Mexico* (der.).

3.4.4. Nuevas variantes de *Beet mild curly top virus-Mexico*

Después del reporte de *BMCTV-Mexico* infectado cultivos de chile variedad serrano presentes en el Altiplano Potosino se inicio con el análisis de los extractos obtenidos a partir de muestras de chile en sus variedades pasilla y poblano ambas, colectadas en la misma zona. El análisis se realizo mediante el procedimiento estándar diseñado durante este trabajo y, la ausencia o presencia de begomovirus se confirmo por medio de la técnica de PCR con la combinación de oligonucleótidos RepMot-1 y pCP-70Rev obteniendo resultados negativos.

Posteriormente una nueva reacción de PCR con los oligonucleótidos CurV3-175For / CurCP-450Rev, diseñados durante este trabajo nos permitió confirmar la presencia de Curtovirus en los extractos de chile en sus variedades pasilla y poblano. Las secuencias genómicas completas de los virus contenidos en los extractos se obtuvieron con las combinaciones de oligonucleótidos RepQWEEFor / CurCP-450Rev y CurV2Gen910For / CurRep2GQRev. Al analizar la secuencia de los fragmentos de PCR amplificados a partir de las muestras de Chile pasilla y poblano logramos armar el genoma de dos curtovirus. Ambas secuencias fueron comparadas por medio del algoritmo computacional Clustal V (MegAlign; DNASTar) con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank.

De las muestras de chile pasilla se aisló un genoma viral de 2964pb; Los análisis de secuencia nos indican que es 93.8% similar a *BMCTV-Mexico* previamente reportado durante este trabajo. La segunda secuencia viral de 2955pb fue identificada en las muestras de chile poblano y correspondió a un curtovirus que mostró un 95.5% de similitud con *BMCTV-Mexico* y un 94.6% con respecto al curtovirus aislado en chile pasilla.

En base a los resultados obtenidos del análisis de secuencias y los criterios establecidos por el comité internacional para la taxonomía de virus (ICTV por sus siglas en ingles), que indican que un geminivirus se considera una nueva variante si su genoma completo presenta una similitud global entre el 93 y 99% con su pariente más cercano (Fauquet *et al.* 2008), se estableció que los curtovirus aislados de las

plantas de Chile pasilla y poblano corresponden a nuevas variantes de *BMCTV-Mexico*. El nombre provisional para el curtovirus aislado de Chile pasilla es *Beet mild curly top virus-SLP1* (*BMCTV-SLP1*; No. acceso EU586260) y *Beet mild curly top virus-SLP2* (*BMCTV-SLP2*; No. de acceso EU586261) para el identificado en Chile poblano. El análisis del origen de replicación presente en *BMCTV-SLP1* indica que las secuencias de sus iterones son un poco divergentes en el segundo iteron localizado río arriba de la caja TATA e idénticas a los iterones restantes presentes en *BMCTV-Mexico* y *BMCTV-SLP2* los cuales comparten entre sí iterones idénticos (figura 13).

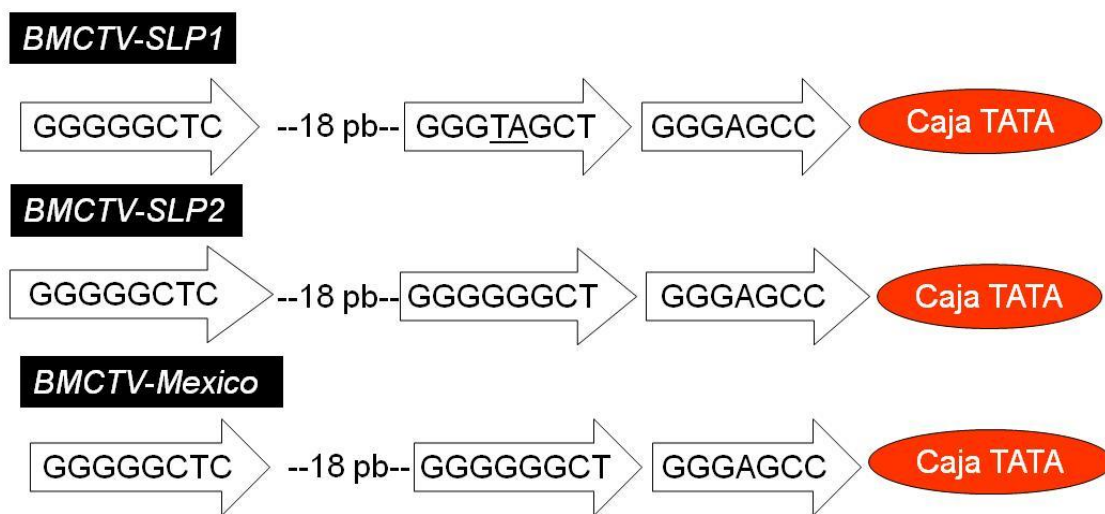


Figura 13. Comparación entre el número y arreglo de los iterones presentes en, *Beet mild curly top virus-SLP1* (*BMCTV-SLP1*; No. de acceso EU586260), *Beet mild curly top virus-SLP2* (*BMCTV-SLP2*; No. de acceso EU586261) y *Beet mild curly top virus-Mexico* (*BMCTV-Mexico*; No. de acceso EU193175).

Para confirmar si existía alguna diferencia a nivel biológico entre los curtovirus identificados en los chiles pasilla y poblano con respecto a *BMCTV-Mexico* se obtuvieron clones infectivos de *BMCTV-SLP1* y *BMCTV-SLP2* mediante la técnica de templiPhi utilizada anteriormente. Con el uso del programa Map Draw (DNASStar) nos dimos a la tarea de identificar sitios de restricción únicos presentes en los genomas de *BMCTV-SLP1* y *BMCTV-SLP2* y, finalmente las largas secuencias de ADN viral obtenidas mediante la técnica de TempliPhi a partir de las muestras de Chile pasilla y poblano fueron digeridas con la enzima *Pst* I de manera que después

de una digestión total obtuvimos monómeros virales que posteriormente fueron clonados en el vector viral PBS SK⁺ digerido previamente con la enzima *Pst* I.

Las inoculaciones se hicieron por duplicado utilizando como modelo de estudio plántulas con un promedio de cuatro hojas verdaderas para el caso de chile variedad Anaheim y de tres semanas de crecimiento para betabel; Se utilizaron dos controles negativos inoculados con el vector pGEMTEasy y para todos los casos cada experimento se realizó por duplicado. Para evaluar la capacidad infectiva de las clonas utilizadas, al momento de observar la presencia de posibles síntomas se hicieron extractos de ADN genómico de las plantas inoculadas y con la técnica de PCR confirmamos la presencia o ausencia de *BMCTV-SLP1* aun y cuando no se observara la aparición de síntomas con el paso del tiempo, los extractos de las plantas inoculadas también eran analizadas para confirmar la presencia o ausencia de *BMCTV-SLP1* previendo posibles infecciones asintomáticas.

Con la clona infectiva de *BMCTV-SLP1* se inocularon cinco plantas de chile variedad Anaheim de las cuales tres mostraron el desarrollo de síntomas entre las tres y cuatro semanas post inoculación y que al mismo tiempo resultaron positivas para *BMCTV-SLP1* al ser analizadas por PCR con los oligonucleótidos CurV3-175For y CurCP450Rev. Los síntomas observados fueron muy parecidos a los provocados por *BMCTV-Mexico* y consistieron en el retroceso en el crecimiento, deformación foliar (epinastía), arrugamiento y acucharamiento leve de las hojas hacia arriba, debilidad en la arquitectura de la planta y hojas nuevas deformes (Figura 14). Al mismo tiempo se inocularon cinco plantas de betabel de las cuales en cuatro de ellas logramos confirmar por PCR la presencia de *BMCTV-SLP1* a las cuatro semanas post infección junto con la aparición de síntomas tales como, retraso en el desarrollo, hojas pequeñas, deformación foliar severa en forma de acucharamiento hacia arriba (sin enaciones) y debilitamiento de los tallos (figura 14).

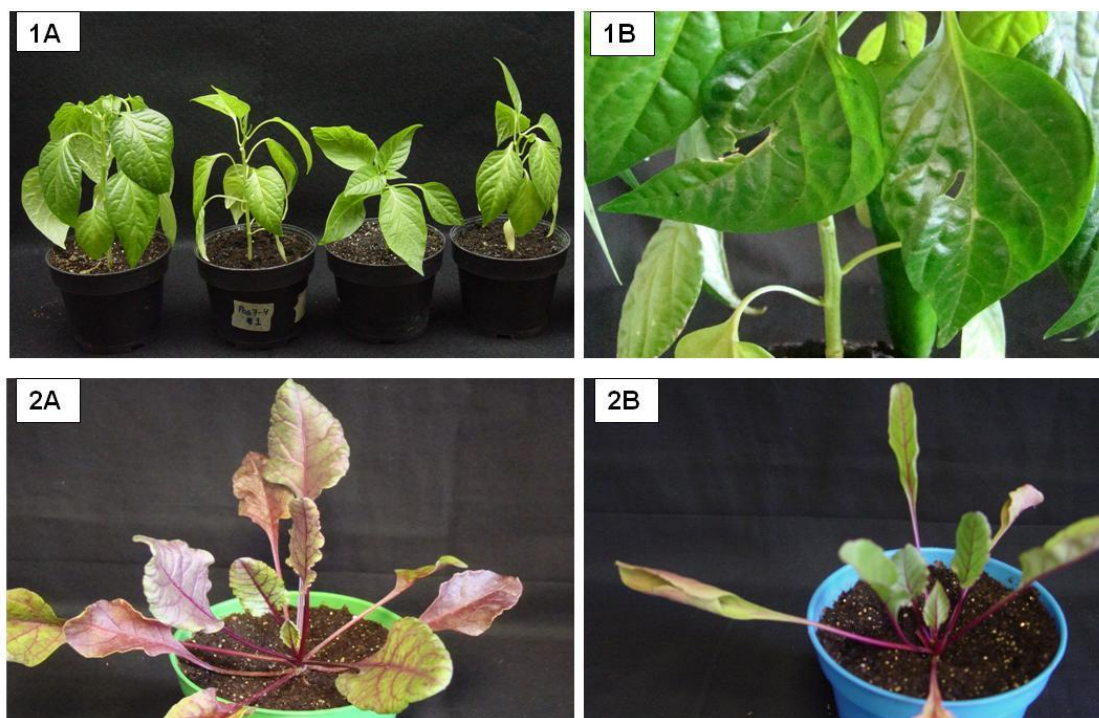


Figura 14. Síntomas observados en plantas sintomáticas infectadas con *BMCTV-SLP1*. 1A) Comparación entre una planta de chile var. Anaheim sana (Izq.) y los síntomas observados en plantas de la misma variedad afectadas por *BMCTV-Mexico* (centro-derecha); 1B) Arrugamiento y deformación foliar en plantas de chile var. Anaheim enfermas. 2A) Betabel sano. 2B) Betabel con acucharamiento hacia arriba y hojas pequeñas.

Con el reporte de *BCTV* (Velásquez *et al*, 2008; Secuencia no disponible) infectando chile en el estado de Zacatecas y la presencia de *Circulifer tenellus* en el Altiplano Potosino nos dimos a la tarea de establecer una colaboración con investigadores del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) campus Zacatecas con el objetivo de recolectar al insecto vector y hacer muestreos vegetales en las zonas posiblemente afectadas por curtovirus. Los insectos colectados fueron separados en lotes y se tomaron de ocho a diez individuos para hacer extractos y fueron analizados por PCR para confirmar la presencia de curtovirus con resultados positivos y con el uso de la combinación de oligonucleótidos RepQWFor / CurCP-450Rev obtuvimos un fragmento de 1760pb que incluye la totalidad de la región intergénica, los genes V2, V3 y porciones de los genes C1 y V1. El análisis de la región intergénica nos indica que las secuencias itericas de las variantes de *BMCTV-Mexico* encontradas en *Circulifer tenellus* son

idénticas a las presentes en *BMCTV-Mexico* y *BMCTV-SLP2*. Adicionalmente demostramos que con el método desarrollado durante esta tesis es posible aislar e identificar los curtovirus contenidos en el insecto vector y así establecer una posible predicción sobre las especies de curtovirus presentes en un agro ecosistema específico.

Al mismo tiempo las muestras vegetales colectadas fueron analizadas mediante el mismo protocolo obteniendo resultados negativos para la presencia de curtovirus en plantas de chile variedad puya; Siendo los extractos de frijol variedad rosita los que dieron resultados positivos para la presencia de curtovirus, para este caso en específico y con base en la importancia económica que representa la producción de frijol en nuestro país utilizamos las combinaciones de oligonucleótidos RepQWEFor / CurCP-450Rev y CurV2Gen910For / CurRep2GQRev y con las secuencias obtenidas armamos un genoma de 2961pb el cual mostro un 97.9% de similitud con *BMCTV-SLP1* su pariente mas cercano. Tomando en cuenta lo establecido por el ICTV, que indican que un geminivirus se considera una nueva variante si su genoma completo presenta una similitud global entre el 93 y 99% con su pariente mas cercano (Fauquet *et al.* 2008), se estableció que el curtovirus aislado de muestras de frijol en el Altiplano Zacatecano es una nueva variante de *BMCTV-SLP1* denominado provisionalmente como *BMCTV-Zacatecas*.

Los iterones presentes en el origen de replicación de *BMCTV-Zacatecas* son idénticos a los presentes en *BMCTV-SLP1*. El aislado de frijol amplia la distribución geográfica de la especie viral *BMCTV* e incrementa su rango de hospederos pues aunque existen reportes sobre síntomas posiblemente causados por curtovirus a la fecha no se había confirmado su presencia por métodos moleculares. Después de analizar la secuencias presentes en el origen de replicación de cada uno de los virus reportados durante este trabajo se observa como una constante que la secuencia de los tres iterones presentes en cada secuencia muestran diferencias entre si lo cual les puede conferir características especiales como el ser reconocidas por mas de una proteína de replicación como el caso en el que *BMCTV-Worland* y *BSCTV-Cfh* en donde a pesar de pertenecer a especies diferentes comparten sus elementos de replicación específicos tanto en Cis como en Trans (Stenger 1998). Finalmente la

alta similitud a nivel de secuencia entre los curtovirus aislados en la región del Altiplano de los estados de San Luis Potosí y Zacatecas nos indica que estos conforman un pequeño clado endémico de esta región aun perteneciente al desierto Chihuahuense.

4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo desarrollamos un nuevo método de diagnóstico molecular cuyas características lo hacen apropiado para el diagnóstico y el descubrimiento de nuevas especies virales pertenecientes al género de los curtovirus mostrando una mayor eficiencia en comparación con los métodos existentes los cuales se basan solo en el uso de sondas moleculares y el posterior diseño de oligonucleótidos específicos.

Se diseñaron 6 diferentes oligonucleótidos universales y dos específicos para amplificar el genoma completo de *PepCTV* todos ellos flanqueados por sitios de restricción que facilitan su clonación en plásmidos de uso general como pK19 o pBSK⁺ y con los cuales se puede amplificar el genoma completo de cualquier curtovirus sin importar su origen geográfico. La versatilidad de los oligonucleótidos se demostró experimentalmente amplificando con éxito regiones genómicas específicas de geminivirus pertenecientes al género curtovirus.

Lo anterior contrasta con los métodos utilizados actualmente, la mayoría de los cuales se basan en el diseño de oligonucleótidos que amplifican porciones de los genes que codifican para las proteínas de Replicación (Rep) y la cápside (CP) de curtovirus obteniendo solo información parcial y no permite eficientizar la caracterización taxonómica completa del virus en cuestión ya que necesariamente se tienen que diseñar oligonucleótidos específicos a partir de las secuencias obtenidas.

La combinación de oligonucleótidos CurtoV3-175For / CurtoCP-450Rev produce un amplicón de aproximadamente 660pb e incluye regiones parciales de los genes V1, V2 y V3. El uso de esta combinación de oligonucleótidos favorece el fitodiagnóstico molecular ya que con sus alta especificidad y sensibilidad es capaz de indicarnos la ausencia o presencia de geminivirus pertenecientes al género curtovirus en cualquier extracto de origen vegetal sin importar su origen geográfico.

Una vez que se confirmó la presencia de un curtovirus el siguiente paso es el uso de la combinación de oligonucleótidos degenerados RepQWEFor / CurCP-450Rev que amplifica un fragmento de ADN de 1760pb que incluye la totalidad de la región intergénica, los genes V2, V3 y porciones de los genes C1 y V1. La región intergénica contiene el origen de replicación del genoma viral y los dos promotores divergentes. Los productos de PCR que corresponden a la región RepQWEFor / CurP450Rev se pueden clonar para analizar experimentalmente la organización funcional del origen de replicación de los curtovirus, lo anterior implica no solo el análisis de los elementos en Cis implicados de forma directa en la replicación viral sino también los elementos reguladores de la transcripción de genes tempranos y tardíos. En caso de algún indicio sobre la presencia de infecciones mixtas se aprovecho la alta variabilidad genómica presente en la región intergénica de los geminivirus y se recurrió a la técnica de RFLPs utilizando las enzimas Hha1 y Msp1 utilizadas por Monreal y Col., (Tesis maestría 2005) para confirmar la presencia de una infección mixta y posteriormente establecer diferencias entre los productos de PCR correspondientes a cada begomovirus implicado en la co-infección.

La información obtenida es actualmente utilizada en el diseño de vectores virales que faciliten la expresión de genes foráneos en plantas, y establecer la bases moleculares para obtener líneas transgénicas resistentes a mas de un begomovirus basándonos en los resultados obtenidos por Yang y *col.* (2004) los cuales indican que las plantas de tomate que expresan una formas mutantes o truncadas de la proteína Rep exhiben mayor resistencia a geminivirus. Además, con la región intergénica se puede identificar si el virus analizado corresponde a una nueva especie o se trata de alguna cepa o variante de una especie previamente descrita y se pueden realizar estudios evolutivos utilizando las secuencias itericas presentes en el origen de replicación debido a que el número y arreglo de estas secuencias es conservado entre grupos geminivirales relacionados evolutivamente (Arguello-Astorga y *col.*, 1994).

Si la secuencia amplificada con la combinación de oligonucleótidos RepQWEFor / CurCP-450Rev pertenece a un curtovirus potencialmente importante

la porción restante del genoma completo se obtuvo con la combinación CurV2Gen-910For / CurRep2GQRev cuyo amplicón de 1850pb incluye las secuencias restantes de los genes C1, V1 y la totalidad de los genes C2 y C3. Otra de las características resaltar es que los fragmentos obtenidos con las combinaciones RepQWEFor / CurCP-450Rev y CurV2Gen-910For / CurRep2GQRev se traslapan en una región de aproximadamente 250pb localizada en el gen Rep y de 450pb en el gen CP evitando de una manera eficaz la presencia de ambigüedades al momento de ensamblar los genomas completos en caso de infecciones mixtas y así evitar el reporte de nuevas especies, cepas o variantes falsas.

La técnica diseñada y probada experimentalmente durante el presente estudio pueden ser utilizada para la identificación y caracterización genómica tanto de regiones específicas como el genoma completo de cualquier curtovirus sin importar su origen geográfico o rango de hospederos, establecer e identificar el rango de hospederos de las diversas especies presentes en una región geográfica determinada debido a que *Circulifer tenellus* en algunas ocasiones se alimenta de plantas infectadas con varios curtovirus, se puede estudiar la interacción entre estos últimos y su insecto vector así como su capacidad para transmitirlos de malezas a cultivos de interés económico y viceversa, es factible el aislamiento e identificación de los curtovirus contenidos en el insecto vector, de tal forma que al combinar nuestro método con métodos ya existentes como la técnica de RFLP se podría establecer un sinergismo que facilite el aislamiento de los geminivirus pertenecientes al género de los curtovirus, desde el punto de vista fitosanitario se puede evaluar el material vegetal de importación para evitar la introducción de begomovirus de una región geográfica a otra, como sucedió con el virus *Beet curly top severe virus* (BCTSV) detectado inicialmente en Estados Unidos y posteriormente identificado en el medio Oriente infectando cultivos de remolacha (Bridson *et al.* 1998) o lo acontecido en Estados Unidos en donde las enfermedades provocadas por curtovirus en cultivos como chile y betabel se diseminaron debido en mayor parte a la falta de métodos de diagnóstico molecular eficientes y de una legislación fitosanitaria adecuada.

Con respecto al estado de Nuevo Mexico, E.U. los primeros registros sobre enfermedades posiblemente causadas por curtovirus se dieron en 1927 y desde ese momento se han presentado epidemias esporádicas que infectan principalmente al cultivo del chile. El estudio sobre los patrones de migración de *Circulifer tenellus* en california nos indica que las malezas juegan un rol determinante en el proceso de adquisición del virus por el insecto vector en las primeras etapas de su desarrollo. En el estado de Nuevo Mexico se ha identificado a *Chenopodium sp*, *Amaranthus sp*, *sisymbrium irio L.* y *Kochia scoparia* como los principales reservorios virales, sitios de reproducción y fuente de alimento para los vectores en las épocas invernales en el estado de Nuevo Mexico de tal forma que en el verano los nuevos adultos ya virulíferos regresan a las regiones agrícolas en busca de alimento (Creamer *et al.* 2003).

Estudios recientes indican que los cultivos de chile se ven afectados principalmente por dos especies de curtovirus, *BMCTV-Worland* y *BSCTV-Cfh* produciendo grandes perdidas económicas como las registradas en el año de 1999 cuando se registraron daños hasta en un 50% de los cultivos de chile dependiendo de la zona geográfica (Goldberg, 1999) o en el 2003 cuando la producción de chile disminuyo en un tercio con respecto a los años 2000 y 2002 en donde la incidencia de enfermedades relacionadas con curtovirus se vio disminuida (Creamer *et al.* 2003).

Como producto de muestreos realizados entre los años 2003 y 2005 en cultivos de chile del Sur de Nuevo Mexico se identifico una nueva especie de curtovirus que produce manchas cloróticas en las plantas infectadas. El nuevo aislado de Nuevo Mexico fue denominado como *Pepper yellow dwarf virus* y es producto de una recombinación entre *BSCTV-Cfh* y *BMCTV-Worland*, las dos especies mas preponderantes en la región (Creamer *et al.* 2008).

En relación a los begomovirus identificados durante este ensayo cabe resaltar el hecho de que todas las muestras vegetales analizadas fueron infectadas por un solo curtovirus dato que contrasta con lo observado para begomovirus. Un ejemplo

claro es el de *PepCTV* un nuevo curtovirus aislado de plantas de Chile con síntomas de virosis colectadas en Nuevo Mexico, E.U. El genoma completo (2931pb) de esta nueva especie viral mostro un 82.6% con respecto a *BSCTV-Cfh* su pariente mas cercano y por lo tanto cumple con el parámetro establecido por el ICTV el cual establece que para que un aislado pueda ser considerado como una nueva especie geminiviral su genoma completo debe de mostrar una similitud inferior al 88% con su pariente mas cercano. Los análisis de secuencia indicaron que *PepCTV* se origino a partir de un evento de recombinación entre *BSCTV-Cfh* y un virus no identificado previamente: Finalmente se analizo el origen de replicación del nuevo virus y como resultado observamos que contiene iterones idénticos a los presentes en *BSCTV-Cfh*.

Para completar la caracterización de esta nueva especie de curtovirus se obtuvieron clonas infectivas obtenidas mediante la técnica de PCR y clonadas en el vector pGEMTeasy para inocularlas mediante biobalística en plántulas sanas de Chile en sus variedades Anaheim y Pasilla, Betabel y Acelga. Las clonas infectivas de *PepCTV* fueron capaces de producir infección en todas las plantas analizadas con excepción de betabel para el cual no se detecto la presencia del virus inoculado. Las plantas de Chile variedad pasilla sufrieron de infección asintomática, mientras que las plantas de Chile variedad Anaheim y Acelga mostraron como síntomas disminución en la rigidez arquitectónica de la planta y la deformación foliar. La falta de síntomas en Chile pasilla y betabel aunado a la baja tasa de infección se puede deber en gran parte a la clona infectiva se obtuvo por PCR y puede existir algún cambio ligero en la secuencia viral o a que *PepCTV* no tiene aún la capacidad para sortear las defensas de ciertas plantas provocando la ausencia de infección viral y la consecuente presencia de sintomatología. Con los datos obtenidos hasta la fecha completamos la caracterización tanto filogenética como biológica de *PepCTV*.

Aunque se ha confirmado que las especies de curtovirus mas comunes presentes en las zonas agrícolas de Nuevo Mexico son *BMCTV-Worland* y *BSCTV-Cfh* el descubrimiento de nuevas especies como *PepYDV* y *PepCTV* ambas producidas a partir de recombinaciones entre ambos o con virus aun no descritos pone de manifiesto la alta capacidad de mutación y recombinación que tienen los

geminivirus y por ende se corre el riesgo de sufrir nuevas epidemias devastadoras como las sufridas en los estados Unidos durante el ultimo siglo pero en esta ocasión con nuevas especies cepas o variantes cada vez mas agresivas y con un amplio rango de hospederos siempre favorecido por la presencia constante de malezas en las regiones cercanas a las zonas agrícolas.

Con el objetivo de seguir probando la eficiencia del método propuesto durante esta trabajo y tomando en cuenta que nuestro país comparte un amplio territorio con una clima muy similar al presente en los estados de Texas y Nuevo Mexico supusimos que seria factible el encontrar a *Circulifer tenellus* en regiones agrícolas del Altiplano Potosino y Zacatecano y fue así como iniciamos con el muestreo de zonas con presencia del insecto vector. Primeramente en el municipio de Villa de Arista, S.L.P. se aislaron tres nuevos curtovirus, el primero de chile serrano con una longitud de 2955pb y que mostraba una baja similitud (88.1%) con respecto a BMCTV-Worland su pariente mas cercano. El aislado de chile serrano fue nombrado BMCTV-Mex y aunque se encuentra en el limite de ser considerado como una nueva especie viral según el ICTV nos basamos en el echo de que el análisis de sus secuencias itericas nos muestra una alta similitud entre los determinantes de especificidad replicativa presentes en el aislado de chile serrano y *BMCTV-W* aunado a que la diferencia a nivel filogenético no fue lo suficientemente amplia nos da la certeza de que, el curtovirus aislado de *Chile serrano* corresponde a una nueva cepa de la especie *BMCTV-Worland* denominada tentativamente: *Beet mild curly top virus-Mexico* (*BMCTV-Mexico*; No. Acceso EU193175). El análisis de la segunda y tercer muestras de chile dieron como resultado un genoma viral de 2964pb para el aislado de chile pasilla y de 2955pb para el aislado de chile poblano. El aislado de chile pasilla mostro un 93.8% de similitud con *BMCTV-Mexico* mientras que el aislado de chile poblano fue un 95.5% similar a *BMCTV-Mexico*.

Con base en los criterios establecidos por el comité internacional para la taxonomía de virus (ICTV por sus siglas en ingles), que indican que un geminivirus se considera una nueva variante si su genoma completo presenta una similitud global entre el 93 y 99% con su pariente mas cercano (Fauquet y Stanley, 2008), se estableció que los curtovirus aislados de las plantas de Chile pasilla y poblano

corresponden a nuevas variantes de *BMCTV-Mexico*. El nombre provisional para el curtovirus aislado de chile pasilla es *Beet mild curly top virus-SLP* y *Beet mild curly top virus-SLP2* para el identificado en chile poblano. El análisis del origen de replicación presente en *BMCTV-SLP1* indica que las secuencias de sus iterones son un poco divergentes en el segundo iteron localizado río arriba de la caja TATA e idénticas a los iterones restantes presentes en *BMCTV-Mexico* y *BMCTV-SLP2* los cuales comparten entre sí iterones idénticos. Este primer reporte de *BMCTV* en nuestro país nos indicó que la presencia de curtovirus podría ser más común de lo que se esperaba y lo anterior se corroboró con el reporte de *BCTV* infectando cultivos de chile en el estado de Zacatecas, desafortunadamente aunque existe un reporte, a la fecha no se conoce la secuencia del probable curtovirus identificado.

Se obtuvieron clonas infectivas de cada uno de los tres curtovirus aislados en San Luis Potosí mediante el uso de la técnica TempliPhi y su posterior clonación en el vector PBS SK⁺ previamente digeridos en los sitios *Xba* I para *BMCTV-Mexico* y *Pst* I en el caso de *BMCTV-SLP1* y *SLP2*. Las clonas infectivas inoculadas en plántulas de chile variedad Anaheim, acelga y betabel fueron las correspondientes a *BMCTV-Mexico* y *BMCTV-SLP1*. Los síntomas observados para ambas clonas fueron muy similares y en el caso de chile consistieron en, un retraso en el crecimiento, epinastia, enaciones foliares, debilitamiento de los tallos, acucharamiento leve de las hojas y hojas nuevas deformes. Para el caso de acelga y betabel los síntomas observados fueron, retraso en el crecimiento, deformación foliar severa, acucharamiento de las hojas severo, debilidad de tallos, hojas más pequeñas y enaciones (excepto en betabel infectado con *BMCTV-SLP1*). Las infecciones se confirmaron mediante PCR y la presencia de síntomas claros junto con la alta tasa de infección nos indica que las clonas obtenidas son altamente eficientes para producir infecciones en hospederos pertenecientes a familia diferentes.

Con los datos anteriores se completó la caracterización biológica de *BMCTV-Mexico* y *BMCTV-SLP1*, ambos curtovirus aislados por primera vez en nuestro país.

La cercanía entre las regiones del Altiplano Potosino y Zacatecas nos dio la pauta para iniciar muestreos en cultivos de frijol con síntomas como enanismo y enchinamiento severo de las hojas posiblemente provocados por curtovirus y al mismo tiempo colectar al insecto vector, *Circulifer tenellus*. De los insectos colectados se logro amplificar y analizar fragmento de ADN de aproximadamente 1760pb los cuales incluye la totalidad de la región intergénica, los genes V2, V3 y porciones de los genes C1 y V1. Los fragmentos de ADN viral aislados de *Circulifer tenellus* contienen secuencias itericas idénticas a las presentes en *BMCTV-Mexico* y *BMCTV-SLP2*. Es de vital importancia confirmar que el método diseñado durante este trabajo es altamente eficiente para amplificar y aislar el genoma de curtovirus presentes en el insecto vector consolidándose como una poderosa herramienta que facilita el estudio de la diversidad genómica de los curtovirus presentes en un determinado agro ecosistema y así establecer una idea general sobre la capacidad virulífera y eficiencia en la transmisión de curtovirus por parte de su insecto vector.

Con respecto a las plantas analizadas no identificamos la presencia de curtovirus en muestras de chile variedad puya caso contrario a lo observado en muestras de frijol variedad rosita de las cuales logramos aislar un genoma viral de 2961pb que al ser comparado con la base de datos del GenBank mostro un 97.9% de similitud con *BMCTV-SLP1* su pariente mas cercano y con el que comparte todos sus determinantes de especificidad replicativa. Con base en lo anterior y tomando en cuenta lo establecido por el ICTV, que indica que un geminivirus se considera una nueva variante si su genoma completo presenta una similitud global entre el 93 y 99% con su pariente mas cercano (Fauquet, 2008), se estableció que el curtovirus aislado de muestras de frijol en el Altiplano Zacatecano es una nueva variante de *BMCTV-SLP1* denominado provisionalmente como *BMCTV-Zacatecas*. El aislamiento de frijol amplia la distribución geográfica de la especie viral *BMCTV* e incrementa su rango de hospederos pues aunque existen reportes sobre síntomas posiblemente causados por curtovirus a la fecha no se había confirmado su presencia en muestras de campo por métodos moleculares.

Los geminivirusvirus aprovechan su genoma bipartita y mediante los mecanismos de recombinación y pseudorecombinación evolucionan emergiendo

como begomovirus con una alta capacidad de infección (Hou y Gilbertson., 1996) que inclusive les facilita ampliar su rango de hospederos naturales.

Actualmente, el riesgo de sufrir epidemias devastadoras en nuestro país como las reportadas en betabel, tomate y chile en toda la región Oeste de los Estados Unidos (Strausbaugh *et al.* 2008) o los inmensos daños a las industria azucarera en Irán (Briddon, 1998) producidas en la mayoría de los casos por curtovirus endémicos o introducidos por el hombre, dando lugar al surgimiento de variantes altamente virulentas.

El método de diagnóstico e identificación de curtovirus desarrollado durante este ensayo, posee varias características que superan las limitaciones presentadas por los métodos actuales; y son las siguientes:

Cuenta con varios juegos de oligonucleótidos universales degenerados con los que se puede amplificar el genoma de todos los geminivirus pertenecientes al género curtovirus. Las secuencias amplificadas nos proporcionan información suficiente sobre la identidad del begomovirus en cuestión, principalmente la región RepQWEFor / CurCP-450Rev. Esta región nos ayuda a identificar la diversidad de especies dentro de una región geográfica determinada, identificar los hospederos naturales, diagnosticar infecciones mixtas causadas por begomovirus y evaluar la capacidad del insecto vector para transmitirlos. Los productos de PCR amplificados con los iniciadores diseñados durante este trabajo se traslapan en regiones pertenecientes a los genes Rep y CP facilitando la caracterización del genoma de los curtovirus presentes en infecciones mixtas.

Nuestro método incluye 6 iniciadores universales capaces de amplificar el genoma completo de curtovirus sin importar su origen geográfico. La interacción de nuestro método con el método diseñado por Monreal-Vargas y Mauricio-Castillo (En proceso) resulta en un sinergismo que facilita el diagnóstico y la caracterización genómica tanto de los begomovirus como de los curtovirus localizados en el continente Americano. Con base en lo anterior concluimos que la metodología desarrollada durante este trabajo constituye un poderosa herramienta, sencilla,

segura, rápida y económica para el diagnóstico y la caracterización del genoma de
coronavirus sin importar su origen geográfico

5. LITERATURA CITADA

- Accotto, G. P., Mullineaux, P. M., Brown, S. C., and Marie, D. (1993). Digitaria streak geminivirus replicative forms are abundant in Sphase nuclei of infected cells. *Virology* 195: 257-259.
- Argüello-Astorga, G. R., Guevara-González, R. G., Herrera-Estrella, L. R. y Rivera-Bustamante, R. F. (1994). Geminivirus replication have a group-specific organization of iterative elements: A model for replication. *Virology* 203: 90-100.
- Argüello-Astorga, G., Herrera-Estrella, L., Rivera-Bustamante, R. (1994). Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Molecular Biology* 26: 553-556.
- Arguello-Astorga, G., Lopez-Ochoa, L., Kong, Ling-Jie, Orozco Beverly M., Settlege Sharon B., and Hanley-Bowdoin Linda (2004). A novel motif in Geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. *Journal of General Virology*. 78: 4817-4826.
- Ascencio-Ibáñez, J.T., Arguello-Astorga, G.R., Méndez-Lozano, J., Rivera-Bustamante, R.F. (2002). First report of *Rhynchosia golden mosaic virus (RhGMV)* infecting tobacco in Chiapas, Mexico. *Plant Disease* 86: 692.
- Ascencio-Ibáñez, J.T., Díaz-Plaza, R., Méndez-Lozano, J., Monsalve-Fonnegra, Z.I., Arguello-Astorga, G.R., Rivera-Bustamante, R.F. (1999). First report of Tomato yellow leaf curl geminivirus in Yucatan, Mexico. *Plant Disease* 83: 1178.
- Baliji, S., Black, M. C., French, R., Stenger, D. C., Sunter, G. (2004). Spinach curly top virus: a newly described Curtovirus species from southwest Texas with incongruent gene phylogenesis. *Phytopathology* 94: 772-79.
- Bedford, I.D., Briddon, R.W., Brown, J.K., Rosell, R.C., Markham, P.G. (1994). Geminivirus transmission and biological characterization of Bemisia tabaci biotypes from different world regions. *Annals of Applied Biology* 125: 311-325.
- Bennett, C. W. The curly top disease of sugarbeet and other plants. 1971. Monogr. No. 7. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

- Bird J., Perez J. E., Alconero R., Vakili, N. G., Melendez, P. L. (1972). A whitefly-transmitted golden yellow mosaic of *Phaseolus lunatus* in Puerto Rico. *J Agric Univ P. R.* 56: 64-74.
- Bird, J., and Maramorosch, K. (1978). Viruses and virus diseases associated with whiteflies. *Advances in Virus Research.* 22: 55-110.
- Blancard, D. 1996. Enfermedades del tomate. Trad. del francés por Antonio Peña Iglesias. Mundi-Prensa. México 212 p.
- Bolok-Yazdi H. R., Heydarnejad, massumi H. (2008). Genome characterization and genetic diversity of a Beet curly Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus Genes.* 36: 539-545.
- Boulton. M, I., Pallaghy, C. K., Chatani, M. , MacFarlane, S., Davies J. W. (1993). Replication of Maize Steak Virus mutants in maize protoplasts: evidence for a movement protein. *Virology* 192: 85-93.
- Briddon, R. W., Heydarmejad Jahangir, Khosrowfar Fakhrosadat, Massumi Hossain, Martin Darren P., Varsani Arvind. (2010). Turnip curly top virus, a highly divergent geminivirus infecting turnip in Iran. *Virus Res.*152: 169-175.
- 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.
- Briddon, R. W., Markham, P. G. (2001). Complementation of bipartite begomovirus movement functions by topocuviruses and curtoviruses. *Arch. Virol.* 146: 1811-1819.
- Briddon, Rob W., Bull Simon, E., Amin Imran, MansoorShaid Bedgord Ian D., Rishi Mayaran, Siwatch Surender S., Zafar Yusuf, Abdel-Salam Aly, M., Markham, Peter G. (2004). Diversity of DNA 1: a satellite-like molecule associated with monopartita begomovirus-DNA complexes. *Virology.* 324: 462 – 474.
- Briddon, R. W., Stenger, Drake C., Bedford Ian D., Stanley John, Izadpanah Keramatollah, Markham Peter G. (1998). Comparison of a Beet curly top virus isolate originating from the old world with those from the new world. *European Journal of plant pathology.* 104: 77-84.

- Briddon, R. W., Bull S. E., Amin, I., Idris A. M., Mansoor S., Bedford I. D., Dhawan, P., Rishi, N., Siwatch, S. S., Abdel-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.
- Briddon, R.W., Bedford, I.D., Tsai, J.H. and Markham, P.G. (1996). Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted Geminivirus, *Tomato Pseudo-Curly Top Virus*, suggests a recombinant origin. *Virology*. 219: 387-394.
- Briddon, R.W., Bull, S.E., Amin, I., Mansoor, S., Bedford, I.D., Rishi, N., Siwatch, S.S., Zafar, Y., Abdel-Salam, A.M., Markham, P.G. (2004). Diversity of DNA 1: a satellite molecule associated with monopartita begomovirus-DNA h complexes. *Virology*. 324: 462–474.
- Briddon, R.W., Pinner, M.S., Stanley, J., and Markham, P.G. (1990). Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*. 177: 85-94.
- Briddon, R.W., Pinner, M.S., Stanley, J., and Markham, P.G. (1990). Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*. 177: 85-94.
- Brown, J.K., Frohlich, D.R., and Rosell, R.C. (1995). The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annual Review of Entomology*. 40: 511-534.
- Brown, J.K., Idris, A.M., Torres-Jeréz, I., Banks, G.K., and Wyatt, S.D. (2001). The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Archives of Virology*. 146: 1581-1598.
- Brown, J.K., Ostrow, K.M., Idris, A.M., and Stenger, D.C. (2000). Chino del tomate virus: relationships to other begomoviruses and the identification of A component variants that affect symptom expression. *Phytopathology* 90: 546-552.
- Bruno Gronenborn. (2007). *Tomato yellow leaf curl virus* disease. Part II. 67-119.
- Cardenas-Conejo Y., G. Arguello-Astorga, A. Poghosyan, J. Hernandez-Gonzalez, V. Lebsky, J. Holguin-Peña, D. Medina-Hernandez, S. Vega-Peña.

- (2010). "First report of Tomato yellow leaf curl virus co-infecting pepper with Tomato chino La Paz virus in Baja California Sur, Mexico." *Plant Dis.* 94(10): 1266.
- Cecilia Hernández-Zepeda, Ali M. Idris, Germán Carnevali, Judith K. Brown, and Oscar A. Moreno-Valenzuela (2007). Molecular characterization and phylogenetic relationships of two new bipartite begomovirus infecting malvaceous plants in Yucatan, Mexico, *Virus Genes*, 35: 369-377.
 - Chellappan P., Masona M. V., Vanitharani R., Taylor N. J., Fauquet C. M. 2004. Broad spectrum resistance to ssDNA viruses associated with transgene-induced gene silencing in cassava. *Plant Mol. Biol.* 56:601-11
 - Costa AS (1937) Nota sobre o mosaico do algodoeiro. *Ver Agric Piracicaba Bras* 12: 453-470.
 - Costa, A S. Carvalho, A. M. Comparative studies between the Abulition and Euphorbia mosaic virus.(1960). *Phytopathol Z* 38: 129-152.
 - Costa, A. S. Whitefly-transmitted plant diseases. (1976). *Ann Rev Phytopathology* 14: 429-449.
 - Creamer, R., Carpenter, J., and Rascon, J. (2003). Incidence of the beet leafhopper, *Circulifer tenellus* (Homoptera: Cicadellidae) in New Mexico. *Southwestern Entomologist* 28: 177-182.
 - De La Torre-Almaraz,R. Monsalvo-Reyes, A., Romero-Rodriguez., Argüello-Astorga, G.R., Ambriz-Granados, S. (2006). A New Begomovirus Inducing Yellow Mottle in Okra Crops in Mexico is Related to Sida yellow vein virus. *Plant Dis.* 90: 378.
 - Deng, D., Otim-Nape, W. G., Sangare, A., Ogwal, S., Beachy, R. N., and Fauquet, C. M. (1997). Presence of a new virus closely related to east African cassava mosaic geminivirus, associated with cassava mosaic outbreak in Uganda. *African J. Root Tuber Crops* 2, 23-28.
 - Dennehy T. J., Degain B. A., Harpold V. S., Zaborac M., Morin S., Fabrik J. A., Nichols R. L., Brown J. K., Byrne F. J., Li X.(2010). Extraordinary resistance to insecticides reveals exotic Q biotype of *Bemisia tabaci* in the New World. *J, Econ. Entomol.* 103: 2174-86.
 - DIAZ, F.A.; LEAL, F. (1992). Status of horticulture in northern Tamaulipas, México. *Subtropical Plant Sci.* 45: 58-59.

- Diaz-Franco Arturo, Loera-Gallardo Jesús, Rosales-Robles Enrique, Alvarado-Carrillo Manuel, Ayvar-Serna Sergio. (2007). *Agric. Téc. Méx.* 33.
- Eisenberg S., Griffith J., Kornberg A. (1977) /X174 cistron A protein is a multifunctional enzyme in DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:3198–3202.
- Erdmann J. B., Shepherd D. N., Martin D. P., Varsani A., Rybicli E. P., Jeske H. Replicative intermediates of maize streak virus found during leaf development. (2010). *J. Gen. Virol.* 91: 1077-81.
- Fauquet, C. M., Briddon, R. W., Brown, J. K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M., Zhou, X. (2008). Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch. Virol.* 153: 783.
- Gabor, B., and Wiebe, W. (1997). *Tomato diseases: a practical guide for seedsmen, growers and agricultural advisors.* Saticoy, CA. Seminis Vegetable Seeds Inc. Collection VI, 62 p.
- Goldberg, N. P. (1999) Curly top devastates chile crop. *Plant Science News.* New Mexico State University, Cooperative Extension Service. Las Cruces, 8 p.
- Goodman, R. M. (1977) a. Single stranded-A genome in a whitefly-transmitted plant virus. *Virology* 83: 171-199.
- Gorbalenya, A. E., and E. V. Koonin. (1993). Helicase: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3: 419–429.
- Gronenborn, B. (2002). Genus nanovirus. In the *Springer Index of Viruses* (Tidona, C.A. and Darai, G., eds), pp. 1272-1279, Springer.
- Gutierrez C., Ramirez-Parra E., Mar Castellano M., Sanz-Burgos A. P., Luque A., Missich R. (2004). Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Vet. Microbiol.* 98: 111-19.
- Gutierrez, Crisanto. (2002). Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60: 219-230.
- Haible Daniela, Kober Sigrid, Jeske Holger. (2006). Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of Virological Methods.* 135: 9-16.

- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S., and Robertson, D. (1999). Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18: 71-106.
- Harrison B. D. (1977). Ecology and control of viruses with soil inhabiting vectors. *Ann. Rev. Phytopathology*. 15: 331-360.
- Harrison, B. D., Liu, Y. L., Khalid, S., Hameed, S. Otim-Nape, G. W., and Robinson, D. J. (1997). Detection and relationships of cotton leaf curl virus and allied whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Pakistan. *Ann. Appl. Biol.* 130: 61-75.
- Harrison, B. D., y Robinson, D. J. (1999). Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (Begomoviruses). *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 369-398.
- Harrison, B.D. (1985). Advances in geminivirus research. *Annual Review of Phytopathology* 23: 55-82.
- Hefferon K. L., Moon Y. S., Fan Y. (2006). Multi-tasking of nonstructural gene products is required for bean yellow dwarf geminivirus transcriptional regulation. *FEBS J.* 273: 4482-94.
- Hehnl, S., Wege, C., Jeske, H. (2004). Interaction of DNA with Movement Proteins of geminiviruses Revisited. *Journal of virology*, July 2004, p. 7698-7706.
- Hernandez-Zepeda C. and Brown J. K. (2010). First report of a new curtovirus species, *Spinach severe curly top virus*, in commercial spinach plants (*Spinacia oleracea*) from South central Arizona. *Plant Dis.* 94: 917.
- Hernández-Zepeda, C., Idris, A.M., Carnevali, G; Brown, J. K, Argüello-Astorga, G.R., Moreno-Valenzuela, O.A, Rivera-Bustamante, R. (2010). "Characterization of *Rhynchosia yellow mosaic Yucatan virus (RhYMYuV)* a new recombinant begomovirus associated with two fabaceous weeds in Yucatan, Mexico.". *Archives of virology.* 155: 1-7.
- Heydarnejad J., Hosseini Abhari E., Bolok Yazdi H. R., Hassumi H.(2007). Curly top of cultivated plants and weeds and reports of a unique Curtovirus from Iran. *Journal of Phytopathology.*155: 321-325.

- Holguín–Peña, R. J., Vázquez-Juárez, R., y Rivera-Bustamante, R. F. (2004). Pepper golden mosaic virus affecting tomato crops in the Baja California Peninsula, Mexico. *Plant Dis.* 88: 221.
- Holguín-Peña, R.J., R. Vázquez-Juárez, and R.F. Rivera-Bustamante, (2005). A New Begomovirus Causes Tomato Leaf Curl Disease in Baja California Sur, México. *Plant Disease* 89: 341.
- Hou, Y. M., and Gilbertson, R. L. (1996). Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *J. Virol.* 70: 5430-5436.
- Howarth, Alan J. And Vandemark, George J. (1989). Phylogeny of Geminiviruses. *J. Gen Virol* 70: 2717-2727.
- Hull, R. (2001) Mathew's Plant Virology. 3er. Ed. Academic Press, London.
- Hunter, W. B., Hiebert, E., Webb E.S., Tsai, J. H. Polston, J. E. (1998). Location of Geminiviruses in the Whitefly Bemisia tabaco (Homoptera: Aleyrodidae). *Plant Dis.* 82: 1147-1151.
- Ilyina TV, Koonin EV (1992) Conserved secuencia motifs in the initiator protein for rolling circle DNA replication encoded y diverse replicons from Eubacteria, Eucaryotes y Archaeobacteria. *Nucleic Acids Res* 20: 3279-3285.
- Jeske H. Geminiviruses. (2009). *Curr Top Microbiol Immunol.* 331: 185-226. Review.
- Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E., and Zitter, T.A., eds. (1991). Compendium of Tomato Diseases. The American Phytopathological Society. APS Press, St. Paul, MN. 100p.
- Khan SA (1997) Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:442–455 Determinants for DNA-binding specificity of virus replication proteins 104.
- Klute K. A., Nadler S. A., Stenger D. C. (1996). Horseradish curly top virus is a distinct subgroup II geminivirus species with rep and C4 genes derived from a subgroup III ancestor. *J. Gen. Virol.* 77: 1369-78.
- Kong, L. J., B. M. Orozco, J. L. Roe, S. Nagar, S. Ou, H. S. Feiler, T. Durfee, A. B. Miller, W. Grisseem, D. Robertson, and L. Hanley-Bowdoin. (2000). A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein

through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *EMBO J.* 19: 3485–3495.

- Krake L. R., Rezaian M. A., Dry I. B., (1998). Expression of the tomato leaf curl geminivirus C4 gene produces viruslike symptoms in transgenic plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 413-17.
- Kunik T, Mizrachy L, Citovsky V, Gafni Y. (1999). Characterization of a tomato Karyopherina that interacts with Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) coat protein. *Journal of Experimental Botany* 50: 731-732.
- Kunik T, Mizrachy L, Citovsky V, Gafni Y. (1999). Characterization of a tomato Karyopherina that interacts with Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) coat protein. *Journal of Experimental Botany* 50: 731-732.
- Lam Nhan, Creamer Rebecca, Rascon Jaime, Belfon Robert. (2009). Characterization of a new curtovirus, Pepper yellow dwarf virus from chile pepper and distribution in weed hosts in New Mexico. *Arch. Virol.* 154: 429-436.
- Laufs, J., Jupin, I., David, C., Schumacher, S., Heyraud-Nitschke, F., and Gronenborn, B. (1995). Geminivirus replication: genetic and biochemical characterization of Rep protein function, a review. *Biochimie* 77: 765-773.
- Laufs, J., W. Traut, F. Heyraud, V. Matzeit, S. G. Rogers, J. Schell, and B. Gronenborn. (1995). In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 3879–3883.
- Lavia, P., and P. Jansen-Durr. (1999). E2F target genes and cell-cycle checkpoint control. *Bioessays.* 21: 221–230.
- Lazarowitz SG, pinder AJ, Damsteegt VD, Rogers SG. (1989). Maize streak virus genes essential for systemic spread and symptom development. *The EMBO Journal* 8: 1023-1032.
- Lazarowitz, S.G. (1992). Geminiviruses: genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11(4): 327-349.
- Lazarowitz, S.G. Geminiviruses: genome structure and gene function.(1992). *Critical Reviews in Plant Sciences* 11(4): 327-349.

- Liu H., Boulton M. I., Oparka K. J., Davies J. W. (2001). Interaction of the movement and coat proteins of Maize streak virus: implication for the transport of viral DNA. *J. Gen. Virol.* 82: 35-44.
- Liu H., Boulton M. I., Thomas C. L. Prior D. A., Oparka K. J., Davies J. W. (1999). *Maize streak virus* coat protein is karyophilic and facilitates nuclear transport of viral DNA. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 894-900.
- Londoño A., Riego-Ruiz L., Argüello-Astorga G. R. (2010). DNA-binding specificity determinants of replication proteins encoded by eucaryotic ssDNA viruses are adjacent to widely separated RCR conserved motifs. *Arch. Virol.* 155: 1033-46.
- Londoño Aurora, Riego-Ruiz Lina, Argüello-Astorga Gerardo R.(2010). DNA-binding specificity determinants of replication proteins encoded by eukaryotic ssDNA viruses are adjacent to widely separated RCR conserved motifs. *Arch. Virol.* 155: 1033-1046.
- Mansoor S., Briddon R. W., Zafar Y., Stanley J. (2003). Geminivirus disease complexes: an emergin threat. *Trends Plant Sci.* 8: 128-34.
- Mansoor S., Khan S. H., Bashir A., Saeed M., Zafar Y., *et al.* (1999). Identification of a novel circular single stranded DNA associated with cotton leaf curl disease in Pakistan. *Virology.* 259: 190-99.
- Mauricio-Castillo, J. A. (2006). “Métodos moleculares que potencian el descubrimiento de nuevas especies de begomovirus y la detección de infecciones mixtas.” Tesis de Maestría en Ciencias, IPICYT.
- Méndez-Lozano, J., Torres-Pacheco, I., Fauquet, C.M., and Rivera-Bustamante, R.F. (2003). Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper huasteco virus* and *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* 93: 270-277.
- Monreal-Vargas, C. (2005) Desarrollo de métodos de diagnóstico molecular de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas en hortalizas. Tesis de Maestría en Ciencias, IPICYT.
- Morin, S., Ghanim, M., Sobol, I and Czosnek, H. (2000). The GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomoviruses in the yeast two-hybrid system. *Virology* 276: 404-416.

- Mumtaz H., Kumari S. G., Mansoor S., Martin D. P., Briddon R. W. (2011). Analysis of the sequence of a dicot-infecting mastrevirus (family Geminiviridae) originating from Syria. *Virus*. Epub ahead of print.
- Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Jarvis, A.W., Ghabrial, S.A., Summers, M.D., Martelli, G.P., and Bishop, D.H.L.(1995). 6th Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*. Suppl. 10, Springer-Verlag, Wein, New York.
- Nakhla, M.K., Sorensen, A., Mejía, L., Ramírez, P., Karkashian, J.P., Maxwell, D.P. (2005). Molecular Characterization of Tomato-Infecting Begomoviruses in Central America and Development of DNA-Based Detection Methods. *ISH Acta Horticulturae 695: I International Symposium on Tomato Diseases*. M.T. Momol, P. Ji, J.B. Jones (Eds). Orlando, FL, USA.
- Nash Tara E., Dallas Mary B., Reyes Maria Ines, Buhrman Gregory K., Ascencio-Ibañez J. Trinidad, Hanley-Bowdoin Linda. (2011). Funtional analysis of a novel conserved across geminivirus rep proteins. *Journal of virol.* 85: 1182-1192.
- Navot, N., Pichersky, E., Zeidan, M., Zamir, D. and Czosnek, H. (1991). *Tomato yellow leaf curl virus: a whitefly transmitted geminivirus with a single genomic component*. *Virology* 185: 151-161.
- Nawaz-ul-Rehman Muhammad Shah, Mansoor Shahid, Briddon Rob W., Fauquet Claude M. (2009). Maintenance of an old world betasatellite by a new world helper begomovirus and possible rapid adaptation of the betasatellite. 83: 9347-9355.
- Nawaz-ul-Rehman Muhammad Shah, Mansoor Shaid, Briddon Ron W., Fauquet Claude M. (2009). Maintenance of an old world betasatellite by a New world helper begomovirus ans possible rapid adaptation of the betasatellite. *J. Virol.* 83: 9347-9355.
- Ndunguru, J., Legg, J.P., Aveling, T.A.S., Thompson, C., Fauquet, C.M. (2005). Molecular biodiversity of cassava begomoviruses in Tanzania: evolution of cassava geminiviruses in Africa and evidence for East Africa being a center of diversity of cassava geminiviruses. *Virology journal* 2: 21 doi:10.1186/1743-422X-2-21.

- Noris, E., Hidalgo, E., Accotto, G. P., and Moriones, E. (1994). High similarity among the tomato yellow leaf curl virus isolates from the West Mediterranean Basin: The nucleotide sequence of an infectious clone from Spain. *Arch. Virol.* 135: 165-170.
- Orozco, B. M., and L. Hanley-Bowdoin.(1996). A DNA structure is required for geminivirus origin function. *J. Virol.* 270: 148–158.
- Orozco, B. M., and L. Hanley-Bowdoin. (1998). Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. *J. Biol. Chem.* 273: 24448–24456.
- Padidam, M., Beachy, R.N., and Fauquet, C.M. (1995). Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology* 76: 249-263.
- Padidam, M., Beachy, R.N., and Fauquet, C.M. (1995). Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology* 76: 249-263.
- Padidam, M., Beachy, R.N., and Fauquet, C.M. (1995). Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology* 76: 249-263.
- Palmer K. E., Rybicky E. P. (1998). The molecular biology of mastrevirus. *Adv. Virus Res.* 50: 183-234.
- Pant, V., D. Gupta, N. R. Choudhury, V. G. Malathi, A. Varma, and S. K. Mukherjee. (2001). Molecular characterization of the Rep protein of the blackgram isolate of Indian mungbean yellow mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 82: 2559–2567.
- Paprotka T., Metzler V., Jeske H. (2010). The complete nucleotide sequence of a new begomovirus from Brazil infecting Abutilon. *Archives of Virol.* 155: 813-816.
- Pascal, E., A. A. Sanderfoot, B. M. Ward, r. Medville, R. urgeon and S.G. Lazarowitz. (1994). The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. *Plant Cell.* 6: 995:1006.
- Piroux N, Saunders K, Page A, Stanley J. (2007). Geminivirus pathogenicity protein C4 interacts with Arabidopsis thaliana shaggy-related protein kinase

AtSKeta, a component of the brassinosteroid signalling pathway. *Virology*. 362: 428–440.

- Pooma W., Petty I. T., (1996). Tomato golden mosaic virus open reading frame AL4 is genetically distinct from its C4 analogue in monopartite Geminiviruses. *J. Gen. Virol.* 77: 1947-51.
- Rajeswaran Rajendran, sunitha Sukumaran, Shivaprasad V. Padubidri, Pooggin M. Mikhail, Hohn Thomas, Veluthambi Karuppanan. (2007). The Mungbean yellow mosaic begomovirus transcriptional activator protein transactivates the viral promoter-driven transgene and causes toxicity in transgenic tobacco plants. *MPMI*. 20: 1545-1554.
- Rigden J. E., Dry I. B., Mullineaux P. M., Rezaian M. A. (1993). Mutagenesis of the virion-sense open reading frames of tomato leaf curl geminivirus. *Virology*. 193: 1001-5.
- Roberts, I.M., Robinson, D.J., and Harrison, B.D. (1984). Serological relationships and genome homologies among geminiviruses. *Annals of Applied Biology* 105: 483-493.
- Rojas M. R., Jiang H. Salati R., Xoconostle-Cazares B., Sudarshana M. R. (2001). Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, Tomato yellow leaf curl virus. *Virology*. 291: 110:25.
- Rojas Maria R., Hagen Charles, Lucas William J., and Gilbertson Robert L. (2005). Exploring chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of Geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 361-94.
- Rojas MR, Noueir AO, Lucas WJ, Gilertson R.L.(1998). Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell*. 95: 105:113.
- Ruiz-Medrano, R., Guevara-Gonzalez, G. R., Arguello-Astorga, G.R., Monsalve-Fonnegra, Z., Herrera-Estrella, L.R., Rivera-Bustamante, R.F. (1998). Identification of a Sequence Element Involved in AC2-Mediated Transactivation of the Pepper Huasteco Virus Coat Protein Gene. *Virology*. 253: 162-169.
- Saeed M, S.A.A. Behjatnia, S. Mansoor, Y. Zafar, S. Hasnain and M.A. Rezaian. (2005). A single complementary-sense transcript of a geminiviral

DNA β satellite is determinant of pathogenicity, *Mol. Plant-Microb. Interact.* 18: 7–14.

- Sambrook, J., y Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Habor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY.
- Saunders, K., A. Norman, S. Gucciardo, and J. Stanley. (2004). The DNA β satellite component associated with Ageratum yellow vein disease encodes an essential pathogenicity protein (β C1). *Virology* 324: 37–47.
- Saunders, K., Bedford Ian D., Yahara Tetsukazu, and Stanley John. (2003). Aetiology: The earliest recorded plant virus disease. *Nature*. 422: 831.
- Saunders, K., Lucy, A., and Stanley, J. (1991). DNA forms of the geminivirus African cassava mosaic virus consistent with a rolling circle mechanism of replication. *Nucleic Acids Research*. 19: 2325-2330.
- Saunders, K., N. Salim, V. R. Mali, V. G. Malathi, R. Briddon, P. G. Markham, and J. Stanley. (2002). Characterisation of Sri Lankan cassava mosaic virus and Indian cassava mosaic virus: evidence for acquisition of a DNA B component by a monopartite begomovirus. *Virology*. 293: 63–74.
- Selth L. A., Randles J., Reaian A. (2004). Host responses to transient expression of individual genes encoded by Tomato leaf curl virus. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 17: 27-33.
- Settlage Sharon B., See Renee G., Hanley-Bowdoin Linda. (2005). Geminivirus C3 protein: Replication Enhancement and protein interaction. *J. Virol.* 79: 9885-9895.
- Settlage, S. B., Miller A.B., Gruissem, W., Hanley-Bowdoin L. (2001). Dual interaction of a geminivirus replication accesoty factor with a viral replication protein and a plant cell cilce regulator. *Virology*. 279: 570–576.
- Settlage, S. B., Miller A.B., Hanley-Bowdoin L. (1996). Interactions between geminivirus replication proteins. *J. Virol.* 70: 6790–6795.
- Sidle, A., C. Palaty, P. Dirks, O. Wiggan, M. Kiess, R. M. Gill, A. K. Wong, and P. A. Hamel. (1996). Activity of the retinoblastoma family proteins, pRB, p107, and p130, during cellular proliferation and differentiation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 31: 237–271.

- Soto J. Maria, Gilbertson L. Robert. (2002). Distribution and rate of movement of the curtovirus Beet mild curly top virus (Family Geminiviridae) in the Beet leafhopper. *Phyto*. 93: 478-484.
- Stenger Drake C. (1998). Replication specificity elements of the Worland strain of Beet curly top virus are compatible with those of the CFH strain but not those of the Cal/Logan strain. *Phytopathology*. 88: 1174-8.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88: 8029 - 8033.
- Strausbaugh C. A., Wintermantel W. M., Gillen A. M., Eujayl I. A. (2008). Curly top survey in the western United States. *Phyto*. 98: 1212-1217
- Sunter Garry, Sunter L. Janet, Bisaro M. David. (2001). Plants expressing Tomato golden mosaic virus AL2 or Beet curly top virus transgenes show enhanced susceptibility to infection by DNA and RNA viruses. *Virology*. 285: 59 – 70.
- Sunter, G., and Bisaro, D.M. (1991). Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. *Virology* 180: 416 - 419.
- Sunter, G., and Bisaro, D.M. (1992). Transactivation of geminivirus AR1 And BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell* 4: 1321-1331.
- Surendranath Baliji, Sunter Janet, Sunter Garry. Transcriptional analysis of complementary sense genes in Spinach curly top virus and functional role of C2 in pathogenesis. *Phyto*. 20: 194-206
- 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.
- Teng K., Chen H., 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(6): 11280

- Teuber LR, Rupert ME, gis LK, Taggard KL (1996) Breeding resistant alfalfa holds promise for silverleaf whitefly management. *Calif Agric* 51: 25-29.
- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, A., Brown, J.K., Becerra-Flora, A., and Rivera-Bustamante, R.F. (1996). Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the southern United States. *Phytopathology*. 86: 1186-1192.
- Umaharan, P., Padidam, M., Phelps, R. H., Beachy, R. N., and Fauquet, C. M. (1998). Distribution and diversity of geminiviruses in Trinidad and Tobago. *Phytopathology*. 88: 1262-1268.
- Van Wezel, R., X. Dong, P. Blake, J. Stanley, and Y. Hong. (2002). Differential roles of geminivirus Rep and AC4 (C4) in the induction of necrosis in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Pathol*. 3: 461–471.
- Varsani, A., Shepherd, D., Dent, K., Monjane, A., Rybicki, E., Martin, D. (2009). A highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. *Virology*. 6: 36.
- Velásquez-Valle R., Medina-Aguilar M. M., Creamer R. (2008). First report of *beet mild curly top virus* infection of Chile pepper in North-Central Mexico. *Plant Dis*. 92: 650
- Voinnet, O., Pinto Y.M., Baulcombe, D.C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 14147-14152.
- Vonarmin A, Frischmuth T, Stanley J. (1993). Detection and possible functions of African cassava mosaic virus DNA B gene products. *Virology*. 192: 264:272.
- Wartig L., Khey-Pour A., Noris E., De Kouchkovsky F., Jouanneau F. (1997). Genetic analysis of the monopartite tomato yellow leaf curl geminivirus: roles of V1, V2, and C2 ORFs in viral pathogenesis. *Virology*. 228: 132-140
- Yazdi, H., Heydarnejad, J., Massumi, H. (2008). Genome characterization and genetic diversity of beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus Genes*. 36: 539–545.
- Yedidya, G., Bernard, L.P. (2002). The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 60: 231-241.