



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

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Métodos Moleculares que Potencian el Descubrimiento de
Nuevas Especies de Begomovirus y la Detección de
Infecciones Mixtas”**

Tesis que presenta

Jorge Armando Mauricio Castillo

Para obtener el grado de

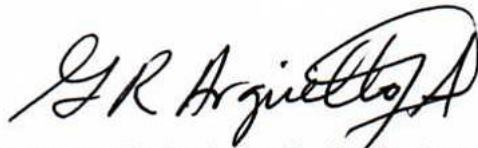
Maestro en Ciencias en Biología Molecular

DIRECTOR DE TESIS:

DR. GERARDO RAFAEL ARGUELLO ASTORGA

SAN LUÍS POTOSÍ, S.L.P., MAYO DE 2006

La presente tesis de maestría en ciencias en la especialidad de biología molecular fue elaborada por Jorge Armando Mauricio Castillo y aprobada el 15 de mayo de 2006 por los suscritos, designados por el colegio de profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga



Dr. Sergio Casas Flores

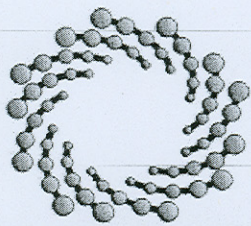


Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, bajo la dirección del Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga.

Durante la realización del trabajo se recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No.189634) y el apoyo del proyecto CONACYT 42639/A-1.



IPICYT

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

Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 023 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 15 días del mes de mayo del año 2006, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

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

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Jorge Armando Mauricio Castillo

sobre la Tesis intitulada:

Métodos Moleculares que Potencian el descubrimiento de Nuevas Especies de Begomovirus y 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 14:15 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé 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 15 días del mes mayo de 2006.

L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



DEDICATORIA

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

A mi ejemplo:

Mi Padre (Armando Mauricio A.)

A mi soporte:

Mi Madre (Carmen E. Castillo M.)

Mis cómplices:

Mis Hermanas (Berenice, Rubí y Yazmín).

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 y Ángel G. Alpuche Solís 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 maestría.**
- **A Javier y Rosy por siempre estar ahí cuando mas los necesito.**
- **A todos mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas.**
- **En especial a Arturo Hernández, Cristian Álvarez y Edgar González por enseñarme que la educación de un Científico debe de ser integral y que no todas las enseñanzas de la vida provienen de los libros.**

ÍNDICE GENERAL

Índice

Lista General de Cuadros

Lista General de Figuras

RESUMEN GENERAL

INTRODUCCIÓN.

1.1. Organización genómica de los begomovirus

1.2. Replicación de los geminivirus

1.3. Primeros reportes de geminivirus infectando cultivos de interés económico en América.

1.3.1 Begomovirus infectando algodón

1.3.2 Begomovirus infectando Frijol

1.3.3 Begomovirus infectando Tomate

1.4. Geminivirus en México

1.5. La mosquita blanca, el vector

1.6. Malezas como reservorios de geminivirus.

1.7. Métodos de diagnóstico

1.7.1. Métodos de diagnóstico basados en la técnica de la PCR

II. MATERIALES Y METODOS

2.1. Colecta en Campo y Manejo de Muestras

2.2. Diseño de Oligonucleótidos Universales

2.3. Evaluación de los Iniciadores Universales

2.4. Extracción de ADN

2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2.6. Caracterización de los fragmentos amplificados y clonas obtenidas por patrón de restricción (RFLP)

2.7. Clonación y secuenciación

III. RESULTADOS

3.1. Diseño y evaluación de los oligonucleótidos universales

3.2. Caracterización genómica de begomovirus pertenecientes al linaje del SLCV a partir de muestras de campo

3.3. Caracterización genómica de begomovirus típicos presentes en infecciones mixtas

3.4. Un caso excepcional de infección múltiple

IV. DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

LISTA DE TABLAS

No.	Título	Página
1	Clasificación taxonómica establecida por el ICTV para geminivirus basada en hospederos naturales, insecto vector y organización genómica.	14
2	Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de muestras vegetales.	33
3	Protocolos utilizados para transformar células competentes Top 10 de E. coli	35
4	Oligonucleótidos diseñados y utilizados como iniciadores universales para amplificar el ADN-A de Begomovirus pertenecientes al linaje Del SLCV.	37
5	Oligonucleótidos degenerados diseñados y utilizados como iniciadores universales para amplificar el ADN-B de geminivirus.	40

LISTA DE FIGURAS

No.	Título	Página
1	Organización genómica de un begomovirus bipartita típico como el PHV y un monopartita como el TYLCV.	18
2	Esquema de la región intergénica del componente A de un geminivirus bipartita típico.	20
3	Componente A mostrando las regiones complementarias a los iniciadores universales diseñados en el presente estudio.	38
4	Productos de PCR derivados de <i>PepGMV</i> con las diferentes combinaciones de oligonucleótidos.	39
5	Componente B mostrando las regiones complementarias a los iniciadores universales diseñados en el presente estudio.	41
6	Productos de amplificación por PCR derivados del componente B de PHV con las diferentes combinaciones de oligonucleótidos.	42
7	Plantas colectadas con síntomas característicos de virosis.	43
8	Regiones del genoma A viral amplificadas con cada combinación de iniciadores.	45
9	<i>Regiones del ADN B viral amplificadas para cada combinación de oligonucleótidos utilizada.</i>	46
10	Árbol filogenético que representa la relación entre el genoma A de RhMSinV (nueva especie de Begomovirus) y las 10 especies virales conocidas pertenecientes al linaje del SLCV.	49
11	La secuencia repetida (iterones) presente en el origen de replicación de Rhynchosia mosaic Sinaloa virus (RhMSinV) es única entre las especies conocidas de geminivirus.	50
12	<i>Plantas de Mala mujer, Soya y Sida recolectadas en este estudio.</i>	51
13	Árbol filogenético de los genomas A completos correspondientes a las variantes y nuevas cepas de la especie <i>RhGMV</i> , aisladas durante este trabajo.	53
14	Árbol filogenético que representa la relación entre el genoma A de <i>SiMSinV</i> (nueva especie geminiviral) y el genoma A de Begomovirus representativos de ambos hemisferios.	55

No.	Título	Página
15	La secuencias repetidas (iterones) presentes en el origen de replicación de <i>SiMSinV</i> son diferentes a las presentes en la mayoría de los geminivirus del viejo mundo y <i>del nuevo mundo</i> pero idénticas a las presentes en el origen de replicación de TYLCV-Sardinia y South Africam Cassava MosaicVirus.	56
16	Análisis RFLP de las clonas conteniendo la región SL-2200Rev / YMACFor obtenido con la enzima Eco R1	59
17	Análisis RFLP de las clonas conteniendo la región DGRSFor / YMACRev utilizando la enzima Msp 1.	60
18	Árbol filogenético que resume los resultados obtenidos durante este trabajo.	76

RESUMEN.

Los geminivirus son fitopatógenos que infectan a una amplia variedad de plantas silvestres y cultivadas, y provocan anualmente grandes pérdidas económicas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. La familia de los geminivirus se divide en cuatro géneros, el más diverso de los cuales es el de los *begomovirus* que, por otra parte, es el único que se encuentra representado en nuestro país y el resto de Latinoamérica. Estos virus son transmitidos por un insecto considerado una plaga mundial, la mosquita blanca (*Bemisia tabaci* Genn), y poseen un genoma que está constituido por una o, más comúnmente, dos moléculas diferentes de DNA circular de cadena sencilla.

Entre los begomovirus del continente americano se distinguen dos subgrupos, uno relativamente pequeño pero económicamente importante, denominado "linaje del SLCV", y el más extenso y diversificado linaje de los begomovirus "típicos". Los miembros del primer subgrupo se hayan distribuidos en Norteamérica y Mesoamérica, y se distinguen por las características atípicas del dominio 1-140 de la proteína iniciadora de la replicación (Rep) y por el número y arreglo de sus iterones. Las técnicas de diagnóstico molecular actualmente utilizadas no permiten distinguir entre virus de los dos linajes mencionados, por lo que es usual que los virus del subgrupo del SLCV no sean detectados cuando coexisten con otros begomovirus en infecciones mixtas.

El genoma B de los begomovirus codifica proteínas involucradas en el movimiento del virus a través de la planta. A pesar de su importancia para la infección, sólo se ha publicado a la fecha la secuencia de un par de iniciadores universales capaces de amplificar una secuencia parcial del genoma B, lo que ha resultado en la acumulación más lenta de datos de secuencia de esos componentes genómicos, en comparación con el acelerado crecimiento de las bases de datos para los genomas A de begomovirus.

La incidencia de enfermedades agrícolas causadas por begomovirus ha aumentado explosivamente en las últimas dos décadas, debido en gran medida al incremento en las poblaciones del insecto vector, a la introducción de nuevos biotipos de mosquita blanca a nuestro continente, y a la presencia de cultivos susceptibles durante todo el año. La proliferación de enfermedades asociadas a geminivirus demanda, naturalmente, el desarrollo de métodos de diagnóstico molecular más rápidos y

precisos, y de costo más bajo, que los utilizados de manera rutinaria en la actualidad.

En el presente trabajo hemos desarrollado dos nuevas metodologías moleculares: la primera facilita el aislamiento y caracterización genómica de virus pertenecientes al linaje del SLCV, para lo cual se diseñaron y probaron experimentalmente 4 nuevos iniciadores “universales”. Los productos de PCR generados a partir de estos oligonucleótidos cubren la totalidad del genoma A de los virus del linaje mencionado, y se sobrelapan parcialmente, lo que garantiza la apropiada reconstrucción de las secuencias genómicas a partir de los fragmentos virales amplificados. El desarrollo de la segunda metodología involucró el diseño de 6 iniciadores presumiblemente “universales”, que permiten amplificar en su totalidad el genoma B de begomovirus representativos de América, Asia y África, obteniéndose fragmentos de PCR parcialmente traslapados.

Utilizando los nuevos iniciadores en combinación con otros previamente diseñados en nuestro laboratorio, logramos amplificar y caracterizar, a partir de extractos de plantas cultivadas y malezas colectadas en campos agrícolas de San Luís Potosí y Sinaloa, los componentes genómicos A y B de 3 nuevas especies de begomovirus, y de un número importante de nuevas cepas y variantes de especies virales previamente descritas, algunas de las cuales fueron encontradas por primera vez en nuestro país. Adicionalmente, pudimos establecer, en el curso del análisis de numerosas muestras de campo, que las infecciones mixtas por begomovirus son mucho más frecuentes de lo que permitían anticipar los datos derivados de estudios previos, basados en métodos moleculares menos versátiles. Considerando la abundancia de hallazgos derivados del uso de las metodologías desarrolladas en este trabajo, podemos concluir que las mismas representan un avance importante en el área del diagnóstico molecular de begomovirus, y en las técnicas para la caracterización genómica de los mismos.

INTRODUCCIÓN.

Los virus fitopatógenos con genomas compuestos de ácido desoxirribonucleico (ADN) se dividen en dos grupos: los que contienen ADN circular de doble cadena, como los caulimovirus y badnavirus, y que replican su genoma utilizando un mecanismo que involucra intermediarios de ARN y transcripción reversa (“para-retrovirus”), y los que contienen ADN circular de cadena sencilla, y que se replican por un mecanismo de círculo rodante, como los nanovirus (Gronenborn y col., 2002) y los geminivirus (Saunders y col., 1991).

Los geminivirus son un grupo diversificado y ampliamente distribuido de fitopatógenos que producen grandes pérdidas económicas alrededor del mundo. Reciben su nombre debido a la morfología de las partículas virales vistas al microscopio electrónico, ya que estas se asemejan a dos poliedros idénticos fusionados (Gemini = Gemelos) (Bird y Maramorosch., 1978). Su genoma esta constituido por una o dos moléculas de ADN circular de cadena sencilla con un tamaño de 2.5 a 3.0 Kb (Lazarowitz, 1992). Son transmitidos por insectos del orden Homóptera (mosquitas blancas y chicharritas) a una gran variedad de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, produciendo síntomas como mosaicos, moteados, rayados, deformaciones foliares, enanismo, amarillamientos y clorosis en las plantas infectadas, provocando grandes pérdidas económicas, y contribuyendo a incrementar las condiciones de pobreza, principalmente en los países subdesarrollados de América, África y Asia.

En 1884 Warburg dio a conocer el primer reporte de enfermedad causada por un geminivirus al Este de continente Africano, el mosaico de la yuca (Harrison, 1985), enfermedad causada por *African Cassava Mosaic Virus (ACMV)*. Posteriormente a principios del siglo XX se dieron a conocer nuevos reportes sobre enfermedades posiblemente provocadas por geminivirus: el enchinamiento de la remolacha y el estriado del maíz. Posteriormente, Costa (1937) se dió a la tarea de investigar la causa de algunos mosaicos observados en plantas de algodón. La presencia de mosaicos, amarillamiento, enchinamiento y enanismo en malváceas se expandió a otras familias como las Euphorbiaceae (Costa y Caravallo., 1960). Tomando como base a las diferencias observadas en los síntomas, se estableció

que los agentes causales de estas enfermedades eran diferentes a pesar de que eran transmitidos por el mismo vector (Bird y col., 1972). Pero no fue si no hasta 1977 cuando Goodman inició formalmente los estudios sobre geminivirus, al reportar la caracterización de un virus que infectaba frijol y que estaba compuesto por DNA de cadena sencilla y no por RNA como la mayoría de los virus reportados hasta la fecha (Goodman, 1977). Mientras tanto en ese mismo año (1977) Harrison y col. propusieron el nombre de Geminivirus, aceptado en 1978 por el ICTV. Sin embargo no fue si no hasta la década de los 80's cuando se estableció con claridad la morfología de la partícula viral y la naturaleza genómica de los geminivirus.

La clasificación taxonómica de los geminivirus inició basándose en los síntomas observados en las plantas enfermas (Costa, 1976). Actualmente el ICTV reconoce cuatro géneros (tabla 1) pertenecientes a la familia Geminiviridae (Fauquet y col., 2003) tomando como criterios principales la organización genómica (monopartita o bipartita), tipo de planta hospedera (monocotiledóneas y/o dicotiledóneas) y el insecto vector (chicharritas o mosquitas blancas). También utiliza un virus tipo para diferenciarlos y para establecer la nomenclatura de los mismos.

Mastrevirus, transmitidos por chicharritas, tienen un genoma monopartita, infectan plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. El virus tipo es *Maize streak virus (MSV)*.

Curtovirus, *Beet curly top virus (BCTV)* es el virus tipo para este género. Son transmitidos por chicharritas ("leafhoppers"), tienen un genoma monopartita, e infectan plantas dicotiledóneas.

Topocuvirus, cuyo único miembro es *Tomato pseudo curly top virus (TPCTV)*, transmitido por chicharritas saltadoras ("treehoppers"), infecta plantas dicotiledóneas, y tiene un genoma monopartita.

Begomovirus, que constituyen el género más diversificado y de más amplia distribución a nivel global. Su virus tipo es *Bean golden yellow mosaic virus (BGYMV)*. Son transmitidos por la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) a plantas dicotiledóneas, y su genoma puede ser monopartita o bipartita.

Grupo	Miembro tipo	Tipo de hospedante	Vector/Familia	Genoma (DNACs)
<i>Mastrevirus</i>	<i>MSV</i>	Monocotiledóneas	Chicharritas / (<i>Cicadellidae</i>)	Monopartita
<i>Curtovirus</i>	<i>BCTV</i>	Dicotiledóneas	Chicharritas / (<i>Cicadellidae</i>)	Monopartita
<i>Begomovirus</i>	<i>BGYMV</i>	Dicotiledóneas	Mosquita blanca / (<i>Aleyrodidae</i>)	Bipartita, Monopartita
<i>Topocuvirus</i>	TPCTV	Dicotiledóneas	Chicharritas saltadoras / (<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*.

ORGANIZACIÓN GENOMICA DE LOS BEGOMOVIRUS.

Los términos monopartita o bipartita indica que el genoma de los begomovirus pertenecientes a este grupo está compuesto por una o dos moléculas de DNA respectivamente (Figura 1). En el caso de los bipartitas estas moléculas se conocen como genoma A (o “componente A”) y genoma B (“componente B”) cada uno con un tamaño de 2.6 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) o hacia la derecha, y en sentido de la cadena complementaria (C) o hacia la izquierda. Ambos componentes son totalmente diferentes en su secuencia excepto en una región de aproximadamente 200 pares de bases (pb) de longitud denominada “región común”, localizada en el dominio que contiene todos los elementos en *cis* necesarios para la replicación viral, conocida como región intergénica (Lazarowitz, 1992).

La secuencia de la región común es idéntica en los componentes A y B siempre y cuando pertenezcan al mismo begomovirus bipartita común, pero es diferente a la de cualquier otro virus. La región común contiene una secuencia parcialmente palindromica (GGCCA T/A CCGN T/A A/T TAATATTACCGG A/T TGGC) presente en todos los geminivirus con la capacidad de formar una estructura tallo-asa necesaria para el inicio de la replicación viral (Lazarowitz, 1992; Arguello-Astorga y *col.*, 1994).

El componente A contiene 5 genes que codifican para las proteínas encargadas de la replicación viral y la encapsidación (revisado por Gutiérrez, 2002). En sentido del virión el gen CP 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 se presume que tiene que ver con la llegada del virión al núcleo (Kunik y *col.*, 1999), está involucrada en el movimiento del DNA viral en el caso de geminivirus monopartitas (Lazarowitz y *col.*, 1989; Boulton y *col.*, 1993) y presenta homología con la proteína BV1 de bipartitas. Utilizando el análisis de distancia evolutiva para secuencias, Howarth y Vandemark, en 1989 propusieron que la evolución del gen CP esta regida por la especificidad al insecto vector. Después se comprobó que si se intercambian los genes de CP entre virus diferentes, se altera la especificidad para la transmisión por el insecto vector (Bridson y *col.*, 1990).

Por otra parte, en la cadena complementaria se localizan cuatro genes:

1. AC1 (o AL1), cuyo producto es la proteína iniciadora de la replicación, Rep. Es la única proteína viral indispensable para iniciar la replicación del virus por el mecanismo de círculo rodante. Está relacionada con proteínas que catalizan el inicio de la replicación en plásmidos que tienen DNA de cadena sencilla (Ilyina y Koonin., 1992), tiene actividad de topoisomerasa, ligasa (Laufs y *col.*, 1995; Orozco y *col.*, 1996), helicasa (Gorbalenya y Koonin., 1993; Pant y *col.*, 2001) y reprograma células maduras para inducir la replicación del DNA interactuando con la proteína de retinoblastoma (Arguello-Astorga y *col.*, 1994). Rep también se une a la proteína

potenciadora de la replicación (AL3) y se oligomeriza en solución (Settlage y *col.*, 1996; Orozco y Hanley-Bowdoin., 1998). La comparación de secuencias entre diferentes proteínas Rep muestra 3 motivos conservados (Ilyina y Koonin., 1992). El motivo 1 parece estar involucrado en la unión a DNA, el motivo 2 está relacionado con la unión a iones metálicos (Koonin e Ilyina., 1992), mientras que el motivo 3 contiene una tirosina conservada implicada en el corte de DNA.

2. La proteína TrAP es el producto del gen AL2. Es un factor que actúa en *trans*, y es capaz de activar la transcripción de los genes virales CP, BC1 y BV1 (Sunter y Bisaro., 1991; Sunter y Bisaro., 1992). Tiene además la habilidad de suprimir el mecanismo de silenciamiento en las plantas (Voinnet y *col.*, 1999) lo cual implica que la planta se torna susceptible a otros fitopatógenos. Entre los blancos funcionales de la proteína TrAP se han delimitado algunos elementos en *cis* conocidos como Elementos tardíos Conservados (CLEs por sus siglas en inglés) que han mostrado ser necesarios y suficientes para llevar a cabo la transactivación (Ruiz-Medrano y *col.*, 1999). La proteína presenta un dominio básico, otro dominio tipo “dedos de zinc” y un tercer dominio ácido (Sunter y Bisaro., 1992).
3. El producto de gen AL3 es la proteína potenciadora de la replicación (REn). Se desconoce como esta proteína podría afectar la replicación pero se ha observado que en mutantes REn (-) la tasa de replicación disminuye 50 veces. La proteína REn de TGMV interactúa con Rep (Settlage y *col.*, 1996) y con la proteína homóloga a retinoblastoma (PRb) de la planta (Settlage y *col.*, 2001). También se ha observado que Rep y la proteína retinoblastoma de la planta se unen a REn en regiones similares (Settlage y *col.*, 2001). Recientemente se ha propuesto que actúa como un multímero potenciando la acción de Rep (Hanley-Bowdoin y *col.*, 1999) aunque aun no se entiende bien la relevancia funcional de estas interacciones. En el caso de gen C4, este codifica la proteína AC4 y no se conoce dato alguno sobre su función.

El componente B, contiene dos genes cuyos productos están implicados en el movimiento del virus a través de la planta, en sentido del virión se localiza al gen NSP y en sentido de la cadena complementaria al gen MP (Yedidya y Bernard, 2002). La proteína NSP es codificada por el gen BV1 (proteína de transporte nuclear). Tiene afinidad específica por DNA viral de cadena doble y sencilla (Rojas y *col.*, 1998) empaquetándolo y transportándolo del núcleo al citoplasma y del citoplasma al núcleo (Hehnle y *col.*, 2004). La proteína se localiza principalmente en el núcleo de la célula vegetal (Pascal y *col.*, 1994). El gen BC1 codifica a la proteína de movimiento, MP (o BC1) la cual tiene una afinidad específica por el ADN de cadena doble y sencilla (Rojas y *col.*, 1998). El fraccionamiento de extractos obtenidos a partir de células infectadas muestra que BC1 se localiza en las fracciones de la membrana y pared celular (Von-Arnim y *col.*, 1993). Interacciona con el complejo “BV1-DNA viral de cadena sencilla” presente en el citoplasma y promueve el movimiento célula-célula aumentando el límite de exclusión de los plasmodesmos (Stefan Hehnle y *col.*, 2004). La alteración en el sistema de los plasmodesmos provoca un desequilibrio en la comunicación intercelular y podría explicar el por qué líneas transgénicas que expresan la proteína BC1 en concentraciones adecuadas presentan síntomas de virosis.

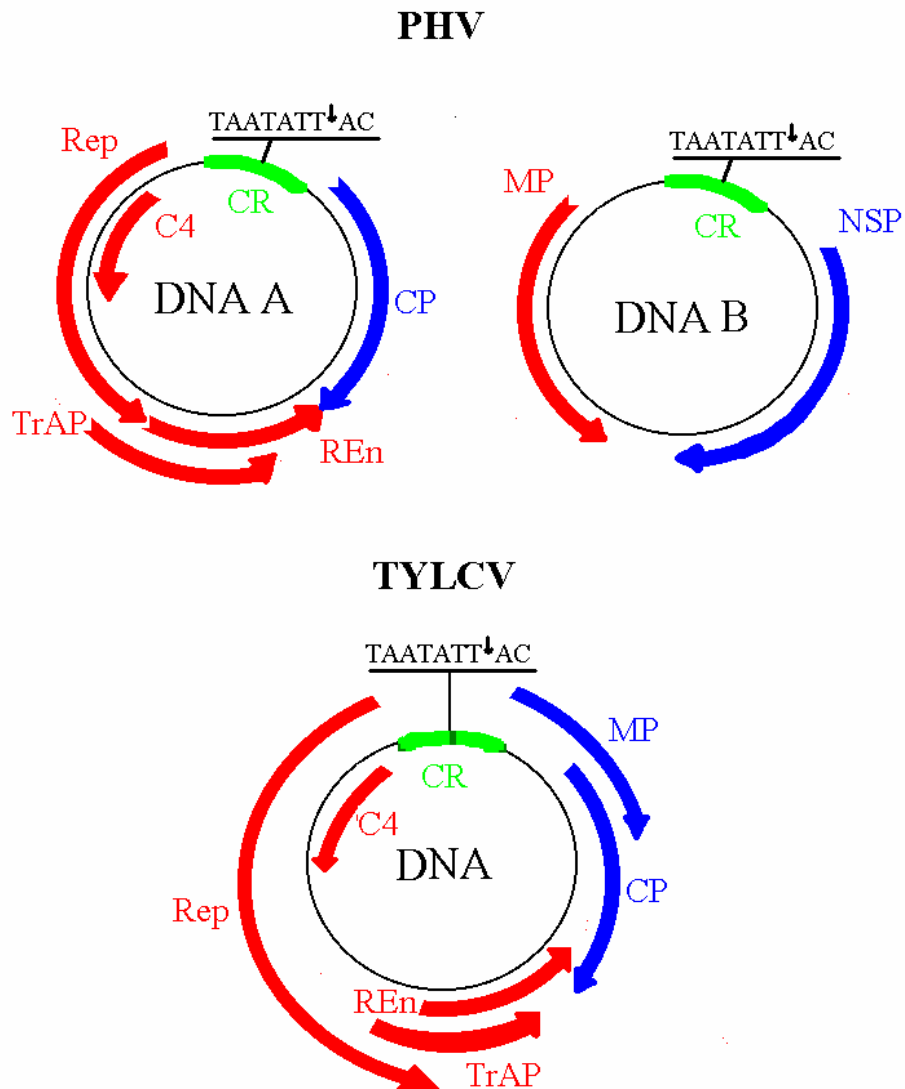


Figura 1. Organización genómica de: (a) un Begomovirus bipartita típico como el PHV (b) un monopartita como el TYLCV. Proteínas codificadas: Rep, proteína de replicación; TrAP, proteína activadora de la transcripción; Ren, proteína potenciadora de la replicación; proteína de la cápside; MP, proteína de movimiento y NSP, proteína de transporte nuclear; RC, región común. La secuencia TAATATTAC es el sitio de inicio de la replicación por círculo rodante.

REPLICACIÓN DE LOS GEMINIVIRUS.

Los geminivirus replican su genoma a partir de intermediarios de DNA de doble cadena en los núcleos celulares de las plantas que infectan (Stenger y *col.*, 1991; revisado por Gutierrez-Crisanto., 2002), por el mecanismo de círculo rodante y se realiza en células diferenciadas que carecen de los niveles necesarios de polimerasas y factores relacionados con la replicación producidos por el huésped; este inconveniente es superado por la expresión de la proteína viral Rep, considerada como la única proteína indispensable para iniciar la replicación viral.

La proteína Rep interactúa con la proteína homóloga a Retinoblastoma, a través de una región de aproximadamente 80 a.a. (Kong y *col.*, 2000) que contiene al dominio alfa-hélice 4, conservado entre las proteínas Rep de otros geminivirus. La proteína homóloga a Rb se encarga de regular el ciclo celular mediante su interacción con el factor transcripcional E2F (Sidle y *col.*, 1996) reprimiendo la transcripción de genes que codifican proteínas necesarias para entrar a la fase S del ciclo celular (Lavia y Jansen-Durr., 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.

En el caso del virus TGMV, la proteína Rep contiene un residuo de leucina en la posición 148 cuya sustitución por cualquier otro amino ácido (excepto la metionina) afecta de manera negativa la interacción entre Rep y la proteína Rb. En el caso de *Cabbage leaf curl virus (CaLCuV)* el residuo importante para la interacción con Rb se localiza en la posición 145, y corresponde a un residuo de Leucina de tal modo que se establece que la proteína Rep interactúa con Rb por medio de motivos conservados (Arguello-Astorga y *col.*, 2004).

El origen de replicación (Figura 2) está formado por la estructura tallo-asa que incluye una secuencia nanonucleotídica (TAATATTAC) altamente conservada en todos los geminivirus, además de secuencias repetidas de 6 a 8 nucleótidos, conocidas como iterones, y que son características de la especie viral, pudiendo diferir aún entre virus filogenéticamente cercanos (Arguello-Astorga y *col.*, 1994). Los iterones funcionan como determinantes de la replicación viral, y en la regulación transcripcional del gen Rep.

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 (AATATT/AC) presente en la horquilla de replicación. La tirosina 103 de la proteína Rep corta el enlace fosfodiéster entre las bases 8 y 9 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 (Laufs y *col.*, 1995).

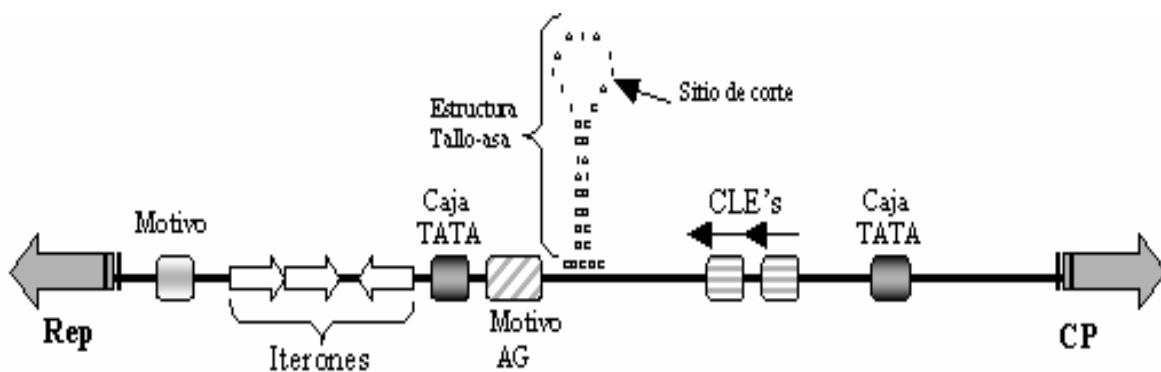


Figura 2.

Se observan los sitios de unión de las proteínas Rep (iterones) y los sitios de acción de diferentes reguladores de la transcripción (motivos, CLE) y la estructura tallo-asa y el sitio de corte para el inicio de la replicación.

PRIMEROS REPORTES DE GEMINIVIRUS QUE INFECTAN CULTIVOS DE INTERES ECONOMICO EN AMERICA.

Algodón (*Gossypium hirsutum*).- Los primeros reportes sobre la posible presencia de geminivirus en América se dieron a conocer en Brasil en 1937 cuando Costa publicó una investigación sobre el mosaico del algodón, poco tiempo después la mosquita blanca se considero como una plaga, la cual aparte de alimentarse de la savia de las plantas, estaba relacionada con la aparición de epidemias presumiblemente causadas por agentes virales. La creciente demanda de algodón a nivel mundial provocó la expansión de los cultivos de algodón en Guatemala, El Salvador y Nicaragua, lugares en donde no se hizo esperar la presencia de grandes poblaciones de mosquita blanca y por consiguiente la aparición de infecciones geminivirales provocando grandes pérdidas económicas. Como mecanismo de control a finales de los 60s se estableció el uso de insecticidas, lo cual ayudo a reestablecer la producción de algodón. Pero, el problema se agravo cuando la mosquita blanca adquirió resistencia contra los insecticidas originando epidemias causadas por geminivirus. De tal forma que para 1990 el área destinada al cultivo del algodón se había reducido al 10% con respecto a la cultivada en 1975.

Fríjol (*Phaseolus vulgaris*).- Nuevamente en el año de 1965, Costa describió una nueva enfermedad presente en el fríjol y relacionada con la presencia de mosquita blanca, el mosaico dorado. Para finales de los años 60s el mosaico dorado estaba distribuido en El salvador, Guatemala, Nicaragua, Costa Rica, Panamá y las principales regiones productoras de fríjol en Brasil. Por el año de 1966 se describió una nueva enfermedad conocida como "Bean golden yellow mosaic" causando pérdidas totales en los cultivos de fríjol en El Salvador, Guatemala y Nicaragua.

A principios de los años 50s se describió una clorosis infecciosa relacionada con la presencia de mosquita blanca que afectaba cultivos de tomate en Brasil (Flores y col., 1960). Posteriormente a principios de los años 60s nuevamente se describió una segunda enfermedad afectando tomate en Venezuela, conocida como el mosaico amarillo del tomate (Debrot y col., 1963); Posteriormente se caracterizo TGMV (Matys y col., 1975) en Brasil.

GEMINIVIRUS EN MÉXICO.

A principios de los años 70s se reporto la presencia de enchinamientos en las hojas de las plantas de tomate cultivadas en el estado de Sinaloa (González y Cervantes, 1973). La aparición de esta enfermedad se encontraba asociada con la presencia de grandes poblaciones de mosquita blanca (Brown y Nelson 1988) provocando epidemias desde principios de los años 70s hasta la fecha. En 1984 se aísló y caracterizó el agente causal de este enchinamiento denominado “*Virus del Chino del Tomate*”, *CdTV* (Brown y Nelson., 1988, Gallegos, 1978). Actualmente se ha reportado que *CdTV* infecta tanto tomate como chile en los estados de Chiapas, Morelos y Tamaulipas, con tendencia a diseminarse a través de todo el país debido a que su rango de hospederos es amplio (Torres-Pacheco y col., 1996).

Posteriormente a finales de los años 80s se detectaron tres geminivirus pertenecientes al linaje del *SLCV*, el primero fue *Squash leaf curl virus SLCV* observado en 1977 afectando cultivos de calabaza en Arizona, California y el valle de Mexicali en México (Flock y Mayhew., 1981), posteriormente se observó en el valle del Mayo en Sonora afectando el cultivo de la calabaza (Delgadillo y col., 1989), el segundo virus se detectó por primera vez en 1990 en Texas y fue conocido como *Texas pepper virus [(TPV)* (Stenger y col., 1990)] nombre que fue más tarde cambiado a *Pepper golden mosaic virus (PepGMV)*; se han reportado nuevas variantes de *PepGMV*, tal es el caso del Serrano golden mosaic virus (*SGMV*) presente en México (Brown y Poulos, 1990) y el tercer geminivirus perteneciente al linaje del *SLCV* fue *Bean calico Mosaic Virus (BCaMV)* aislado en el estado de Sonora (Brown y col., 1990).

Dentro de la región conocida como la meseta huasteca (Sur de Tamaulipas, Norte de Veracruz y el Este de San Luís Potosí) a finales de los años 80s se detectó un geminivirus transmitido por la mosquita blanca infectando cultivos de Chile serrano, tomate y frijol (Leal y Quintero., 1989) Este virus fue llamado *Pepper huasteco virus (PHV)* aunque actualmente se conoce como *Pepper huasteco yellow vein virus (PHYVV)* y se encuentra distribuido en los estados de Sinaloa, Tamaulipas, Guanajuato y Quintana Roo (Torres-Pacheco y col., 2001).

En los cultivos de tomate y chile de Sinaloa se ha detectado a partir de 1989 a *Tomato leaf curl Sinaloa virus* [*ToLCSinV* (Brown y col., 1993)]; Desde 1977 BGYMV infecta cultivos en Veracruz, Tamaulipas, Chiapas y Yucatán (López-Salinas y Becerra., 1994) en donde atacan cultivos de tomate, chile, calabaza, y melón, pero fue hasta 1994 cuando fue identificado mediante técnicas moleculares.

A finales de los 80s y principios de los 90s se reporto el primer y único caso hasta la fecha de un geminivirus originario del viejo mundo introducido en el continente americano. *TYLCV* es un begomovirus monopartita aislado en Israel (Navot y col., 1991) e introducido en la República Dominicana al importar transplantes de tomate infectadas de Israel. Recientemente se ha reportado la presencia de *TYLCV* en la península de Yucatán (Ascencio-Ibañez y col., 1999).

Durante los últimos años se ha reportado el aislamiento de *Tomato mottle virus* (*ToMoV*) a partir de muestras de chile recolectadas en el sureste de México (Díaz-Plaza y col., 2002), *Pepper golden mosaic virus* (*PepGMV*) en La Paz, Baja California Sur (Holguin-Peña y col., 2004) y por último el aislamiento y caracterización de 2 nuevas especies geminivirales, *Tomato chino La Paz virus* (*ToChLPV*) y *Tomato chino Baja California Sur virus* (*ToChBCSV*) causantes del enchinamiento foliar del tomate y del carrizal respectivamente (Holguin- Peña y col., 2004).

En algunas regiones del mundo, el monocultivo, el aislamiento geográfico y la ausencia de malezas portadoras ocasionan epidemias causadas por un solo geminivirus, del cual es un ejemplo *TYLCV* en Israel, mientras que en las zonas tropicales y subtropicales, se presentan infecciones mixtas (Garzon-Tiznado y col., 1993) que pueden dar lugar, por recombinación, al surgimiento de variantes virales altamente agresivas. Adicionalmente, pueden formarse los llamados pseudorecombinantes, en los que el genoma A de un virus puede replicar al genoma B de un virus diferente.

El hecho de encontrar a los geminivirus *PHYVV* y *PepGMV* coinfectando varios hospederos sugiere 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.

Por otro lado, a nivel de movimiento hay una complementación asimétrica, ya que mientras las proteínas codificadas por el componente B de *PHYVV* pueden mover sistemáticamente al componente A de *PepGMV*, la combinación inversa no funciona de manera similar. Igualmente se ha podido determinar que los niveles de formas replicativas de ambos virus aumentan en las plantas infectadas por ambos virus, en comparación con las plantas infectadas de manera individual (Méndez-Lozano y *col.*, 2003)

LA MOSQUITA BLANCA, EL VECTOR.

Los efectos negativos de la mosquita blanca son por el daño que ocasiona el insecto al succionar la savia del huésped, por la toxicidad de su saliva y por la formación de mielecilla que favorece la aparición de hongos (fumagina) que impiden una adecuada fotosíntesis. Sin embargo, su impacto más fuerte es por su capacidad de transmitir virus a sus hospedantes. La transmisión de los geminivirus por sus insectos vectores es del tipo circulativo, involucrando el paso del virus a través del cuerpo del insecto después de alimentarse con la savia de una planta infectada en un lapso de 15 a 30 minutos, y consiste de dos fases: primero es la adquisición del virus, en la cual pasa hasta la hemolinfa vía la pared del tracto digestivo, y segundo, la inoculación del virus en la planta, lo cual requiere el paso del virus desde la hemolinfa hasta la glándulas salivares (Hunter y *col.*, 1998).

Se ha determinado que la proteína de la cápside es la principal determinante en la adquisición del virus por el insecto. La proteína de la cápside puede alterar el patrón de transmisión para mosquita blanca o para chicharrita cuando es intercambiada (Briddon y *col.*, 1996). Se ha establecido la posibilidad de un origen entomopatógeno de los geminivirus debido a que se ha observado que TYLCV disminuye la capacidad reproductiva y las expectativas de vida de la mosquita

blanca (Rubinstein y Czosnek., 1997) aunque hacen falta más trabajos al respecto. Existen evidencias sobre la transmisión transovárica del begomovirus monopartita TYLCV hasta por dos generaciones (Ghanim y *col.*, 1998).

Las poblaciones de mosquitas blancas originarias de América se alimentan y reproducen en tomate y chile de manera muy limitada, disminuyendo la transmisión de begomovirus desde y hacia plantas de estas hortalizas. Sin embargo, a mediados de los años 80s se introdujo al continente un nuevo biotipo de mosquita blanca que, aunque no mostraba diferencias morfológicas con respecto a las mosquitas endémicas, a nivel biológico las diferencias fueron muy marcadas (Bedford y *col.*, 1994) y fue nombrada mosquita blanca biotipo B para distinguirla del biotipo A endémico.

El biotipo B de mosquita blanca tiene como características fisiológicas, una alta tasa de reproducción, un amplio rango de hospederos, gran voracidad y capacidad para desarrollar rápidamente resistencia a insecticidas órgano-fosforados. 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 y *col.*, 1995), y provocando en 1991 pérdidas económicas por 200 millones de dólares y por 500 millones de dólares en 1992 (Teuber y *col.*, 1996).

MALEZAS COMO RESERVORIOS DE GEMINIVIRUS

Cuando un cultivo determinado está presente durante todo el año las mismas plantas son potencialmente la fuente de geminivirus. Además, las malezas susceptibles a la infección viral pueden actuar como reservorio del virus, constituyendo un “puente” de infección entre las estaciones de cultivo. Entre las plantas arvenses que han sido reportadas como hospederas sintomáticas de geminivirus se encuentran principalmente plantas de las familias de las Solanáceas, Malváceas y Euforbiáceas.

Algunos virus muestran una alta especificidad por los huéspedes que infectan, como es el caso del virus del enrollamiento de la hoja de la calabaza (*Squash leaf curl virus*) con su hospedante natural (*Cucurbita pepo* L), encontrándose que cepas que difieren en 13 nucleótidos de la región intergénica y tres aminoácidos de la proteína del movimiento (BV1) colonizan un rango de hospederos diferente (Polston y col., 1989).

METODOS DE DIAGNOSTICO.

La diseminación de los geminivirus a través de los campos agrícolas del continente Americano se debe a diversos factores, entre ellos la introducción de un nuevo biotipo del insecto vector, la comercialización de explantes infectados, técnicas de cultivo inapropiadas, aumento en el rango de hospederos susceptibles a la infección por geminivirus, el uso inadecuado de insecticidas, etc. La presencia de nuevas especies o variantes virales puede deberse algunas veces a la interacción entre geminivirus diferentes que coinfectan a la misma planta; esta interacción favorece el surgimiento de recombinantes y pseudorecombinantes.

Con base en lo anterior, se hace evidente la necesidad de desarrollar nuevas y mejores técnicas de diagnóstico para geminivirus, que hagan factible el aislamiento y caracterización genómica de los mismos, aún y cuando se encuentren formando parte de una infección mixta.

Las primeras técnicas utilizadas para la identificación de plantas infectadas por geminivirus se basaron en observar la sintomatología, esta técnica presentaba como obstáculo principal que los síntomas se pueden confundir con los causados por otras especies virales o condiciones propias del ambiente. Posteriormente se aprovechó de la circunstancia de que los geminivirus forman cuerpos de inclusión nucleares, los cuales pueden ser teñidos con el colorante Azur A, y observados al microscopio de luz; la principal debilidad de este método es que requiere de la capacitación de técnicos, que deben primero adquirir experiencia suficiente para manipular adecuadamente las muestras.

Hasta hace poco las técnicas de identificación tradicional de geminivirus han estado limitadas básicamente a las técnicas de inmunodetección (ELISA). Sin embargo, la producción de antígenos virales específicos para los begomovirus ha enfrentado dos problemas técnicos: 1) las propiedades físicas y químicas de la partícula las hace difícil de purificar en una forma estable y, 2) los viriones parecen ser poco inmunogénicos (Roberts y *col.*, 1984). Existen métodos basados en técnicas de hibridación del DNA viral utilizando una sonda de DNA radioactiva que reconoce por complementariedad de bases al DNA problema unido a una membrana de Nylon; después de una serie de lavados se procede al final a realizar una autorradiografía de la membrana, y se establece si la sonda se unió al DNA problema y comprobando de ese modo si existe o no una infección causada por geminivirus.

A finales de los años 80s se desarrolló una técnica molecular conocida como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) capaz de amplificar genomas de ADN a partir de pequeñas muestras de tejido fresco, desecado o liofilizado, gracias a su alta sensibilidad. La PCR se basa en el diseño de oligonucleótidos que funcionan como iniciadores o "primers" para iniciar la replicación del DNA y en la estandarización de variantes como la temperatura, concentración de iones Mg²⁺, ADN polimerasa termo-resistente, y desoxirribonucleótidos, etc.

Para establecer criterios de caracterización viral es importante amplificar la región correspondiente a los genes CP, Rep y la región intergénica presentes en el componente A. La técnica de PCR es complementada por técnicas moleculares como la clonación y secuenciación, que han sido utilizadas exitosamente con fines de detección e identificación, así como para poder inferir sobre la relación entre quasi-especies virales (Padidam y *col.*, 1995). Estas técnicas junto con el análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmento de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) son muy útiles para la identificación preliminar de geminivirus y para el estudio de la diversidad poblacional. Las técnicas de clonación y secuenciación se han consolidado como herramientas necesarias para la detección, identificación y caracterización genómica de nuevas especies geminivirales (Czosnek y *col.*, 1990; Brown y *col.*, 2001).

Entre los métodos de diagnóstico basados en la técnica de la PCR figuran los siguientes:

1) El método de Wyatt y Brown (1996) que consiste en la amplificación de una región conservada de 576 pb del gen que codifica la proteína de la cápside; aunque el método es comparativamente sencillo, tiene varias limitaciones:

- La región amplificada está muy conservada entre los begomovirus y por consiguiente no proporciona suficiente información sobre la identidad del virus.
- El tamaño del producto de PCR es prácticamente el mismo para todos los begomovirus conocidos, sin importar su origen geográfico. Por lo tanto, no se obtiene información preliminar de la diversidad viral en muestras de una región dada.
- Todos los productos de PCR deben ser secuenciados para la identificación preliminar del virus.

2) Un segundo método fue establecido por Rojas y *col.* (1993), quienes diseñaron un juego de iniciadores universales degenerados, basándose en regiones altamente conservadas identificadas en el componente A. Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento que comprende parte del gen *Rep*, la IR y una porción del gen *CP*. Además, el uso del juego de iniciadores en antisentido permite la amplificación de dos grandes regiones genómicas, que juntas cubren la totalidad del genoma A de los begomovirus. Las ventajas de este método son:

- Tiene una aplicación general para la amplificación del componente A de los begomovirus originarios de ambos hemisferios, los cuales se pueden distinguir porque los begomovirus del Nuevo Mundo amplifican un fragmento de 1.1 kb, en tanto que para los del Viejo Mundo el tamaño es de 1.3 kb.
- Los productos de PCR obtenidos se pueden someter a un análisis de RFLP, lo cual permite la caracterización preliminar de los begomovirus y la demostración de infecciones mixtas en una planta sintomática. Sin embargo, los autores del método no definieron un conjunto de enzimas de restricción apropiadas para obtener patrones característicos para cada begomovirus.

Algunas limitaciones del método son las siguientes:

- El tamaño de la región amplificada no contribuye con información preliminar sobre la variabilidad entre los begomovirus originarios de un mismo hemisferio.
- La identidad viral solo se puede establecer por clonación y secuenciación de la región o regiones amplificadas.
- Las dos grande regiones genómicas amplificadas, no se traslapan, lo cual puede dar origen a errores cuando coexisten dos o más begomovirus en una planta, ya que puede reconstruirse un genoma A inexistente a partir de segmentos genómicos de begomovirus distintos.

3) El método más reciente establecido por Monreal y *col.*, en el 2005 (manuscrito en preparación) presenta las siguientes características:

- Útil para identificar y caracterizar begomovirus de todos los continentes.
- Involucra varios pares de iniciadores universales que amplifican segmentos traslapados del genoma A de begomovirus coinfectantes.
- Múltiples posibilidades para el anidamiento de PCRs (mayor sensibilidad).
- Reduce la necesidad de secuenciar todos los productos de PCR, al caracterizarlos por RFLPs.

Algunas limitaciones del método son las siguientes:

- No es un método eficiente para amplificar begomovirus del linaje del *SLCV*, que son comunes en México (v.gr: *Pepper golden mosaic virus*, *PepGMV*).
- No incluye iniciadores para amplificar el genoma B de los virus identificados.
- Aunque su utilidad para identificar begomovirus en infecciones mixtas es superior a la de otros métodos, se encuentra todavía debajo del óptimo teórico.

De lo expuesto en la sección precedente, se hace evidente la necesidad de desarrollar nuevos y mejores métodos moleculares de diagnóstico e identificación de begomovirus, los cuales deberán superar o complementar a los ya existentes.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Desarrollar una metodología molecular integral para la identificación y caracterización genómica de begomovirus, que al mismo tiempo sea altamente eficiente para detectar infecciones mixtas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Diseñar y probar iniciadores para amplificar el genoma A de begomovirus del linaje del SLCV.
- Desarrollar un método para amplificar el genoma B de begomovirus de diversos continentes.
- Optimizar la técnica establecida por Monreal y col., (2005) para amplificar begomovirus coinfectantes.
- Realizar un análisis preliminar de la diversidad de begomovirus en los estados de San Luís Potosí y Sinaloa.

II. MATERIALES Y METODOS.

2.1. COLECTA EN CAMPO Y MANEJO DE MUESTRAS.

Los muestreos se realizaron durante el año 2005 en cultivos de soya y tomate localizados en el estado de Sinaloa; y cultivos de pepino, tomate y tomatillo presentes en el estado de San Luis Potosí donde se han observado plantas con síntomas de virosis asociados con la presencia de mosquitas blancas. En el caso del estado de San Luis Potosí la ciudad de Río verde y sus alrededores fueron los puntos de recolección, mientras que en el caso del estado de Sinaloa, los cultivos presentes en el municipio de Guasave cumplieron con el mismo fin. Las muestras fueron colectadas, rotuladas y almacenadas en bolsas de plástico a una temperatura promedio de 4 °C, para finalmente ser almacenadas a -80° y así evitar su descomposición. 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).

2.2. DISEÑO DE INICIADORES UNIVERSALES

Los oligonucleótidos (“iniciadores”) universales utilizados en el presente trabajo incluyendo los oligonucleótidos YMACFor, YMACRev, DGRSFor y DGRSRev utilizados por Monreal y col., (manuscrito en preparación) 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 A de begomovirus pertenecientes al linaje del SLCV se diseñaron a partir de secuencias altamente conservadas en los genomas A de las 10 especies pertenecientes al linaje en cuestión, identificadas por medio del programa MegAlign (DNASTAR Software, London). Fueron seleccionadas secuencias nucleotídicas altamente conservadas de 17 a 25 pb.

Los iniciadores universales para amplificar el genoma B de Begomovirus pertenecientes a ambos hemisferios, se diseñaron a partir de secuencias altamente conservadas presentes en los genomas B de 20 begomovirus presentes en el continente americano y 15 presentes en el viejo mundo, e identificadas por medio del programa MegAlign (DNASTar, Inc.) identificando secuencias nucleotídicas altamente conservadas de 17 a 25 nucleotidos.

En ambos casos 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 (Tabla 4).

2.3. EVALUACIÓN DE LOS INICIADORES UNIVERSALES.

Los oligonucleótidos universales diseñados para amplificar el componente A de begomovirus pertenecientes al linaje del SLCV fueron evaluados utilizando el genoma A de PepGMV clonado en el Vector pBSK⁺.

Para evaluar la eficiencia de los iniciadores diseñados para amplificar el genoma B de geminivirus se utilizó el genoma B de PHV clonado en el vector pBSK⁺.

2.4. 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 muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de muestras vegetales.

1. Se pesan 50 mg de tejido vegetal
2. Hacer molienda en Nitrógeno líquido
3. Agragar 480 µl de buffer de extracción A y moler suavemente.
4. Adicionar 37.5 µl de SDS al 20% y mezclar invirtiendo los tubos
5. Calentar a 65°C por 5 minutos y enfriar a temperatura ambiente.
6. Agragar 94 µl de Acetato de sodio 5 Molar y mezclar invirtiendo los tubos
7. Colocar en hielo 5 minutos
8. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos
9. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo
10. Adicionar 600 µl de Fenol-Cloroformo y mezclar con vortex por 10 segundos
11. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos
12. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo
13. Agragar 600 µl de cloroformo-Alcohol isoamilico y centrifugar a 13rpm por 5 minutos
14. Agregar 600 µl de Isopropanol e incubar en hielo 5 minutos
15. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos y eliminar el sobrenadante
16. Lavar pastilla con 400 µl de Etanol al 70%
17. Centrifugar a 13000rpm por 3 minutos
18. Eliminar el sobrenadante y secar en servitoallas
19. Resuspender en 40 µl de TE

2.5. 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, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.2mM, oligonucleótidos 1µM, *Taq* polimerasa 2.5 UT, DNA 1µg. Con excepción del juego de oligonucleótidos YMACFor / YMACRev, las condiciones para la amplificación del ADN viral fueron: desnaturalización inicial a 94°C/2min, y 35 ciclos conformados por 94°C/1min,

55°C/1min, 72°C/1min, con una extensión final de 72°C/5 min. Los productos amplificados fueron analizados por movilidad electroforética en geles de agarosa al 1.0 %.

2.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS Y CLONAS OBTENIDAS POR PATRÓN DE RESTRICCIÓN (RFLP)

Los productos de PCR y sus clonas, obtenidos 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 Hha 1 (New England BioLabs™) establecidas previamente por Monreal y col., (manuscrito en proceso). Los productos digeridos se analizaron por movilidad electroforética en geles de agarosa al 1.0 %.

2.7. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN

Los productos de PCR obtenidos 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 (tabla4), facilitando la selección de transformantes en base al color de las colonias crecidas (blancas / azules) en medio LB conteniendo ampicilina, IPTG y X-gal. Los protocolos de transformación se describen en las tablas 3 (a) y 3 (b).

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 GenBank, utilizando el programa BLAST y el método Clustal (MegAlign, DNASTAR software, London).

Tabla 3 (a). Protocolo para la Transformación de células competentes (E. coli Top 10) por el método de choque térmico (CaCl₂).

Descongelar las células competentes Top 10 en hielo (33 µl por tubo).
Agregar 1 µl de de ligación (100 ng de ADN/µl).
Colocar los tubos en hielo de 20 a 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 18 a 24 horas a 37°C.

Tabla 3 (b). Protocolo para la Transformación de células competentes (E. coli Top 10) por el método de electroporación.

1. Descongelar en hielo las células competentes.
2. Enfriar las celdas de electroporación
3. Una vez que las células competentes estén descongeladas adicionar 2 µl de la ligación.
4. Pasar la mezcla a la celda de electroporación evitando la formación de
5. Electroporar a 25 µFaradays; 200 homs y 2.5 Kvolts.
6. Recuperar las células en un tubo eppendorf y agregar 450 µl de medio LB.
7. Poner en agitación de 30 a 40 minutos a 37°C
8. Plaquear 25 y 50 µl en placas de medio LB sólido adicionado con Antibiótico, Xgal e IPTG
9. Incubar de 18 a 24°C horas.

Tabla 3.- Protocolos utilizados para transformar células competentes Top 10 de E. coli mediante las técnicas de: (a) Choque térmico (CaCl₂) y (b) Electroporación.

III. RESULTADOS.

3.1. DISEÑO Y EVALUACIÓN DE LOS INICIADORES UNIVERSALES.

Se diseñaron 4 oligonucleótidos degenerados, flanqueados por diferentes sitios de restricción, para amplificar el genoma A de begomovirus pertenecientes al linaje del SLCV. Estos iniciadores hibridan con secuencias conservadas en el primer tercio del gen Rep, región que codifica los primeros 120 aa de la proteína de replicación, y que diferencia a los virus del linaje SLCV de otros geminivirus.

Los iniciadores fueron designados por conveniencia como prSL, añadiendo un número que los diferencia y que indica la posición dentro del genoma viral del segmento nucleotídico con el cual 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 4). El dominio “DGRS” se ubica en el gen Rep y el “YMAC” en el gen que codifica para la proteína de la cápside.

En la tabla 4 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 amplificar dos regiones, una que incluye la totalidad de la región intergénica y una parte de los genes Rep y CP, mientras que la segunda incluye las secuencias restantes de los dos genes mencionados, así como las secuencias totales de los genes TrAP y REn., de modo tal que el genoma A es amplificado en su totalidad.

Iniciadores orientados en el sentido del virión (Sitio de restricción).	Secuencia
prRep-WAR-for (Xho1)*	<u>AGAGCTCGAG</u> CCCACATYGTCTTYCCNGT
prYMAC-for (EcoR1)*	CGTGA <u>ATTCTT</u> ATTGTAYATGGCRTGTACDCATGC
prSL-2060-for	CGGCGTTRTRRTARACGTCGTC
prSL-2150-for (Eco R1)	TGGA <u>ATTCT</u> KGACGGCRTTGGYGTCTTTGGC
prRep-DGRS-for (Xba 1)*	<u>GAGTCTAGAT</u> GCTGACCTCCTCTAGCWGATCTGCC GTC
Iniciadores orientados en sentido complementario. (Sitio de restricción).	Secuencia
prSL-2200-rev (EcoR1)	<u>CAGAATTCGAC</u> MTYACTCACCC
prSL-2150-rev	GCWGCCAAAGACACCAAYGCCGT
prRep-DGRS-rev (Xba 1)*	<u>GAGTCTAGAC</u> GGCAGATCWGCTAGAGGAGG
prYMAC-rev (Xba 1)*	<u>GAGTCTAGAC</u> GGCAGATCWGCTAGAGGAGG
prRep-WAR-rev (Xba1)*	<u>GAGTCTAGAC</u> NGGRAAGACRATGTGGGC

Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados y utilizados como iniciadores universales para amplificar el ADN-A de Begomovirus pertenecientes al linaje del SLCV. Las regiones subrayadas corresponden al sitio de restricción presente en cada oligonucleótido.

*Oligonucleotidos diseñados y/o utilizados por Monreal y *col.*, (Manuscrito en proceso).

Los fragmentos de ADN amplificados utilizando los iniciadores prSL 2060-for y prSL2150-for en combinación con prYMACRev son importantes debido a que comprenden segmentos de 132 y 102 codones del gen Rep respectivamente, la región intergénica que es la región genómica más variable en secuencia nucleotídica (Padidam y *col.*, 1995), y fragmentos 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, los segmentos de ADN que se amplifican con los iniciadores prSL2200-rev y prSL2150-rev en combinación con prYMAC-for incluyen las regiones genómicas faltantes para completar los genes Rep y CP, así como las secuencias completas de los genes TrAP y REn.

Cabe destacar que, dependiendo de las combinaciones utilizadas, dos fragmentos amplificados abarcan la totalidad del genoma A y se translanan a lo largo de una longitud de 50 a 140 nucleótidos (figura 3).

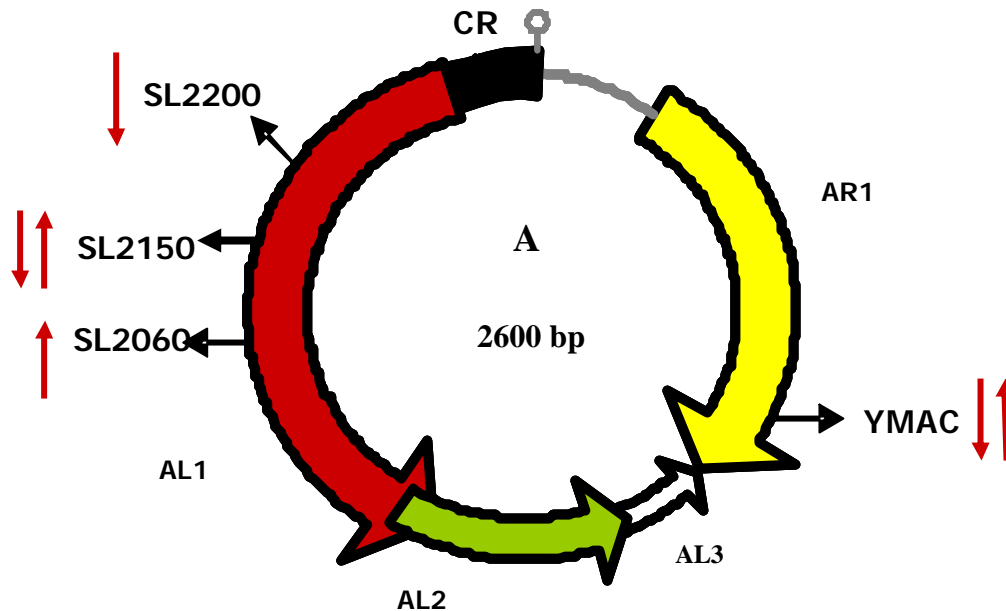


Figura 3. Componente A mostrando las regiones complementarias a los iniciadores universales diseñados en el presente estudio. Las flechas indican el sentido del iniciador con respecto a la dirección de replicación del virus, “For” (en sentido de las manecillas del reloj) y “Rev” (en sentido contrario a las manecillas del reloj).

La evaluación inicial de los iniciadores universales prSL diseñados se realizó amplificando el genoma A de *PepGMV* clonado en el vector pBSK⁺, 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. Todas las combinaciones evaluadas mostraron ser efectivas para amplificar secuencias del componente A de *PepGMV* (Figura 3). La combinación prSL2200-rev / prYMAC-for amplificó un fragmento de 1323 pb; la combinación prSL2150-rev / prYMAC-for amplificó una región de 1273 pb; ambos fragmentos incluyen la secuencia completa de los genes TrAP, REn y una parte del extremo 3' de los genes *Rep* y *CP*. Con la combinación prSL2150-for/ prYMAC-rev se amplificó un fragmento de 1327 pb, mientras que la combinación prSL2060-for / prYMAC-rev amplificó un fragmento de 1417 pb; en ambos casos los productos de PCR incluyen a la secuencia completa de la región intergenica y una parte importante de los genes *Rep* y *CP*.

Seleccionamos las combinaciones prSL2200-rev / prYMAC-for y prSL2060-For / prYMAC-rev porque los productos de PCR obtenidos a partir de estas combinaciones comprenden la totalidad del genoma A de begomovirus pertenecientes al linaje del SLCV, y se traslapan en una región de 140 pb, lo cual facilita el ensamble correcto de los genomas A completos en el caso de infecciones mixtas.

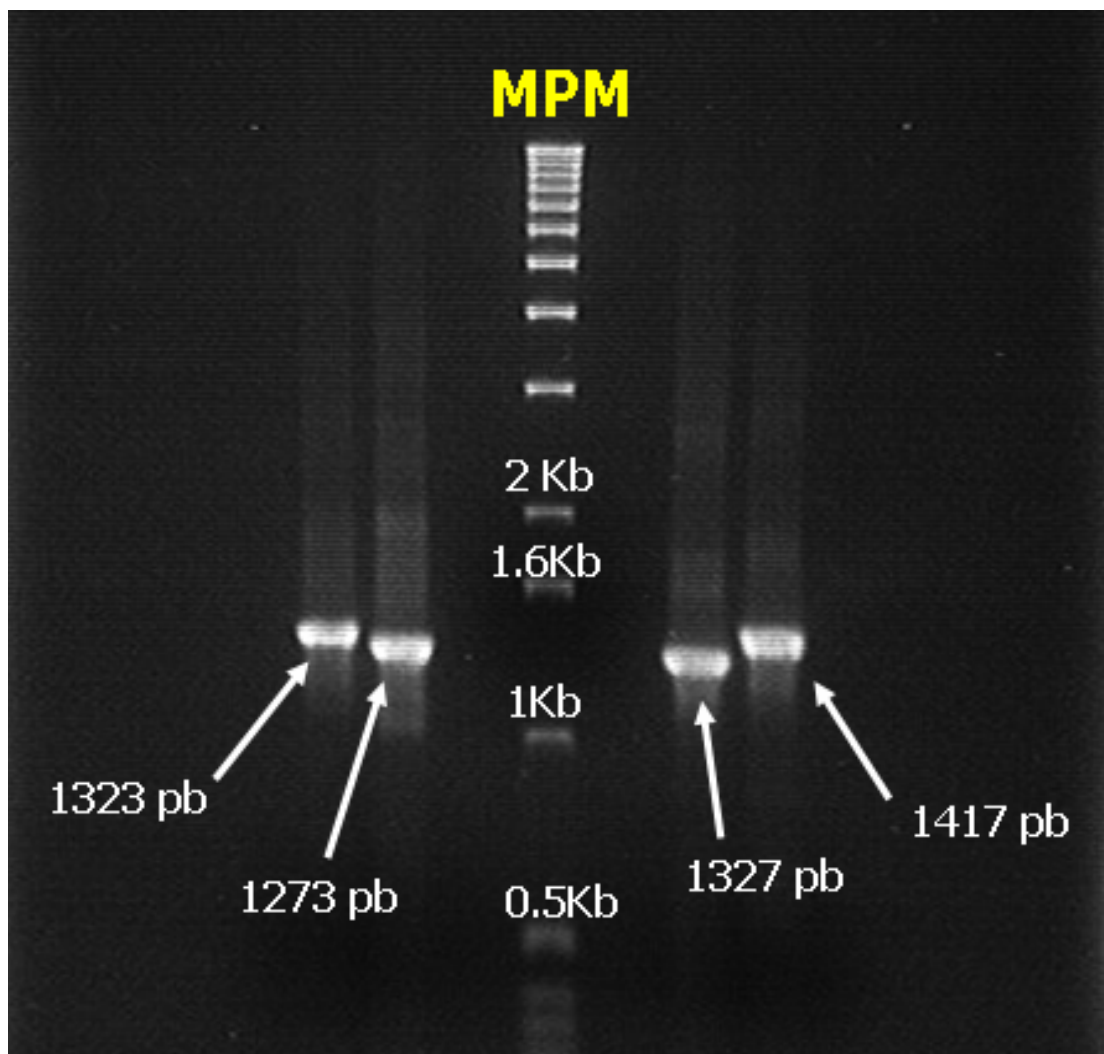


Figura 4. Productos de PCR derivados de *PepGMV* con las diferentes combinaciones de oligonucleótidos. 1) Control negativo SL-2200Rev / YMACFor, 2) SL-2200Rev / YMACFor, 3) SL2150Rev / YMACFor, 4) Control negativo SL2150Rev / YMACFor, 5) MPM (1Kb), 6) Control negativo SL-2150For / YMACRev, 7) SL-2150For / YMACRev, 8) SL-2060For / YMACRev, 9) Control negativo SL-2060For / YMACRev.

3.1.2-AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DEL GENOMA B.

Para amplificar el genoma B de geminivirus se diseñaron 4 oligonucleótidos degenerados flanqueados por distintos sitios de restricción (Tabla 5). 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.

Los iniciadores fueron designados como BC1 y BV1 dependiendo del gen a partir del cual se obtuvieron las secuencias conservadas utilizadas para su diseño y un número que indica la posición dentro del genoma viral con la cual hibridan, así como por el sentido del iniciador con respecto a la dirección de replicación del virus, "for" (en sentido del virión) y "rev" (en sentido de la cadena complementaria).

Iniciadores con orientación en sentido del virión (Sitio de restricción).	Secuencia
prBV1310-for (Xba1)	<u>GGTCTAGAG</u> GGWACNGTNAARATYGARCGTGT
prBC1290-for (Bgl II)	GAGAARTAGTGG <u>GAGATCT</u> ATGTTTRCAYCT
Iniciadores con orientación en sentido complementario (Sitio de restricción).	Secuencia
prBV1-310rev	CGTTCAATYTTNACNGTWCCYTTRAAACG
prBC1-80rev (Xba1)	<u>GGTCTAGAG</u> GAYGARTATCARYTDTTCNCATGA

Tabla 5. Oligonucleótidos degenerados diseñados y utilizados como iniciadores universales para amplificar el ADN-B de geminivirus. Las regiones subrayadas corresponden al sitio de restricción presente en cada oligonucleótido.

Con la combinación de iniciadores prBC1-80rev y prBC1-310for se obtienen productos de PCR que incluyen una porción del gen BC1 y otra del gen BV1. Mientras que con el par de oligonucleotidos BC1-290For y BR1-310Rev se amplificó un fragmento que incluye la parte restante de los genes BL1 y BR1, así como la región intergénica que incluye el origen de replicación (Figura 5).

Componente B

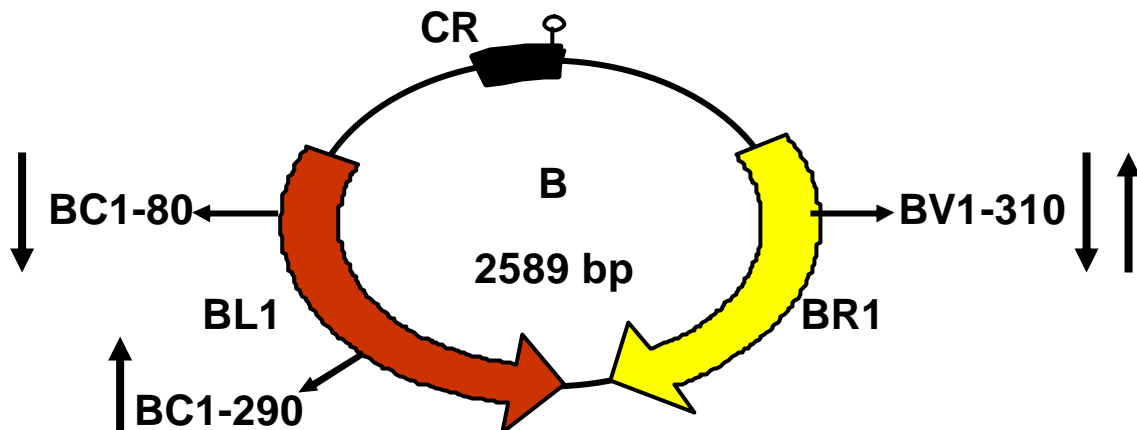


Figura 5. Componente B mostrando las regiones complementarias a los iniciadores universales diseñados en el presente estudio. Las flechas indican el sentido del iniciador con respecto a la dirección de replicación del virus, que se indica con los identificadores “For” (en sentido de las manecillas del reloj) y “Rev” (en sentido contrario a las manecillas del reloj).

La evaluación preliminar de los iniciadores universales diseñados para amplificar el genoma B de geminivirus se basó en su capacidad para amplificar el genoma B clonado de un geminivirus de amplia distribución en México, PHV, a partir del cual se estableció el tamaño aproximado de los productos de PCR obtenidos con cada combinación de oligonucleótidos.

El par de combinaciones utilizadas mostraron ser altamente efectivas al momento de amplificar el genoma B de PHV. 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 intergenica 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).

Un aspecto importante de este procedimiento es que los productos de PCR obtenidos con estos pares de iniciadores comprenden en su totalidad al genoma B de Begomovirus, y comparten una región traslapada de 210 pb lo cual resulta efectivo para identificar geminivirus coexistentes en infecciones mixtas o inclusive la presencia de pseudorecombinantes.

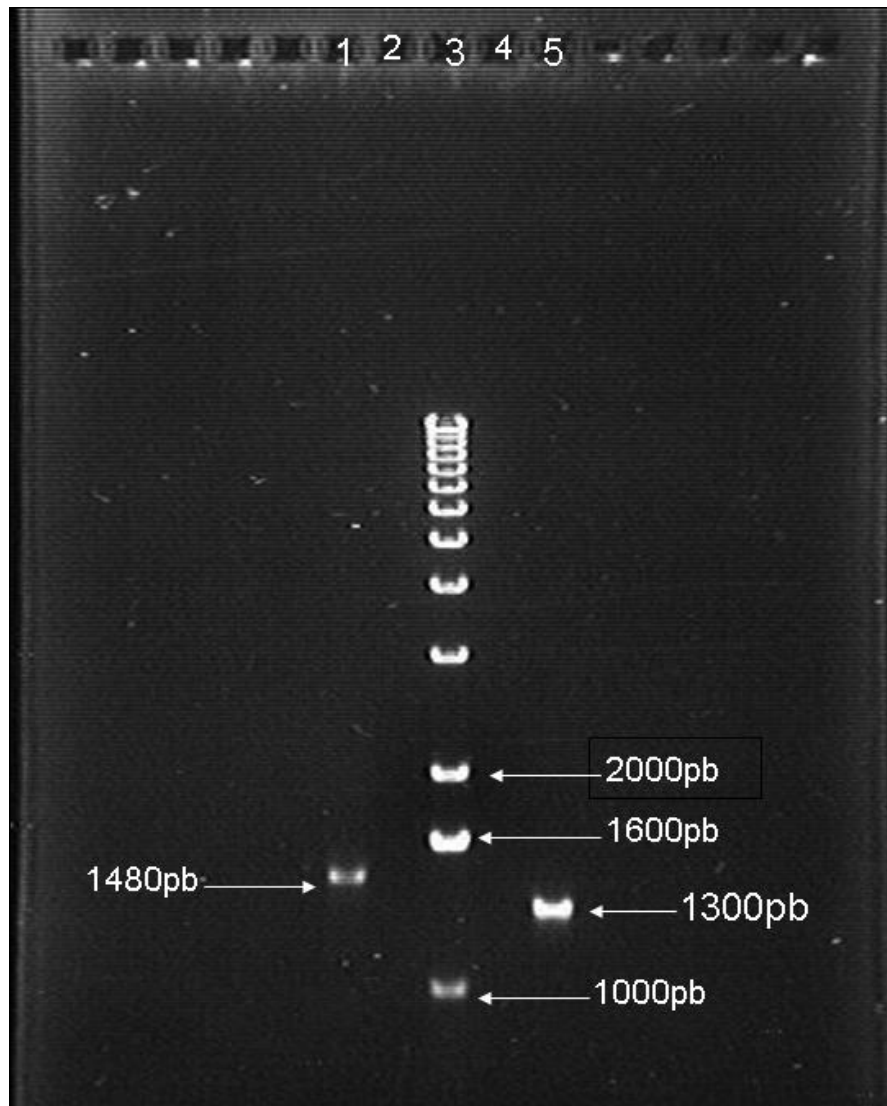


Figura 6. Productos de amplificación por PCR derivados del componente B de PHV con las diferentes combinaciones de oligonucleotidos. 1) Combinación BL1-290For / BR1-310Rev, 2) Control negativo BL1-290For / BR1-310Rev 3) MPM (1Kb), 4) Control negativo BC1-80Rev / BV1-310For, 5) Combinación BC1-80Rev / BV1-310For.

3.2. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE BEGOMOVIRUS PERTENECIENTES AL LINAJE DEL SLCV A PARTIR DE MUESTRAS DE CAMPO.

Para aislar y caracterizar Begomovirus pertenecientes al linaje del SLCV utilizamos principalmente los pares prSL2200-rev / prYMAC-for y prSL2060-for / prYMAC-rev (tabla 5). Las reacciones de PCR se realizaron utilizando extractos de ADN obtenidos a partir de plantas de “tomatillo” (*Physalis ixocarpa*), pepino (*Cucumis sativus L.*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) y, una maleza conocida como “frijolillo” (*Rhynchosia minima*) con síntomas característicos de infección por begomovirus (figura 7). Las mayoría de las muestras analizadas (excepto *Rhynchosia minima*) fueron colectadas en áreas de cultivo pertenecientes al Municipio de Río verde, S.L.P.

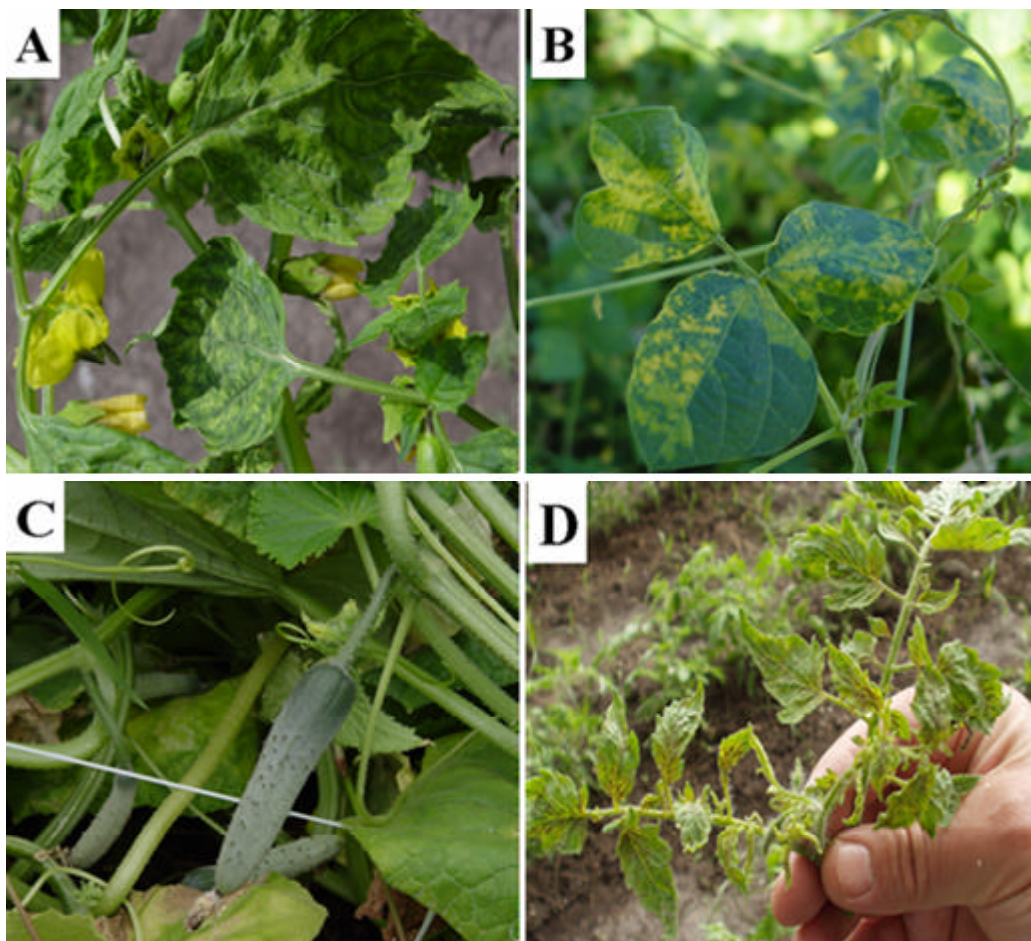


Figura 7. A) Planta de tomatillo con síntomas de virosis (Río verde, SLP). B) Planta de *Rhynchosia mínima* con mosaico (Sinaloa). C) Planta de pepino (sin síntomas). D) Enrollamiento foliar y clorosis en plantas de tomate (Río verde, SLP).

Se obtuvieron extractos de ADN total a partir de las plantas colectadas y, mediante la técnica de la PCR, se amplificaron los fragmentos correspondientes a las combinaciones SL-2200Rev / YMACFor (1323 pb) y SL-2060For / YMACRev [(1417 pb) Figura 8]. Los fragmentos de ADN amplificados comparten una región traslapada de aproximadamente 140 pb, que permite verificar que ambos productos han sido amplificados a partir de la misma secuencia viral, y facilita la reconstrucción de los genomas A aislados.

Como parte del protocolo hicimos mezclas para la PCR utilizando como iniciadores universales las combinaciones WARFor / YMACRev (1685 pb) y DGRSRev / YMACFor (1200 pb) utilizadas por Monreal y *Col.*, (manuscrito en proceso). Los fragmentos de PCR amplificados con este par de combinaciones abarcan en su totalidad el genoma A de Begomovirus típicos y comparten una región traslapada de aproximadamente 300 pb dependiendo del tamaño del virus amplificado. Después de obtener clonas que contenían los fragmentos de ADN de nuestro interés y liberar estos últimos mediante el uso de enzimas de restricción, se observaron patrones de restricción diferentes inclusive entre clonas que aparentemente eran iguales, sugiriendo por tanto la existencia de una infección mixta.

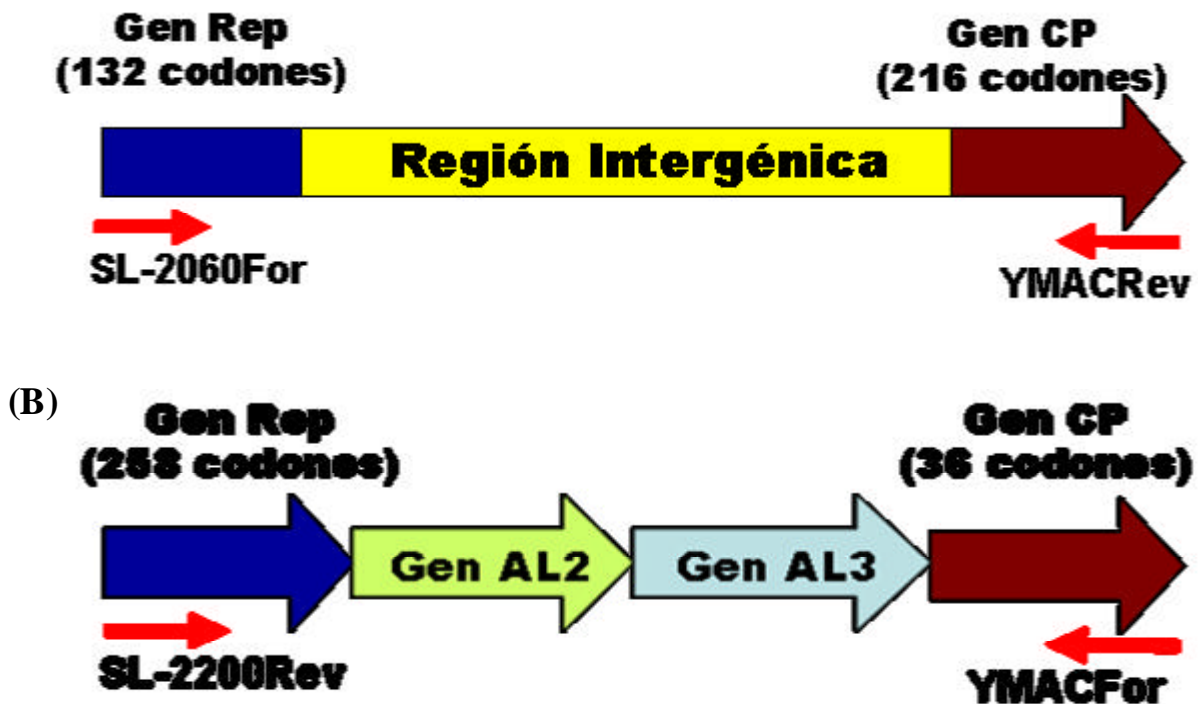


Figura 8.- Regiones del genoma A viral amplificadas con cada combinación de iniciadores. A) La región SL-2060For / YMACRev facilita la identificación de las especies virales debido a que incluye 132 codones del gen Rep, la secuencia completa de la región intergénica y 216 codones del gen CP. B) La región SL-2200Rev / YMACFor complementa la caracterización genómica viral. Incluye 258 codones del gen Rep, la secuencia completa de los genes AL2 y AL3, y 36 codones del gen CP.

Posteriormente al aislamiento y caracterización del genoma A de los begomovirus obtenidos de las muestras problema, nos dimos a la tarea de aislar el genoma B que corresponde a cada uno de ellos mediante el uso de los iniciadores universales BC1-80Rev / BV1-310For (1300 pb) y BC1-290For / BV1-310Rev [(1480 pb) Figura 9]. Los productos de PCR obtenidos se traslapan en un segmento de 220 pb, permitiendo la reconstrucción de la secuencia genómica global.

(A)



(B)

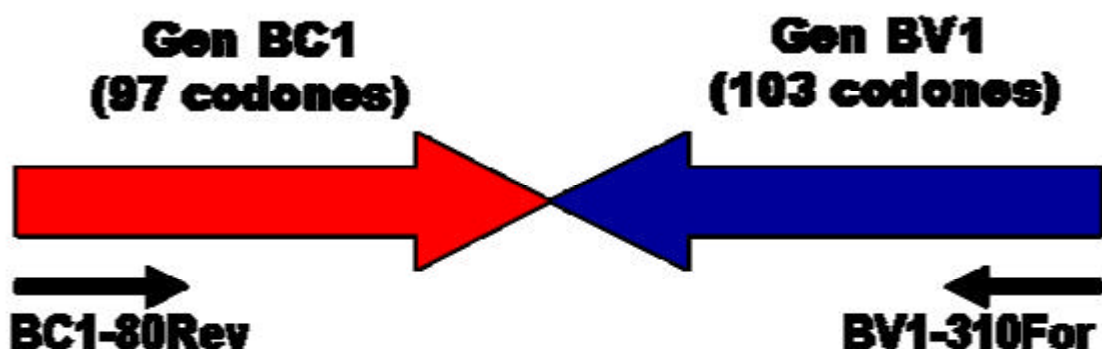


Figura 9.- Regiones del ADN B viral amplificadas para cada combinación de oligonucleotidos utilizada. A) La región BC1-290For / BV1-310Rev facilita la identificación del begomovirus al que pertenece el genoma B en cuestión ya que contiene 97 codones del gen BC1, la secuencia completa de la región intergenica que incluye la región común y 103 codones del gen BV1. B) La región BC1-80Rev / BV1-310For completa la caracterización genómica viral. Incluye 267 codones del gen BC1 y 153 codones del gen BV1.

Los genomas A obtenidos a partir de los extractos de tomatillo y pepino se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank, y encontramos que correspondían a variantes del *PepGMV*, con un 97 y 98% de similitud global respectivamente. Hasta la fecha solo se habían reportado infecciones causadas por *PepGMV* en Solanáceas, por lo que los resultados obtenidos amplían el rango de huéspedes naturales para esta especie viral.

En el caso del extracto obtenido a partir de una planta de tomate colectada en Río verde, en primera instancia se reconstruyeron un par de genomas A completos. El primer genoma A (2588 pb) mostró una similitud del 97.1 % con el *Tomato severe leaf curl virus-GT94 (ToSLCV-GT94)*, un virus que solo se había encontrado hasta ahora en Centroamérica; a esta nueva variante se le otorgo provisionalmente el

nombre de *ToSLCV-SLP1*. Una segunda secuencia viral de 2614 pb resulto 93.9 % similar en secuencia al *Tomato golden mottle virus-GT94-R2 (ToGMoV-GT94-R2)*, que al igual que el virus anterior, solo se había registrado en países centroamericanos.

A partir del mismo extracto se logro amplificar y reconstruir un genoma B completo de 2588 pb que correspondió al *ToGMoV* para el cual no existía reportada más que una secuencia parcial (Nakhla y col., 2005). Las marcadas diferencias entre las secuencias iterativas presentes en *ToSLCV* y *ToGMoV* y la baja similitud entre las secuencias presentes en la base de datos del GenBank y secuencia parcial (1300 pb) de un segundo genoma B presente en la misma muestra, indica que probablemente esta última sea el primer indicio sobre la existencia del genoma B de la especie *ToSLCV*. En base a los resultados obtenidos se logro la caracterización genómica total de *ToGMoV* y parcial de *ToSLCV*, significándose como el primer reporte de la presencia en México de estos dos virus.

Por otra parte, se proceso una muestra proveniente de una región cercana a Guasave, Sinaloa, correspondiente a una maleza conocida como “frijolillo” (*Rhynchosia minima*), y se realizó el análisis de los extractos por PCR con el uso de los iniciadores WARFor / YMACRev y DGRSRev / YMACFor (Monreal y col., no publicado) y se logró amplificar un genoma A completo de 2605 pb. La secuencia obtenida se comparo con las presentes en la base de datos del GenBank y obtuvimos una similitud del 90.6 % con *Rhynchosia golden mosaic virus (RhGMV)* aislado en Honduras y un 90.2% con respecto a *RhGMV-Chiapas*.

Los criterios taxonómicos actuales establecen que las variantes de un begomovirus cuyo genoma A presenta una identidad global del 89 al 93% se consideran cepas (“strains”) de la misma especie (Fauquet & Stanley, 2005). Por lo tanto, este primer virus aislado de *Rhynchosia sp* corresponde a una nueva cepa de la especie *RhGMV* denominada tentativamente: *Rhynchosia golden mosaic virus-Sinaloa (RhGMV-Sinaloa)* y amplía notablemente la distribución geográfica de esta especie viral (Figura 10).

Se trabajó con el mismo extracto con la finalidad de determinar la presencia de begomovirus pertenecientes al linaje del *SLCV*, para lo que se utilizaron las siguientes combinaciones: SL-2200Rev / YMACFor (1323 pb) y SL-2060For / YMACRev (1417 pb). Esta nueva reacción de PCR puso en evidencia la existencia de un virus diferente a RhGMV, y los productos de amplificación obtenidos permitieron reconstruir un genoma A de 2578 pb, cuya secuencia fue analizada y comparada con las secuencias disponibles en el banco de datos del GenBank mostrando un 86.3% de similitud con *CaLCuV-Jamaicapcrfa4*, su pariente más cercano (Figura 9). 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 89% con su pariente más cercano (Fauquet y Stanley, 2005), se estableció que el segundo virus aislado de la planta *Rhynchosia minima* corresponde a una nueva especie de geminivirus. Para confirmar esto por otro criterio, nos dimos a la tarea de analizar el origen de replicación del nuevo virus y como resultado observamos que contiene iterones cuya secuencia es única entre las 120 especies conocidas de begomovirus (figura 11). En base en los criterios taxonómicos actuales (Fauquet y Stanley., 2005) el nombre tentativo para este nuevo geminivirus fue: *Rhynchosia Mosaic Sinaloa Virus (RhMSinV)*.

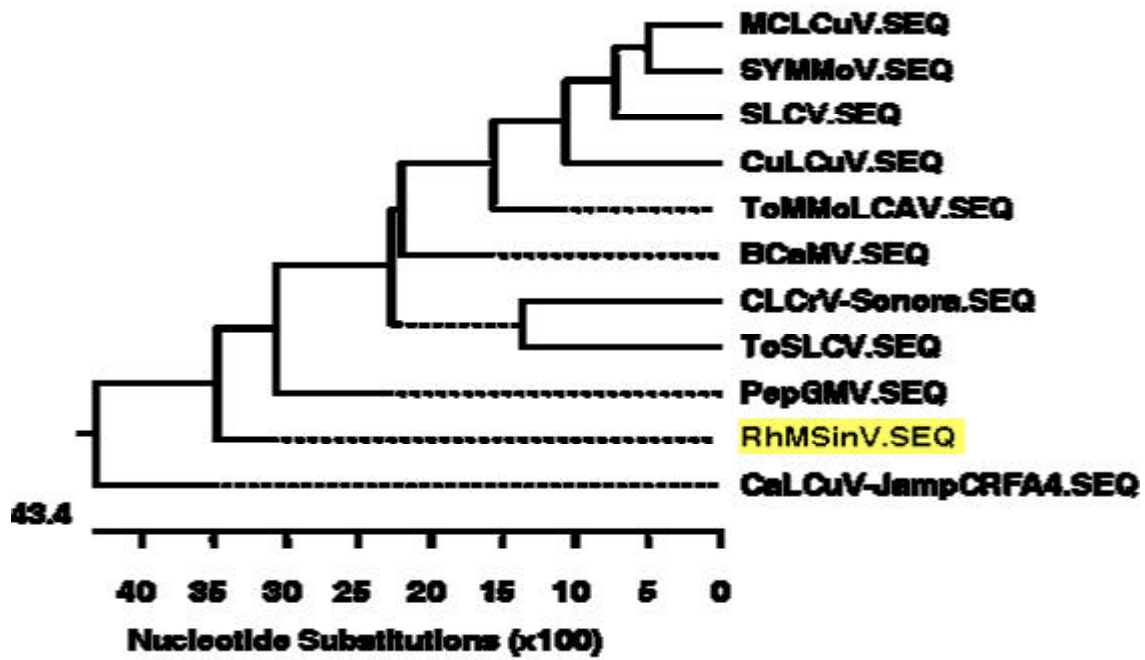


Figura 10. Árbol filogenético que representa la relación entre el genoma A de *RhMSinV* (nueva especie de *Begomovirus*) y las 10 especies virales conocidas pertenecientes al linaje del SLCV. La escala representa el número de sustituciones por cada 100 nucleótidos.

Utilizando el mismo extracto logramos aislar y reconstruir un genoma B completo de 2525 pb. Para comprobar que la secuencia obtenida corresponde a *RhMSinV* comparamos la región común presente en ambos genomas (A y B), y determinamos que ambas regiones son prácticamente idénticas. Con los resultados obtenidos logramos la caracterización genómica total de esta nueva especie de begomovirus.

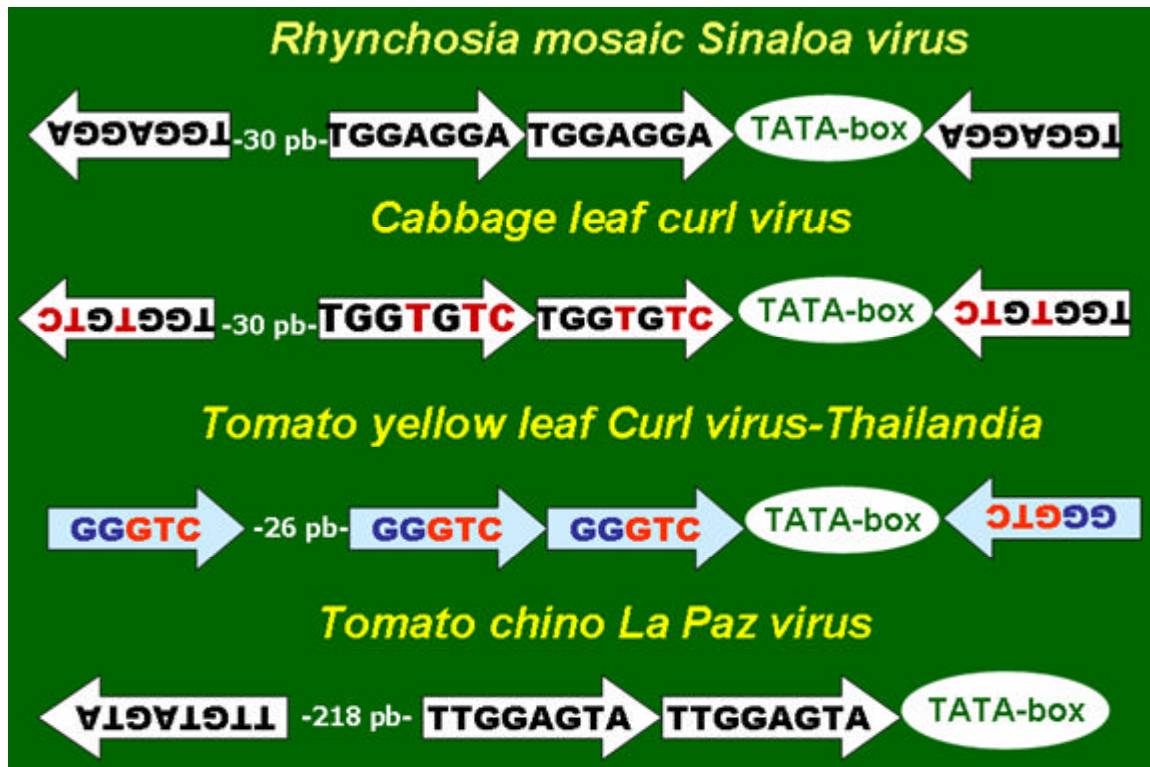


Figura 11. La secuencia repetida (iterones) presente en el origen de replicación de *Rhynchosia mosaic Sinaloa virus* (RhMSinV) es única entre las especies conocidas de geminivirus. Los iterones presentes en *Rhynchosia mosaic Sinaloa virus* se comparó con los iterones presentes en begomovirus del viejo mundo (*Tomato yellow leaf curl virus-Thailandia*), begomovirus típicos del nuevo mundo (*Tomato chino La Paz virus*) y begomovirus pertenecientes al linaje del SLCV (*Cabbage leaf curl virus*).

3.3. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE BEGOMOVIRUS TÍPICOS PRESENTES EN INFECCIONES MIXTAS.

Para amplificar secuencias de Begomovirus típicos, mucho más abundantes en la naturaleza, el procedimiento fue similar al usado con las muestras de plantas infectadas por begomovirus pertenecientes al linaje del SLCV, pero con diferentes iniciadores. Las reacciones de PCR se realizaron con extractos de ADN obtenidos a partir de plantas de soya (*Glycine max*, Merr.) y de 3 malezas con síntomas de virosis, conocidas como “mala mujer” (*Solanum rostratum*), Sida (*Sida sp*), y una planta herbácea de la familia de las Compuestas (Asteraceae) que no pudo ser identificada a nivel de Género, y que llamamos simplemente “girasol silvestre” (Figura 12). Las muestras de Soya, “girasol silvestre” y *Sida sp* fueron colectadas en áreas de cultivo pertenecientes al municipio de Guasave, Sinaloa, mientras que las muestras de Mala mujer fueron colectadas en áreas agrícolas del Municipio de Río verde, S.L.P.

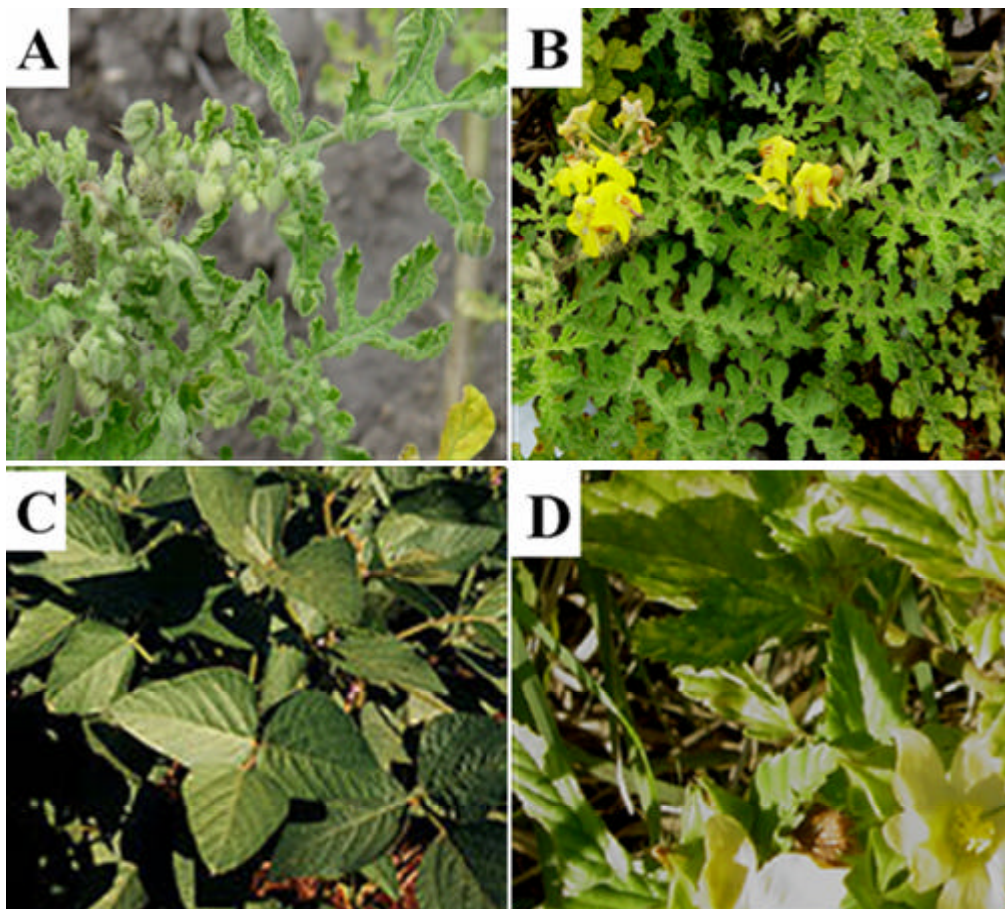


Figura 12. A) Enrollamiento foliar severo que expresaba la planta de “mala mujer” que designamos MM4. B) Planta de “mala mujer” con clorosis difusa. C) Planta de soya asintomática. D) Mosaico severo expresado en plantas de *Sida sp.*

Para descartar o establecer la existencia de infecciones mixtas, utilizamos la técnica de RFLP (patrones de restricción) para diferenciar unas clonas de otras mediante los patrones de restricción observados. Por último aplicamos la metodología desarrollada en este estudio para amplificar el genoma B correspondiente a cada uno de los virus aislados.

Las primeras muestras en ser analizadas fueron una proveniente de Soya (SO-1068) y otra derivada de una maleza conocida como “girasol silvestre” (especie no identificada). Después de comprobar la ausencia de begomovirus pertenecientes al linaje del *SLCV* proseguimos a utilizar los iniciadores utilizados por Monreal en combinación con los patrones de restricción utilizando las enzimas Hha1 y Msp 1 (Monreal y *col.*, en proceso) a partir de los cuales logramos aislar y reconstruir un par de componentes A en el caso de soya 1068 y uno solo en el girasol silvestre.

El análisis de la secuencia contenida en el primer genoma A (2636pb) aislado de SO-1068 con las secuencias presentes en la base de datos del GenBank, mostró un 92.6% de similitud con el *Chino del tomate virus-(IC)* [*CdTV-(IC)*] y un poco menor con otros genomas de *CdTV* publicados. En base a los criterios taxonómicos actuales (Fauquet y Stanley, 2005) el aislado de Soya 1068 corresponde a una nueva cepa de la especie *CdTV* que denominamos provisionalmente *CdTV-Soybean*. El hallazgo también amplió el rango de huéspedes naturales conocidos para este virus, limitado hasta ahora a solanáceas. A la fecha hemos caracterizado además un fragmento (1300 pb) del genoma B de *CdTV-Soybean* correspondiente a la región BC1-80Rev / BV1-310For. El segundo virus aislado del extracto de Soya 1068 tiene un 98% de similitud con la cepa *RhGMV-Sinaloa* aislado de *Rhynchosia minima* durante este trabajo (Figura 13).

Una segunda muestra de Soya marcada como SO-1045 fue analizada de la misma manera que soya 1068, se amplificaron y reconstruyeron un par de genomas A, el primer genoma fue sometido a un análisis comparativo con las secuencias presentes en la base de datos del GenBank y como resultado se obtuvo que era idéntico al *CdTV-Soybean* aislado de la muestra de Soya 1068. El análisis comparativo de las 2604 pb contenidas en el segundo genoma A aislado de Soya 1045 mostró un 89.9 y un 90.5% de similitud con respecto a los *RhGMV* aislados en

Honduras y Chiapas respectivamente, y mostró ser solo un 92% similar a los aislados de RhGMV-Sinaloa aislados de girasol, soya y “frijolillo”, por lo que constituye una nueva cepa de la especie *RhGMV* que también tiene a soya como huésped natural, y cuyo nombre tentativo es *RhGMV-Soybean* (Figura 13).

Por otra parte, se amplificó el genoma B completo de *RhGMV-Soybean* (2551pb) y *RhGMV-Sinaloa* (2570pb), aislados de SO-1045 y SO-1068, respectivamente. Se compararon las secuencias obtenidas con otros genomas B depositados en el GenBank. El componente B de *PHYVVV* fue el que mostró una mayor similitud con un 69.4% para el caso de *RhGMV-Sinaloa*, mientras que con respecto al componente B de *RhGMV-Soybean* mostró un 69% de similitud; estos fueron sus parientes más cercanos, ya que los genomas B correspondientes a los *RhGMV* identificados en Honduras y Chiapas no han sido aislados todavía. Consecuentemente, los genomas B de los aislados de Soya son los primeros reportados para esta especie viral. La comparación de los genomas B de *RhGMV-Sinaloa* y *RhGMV-Soybean* reveló una similitud del 92.2% entre sí, lo que apoya la noción de que estos virus aislados de soya representan cepas diferentes.

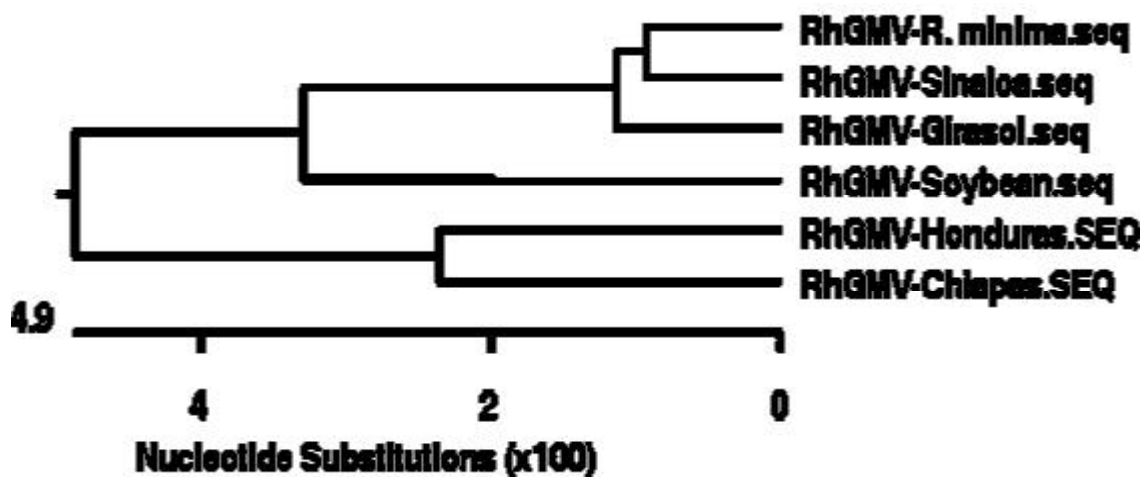


Figura 13. Árbol filogenético de los genomas A completos correspondientes a las variantes y nuevas cepas de la especie *RhGMV*, aisladas durante este trabajo.

Como parte de otro lote de muestras colectadas se identificó una maleza conocida como Sida (*Sida sp*) y se trato de amplificar ADN viral utilizando la combinación de iniciadores prSL, sin obtener resultados favorables; después, se utilizaron los iniciadores diseñados por Monreal y col., con las siguientes combinaciones: DGRS-for / YMAC-rev y DGRS-rev / YMAC-for amplificando los fragmentos de ADN viral esperados.

Con la finalidad de comprobar la presencia de una infección mixta se sometió a un análisis de RFLP con las enzimas Hha1 y Msp1 al producto de PCR obtenido a partir de la combinación DGRSFor / YMACRev (1500 pb) y resultó que la suma de los pesos moleculares de las bandas observadas en el patrón de restricción es superior al tamaño del producto de PCR digerido. Basándonos en el método de RFLPs logramos identificar 2 genomas virales diferentes, los cuales no fueron reconstruídos con la certeza necesaria debido a que las combinaciones de oligonucleótidos utilizadas no comparten regiones traslapadas y a que los fragmentos amplificados con el par de iniciadores DGRS-Rev / YMAC-For (parte inferior del genoma) eran muy similares.

Para solucionar este problema utilizamos la combinación WAR-for/ YMACRev (Monreal y col., manuscrito en proceso) para lograr obtener una secuencia de ADN que se traslape con alguno de los fragmentos amplificados con anterioridad y así reconstruir los genomas A correspondientes a cada virus.

La secuencia del primer genoma A obtenido se comparo con las secuencias presentes en la base de datos del GenBank y presento una similitud mayor al 94% con respecto a su pariente mas cercano, el *CdTV*. Con base en lo anterior y a los criterios taxonómicos actuales el primer aislado de *Sida sp* correspondió a una variante del *CdTV* que amplia el rango de hospederos naturales para esta especie viral. El segundo genoma A reconstruido tenia una longitud de 2605 pb y después de llevar a cabo el análisis de comparación de secuencias determinamos que era en un 87.2% similar a *CdTV-(IC)*, su pariente mas cercano (Figura 14).

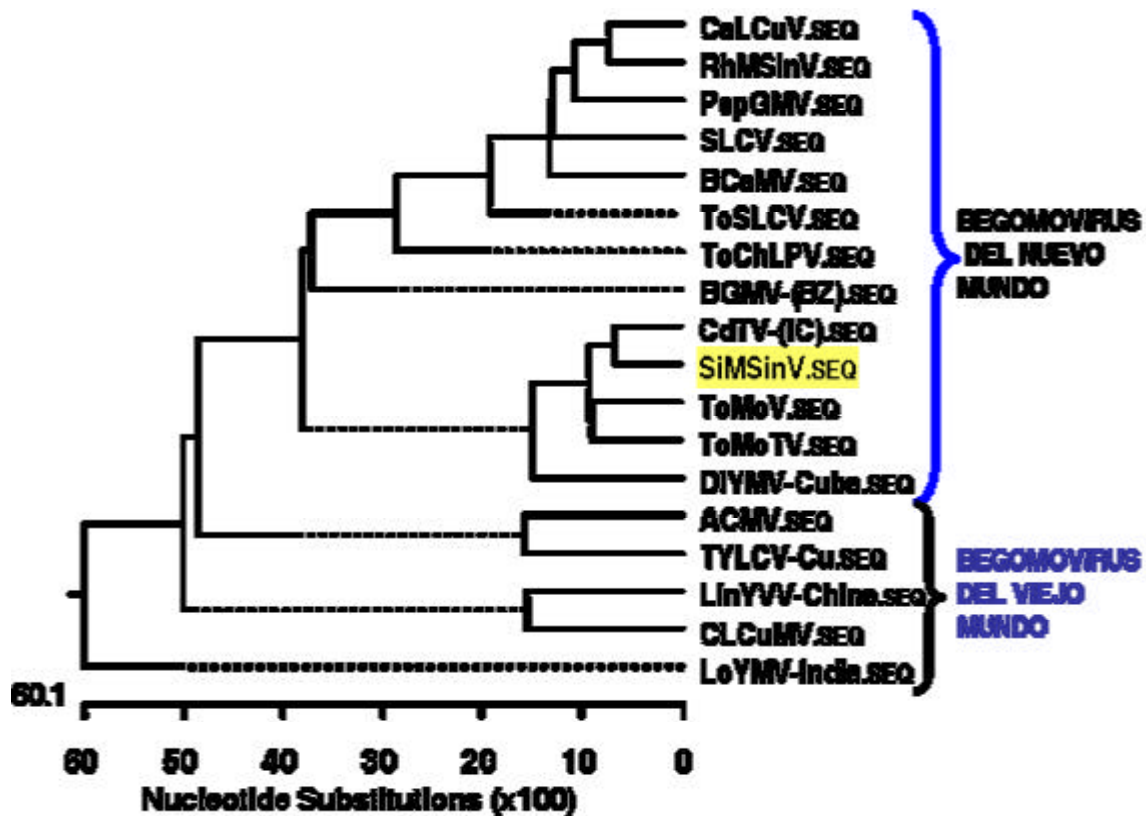


Figura 14. Árbol filogenético que representa la relación entre el genoma A de *SiMSinV* (nueva especie geminiviral) y el genoma A de Begomovirus representativos de ambos hemisferios. La escala representa el número de sustituciones nucleotídicas por 100.

El análisis de los iterones presentes en el origen de replicación mostró que son idénticos a los presentes de otros geminivirus lejanamente relacionados, PYMV de Venezuela, *TYLCSV* de Europa y *SACMV* de África (Figura 15). Con base en las observaciones anteriores, determinamos que el segundo virus de la planta de Sida sp. corresponde a una nueva especie de begomovirus, que denominamos provisionalmente *Sida mosaic Sinaloa virus (SiMSinV)*. Procedimos luego a amplificar el genoma B de esta nueva especie, lo que logramos utilizando nuestros iniciadores, y reconstruimos a partir de dos productos de PCR la secuencia completa (2577pb) del genoma B de *SiMSinV*, que se confirmó mediante el análisis de la región común presente en ambos genomas.

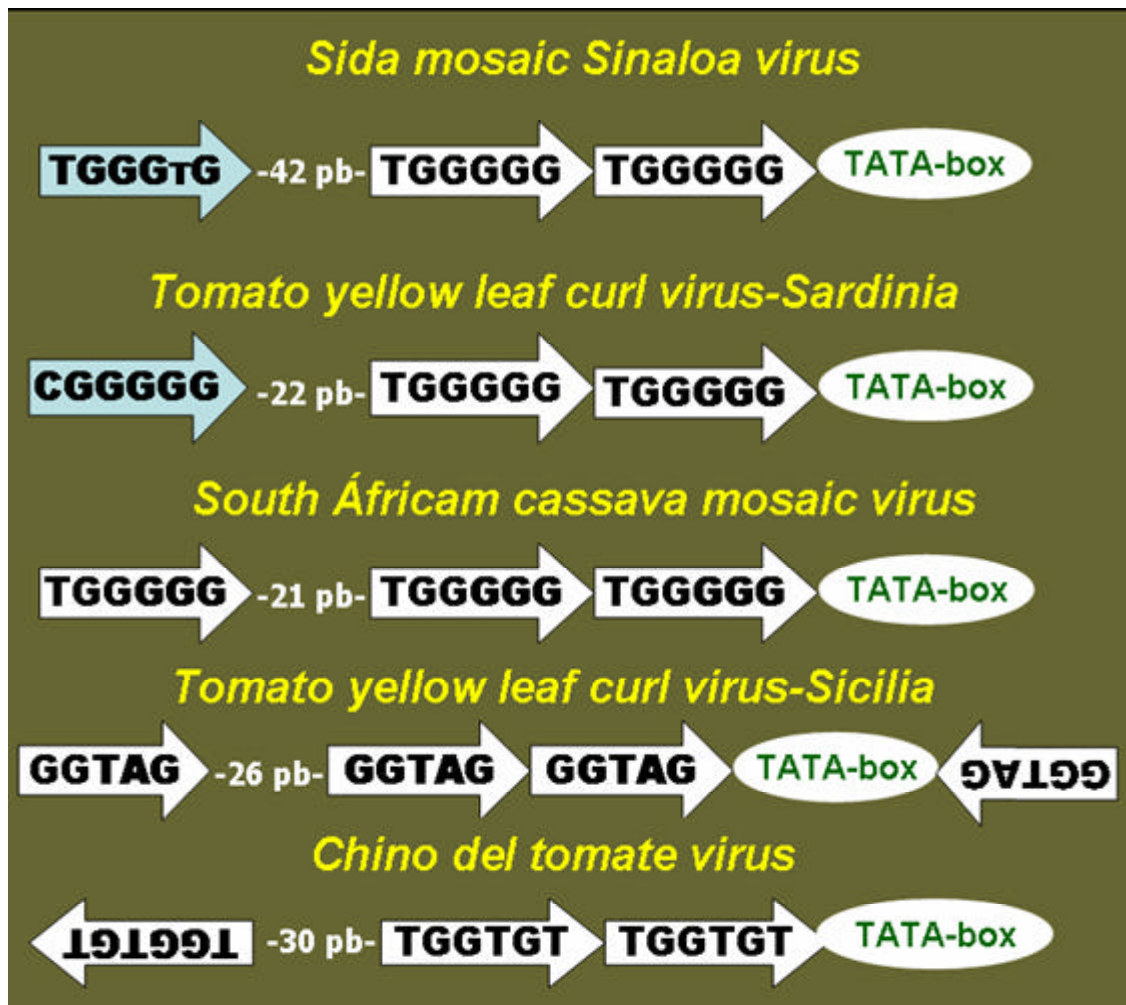


Figura 15. Las secuencias repetidas (iterones) presentes en el origen de replicación de *SiMSinV* son diferentes a las presentes en la mayoría de los geminivirus del viejo mundo (*Tomato Yellow Leaf Curl Virus-Sicilia*) y del nuevo mundo (*Chino del Tomate Virus*) pero idénticas a las presentes en el origen de replicación de *Tomato Yellow Leaf Curl Virus-Sardinia* y *South African Cassava Mosaic Virus*.

Okra yellow mottle México virus (OYMoMV) es un begomovirus bipartita cuyo genoma A fue aislado de cultivos de Okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) presentes en los estados de Guerrero y Morelos (De la Torre- Almaraz y col., 2006). Durante el presente trabajo se recibieron extractos de plantas de Okra de las cuales se aisló y caracterizó originalmente el genoma A de *OYMoMV* y con las combinaciones de iniciadores BC1-80Rev / BV1-310For y BC1-290For / BV1-310Rev se amplificó un genoma B completo correspondiente a *OYMoMV*, logrando con esto la caracterización genómica completa de esta nueva especie viral.

En cada una de las colectas realizadas en el Municipio de Río verde, S.L.P. se observó con frecuencia a una maleza conocida como “mala mujer” (*Solanum rostratum*). Se colectaron diferentes muestras de esta maleza, se rotularon (MM1, MM2, etc.), se les extrajo el ADN y se analizaron por medio de la técnica de la PCR utilizando por separado los iniciadores universales diseñados en este estudio para amplificar el genoma A de begomovirus pertenecientes al linaje *SLCV* y los diseñados por Monreal (manuscrito en proceso) que amplifican el genoma homólogo de los Begomovirus típicos, y así comprobar o descartar la presencia de begomovirus coinfectantes en las muestras. Las secuencias de ADN aisladas fueron comparadas con las secuencias presentes en la base de datos del GenBank.

En el caso de la planta de mala mujer rotulada como MM1 se amplificó una secuencia parcial de 1417 pb similar al genoma A de *PepGMV* usando los iniciadores SL-2060For / YMACRev, mientras que con la combinación WARFor / YMACRev se caracterizó una secuencia de 1685 pb que correspondió al genoma A de *PHYVV*.

A partir del extracto de la planta MM2 y con la combinación SL-2060For / YMACRev se aislaron un par de fragmentos virales, el primero correspondió al genoma A de una nueva cepa perteneciente a la especie *ToSLCV* y, cuyo nombre tentativo es *ToSLCV-SLP2*. El segundo fragmento fue idéntico en secuencia al *ToGMoV* aislado de tomate durante este estudio. Hasta la fecha *ToGMoV* había sido considerado un Begomovirus endémico de Guatemala, siendo esta la primera observación de su presencia en México; en el caso de *ToSLCV*, se amplía el rango de huéspedes naturales para esta especie viral.

El extracto proveniente de la muestra MM3 se analizó con la combinación de iniciadores SL-2060For / YMACRev aislando una secuencia de 1417 pb que corresponde al *ToSLCV*. Posteriormente con el uso de la combinación WARFor / YMACRev se identificó una segunda secuencia de 1685 pb correspondiente a *ToChLPV*, un begomovirus recientemente descrito por Holguín (Holguín y col., 2005). Los resultados obtenidos expanden el rango conocido de huéspedes y la distribución geográfica del *ToChLPV*.

3.4. UN CASO EXCEPCIONAL DE INFECCIÓN MÚLTIPLE.

Como producto de una de las colectas realizadas en el Municipio de Río verde, S.L.P. obtuvimos una planta (*Solanum rostratum*) rotulada como MM4 con síntomas virales característicos de infección por begomovirus. Después de obtener el extracto de ADN, se aplicó la técnica de la PCR utilizando como iniciadores la combinación: SL2200Rev / YMACFor que amplifica una secuencia de 1320 pb de begomovirus típicos.

Se obtuvieron ocho clonas que fueron digeridas con la enzima de restricción Eco R1 para comprobar la presencia de los fragmentos de PCR de 1320 pb, aparentemente todas las clonas eran idénticas ya que todas liberaron un fragmento del tamaño esperado. Para comprobar lo anterior, aplicamos la técnica de RFLP sobre las clonas obtenidas utilizando la enzima Msp 1 y como resultado observamos tres patrones de restricción diferentes (figura 16). Las secuencias aisladas se compararon con las presentes en la base de datos del Gen Bank, dos de las secuencias correspondieron a variantes de *ToSLCV* (*ToSLCV-SLP1* y *ToSLCV-SLP2*), mientras que la tercera secuencia estaba relacionada con *PepGMV*.

El mismo extracto MM4 se analizó utilizando los iniciadores para Begomovirus típicos. Con la combinación DGRSFor / YMACRev se amplificó un fragmento de 1500 pb y se obtuvieron siete clonas que fueron digeridas con la enzima Eco R1 para liberar y comprobar la presencia del producto de PCR amplificado. Nuevamente se observó la presencia de tres patrones de restricción diferentes con Msp1 (Figura 17). El análisis de comparación de secuencias mostró que la primera secuencia corresponde a una variante de PHYVV, la segunda secuencia fue muy similar a *ToChLPV* y la tercera secuencia pertenecía a *ToGMoV*. En total aislamos segmentos parciales del genoma A de cinco begomovirus diferentes (*ToSLCV*, *PepGMV*, *PHYVV*, *ToChLPV* y *ToGMoV*), un hecho sin precedente en la literatura sobre geminivirus.

Por ultimo se amplificaron secuencias del genoma B de Begomovirus y a pesar de realizar múltiples pruebas de escrutinio solo hemos logrado aislar y amplificar el genoma B completo de *PHYVV* y una secuencia de 1485 pb correspondiente *ToGMoV*.

Con base en lo anterior podemos establecer que muy probablemente el par de genomas B aislados del extracto MM4 son los encargados del movimiento a través de la planta de todos los genomas A virales aislados.

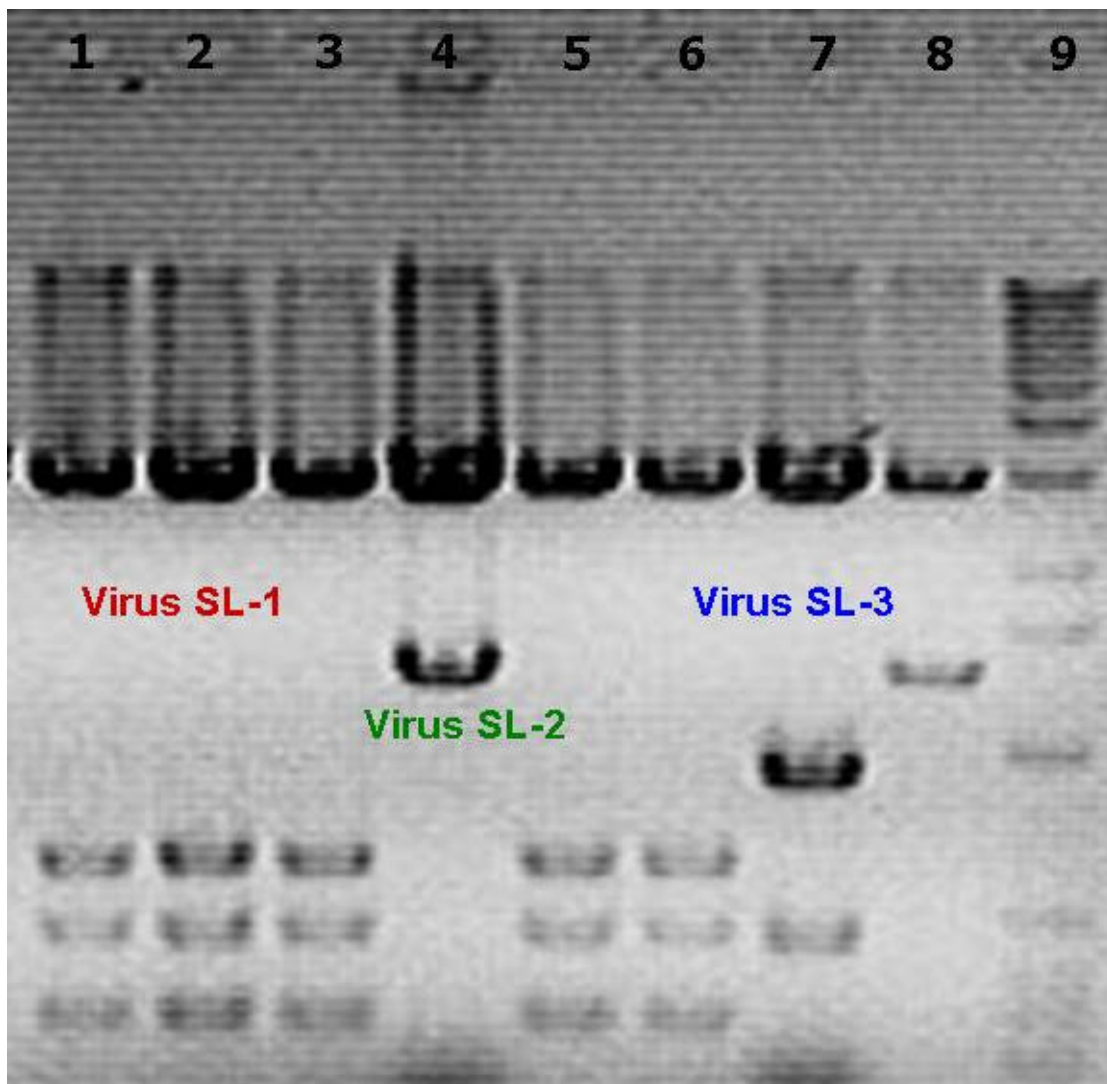


Figura 16.- Análisis RFLP de las clonas conteniendo la región SL-2200Rev / YMACFor obtenido con la enzima Eco R1, el cual se caracteriza por la presencia de tres patrones de restricción diferentes. Los carriles 1-3,5 y 6 muestran el patrón de restricción correspondiente a una variante de la especie *ToSLCV*; Los carriles 4 y 8 comparten un segundo patrón de restricción que pertenece a una segunda variante de *ToSLCV* y el carril 7 presenta el patrón de restricción de *PepGMV*. El carril 9 corresponde al Marcador de peso molecular (1 Kb).

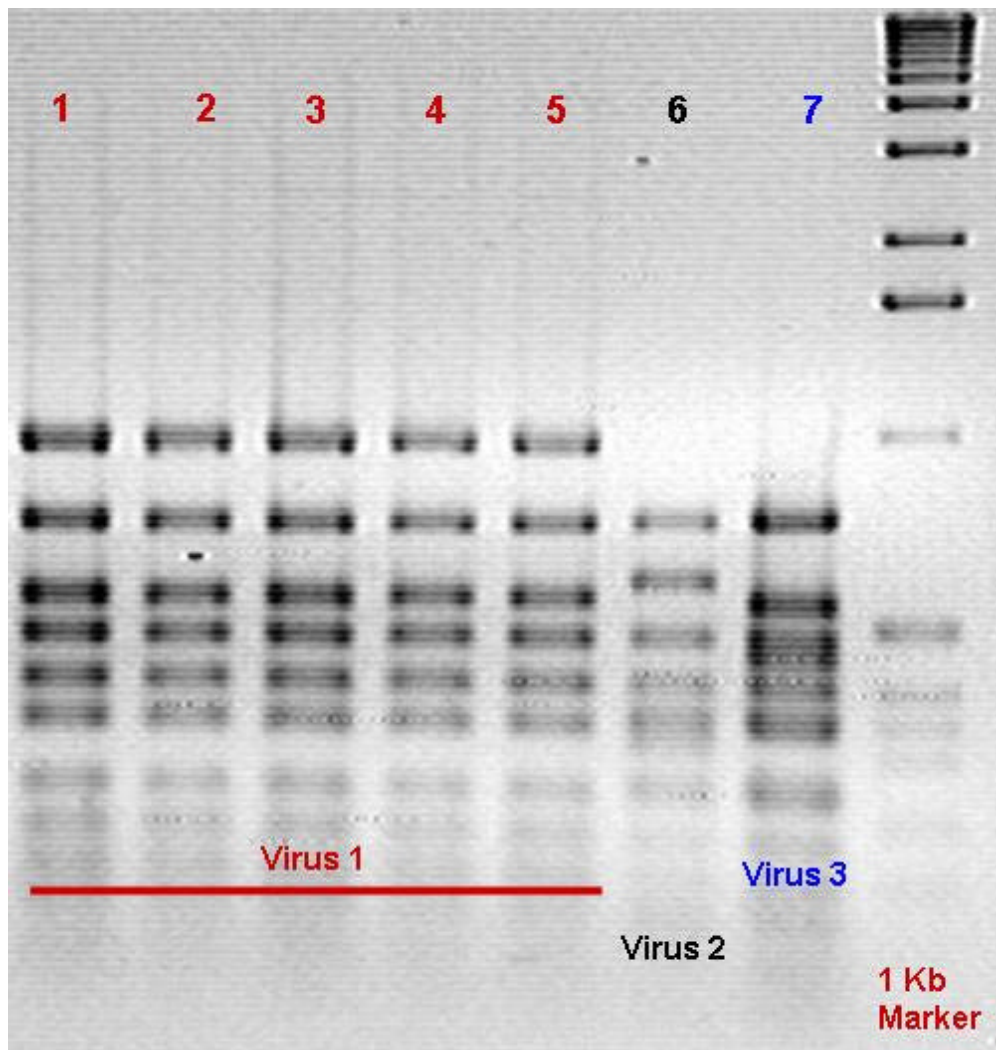


Figura 17.- Análisis RFLP de las clonas conteniendo la región DGRSFor / YMACRev utilizando la enzima Msp 1. Se aprecian tres patrones de restricción diferentes. El primero, correspondió a PHYVV en los carriles 1-5; el segundo a ToChLPV en el carril 6 y tercer patrón a ToGMV en el carril 7. El carril 8 corresponde al Marcador de peso molecular (1 Kb).

DISCUSIÓN.

En el presente trabajo hemos desarrollado dos nuevos métodos de diagnóstico molecular, el primero presenta características que lo hacen más apropiado para el diagnóstico y el descubrimiento de nuevas especies virales pertenecientes al linaje del *SLCV* que los métodos existentes. Mientras que las características presentadas por el segundo método favorecen la amplificación del genoma B completo de cualquier Begomovirus, sin importar su origen geográfico, superando en esto a los demás métodos publicados.

En primera instancia, se diseñaron 6 diferentes oligonucleótidos universales 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 componente A completo de cualquier begomovirus perteneciente al linaje del *SLCV*. La versatilidad de los oligonucleótidos se demostró experimentalmente amplificando con éxito las regiones genómicas correspondientes de begomovirus representativos del linaje *SLCV*.

Lo anterior contrasta con los resultados obtenidos por Wyatt y Brown (1996) cuyos iniciadores AV494/AC1048 amplifican el mismo tamaño de banda (570 pb) del gen que codifica para la proteína de la cápside (CP) de begomovirus de diferentes continentes sin embargo la información obtenida solo es parcial y no permite la caracterización taxonómica completa del virus en cuestión.

Mientras que con los oligonucleótidos universales diseñados por Rojas y col., (1993) y los iniciadores diseñados por Monreal col., (Manuscrito en proceso) a pesar de amplificar el genoma A completo de los begomovirus típicos sin importar su origen geográfico muestran claras deficiencias al momento de amplificar begomovirus pertenecientes al linaje *SLCV*.

Con los oligonucleotidos universales SL2150For y SL2200For en combinación con el oligonucleotido YMACRev se amplifican las regiones SL2200For / YMACRev y SL2150For / YMACRev con las que se pueden diagnosticar e identificar tanto a virus conocidos como a nuevas especies virales pertenecientes al linaje *SLCV* debido a que incluye la región intergénica y parte de los genes Rep y CP.

La región intergénica contiene el origen de replicación del genoma viral y los dos promotores divergentes. Los productos de PCR que corresponden a las regiones SL2200For / YMACRev y SL2150For / YMACRev se pueden clonar para analizar experimentalmente la organización funcional del origen de replicación en begomovirus pertenecientes al linaje *SLCV*, lo anterior implica 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. 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 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 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).

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., (Manuscrito en proceso) para confirmar la presencia de una infección mixta y posteriormente establecer diferencias entre los productos de PCR correspondientes a cada begomovirus implicado en la coinfección.

Nuestro método consta de 4 probables combinaciones de oligonucleotidos universales con los cuales se puede amplificar el componente A completo de begomovirus pertenecientes al linaje del *SLCV*, y a diferencia de los fragmentos amplificados con los oligonucleotidos diseñados por Rojas y *col.*, (1993), los fragmentos genómicos amplificados con nuestros oligos se sobrelapan y por lo tanto se elimina la posibilidad de obtener secuencias begomovirales erróneas al momento de reconstruir los genomas.

Posteriormente diseñamos seis diferentes oligonucleotidos universales flanqueados por sitios de restricción, con los cuales se pueden amplificar diferentes regiones del componente B de begomovirus bipartitas, y clonarse en plásmidos de uso general (pK19 o pBSK⁺). La versatilidad de los iniciadores para amplificar el componente B completo de cualquier begomovirus bipartita independientemente de su origen geográfico se demostró experimentalmente amplificando con éxito las regiones genómicas correspondientes de begomovirus representativos presentes en el continente Americano. Esto contrasta con los resultados obtenidos por Rojas y *col.* (1993) cuyos oligonucleotidos PBL1v2040 y PCRC1 amplifican un fragmento de aproximadamente 600pb que incluye una porción del gen BL1 pero no la región común, evitando con esto la caracterización genómica total del virus en cuestión.

Con los oligonucleotidos BC1-80For y BC1-290For en combinación con el oligonucleotido BV1-310Rev se amplifican las regiones BC1-80For / BV1-310Rev y BC1-290For / BV1-310Rev que pueden ser utilizadas para identificar el begomovirus bipartita al cual pertenece el genoma B amplificado debido a que incluye la región intergénica y parte de los genes BL1 y BR1. La región intergénica contiene el origen de replicación del genoma, la región común y los dos promotores divergentes, es por eso que los productos de PCR se pueden clonar y utilizar para evaluar experimentalmente la organización funcional del origen de replicación de diversos begomovirus. El análisis de las secuencias iterativas presentes en el origen de replicación (Arguello-Astorga y *col.*, 1994) proporciona información sobre la evolución viral de algún begomovirus en particular y nos ayudan a predecir entre que especies begomovirales existe mayor probabilidad de llevar a cabo fenómenos de recombinación y/o pseudorecombinación.

La variabilidad de secuencia presente en las regiones BC1-80For / BV1-310Rev y BC1-290For / BV1-310Rev permito al igual que con las regiones WARFor / YMACRev y DGRSFor / YMACRev establecer patrones de restricción característicos utilizando las enzimas Msp1 y Hha1 (Monreal y col., Manuscrito en proceso), con este método se puede evaluar rápidamente la diversidad de begomovirus presentes en un agroecosistema determinado, identificar a los begomovirus que participan en infecciones mixtas, y la presencia de pseudorecombinantes.

La combinación de los diferentes oligonucleotidos diseñados en este estudio permite obtener la secuencia del genoma B completo de cualquier begomovirus bipartita sin importar su origen geográfico. El hecho de que los productos de PCR amplificados se traslapen elimina la posibilidad de amplificar fragmentos de dos o más begomovirus presentes en una infección mixta y obtener secuencias que erróneamente se consideren nuevas especies.

Las técnicas diseñadas y probadas experimentalmente durante el presente estudio pueden ser utilizadas para la identificación y caracterización genómica del componente A de begomovirus pertenecientes al linaje *SLCV* y del componente B de cualquier begomovirus sin importar su origen geográfico o rango de hospederos, establecer e identificar el rango de hospederos de cada begomovirus presente en una región geográfica determinada, debido a que la mosquita blanca en múltiples ocasiones se alimenta de plantas infectadas con varios begomovirus, 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, de tal forma que al combinar nuestro método con los métodos ya existentes se podría establecer un sinergismo que facilite el aislamiento tanto de los begomovirus pertenecientes al linaje del *SLCV* como de los begomovirus típicos presentes en infecciones mixtas, desde el punto de vista fitosanitario se puede evaluar el material vegetal de importación para evitar la introducción de begomovirus de una región o país a otro, como sucedió con el *PHYVV* detectado inicialmente en Tamaulipas y posteriormente identificado en todas las regiones tomateras del estado de Sinaloa (Torres-Pacheco y col., 1996) o lo acontecido en Republica Dominicana (Polston y col., 1994) y Francia (Delatte y col., 2003) en donde *TYLCV* se disemino debido a la

falta de métodos de diagnóstico molecular eficientes y de una legislación fitosanitaria adecuada.

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 Río verde S.L.P. Por el porcentaje de similitud obtenido (97 y 98% para Tomatillo y Pepino respectivamente) con el genoma A de *PepGMV* se estableció que este aislamiento corresponde al *PepGMV*. El aislamiento en Río verde; S.L.P. amplía 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 sí solo son mucho más agresivos que cuando está 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).

El *ToSLCV* se caracteriza principalmente por presentarse en la naturaleza produciendo infecciones mixtas (Nakhla y col., 2005) o pseudorecombinantes debido a que no había sido posible amplificar su genoma B (Nakhla y col., 2005), y el aislamiento de una muestra de tomate de Río verde, S.L.P. fue la excepción, se caracterizó el genoma A completo (GenBank acc. No. DQ347946) y un fragmento de 1330 pb correspondiente al genoma B de *ToSLCV*; Un segundo genoma B correspondiente a *ToGMoV* (GenBank acc. No. DQ406674) fue aislado y caracterizado. El análisis de comparación de las secuencias entre los aislados de Tomate en Río Verde, S.L.P. y las secuencias presentes en el GenBank estableció la identidad de cada una de ellas, un 97.1 % de similitud para el genoma A de *ToSLCV* en comparación con *ToSLCV-GT94* (GenBank acc. No. AF130415), mientras que la región común presente en el componente A del *ToGMoV-[GT94-R2]* (GenBank acc. No. AF32852) Aislado en Centroamérica es idéntica a la presente en el genoma B del aislamiento en Río verde, S.L.P. La distribución geográfica tanto de *ToSLCV* como de *ToGMoV* estaba restringida solo a Centroamérica de tal forma que este es el primer reporte sobre su presencia en nuestro país.

Aunado a lo anterior se confirma la caracterización parcial del componente B de *ToSLCV* y total del componente B de *ToGMoV* (GenBank acc. No. DQ406674) para los cuales no existía reporte alguno.

Con la caracterización de *RhGMV* en Honduras (Potter y col., 2000) y el reporte de su presencia infectando cultivos de tabaco en Chiapas, México (Ascencio-Ibañez y col., 2002) se comenzó a pensar que esta especie viral a la larga podría diseminarse e infectar cultivos de interés económico en nuestro país.

Se confirmo la caracterización total de una nueva cepa begomoviral aislada de una muestra de soya colectada en Sinaloa rotulada como Soya-1068, cepa que correspondió a la especie *RhGMV* denominada *RhGMV-Sinaloa* (GenBank acc. No. DQ347950). Una segunda cepa denominada *CdTV-Soybean* (GenBank acc. No. DQ347945) perteneciente a la especie *CdTV* se caracterizo parcialmente. El análisis de comparación entre las secuencias aisladas de Soya y las presentes en el GenBank mostró un 88.6% de similitud entre el genoma A de *RhGMV-Sinaloa* y el genoma A de *RhGMV-Honduras* (GenBank acc. No. AF239671); Un 89.2% de similitud entre los genomas A de *RhGMV-Sinaloa* y *RhGMV-Chiapas* (GenBank acc. No. AF408199), mientras que el genoma B de *RhGMV-Sinaloa* fue un 85% similar al genoma B de *RhGMV-Soybean* (GenBank acc. No. DQ356429). El genoma A completo de *CdTV-Soybean* (GenBank acc. No. DQ347945) mostró un 92.6% de similitud con el genoma A de *CdTV-[IC]* (GenBank acc. No. AF101476) y, se identifico una secuencia parcial (1330pb) perteneciente al genoma B de *CdTV-soybean*

La cepa *RhGMV-Sinaloa* amplía la distribución geográfica, el rango de hospederos y además, constituye el primer reporte del genoma B para esta especie viral. El *CdTV-Soybean* amplía su rango de hospederos naturales, que no incluía Leguminosas y se reporta por primera ocasión el genoma B parcial correspondiente a esta cepa viral.

La incidencia de *RhGMV* y *CdTV* sobre cultivos de Soya en Sinaloa se comprobó al caracterizar los genomas A y B de dos Begomovirus aislados a partir de una muestra de soya rotulada como Soya-1045, colectada en Sinaloa. El primer Begomovirus fue idéntico a *CdTV-Soybean* mientras que el segundo Begomovirus caracterizado

mostró ser divergente tanto de los *RhGMVs* aislados de Centroamérica como de *RhGMV-Sinaloa* en un 89% de similitud consolidándose como una nueva cepa denominada *RhGMV-Soybean*.

En las muestras de Soya se observó que no tiene que pasar mucho tiempo entre el descubrimiento y caracterización de una especie geminiviral presente en una maleza y su posterior aislamiento en plantas de interés económico, mientras que *CdTV-Soybean* pone de manifiesto el hecho de que una especie restringida a cierta maleza o cultivo puede encontrar en cualquier momento las condiciones favorables para ampliar su rango de hospederos.

El constante análisis de muestras sin discriminar entre malezas o cultivos de interés económico nos llevó a analizar una maleza conocida como *Rhynchosia minima* presente alrededor de un sembradío de Soya en Sinaloa y reconocida como un importante reservorio de begomovirus presente en múltiples ecosistemas de Latinoamérica. Identificamos y caracterizamos en su totalidad los genomas A y B pertenecientes a dos Begomovirus, el primero correspondía a *RhGMV-Sinaloa* (aislado con anterioridad de Soya-1068), mientras que el genoma A completo del segundo begomovirus mostró un 86.4% de similitud en secuencia con el genoma A de *CaLCuJamV clona pCRFA13*, su pariente más cercano (GenBank acc.No. DQ178612). El segundo begomovirus aislado de *Rhynchosia minima* se considera una nueva especie begomoviral tomando en cuenta los criterios taxonómicos actuales establecidos por el ICTV (Fauquet y Stanley, 2003, 2005) 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).

Tomando en cuenta lo obtenido a partir de la muestra de *Rhynchosia sp* adquirimos un interés especial por analizar malezas presentes en cultivos de soya en Sinaloa y logramos identificar una maleza perteneciente a la familia de las Malváceas denominada *Sida sp*. En primera instancia se aisló un begomovirus cuyo genoma A completo mostró una similitud mayor al 94% con el genoma A de *CdTV* resultando

una variante perteneciente de la especie *CdTV* que amplía el rango de hospederos naturales para esta especie viral. Posteriormente se realizó la caracterización genómica total de un segundo begomovirus considerado como una nueva especie debido a que su genoma A mostró un 87.2% de similitud con respecto al genoma A de *CdTV-[IC]* (GenBank acc. No. AF101476), su pariente más cercano. El análisis de los iterones de esta nueva especie denominada *SiMsinV* (GenBank acc. No. NC008059) indicó que son idénticos en secuencia a los presentados por otros virus lejanamente relacionados desde un punto de vista evolutivo, como *ToMoTV* (Cuba), *TYLCSV* (Europa) y *SACMV* (África). El descubrimiento de una nueva especie presente en una planta de *Sida sp* es un hecho que se correlaciona con su gran capacidad para actuar como un reservorio natural de begomovirus y con el hecho de que a partir de plantas de *Sida sp* se han aislado 10 nuevas especies begomovirales (Fauquet y Stanley., 2005).

El aislamiento y caracterización del genoma A de un begomovirus típico presente en los cultivos de Okra (De la Torre-Almaraz y col., 2006) cuya similitud en secuencia con su pariente más cercano (*SiYVV*; GenBank acc.No. Y11099) fue del 85.4%. El análisis de las secuencias iterónicas 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 se considera al begomovirus aislado de cultivos de Okra (*Abelmoschus esculentus L. Moench*) presentes en los estados de Guerrero y Morelos como una nueva especie denominada *Okra Yellow Mosaic México Virus* (*OYMMV*; GenBank acc. No. DQ022611). Posteriormente como uno de los objetivos planteados para este estudio se logró la caracterización del genoma B correspondiente a *OYMMV*, completando con esto su caracterización genómica.

El descubrimiento de nuevas especies begomovirales es producto del esfuerzo por establecer un registro sobre las poblaciones geminivirales presentes en nuestro país. La caracterización de estas nuevas especies virales puede aportar nuevas ideas sobre la evolución de estos patógenos así como establecer nuevos modelos de estudio que en un futuro nos permita identificar elementos genéticos con potencial biotecnológico.

Continuando con la recolección de malezas, pero ahora localizadas en sembradíos de Tomatillo, Tomate y Pepino localizados en Río verde, S.L.P. nos encontramos con una maleza denominada Mala Mujer (*Solanum rostratum*) cuya persistencia y prevalencia sobre otras malezas presentes en la región es superior. Como parte del lote de plantas de Mala Mujer analizado se identificaron 3 plantas afectadas por infecciones mixtas:

De la planta de mala mujer rotulada como MM1 se aislaron dos fragmentos correspondientes al genoma A de dos begomovirus. El primero corresponde a la región SL2060For / YMACRev que muestra una similitud del 93% con respecto a la misma porción correspondiente al genoma A de *PepGMV* (GenBank acc. No. AY368336) Mientras que el fragmento perteneciente al segundo begomovirus y que incluye la región WARFor / YMACRev fue un 91% similar con respecto a su región homóloga presente en el genoma A de *PHYVV* (GenBank acc. No. X70418). El hecho de encontrar esta mezcla de begomovirus infectando *Solanum rostratum* confirma que las infecciones mixtas provocadas por *PepGMV* y *PHYVV* son las más comunes en nuestro país llegando inclusive a infectar cultivos de importancia económica, tal es el caso de Chile, Tomate, Tomatillo y Tabaco (Ascencio-Ibañez y col., 2002; Torres-Pacheco y col., 1996).

A partir de la planta MM2 en primera instancia se aisló un fragmento de 1417 pb similar a la región SL2060For / YMACRev perteneciente al genoma A de *ToSLCV* (GenBank acc. No. AF130415) Confirmando la presencia de esta especie begomoviral en nuestro país y ampliando su rango de hospederos naturales. Un segundo fragmento que incluía la región WARFor / YMACRev fue caracterizado mostrando un 98% de similitud con la secuencia equivalente presente en *ToGMoV* (GenBank acc. No. DQ520943) Un begomovirus restringido a Centroamérica. Como parte de este estudio ya se había identificado a *ToGMoV* en Tomate de Río Verde S.L.P. confirmando con esto su presencia en México y ampliando el rango de huéspedes naturales para esta especie viral.

En el caso del extracto proveniente de la muestra MM3 se analizó un fragmento de 1417pb que correspondió a la región SL2060For / YMACRev similar con su región equivalente presente en *ToSLCV* (GenBank acc. No. AF130415). Posteriormente

aíslamos una segunda secuencia parcial de 1685 pb similar en un 94% con la región WARFor / YMACRev presente en el *ToChLPV* (Holguín y col., 2005). Se expandió el rango conocido de huéspedes y la distribución geográfica del *ToChLPV*.

El reporte sobre la presencia de una variante perteneciente a la especie *ToChLPV* en el estado de S.L.P. al poco tiempo de su descubrimiento en La Paz, B.C.S. (Holguín-Peña y col., 2005) indica que probablemente este begomovirus ya se encontraba en el estado de S.L.P. como una especie ampliamente distribuida entre malezas y que tal vez aun no ha encontrado las condiciones favorables para infectar tomate como lo hace en el estado de B.C.S. resaltando con esto la importancia de establecer un programa integral de diagnóstico no solo con nuevos y mejores métodos moleculares si no con brigadas de recolección cada vez mas extensas.

La muestra rotulada como MM4 fue analizada de manera rutinaria y después de obtener clonas de los productos de PCR amplificados con la combinación DGRSFor / YMACRev el análisis de restricción con las enzimas Hha1 y Msp1 indico la presencia de tres begomovirus diferentes, una variante denominada *PHYVV-SLP1* cuyo genoma A completo mostró una similitud del 96% con *PHYVV-Sinaloa* (GenBank acc. No. AY044162), el genoma A del segundo begomovirus fue 99% similar a *ToGMoV-SLP2* (GenBank acc. No. EF501976) y el tercer begomovirus resulto ser una variante (95% de similitud) de la especie *ToChLPV* denominada *ToChLPV-SLP2*. Posteriormente se obtuvieron clonas conteniendo fragmentos del genoma A amplificados con la combinación SL-2200Rev / YMACFor, los patrones de restricción indicaron la presencia de al menos 3 begomovirus, dos de ellos variantes de la especie *ToSLCV* [GenBank acc. No. AF130415 (*ToSLCV-SLP1* con un 97% de similitud y *ToSLCV-SLP2* con un 97% de similitud)] Mientras que el tercer begomovirus correspondió a *PepGMV* (GenBank acc. No. AF136404).

A pesar de que se ha resaltado la alta capacidad de las malezas para servir como reservorios naturales de begomovirus hasta la fecha no existen reportes sobre infecciones mixtas causadas por más de dos geminivirus, consolidando este caso en especial como un hecho sin precedentes en la literatura sobre geminivirus. En el caso planta MM4 es una clara muestra de que tan complicados pueden llegar a ser

el diagnóstico molecular y el descubrimiento de las interacciones entre los geminivirus presentes en infecciones mixtas.

La planta MM4 puede ser considerado como un nuevo modelo que nos ayude a comprender de una mejor manera la interacción entre estos virus y sus plantas hospederas. El hecho de haber encontrado solo el genoma B de dos de las cinco especies virales identificadas indica que aunque no hay presencia de pseudorecombinantes las proteínas codificadas por el componente B de *PHYVV* y *ToGMoV* son capaces de mover a través de la planta al componente A de *PepGMV*, *ToChLPV-SLP2*, de las dos variantes de *ToSLCV* (*ToSLCV-SLP1* y *ToSLCV-SLP2*).

La alta incidencia de infecciones mixtas diagnosticadas en plantas colectadas en los estados de Sinaloa y S.L.P. durante este estudio se debe en gran parte a la presencia de una amplia variedad de plantas arvenses portadoras de begomovirus, al aumento en las poblaciones de Mosquita Blanca biotipo B y a la diversidad de cultivos presentes en las zonas tropicales y subtropicales (Harrison y col., 1997; Sanz y col., 2000 y Torres-Pacheco y col., 1996) de tal forma que la presencia de *PepGMV* infectando por si solo cultivos de Tomatillo y Pepino constituye la excepción a la regla.

Desde el punto de vista fitopatológico el aspecto más importante de las infecciones mixtas es su capacidad para alterar la expresión de síntomas. Se ha demostrado que esta alteración es dependiente del huésped, por ejemplo cuando *PepGMV* y *PHYVV* coinfectan plantas de Chile se observa un efecto antagónico en el cual la agresividad de *PepGMV* se ve reducida produciendo hasta cierto punto un efecto benéfico pero cuando se encuentran presentes en Tabaco se observa un sinergismo que desencadena en síntomas devastadores (Méndez-Lozano et al., 2002) de tal modo que los estudios epidemiológicos representan una alternativa para entender de una mejor manera los mecanismos moleculares implicados en la interacción entre begomovirus coinfectantes y, entre estos últimos con sus hospederos naturales.

La constante incidencia del *CdTV-Soybean*, *RhGMV-Soybean* y *RhGMV-Sinaloa* en cultivos de soya presentes en Sinaloa así como de otras variantes y nuevas cepas es el más claro ejemplo sobre como los begomovirus 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 sus rango de hospederos naturales. Esta varibilidad genica 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 rearrreglo del ADN del componente A y B de aislamientos del mismo virus e inclusive entre especies geminivirales poco relacionadas (Hou y Gilbertson., 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 y col., 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 homologa, 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 homologa es el mecanismo clave para la aparición de nuevas formas de virus debido a que facilita el rearrreglo 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 pakistan (Harrison y col; 1997), tomate en Trinidad y Tobago (Umaharan y col; 1998), España e Italia (Noris y col; 1994), Cassava en Uganda (Deng y col; 1997) y Tanzania (Ndunguru y col; 2005), etc. producidas por virus recombinantes se ha incrementado por la presencia del *TYLCV*, un begomovirus monopartita, aislado en Israel (Navot y col., 1991) de manera que su probable interacción con begomovirus endémicos puede dar lugar al surgimiento de variantes virales altamente virulentas.

El método de diagnóstico e identificación de begomovirus desarrollado durante este ensayo, posee varias características que superan algunas de las limitaciones presentadas por los métodos de rojas y col, (1993), Wyatt y Brown (1996) y Monreal y col, (En proceso); y son las siguientes:

Cuenta con varios juegos de oligonucleótidos universales degenerados con los que se puede amplificar el genoma A de todos los begomovirus pertenecientes al linaje del *SLCV*. Las secuencias amplificadas nos proporcionan información suficiente sobre la identidad del begomovirus en cuestión. Principalmente las regiones SL2200-for / YMAC-rev, 2150For / YMAC-rev para el componente A y las regiones BC180-for / BV1-310Rev y BC1-290For / BV1-310Rev para el componente B. Estas regiones nos ayudan a identificar la diversidad de especies en 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 "SL" se sobrelapan facilitando la caracterización de genoma A de cada uno de los begomovirus pertenecientes al linaje del *SLCV* presentes en infecciones mixtas.

Es un método altamente eficiente para amplificar begomovirus pertenecientes al linaje del *SLCV*, muy comunes en Centroamérica, México y el sur de los Estados Unidos.

Incluye 6 iniciadores universales capaces de amplificar el genoma B completo de cualquier begomovirus bipartita. Los productos de PCR obtenidos se sobrelapan evitando con esto incertidumbre al momento de reconstruir el genoma B de begomovirus presentes en infecciones mixtas.

La interacción de nuestro método con el método diseñado por Monreal col, (En proceso) resulta en un sinergismo que facilita el diagnóstico y la caracterización genómica tanto de los begomovirus típicos como de los begomovirus pertenecientes al linaje del *SLCV*.

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 A de begomovirus pertenecientes al linaje del *SLCV* y del genoma B de cualquier begomovirus bipartita sin importar su origen geográfico.

CONCLUSIONES.

Se desarrolló una metodología molecular para la caracterización genómica de begomovirus, que mostró ser una herramienta poderosa para descubrir nuevas especies virales y detectar infecciones mixtas.

Se caracterizaron tres nuevas especies de begomovirus, dos de ellas con iterones que no se encuentran en ningún otro begomovirus conocido, cinco nuevas cepas y siete variantes (figura 18).

Se amplió el rango de hospederos naturales para cinco nuevas especies begomovirales dentro de las que destacan *PepGMV* infectando Tomatillo y Pepino, mientras que *RhGMV* y *CdTV* fueron encontradas infectando soya.

Se incremento la distribución geográfica de cinco especies begomovirales destacando la presencia de *ToSLCV* y *ToGMV* en nuestro país.

Se obtuvo la secuencia (nueve totales y una parcial) del genoma B de 10 begomovirus para los cuales no existía dato alguno.

El estudio reveló que las infecciones múltiples por begomovirus son extraordinariamente frecuentes en la naturaleza, y quizás sean más bien la regla que la excepción.

Se realizó el hallazgo en una maleza de una infección mixta que involucra 5 genomas A y 2 genomas B diferentes, una observación sin precedente en la literatura sobre geminivirus.

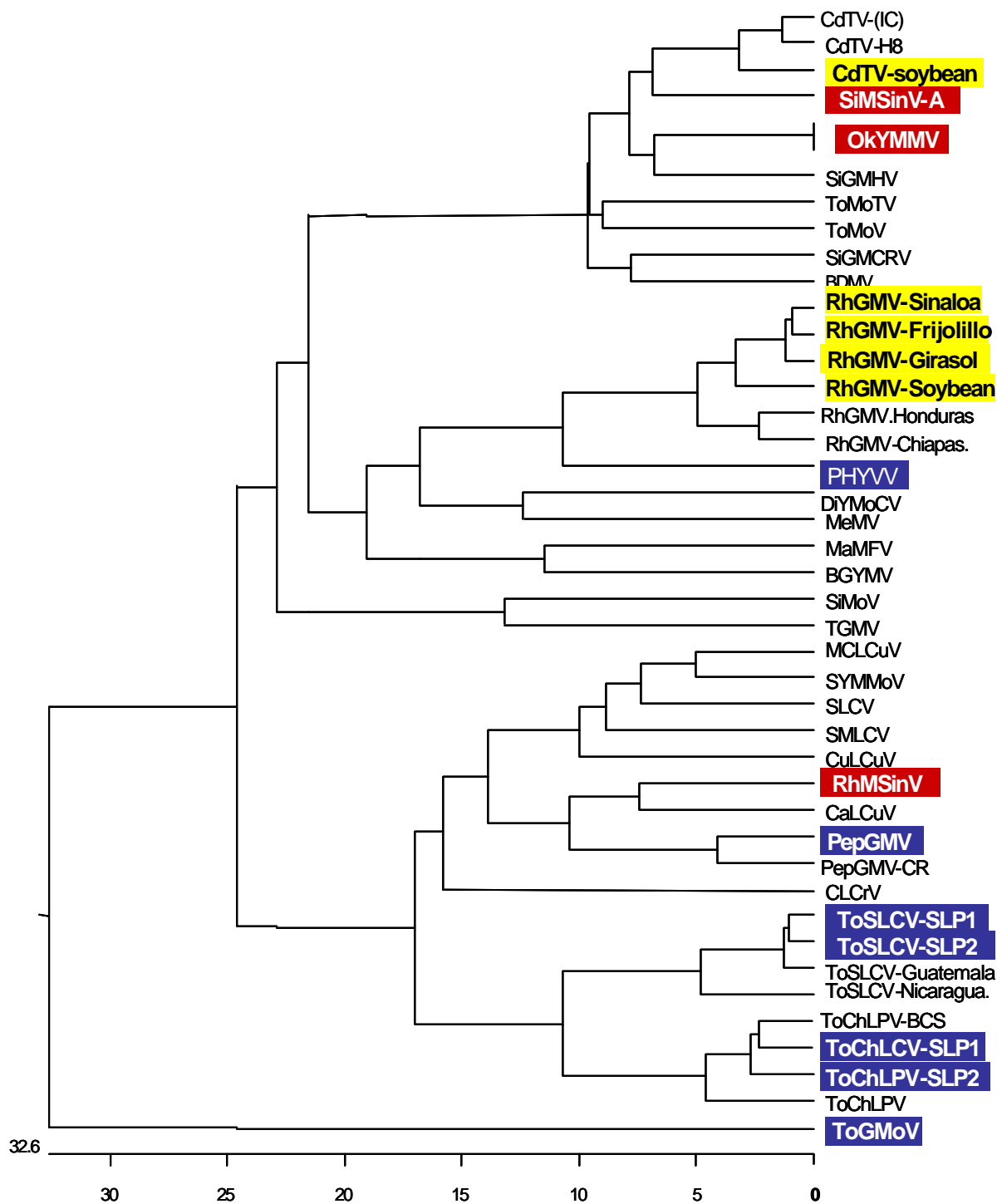


Figura 18.- Árbol filogenético que resume los resultados obtenidos durante este trabajo. Rojo nueva especie; Amarillo nueva cepa, azul nueva variante.

REFERENCIAS

- 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., and Rivera-Bustamante, R. (1994). Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Molecular Biology* 26: 553-556.
- Ascencio-Ibañez, J.T., Díaz-Plaza, R., Méndez-Lozano, J., Monsalve-Fonnegra, Z.I., Arguello-Astorga, G.R., and Rivera-Bustamante, R.F. 1999. First report of Tomato yellow leaf curl geminivirus in Yucatan, Mexico. *Plant Disease* 83(12):1178.
- Ascencio-Ibañez, J.T., Arguello-Astorga, G.R., Méndez-Lozano, J., and Rivera-Bustamante, R.F. 2002. First report of Rhynchosia golden mosaic virus (RhGMV) infecting tobacco in Chiapas, Mexico. *Plant Disease* 86:692.
- Atabekov, J. G., and Taliany, M. E. 1990. Expression of a plant virus-coded transport function by different viral genomes. *Adv. Virus Res.* 38:201-248.
- Bedford, I.D., Briddon, R.W., Brown, J.K., Rosell, R.C., and Markham, P.G. 1994. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* biotypes from different world regions. *Annals of Applied Biology* 125:311-325..
- Bird, J., and Maramorosch, K. 1978. Viruses and virus diseases associated with whiteflies. *Advances in Virus Research* 22:55-110.
- Bird J, Perez JE, Alconero R, Vakili NG, Melendez PL (1972) A whitefly-transmitted golden yellow mosaic of *Phaseolus lunatus* in Puerto Rico. *J Agric Univ P R* 56:64-74.
- Blancard, D. 1996. Enfermedades del tomate. Trad. del francés por Antonio Peña Iglesias. Mundi-Prensa. México 212 p.
- Boulton MI, Pallaghy CK, Chatani M, MacFarlane S, Davies JW. 1993. Replication of Maize Stalk Virus mutants in maize protoplasts : evidence for a movement protein. *Virology* 192: 85-93.
- 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., 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.
- Brown, J.K., and Nelson, M.R. 1988. Transmission, host range, and virus-vector relationships of Chino del tomate virus, a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, México. *Plant Disease* 72:866-869.
- Brown, J.K., and Poulos, B.T. 1990. Serrano golden mosaic virus: a newly identified whitefly-transmitted geminivirus of pepper and tomato in the United States and Mexico. *Plant Disease* 74:720.
- Brown, J.K., Idris, A.M., and Fletcher, D.C. 1993. Sinaloa tomato leaf curl virus, a newly described geminivirus of tomato and pepper in west coastal Mexico. *Plant Disease* 77:1262.
- 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., Ostrow, K.M., Idris A.M., and Stinger, D.C. 1999. Biotic, molecular, and phylogenetic characterization of bean calico mosaic virus species with affiliation in the Squash leaf curl virus cluster. *Phytopathology* 89:273-280.
- 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.
- 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., Idris, A.M., Alteri, C., Stenger, C. 2002. Emergence of a new Cucurbit-Infecting Begomovirus Species capable of forming Viable Reassortants with Related Viruses in the *Squash leaf curl virus* cluster. *Virology* 92:734-742
- Costa AS (1937) Nota sobre o mosaico do algodoeiro. *Ver Agric Piracicaba Bras* 12:453-470.
- Costa A S. Carvalho AM (1960b) Comparative studies between the Abulition and Euphorbia mosaic virus. *Phytopathol Z* 38: 129-152.
- Costa A S (1965) Three whitefly-transmitted diseases of beans in the state of Sao Paulo, Brazil. *FAO Plant Prot Bull* 13: 121:130.
- Costa A S (1976) Whitefly-transmitted plant diseases. *Ann Rev Phytopathol* 14:429-449.
- Crisanto-Gutierrez (2002) Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60, 219-230.
- Debrot E, Herold F, Dao F (1963) Nota preliminar sobre un "Mosaico amarillento del tomate" en Venezuela. *Agron Trop* 13:33-41.
- 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.
- Delatte, H., Dalmon, A., Rist, D., Soustrade, I., Wuster, G., Lett, J. M., Goldbach, R. W., Peterschmitt, M., y Reynaud, B. (2003). *Tomato yellow leaf curl virus can be acquired and transmitted by Bemisia tabaci* (Gennadius) from tomato fruit. *Plant Dis.* 87:1297-1300.
- Delgadillo, S.F., Garzón, J.A., y Vega, P.A. 1989. Cucurbit viruses in México: a survey. *Revista Mexicana de Fitopatología* 7:136-139.
- 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.
- Desbiez, C., David, C.H., Mettouchi, A., Laufs, J. and Gronenorn, B. 1995. rep protein of Tomato yellow leaf curl virus has an ATPase Activity required for DNA viral replication. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 92:5640:5644.
- Díaz-Plaza, R., Avilés-Baeza, W.I., Peña-Ramírez, R., and Rivera-Bustamante, R.F. 2002. Geminivirus detected in habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jac) in Yucatan Peninsula. *Proceeding of the 16th International pepper conference.* Tampico, Tamaulipas, México. November 10-12. pp. 69-70.
- Fauquet C.M., Bisaro D.M., Briddon R.W., Brown J.K., Harrison B.D., Rybicki E.P., Stenger D.C., and Stanley J. 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the *Geminiviridae*, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology* 148: 405-421.

- Flores E, Silberschmidt K, Kramer M (1960) Observações da clorose infecciosa das malváceas em tomateiros do campo. *B iologico* 26:65-69.
- 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.
- Fedorkin, O. N., Merits, A., Luccesi, J., Solovyev, A. G., Saarma, M., Morozov, S. Y., and Mäkinen, K. 2000. Complementation of movement-deficient mutations in potato virus X: Potyvirus coat protein mediates cell-to-cell trafficking of C-terminal truncation but not deletion mutant of potexvirus at protein. *Virology* 270:31-42.
- Fauquet, C. M., Bisaro, D. M. , Bridoon, R. W., Brown, J. K. , Harrison, B. D., Rybicki, E. P., Stenger, D. C. y Stanley, J. (2003). Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and updated list of begomovirus species. *Archiv. Virol.* 148:405-421.
- Fauquet, C. M. y Stanley, J. (2005). Revising the way we conceive and name viruses below the species level: A review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Archiv. Virol.* 150:2151-2179.
- Flock RA, Mayhew D (1981) Squas leaf curl, a new disease of cucurits in California. *Plant Dis* 65: 75-76.
- Gallegos, H. M. L. (1978). Enchinamiento del tomate (chino disease of tomato). In *Enfermedades de cultivos en el estado de Sinaloa*. Sinaloa, México. Secretaria Agric. Recursos Hidráulicos. p. 119.
- Garzón-Tiznado, J.A., Acosta-García, G., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M., Maya-Hernández, V., Guevara-González, R.G., y Rivera-
- Bustamante, R.F. 2001. Presencia de los geminivirus, huasteco del chile (PHV), texano del chile variante Tamaulipas (TPV-V), y chino del tomate (CdTV), en los estados de Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:45-52.
- Ghanin, M., Morin, S., Zeidan, M., and Czosnek, H. 1998. Evidence for transovarial transmission of Tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology* 240(2):295-303.
- González, G.R., y Cervantes, R.J. 1973. Enchinamiento de las plantas del tomate, enfermedad en observación y estudio en el Valle de Culiacán. *In: Primera reunión sobre plagas y enfermedades de las hortalizas en Sinaloa*. SAG, Culiacán, México, pp. 51-56.
- Gonzales AG, Valdés RS (1995) Virus del enchinamiento Amarillo de las hojas del tomate (TYLCV) en cua. *CEIBA* 36:103.
- 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. et al. (2002) Genus nanovirus. In *the Springer Index of Viruses* (Tidona, C.A. and Darai, G., eds), pp. 1272-1279, Springer
- Hanley-Bowdoin, L., Settlege, 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. 1985. Advances in geminivirus research. *Annual Review of Phytopathology* 23, 55-82.
- Harrison, B. D., Zhou, X., Otim-Nape, G. W., Liu, Y., and Robinson, D. 1997. Role of a novel type of double infection in the geminivirus induced epidemic of severe cassava mosaic in Uganda. *Ann. Appl. Biol.* 131:437-448.

- 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.
- Hehnle, S., Wege, C., Jeske, H. 2004. Interaction of DNA with Movement Proteins of geminiviruses Revisited. *Journal of virology*, July 2004, p. 7698-7706.
- 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.
- 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.
- Idris, A.M., Brown, J.K. 2004. *Cotton leaf crumple virus* Is a Distinct western Hemisphere Begomovirus Species with Complex Evolutionary Relationships Indicative of Recombination and Reassortment. *Virology* 94:1068-1073.
- 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.
- 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.
- Kong, L. J., B. M. Orozco, J. L. Roe, S. Nagar, S. Ou, H. S. Feiler, T. Durfee, A. B. Miller, W. Gruissem, 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.
- Kon, T., Dolores, M.L., Bajet, N.B., Hase, S., Takahashi, H., Ikegami, M. 2003. Molecular Characterization of a Strain of Squash leaf curl China Virus from the Philippines. *Revista y pag*
- Koonin, E.V., and Ilyina, T.V. 1992. Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA initiation proteins. *Journal of General Virology* 73: 2763 - 2766.
- 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.
- 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.

Leal RA, Quintero S (1989) Caracterización de una virosis del chile transmisible por mosquita blanca en la planicie Huasteca. *Rev Mex fitopatol* 7: 147-149.

López-Salinas E, Becerra EN (1994) El mosaico dorado del frijol: México sur. In: Morales fJ (ed) *ean goleen mosaic: 1994 Research Advances*. CIAT, Palmira, Colombia, pp 28-33

Matiz JC, Silva DM, Oliveira AR, Costa AS (1975) Purificacao e morfologia do virus do mosaico duorado do tomateiro. *Summa Phytopathol* 1: 267:274.

McGlashan D, polston JE, Bois D (1994) Tomato yellow leaf curl vírus in Jamaica. *Plant Dis* 78:1219

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(3): 270-277.

Morales, F.L. y Anderson P.K. (2001): Emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminivirus in Latin America. *Arch. Virol.* 146: 415:441.

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. 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, 2005.

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.

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.

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.

- 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.
- Pita, J. S., Fondong, V. N., Sangare, A., Otim-Nape, G. W., Ogwal, S., and Fauquet, C. M. 2001. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *J. Gen. Virol.* 82:655-665.
- Polston, J.E., Dodds, J.A., and Perring, T.M. 1989. Nucleid acids probes for detection and strain discrimination of cucurbit geminiviruses. *Phytopathology* 79:1123-1127.
- Polston, J. E., Bois, D., Serra, C. A., y Concepción, S. (1994). First report of tomato yellow leaf curl-like geminivirus from tomato in the Western Hemisphere. *Plant Dis.* 78: 887.
- Polston J (1998) The appearance of tomato yellow leaf curl in Florida and implication for the movement of this and other tomato geminiviruses. International Workshop on Bemisia and geminiviruses, San Juan, Puerto Rico.
- Potter, J.L., Roca de oyle, m.M., Nakhla, M.K., Maxwell, D.P. 2000. First report and characterization of rhynchosia golden mosaic virus in Honduras. *Plant Dis.* 84:1045.
- Revill, P.A., Ha, C.V., Porchun, M.T., Dale, J.L. 2003. The complete nucleotide secuencia of two distintc geminiviruses infecting cucurbits in Vietnam. *Arch. Virol.* 148:1523-1541.
- 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, A., Kvarnheden, A., and Valkonen, J.P.T. 2000. Geminiviruses infecting tomato crops in Nicaragua. *Plant Disease* 84:843-846.
- Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russell, D. R., y Maxwell, D. P. (1993). Use of degenerate primers in the polimerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminivirus. *Plant Dis.* 77: 340-347.
- Rojas MR, Noueir AO, Lucas WJ, Gilertson RL. 1998. Bean dwarf mosaic geminivirus mevement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell* 95:105:113.
- Rubinstein, G., and Czosnek, H. 1997. Long-term association of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. *Journal of General Virology* 78:2683-2689.
- 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
- Sambrook, J., y Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3^d ed. Cold Spring Habor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanz, A. I., Fraile, A., García-Arenal, F., Zhou, X., Robinson, D. J., Khalid, S., Butt, T., and Harrison, B. D. 2000. Multiple infection, recombination and genome relationship among begomovirus isolates found in cotton and others plants in Pakistan. *J. Gen. Virol.* 81:1839-1849.
- 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., Bedford, I. D., and Stanley, J. 2001. Pathogenicity of a natural recombinant associated with ageratum yellow vein disease: Implications for geminivirus evolution and disease etiology. *Virology* 282:38-47.
- Settlage, S. B., Miller A.B., Hanley-Bowdoin L. 1996. Interactions between

geminivirus replication proteins. *J. Virol.* 70:6790–6795.

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.

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.

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 vial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 8029 - 8033.

Stenger, D. C., Duffus, J. E. y Villalon, B. (1990). Biological and genomic properties of a geminivirus isolated from pepper. *Phytopathology* 80:704-709.

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.

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.

Torres-Pacheco, I., Guzmán-Maldonado, H., González-Chavira, M. 2002. Diagnosis of chilli pepper virus in Mexico. *Proceedings of the 16th Internacional Pepper Conference*. Tampico, Tamaulipas, Mexico. November 10-12.

Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J. A., Brown, J. K., Becerra-Flora,A., and Rivera Bustamante, R. F. 1996. Detection and Distribution of Geminiviruses in Mexico and 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.

Urbino, C. y Tassius, K. (2003). First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in Tomato in Guadeloupe. *Plant Dis.* 87: 1397.

Voinnet, O., Pinto Y.M., Baulcombe, D.C. 1999. Supression of gen silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 14147-14152.

Vonarnim A, Frischmuth T, stanley J. 1993. Detection and possible functions of africam cassava mosaic virus DNA B gene products. *Virology* 192: 264:272.

Wyatt, S. D., y Brown, J. K. (1996). Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86: 1288-1293.

Yang,Y., Sherwood, T. A., Patte, C. P., Hiebert, E., y Polston, J. E. (2004). Use of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) *Rep* gene sequences to engineer TYLCV resistance in tomato. *Phytopathology* 94:490-496.

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.