



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**GEMINIVIRUS EN TOMATE EN BAJA CALIFORNIA SUR:
IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

**Uso, Manejo, y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)**

P r e s e n t a

Ramón Jaime Holguín Peña

La Paz, B. C. S. Junio del 2004

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las ____ horas del día ____ del

Mes de _____ del 2004, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

Geminivirus en tomate en Baja California Sur: identificación, caracterización y epidemiología

Presentada por el alumno:

Ramón Jaime Holguín Peña

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Co-DIRECTOR DE TESIS

Dr. Rafael Francisco Rivera Bustamante
Co-DIRECTOR DE TESIS

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz
Co-TUTOR

Dr. Macario Bacilio Jiménez
Co-TUTOR

Dr. José Antonio Garzón Tiznado
Co-TUTOR

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Este trabajo se realizó en forma conjunta en las siguientes instituciones:

- 1) Laboratorio del Departamento de Biotecnología del Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste. La Paz, Baja California Sur.

Bajo la dirección del Dr. Ricardo Vázquez Juárez

- 2) Laboratorio de Virología Vegetal del Departamento de Ingeniería Genética del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato. Irapuato, Guanajuato

Bajo la dirección del Dr. Rafael Francisco Rivera Bustamante.

CONFORMACIÓN DEL COMITÉ

Esta tesis fue dirigida por:

Dr. Ricardo Vázquez Juárez	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Rafael F. Rivera Bustamante	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., Unidad Irapuato

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Ricardo Vázquez Juárez	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Rafael F. Rivera Bustamante	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., Unidad Irapuato
Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. José Antonio Garzón Tiznado	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Unidad de Biotecnología del Campo Experimental Valle de Culiacán.
Dr. Macario Bacilio Jiménez	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

El Jurado de Exáman de Grado estuvo integrado por:

Dr. Ricardo Vázquez Juárez	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Rafael F. Rivera Bustamante	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., Unidad Irapuato
Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Macario Bacilio Jiménez	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Roberto C. Vazqu�ez Ju�arez (suplente)	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

RESUMEN

Al estudiar la etiología de la enfermedad del “enchinado foliar” en el cultivo del tomate en Baja California Sur (BCS), se detectaron tres geminivirus no descritos y uno previamente reportado en México. Las pruebas de DAS-ELISA, la separación electroforética de la forma replicativa (FR) del ADN viral, los análisis de hibridación molecular y la amplificación por PCR nos indicaron que estos geminivirus tienen dos moléculas de ADN de cadena sencilla (bipartitas) y que pertenecen al género *Begomovirus*. Las reacciones de PCR fueron realizadas con iniciadores genéricos y específicos que amplifican los genes: AV1 (CP), AC1 (Rep), AC2 (TraP), AC3 (REn), incluyendo la región intergénica (RI). Los productos de PCR clonados y secuenciados se compararon por alineamientos locales (BLAST) usando como referencia los geminivirus de la base de datos del NCBI (GenBank). Las secuencias que produjeron las más altas identidades fueron comparadas por alineaciones múltiples en el programa MegAlign (DNASTAR) basados en la secuencia nucleotídica (nt) completa del componente A (ADN-A) o en un fragmento (RI-1.1 kb) que incluye la región amino terminal de Rep y CP, así como la RI. En el área de La Paz se detectó un geminivirus con un 73.8 % (nt) de identidad (ADN-A) con el virus del enrollamiento severo del tomate (*Tomato severe leaf curl virus*-ToSLCV) y un 83.8 % de identidad (RI-1.1 kb) con un geminivirus parcialmente caracterizado, tentativamente nombrado virus del jaspeado ligero del tomate (*Tomato mild mottle virus*, ToMMoV). En la misma región se encontró un geminivirus con un 98 % de identidad (RI-1.1 kb) con la variante de Tamaulipas del virus del mosaico dorado del chile (*Pepper golden mosaic virus*-PepGMV-[Tam]). En la región de el Calandrio se detectó un geminivirus con un 82.8 % de identidad (RI-1.1 kb) con el ToSLCV. Finalmente, en el Carrizal se detectó un geminivirus con la identidad más alta (90.2%) con el virus aislado de La Paz. Basados en los análisis de identidad, filogenia y estructura de iterones estos geminivirus fueron designados como: chino del tomate de La Paz (*Tomato chino de La Paz virus*-ToChLPV [AY339618]), chino del tomate de el Calandrio (*Tomato chino Calandrio virus*-TChCV [AY336088]) y chino del tomate de Baja California Sur (*Tomato chino Baja California Sur virus*-ToChBCSV [AY339619]). Los virus fueron experimentalmente inoculados por varios métodos, observándose diferentes eficiencias de transmisión (EfT). Mecánicamente se obtuvo una EfT de 35% y un 100% por biobalística y por injerto, mientras que por medio de mosquitas blancas (mb) se obtuvo una EfT del 65 al 83.3 %. Los síntomas observados en las plantas infectadas experimentalmente (arrugamientos foliares, mosaicos, enanismo y reducción de foliolos) fueron similares a los observados en infecciones naturales. El rango de hospedantes se encontró delimitado a la familia *Solanaceae*, donde el tomate y el chile son hospedantes naturales, mientras que el tomatillo (*Physalis ixocarpa*), toloache (*Datura discolor*) y tabaquillo (*Nicotiana glauca* [asintomática]) se encontraron como hospedantes alternos. Las poblaciones más altas de mb fueron registradas en junio (11 mb/hoja) coincidiendo con las altas incidencias (92-100%) de la enfermedad y altos niveles de severidad (9 en escala de 1-10). Se detectó la presencia de los biotipos A y B de *Bemisia tabaci*, transmisores específicos de estos geminivirus e involucrados con la enfermedad del “chino del tomate de BCS”.

Palabras clave adicionales: *Begomovirus*, *Bemisia* spp., virus de ADN de plantas.

ABSTRACT

In the aim to study the etiology of the tomato “chino” leaf curl disease in Baja California Sur (BCS) tomato crops, three new geminiviruses and one previously reported in Mexico were detected. DAS-ELISA, electrophoresis motility of DNA replicative form (RF), DNA hybridization and PCR assays, as well as, sequences analysis indicated that these geminivirus have two single-stranded DNA molecules (bipartite) and belong to the genus *Begomovirus*. PCR reactions were realized using specific and degenerate primers that target the AV1 (CP), AC1 (Rep), AC2 (Trap), AC3 (REn) genes, including the intergenic region (IR). Amplicons were cloned and sequenced and compared by local alignment (BLAST) to other geminiviruses and of the NCBI data base (GenBank). The nucleotide (nt) sequences with the highest scores were analyzed by multiple alignments using MegAlign (DNASTAR), based on the identities percentages of the complete DNA-A sequence, either in the fragment (IR-1.1 kb) that includes the amino termini region of Rep and CP as well as the IR. A geminivirus sharing a 73.8% nt identity (DNA-A) to *Tomato severe leaf curl virus* (ToSLCV) and 83.8% (IR-1.1 kb) to the partially characterized *Tomato mild mottle virus* (ToMMoV) was detected in La Paz. In the same region, a geminivirus sharing 98% (IR-1.1 kb) nt identity to *Pepper golden mosaic virus*-PepGMV Tamaulipas strain was found. An isolate from the Calandrio area shared 82.8% nt sequence identity (IR-1.1 kb) to ToSLCV. Finally, the geminivirus found in the Carrizal shared the highest nt identity (90.2%) to the La Paz isolate. Based on the nt identity, phylogeny and structural analysis of iterons these geminivirus were named: *Tomato chino La Paz virus*-ToChLPV (AY339618), *Tomato chino Calandrio virus*-TChCV (AY336088), and *Tomato chino Baja California Sur virus*-ToChBCSV (AY339619). These viruses were experimentally transmitted by several methods, being observed different transmission efficiency (TEf). By mechanical methods a TEf of 35% and 100% by grafting and biolistically methods were observed, whereas, a TEf of 65 to 83.3% by whiteflies (wf) were observed. The symptoms observed in the experimental infected plants (leaf curling, mosaic patterns, stunting and reduced leaf size) were similar from those observed in the field. The host range was found delimited to the family *Solanaceae*, where tomato and peppers were the natural hosts, whereas, green tomato (*Physalis ixocarpa*), jimsonweed (*Datura discolor*) and wild tobacco (*Nicotiana glauca* [asymptomatic]) were alternate hosts. The highest population density of wf was registered in June (11 wf/leaf), matching with the highest incidences (92% to 100%) and high severity levels (9 in a 1-10 scale) of the disease. *Bemisia tabaci* biotypes A and B, specific transmitter of these viruses and associated to the tomato leaf curl “chino” disease in BCS fields were detected.

Additional key words: *Begomovirus*, *Bemisia* spp., plant DNA viruses.

DEDICATORIA

A Dios....

A mis padres Ana María Peña y Ramón Holguín, por su educación recibida y por hacerme un hombre de bien.

A mis hermanos, Javier, Ana Rosa, Lilia Margarita y Luis Roberto, por compartir tantos momentos inolvidables.

A mis amigos de toda la vida....nostalgia pura !.

A mi esposa, Fernanda Lina Manzano Romero, por su apoyo, comprensión, su gran corazón, y su infinita paciencia para escucharme...aún sobre la tesis!

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo de la beca-crédito No. 95705.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR), por brindarme la oportunidad de la realización de esta investigación.

Al Dr. Rafael Francisco Rivera Bustamante, jefe del Departamento de Ingeniería Genética de Plantas del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato (CINVESTAV) por poner a mi disposición tiempo, espacio y reactivos del Laboratorio de Virología en mi estancia profesional y por aceptar ser parte de la dirección de este trabajo.

Al Dr. Ricardo Vázquez Juárez, por su confianza...aun en momentos críticos.

A mis tutores de tesis: Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz, Dr. Macario Bacilio Jiménez y al Dr. José Antonio Garzón Tiznado por su amable disponibilidad.

A quienes influyeron en mi entrenamiento técnico:

Meliza Gutiérrez (CIBNOR)

Esmeralda, Isabel, Edgar, Jimena, Bety (CINVESTAV)

Sergio Soto, UABCS.

A Edgar Rueda por su apoyo inicial y sus interesantes pláticas. A Samuel Ochoa, por su eficiencia como guía de muestreos y amigo. A la Dra. Maurilia Rojas, por la disposición de su laboratorio (UABCS). Al Dr. Gerardo Rafael Arguello Astorga, por su ayuda y sugerencias en el análisis de las secuencias obtenidas. A Juan Vega por su disposición del invernadero del área agrícola experimental. A las agrícolas de la región (Agrobatiz, Agrodulicias, PROCOVA, Invernaderos La Pequeña Joya, Agrobionova, Greenver, Sueño Tropical, Agrícola Lidia, Orgánicos Los Cabos) y pequeños propietarios por permitirme realizar los muestreos en sus campos.

Al personal y amigos de diferentes áreas y laboratorios del CIBNOR: Sergio Soto, Roberto Carlos, Valerie, Hever, Norma Ochoa, Alicia, Norma, Meliza, Marta Candelaria, Edilmar, Toño Luna, Carlos Ceseña, Ángel Campa, Martín Ramírez, Adrián Mungía, Lili Gama, Dariel, Alma, Martín, Neftali, Delia, Nacho, Vania, Esther, Ariel, Arturo Sánchez, Pedro Cruz, José Luis, Jesús Pérez Linares, Alberto Burgos, Cristina, Rubén Valles, Fabiola Arcos, Francisco y José Luis, Amaury Cordero, Erick, Laura Celis, Laura Rivera, Manuel, Roxana, Itzel, María de Jesús, Alfonso, Felipe Ascencio, Claudia López, Dra. Dimayuga, Ivan, Bernardo Murillo, José Luis García, Enrique Troyo, Juan Larrinaga, Luis Landa, Dra. Arevik, Dr. Levsky, Cristian, Karina, Cesar, Evelyn, Alfonso y Blanca. Personal de Computo e Información y posgrado: Manuel Melero, Horacio, Ana Maria, Tony, Esther, Aldo, Lety, Lupita, Bety, Osvelia, Claudia y Thelma. Edición: Ira y Olimpia

Al personal y amigos de diferentes áreas y laboratorios del CINVESTAV Irapuato, Laboratorio L-11: Esmeralda, Isabel, Edgar, Jimena, Juan Carlos, Salvador, Raúl Díaz, Diana, Sara, Rigo, Harumi, Julio, Lety Chon.

A mis amigos de siempre: Los Gómez Pérez, Keko, Popis, Ramón, Tavo, Armando, Julio Núñez, Héctor Huerta, Enrique Rosas y Juan Carlos Navarro y especialmente a Celia Hernández y Tuti Prieto (†).

ÍNDICE GENERAL

CONFORMACIÓN DEL COMITÉ.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE CUADROS.....	xiii
PREFACIO.....	xiv
ABREVIATURAS.....	xvi
ABREVIATURAS DE GEMINIVIRUS.....	xvii
I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE GEMINIVIRUS.....	1
1.2. GEMINIVIRUS EN MÉXICO.....	2
1.3. GEMINIVIRUS EN BAJA CALIFORNIA SUR.....	4
1.4. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS GEMINIVIRUS.....	8
1.5. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA FAMILIA <i>Geminiviridae</i>	9
1.6. ORGANIZACIÓN GENÓMICA.....	10
1.7. FUNCIONES GENÉTICAS.....	12
1.7.1. Replicación.....	12
1.7.2. Transcripción.....	14
1.7.3. Traducción.....	14
1.7.4. Control de Expresión Génica.....	15
1.8. MOVIMIENTO SISTÉMICO DE GEMINIVIRUS.....	15
1.9. SINTOMATOLOGÍA.....	16
1.10. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN.....	17
1.10.1. Adquisición.....	18
1.10.2. Inoculación.....	18
1.11. MOSQUITAS BLANCAS E IMPLICACIONES EPIDEMIOLÓGICAS.....	19
1.11.1. Clasificación de Biotipos.....	20
1.12. PROCESO DE INFECCIÓN Y CICLO VIRAL.....	21
1.13. MALEZA, COMO HOSPEDANTES DE GEMINIVIRUS.....	22
1.14. IDENTIFICACIÓN DE GEMINIVIRUS.....	23
1.15. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE GEMINIVIRUS.....	23
1.15.1. Purificación de ADN Viral.....	24
1.16. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS Y GEMINIVIRUS.....	25
1.17. MANEJO INTEGRADO DE GEMINIVIRUS.....	26
1.17.1 Variedades Resistentes a Geminivirus.....	27
JUSTIFICACIÓN.....	28
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVO GENERAL.....	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
ESTRATEGIA GENERAL.....	31

II MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.1. COLECTA DE CAMPO Y MANEJO DE MUESTRAS.....	33
2.2. DETECCIÓN DE MOSQUITAS BLANCAS.....	33
2.3. TRANSMISIONES EXPERIMENTALES.....	34
2.3.1. Transmisión por <i>Bemisia tabaci</i>	34
2.3.2. Transmisión Mecánica.....	34
2.3.3. Transmisión por Biobalística.....	35
2.4. EXTRACCIÓN DE ADN VIRAL Y ELECTROFORESIS.....	36
2.5. DETECCIÓN POR SEROLOGÍA (ELISA).....	36
2.6. HIBRIDACIÓN MOLECULAR.....	36
2.6.1. Hibridación Molecular no Radiactiva.....	36
2.6.2. Hibridación Molecular por Radioisótopos.....	37
2.6.3. Preparación de la sonda.....	37
2.7. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	38
2.8. CLONACIÓN.....	40
2.8.1. Ligación.....	40
2.8.2. Transformación de Células-Competentes.....	40
2.8.3. Transformación de Células Electro-Competentes.....	41
2.8.4. Extracción y Purificación de Plásmidos.....	41
2.9. RFLP.....	42
2.10. ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	42
2.11. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS.....	43
2.12. DISEÑO DE INICIADORES ESPECÍFICOS.....	43
2.13. DISTRIBUCIÓN DE GEMINIVIRUS.....	44
2.14. INCIDENCIA Y SEVERIDAD.....	44
2.15. RANGO DE HOSPEDANTES NATURALES.....	44
2.16. INFESTACIÓN Y DINÁMICA POBLACIONAL DE MOSQUITAS.....	45
2.17. IDENTIFICACION DE BIOTIPOS DE MOSCAS BLANCAS.....	46
2.17.1. Identificación por Morfología y Propiedades Biológicas.....	46
2.17.2. Identificación por PCR-RAPD.....	47
III RESULTADOS	48
3.1. COLECCIÓN DE MUESTRAS.....	48
3.2. SINTOMATOLOGÍA.....	48
3.2. TRANSMISIÓN EXPERIMENTAL.....	52
3.3. DETECCIÓN DE GEMINIVIRUS.....	54
3.4. DETECCIÓN POR SEROLOGÍA.....	54
3.5. HIBRIDACIÓN ADN-ADN.....	54
3.6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	57
3.7. CLONACIÓN.....	59
3.8. ANÁLISIS DE SECUENCIAS POR BLAST.....	60
3.9. ALINEAMIENTOS MULTIPLES POR MEGALIGN.....	62
3.10. MAPA GENÓMICO.....	69
3.11. ORGANIZACIÓN DE ITERONES.....	72
3.12. FILOGENIA.....	75
3.13. DISEÑO DE INICIADORES ESPECÍFICOS.....	80
3.14. DISTRIBUCIÓN DE GEMINIVIRUS.....	81
3.15. DIVERSIDAD GENÉTICA DE GEMINIVIRUS EN BCS.....	82
3.16. MEZCLAS VIRALES.....	83
3.17. RANGO DE HOSPEDANTES NATURALES.....	84
3.18. ÍNDICES DE PATOGENICIDAD Y FLUCTUACION POBLACIONAL DE MOSCAS.....	84
3.19. IDENTIFICACIÓN DE MOSQUITAS BLANCAS.....	89
3.19.1. Identificación por morfología y características biológicas.....	89
3.19.2. Identificación de biotipos por RAPD.....	89

IV DISCUSIÓN	91
4.1. ETIOLOGÍA DEL “ENCHINADO FOLIAR” DEL TOMATE DE BCS.....	91
4.2. SÍNTOMAS Y PRUEBAS DE TRANSMISIÓN.....	92
4.3. TÉCNICAS MOLECULARES PARA IDENTIFICACIÓN DE GEMINIVIRUS.....	95
4.4. ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	96
4.4.1. <i>Tomato chino La Paz virus</i> (ToChLPV).....	97
4.4.2. <i>Tomato chino Baja California Sur virus</i> (ToChBCSV).....	99
4.4.3. <i>Tomato chino Calandrio virus</i> (TChCV).....	101
4.4.4. <i>Pepper golden mosaic virus- Baja California Sur</i> (PepGMV-[La Paz]).....	102
4.5. FILOGENIA DE GEMINIVIRUS AISLADOS EN MÉXICO.....	104
4.5.1. <i>Pepper golden mosaic virus</i>	104
4.5.2. <i>Pepper huasteco yellow vein virus</i>	105
4.5.3. <i>Chino del tomate virus</i>	105
4.5.4. <i>Tomato leaf curl Sinaloa virus</i>	106
4.5.5. <i>Pepper mild tigre virus</i>	106
4.6. ANÁLISIS DE ITERONES.....	106
4.7. DISTRIBUCIÓN Y DETECCIÓN ESPECÍFICA DE GEMINIVIRUS EN BCS.....	107
4.8. HOSPEDANTES NATURALES.....	108
4.9. INCIDENCIA DE GEMINIVIRUS E INFESTACIÓN DE MOSQUITAS.....	109
4.10. BIOTIPOS DE MOSCAS PRESENTES EN BCS.....	110
CONCLUSIONES	112
PERSPECTIVAS	113
BIBLIOGRAFÍA	114
ANEXOS	130
Artículos en Extenso	
Notas Científicas y Resúmenes a Congresos	
Secuencias Depositadas en el GenBank	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la producción de tomate en la península de Baja California.....	6
Figura 2. Micrografía electrónica de partículas geminivirales.....	8
Figura 3. Organización genómica de los begomovirus bipartitas.....	11
Figura 4. Esquema de la región intergénica del componente A de un geminivirus bipartita.....	11
Figura 5. Esquema del proceso de infección geminiviral en la célula vegetal.....	22
Figura 6. Sitios de amplificación por PCR del genoma de un geminivirus bipartita típico.....	40
Figura 7. Componente A de los geminivirus de BCS, mostrando el sitio donde los iniciadores Específicos inician la amplificación de la CP.....	43
Figura 8. Síntomas asociados a infecciones por <i>Tomato chino la paz virus</i> (ToChLPV) en tomate en La Paz.....	49
Figura 9. Síntomas asociados a infecciones por <i>Tomato chino Baja California Sur virus</i> (ToChBCSV) en tomate en El Carrizal.....	50
Figura 10. Síntomas ocasionados por <i>Tomato chino Calandrio virus</i> (TChCV) en plantas de tomate tipo Roma (saladet) en la región de El Calandrio.....	51
Figura 11. Patrón electroforético en gel de agarosa del ADN de plantas infectadas, mostrando el ADN geminiviral en su forma replicativa (FR).....	54
Figura 12. Hibridación molecular para detección general y específica de geminivirus en BCS.....	56
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de productos de PCR utilizando iniciadores generales y específicos que amplifican diversas regiones del genoma de geminivirus.....	58
Figura 14. Selección y verificación de fragmentos clonados.....	60
Figura 15. Alineamientos múltiples de los primeros 170 nucleótidos de la región intergénica de los geminivirus más recurrentes en México.....	63
Figura 16. Alineamiento de la región aminoterminal de la CP de los geminivirus aislados en BCS.....	66
Figura 17. Alineamientos múltiples de los geminivirus detectados en BCS basados en la secuencia de aminoácidos de Rep.....	67
Figura 18. Porcentajes de identidad por alineamientos múltiples de varios geminivirus del género <i>Begomovirus</i>	68
Figura 19. Mapas genómicos de TChLPV y TChBCSV indicando la posición de los MLA de los genes que codifican para las proteínas Rep, TraP, REn, AC4 y CP.....	70
Figura 20. Alineamientos basados en las secuencias nucleotídicas de la región intergénica de los geminivirus aislados en BCS y secuencias de algunos motivos involucrados en la replicación.....	71

Figura 21. Representación esquemática de la organización genómica de la región intergénica de los geminivirus aislados en BCS.....	73
Figura 22. Agrupación y alineamiento de geminivirus basados en los motivos conservados de ≈ 8 nucleótidos (iterones) y en las características biológicas y moleculares de la región intergénica.....	74
Figura 23. Filograma de los geminivirus de BCS utilizando la secuencia nucleotídica completa del componente A de geminivirus bien caracterizados.....	76
Figura 24. Filograma de los geminivirus de BCS utilizando la secuencia de aminoácidos del gen asociado con la replicación AC1 (Rep) en comparación con otros geminivirus.....	77
Figura 25. Filograma de los geminivirus de BCS utilizando la secuencia de aminoácidos del gen de la cubierta proteínica AV1 (CP) en comparación con otros geminivirus.....	78
Figura 26. Filograma de los geminivirus de BCS utilizando la secuencia nucleotídica de la región intergénica (RI).....	79
Figura 27. Diseño de iniciadores específicos para detección de los geminivirus de BCS.....	80
Figura 28. Mapa de distribución de geminivirus en la región tomatera de Baja California Sur.....	81
Figura 29. Análisis por RFLP con enzimas de restricción específicas para la detección de geminivirus de diferentes regiones.....	82
Figura 30. Detección de mezclas virales en muestras procedentes de La Paz.....	83
Figura 31. Incidencia de PepGMV-La Paz y dinámica poblacional de mosquitas blancas (<i>Bemisia tabaci</i>) durante dos ciclos agrícolas en el cultivo del tomate.....	87
Figura 32. Análisis de biotipos de mosquitas blancas presentes en BCS por RAPDS.....	90

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Geminivirus más importantes detectados en México en el cultivo del tomate y chile.....	5
Cuadro 2. Eventos importantes de la presencia de geminivirus en México.....	7
Cuadro 3. Clasificación de geminivirus basada en la especificidad del hospedante, tipo de vector y estructura genómica.....	9
Cuadro 4. Iniciadores utilizados en las reacciones de PCR.....	39
Cuadro 5. Escala numérica propuesta para la evaluación de virosis por geminivirus en tomate.....	45
Cuadro 6. Escala numérica propuesta por Andreas-Serra (1996) de acuerdo al número de adultos de <i>B. tabaci</i> por planta.....	46
Cuadro 7. Regiones y localidades de Baja California Sur, donde se encontraron evidencias de geminivirus.....	52
Cuadro 8. Eficiencia de transmisión experimental de la enfermedad viral en varios hospedantes, utilizando diferentes métodos de inoculación.....	53
Cuadro 9. Amplificación por PCR utilizando iniciadores de amplio espectro y específicos para detección de geminivirus.....	57
Cuadro 10. Aislamientos y clones de El Carrizal y La Paz obtenidos a partir de la PCR	59
Cuadro 11. Nucleótidos secuenciados de cuatro aislamientos de geminivirus BCS.....	61
Cuadro 12. Porcentajes de identidad basados en la comparación de la secuencia nucleotídica.....	61
Cuadro 13. Porcentajes de identidad basados en la comparación de secuencia de aminoácidos del gen de la proteína de la cápside (AV1-CP).....	62
Cuadro 14. Nomenclatura provisional de las secuencias obtenidas, número de acceso al GenBank y número de referencia taxonómico del NCBI.....	62
Cuadro 15. Comparación de ToChLPV basados en la secuencia completa del componente A con otras secuencias de geminivirus del genero <i>Begomovirus</i>	64
Cuadro 16. Porcentaje de identidad de TChCV con otros geminivirus basados en la secuencia nucleotídica (Rep, RI y CP) y de aminoácidos.....	65
Cuadro 17. Distribución temporal de geminivirus en BCS durante dos ciclos agrícolas.....	85
Cuadro 18. Fluctuación poblacional de mosquitas blancas e incidencia de geminivirus durante 2002 y 2003 en muestreos realizados en La Paz.....	86
Cuadro 19. Fluctuación poblacional de mosquitas blancas de acuerdo a la altura de la planta y la dirección del viento.....	88

PREFACIO

Del presente trabajo de tesis doctoral se originaron las siguientes publicaciones:

1) Publicaciones en revistas internacionales con arbitraje.

Holguín-Peña, R.J., Vázquez-Juárez R., and Rivera-Bustamante, R.F. 2003. First report of a geminivirus associated with leaf curl in Baja California Peninsula tomato fields. *Plant Disease* 87(11):1397.

Holguín-Peña, R.J., Vázquez-Juárez, R., and Rivera-Bustamante R.F. 2003. *Pepper golden mosaic virus* affecting tomatoes crops in the Baja California Península, México, *Plant Disease* 88(2):221.

Holguín-Peña, R.J., Vázquez-Juárez, R., Mejía-Ruiz, C.H., Garzón-Tiznado, J.A., y Rivera-Bustamante, R.F. 2004. Geminivirus en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Baja California Sur, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* Vol. 22 (**En prensa**).

Holguín-Peña R.J., Vázquez-Juárez, R., y Rivera-Bustamante, R.F. 2004. Rango de hospedantes, incidencia y filogenia del virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) en Baja California Sur, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* Vol. 23 (**En prensa**)

Holguín-Peña, R.J., Vázquez-Juárez, R., and Rivera-Bustamante, R.F. *Tomato chino Calandrio virus*: Distribution and phylogeny of a new tomato begomovirus from Baja California sur, México. (**Sometido en Plant Disease**).

Holguín-Peña, R.J., Vázquez-Juárez, R. and Rivera-Bustamante, R.F. *Tomato chino La Paz virus*; biological and molecular evidence for a new whitefly-transmitted geminivirus of tomato in Baja California Sur, México. (**En preparación**)

Holguín-Peña, R.J., Vázquez-Juárez, R. y Rivera-Bustamante, R.F. Enfermedades geminivirales asociadas a la presencia de diferentes biotipos de *Bemisia tabaci* en BCS. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Nota fitopatológica (**En preparación**)

2) Trabajos en Congresos Internacionales

Arguello-Astorga, G.R., **Holguín-Peña, R.J.**, Monreal-Vargas, C.I., Méndez-Lozano, J., Ambriz-Granados, S.I, Rivera-Bustamante, R.F. and Alpuche-Solis, A.G. 2003. A PCR based method to discover new begomovirus species and produce gene expression cassettes with viral promoters. XI Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. 3-7 de noviembre 2003. Acapulco, Guerrero, México.

Arguello-Astorga, G.R., **Holguín-Peña R.J.**, Monreal-Vargas, C., Méndez-Lozano, J., Ambriz-Granados, S., Rivera-Bustamante, R.F., and Alpuche-Solís, A.G. 2004. Using evolutionary PCR to analyse begomovirus diversity and produce gene expression cassettes with viral promoters. 4th International Geminivirus Symposium. 2nd International ssDNA Comparative Virology Workshop. 15-20 Febrero 2004. Cape Town, Sudafrica. (P3-4)

3) Publicaciones en revistas de divulgación

Holguín-Peña, R.J., y Troyo-Dieguez, E. Manejo integrado del virus chino del tomate de La Paz y otros geminivirus que afectan tomate en Baja California Sur. (**En preparación**)

ABREVIATURAS

AC4	Gen y proteína de geminivirus, involucrados en la expresión de síntomas
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ADNed	Ácido desoxiribonucleico de cadena doble
ADNcs	Ácido desoxiribonucleico de cadena sencilla
ARN	Ácido ribonucleico
ATG	Codón de inicio de los marcos de lectura del código genético de geminivirus
BC1	Gen y proteína involucrados en el movimiento célula-célula
BLAST	(Basic Local Alignment Search Tool). Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico
BV1	Gen y proteína involucrados en el movimiento sistémico
CAT	Anticodón de inicio
CLE	(Conserved Late Element). Motivos conservados tardíos involucrados en la transcripción.
CNRDF	Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario
CP	Proteína de la cápside
DAS-ELISA	(Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Prueba inmunoenzimática con anticuerpos de doble sándwich.
DDBJ	(DNA DataBank of Japan). Banco de datos de ADN de Japón
DGSV	Dirección General de Sanidad Vegetal
EEC	Elemento Estructural Conservado
EfT	Eficiencia de transmisión
EMBL	(European Molecular Biology Laboratory). Laboratorio Europeo de Biología Molecular
EPP0	European and Mediterrean Plant Protection Organization (Organización Europea y del Mediterráneo para la protección de plantas)
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses (Comité Internacional en Taxonomía de Virus)
IMI	Índice Medio de Infestacion
kb	Kilo bases (1000 pb)
kDa	Kilodalton
M	Molar
mL	Mililitro
MLA	Marco de Lectura Abierto
mM	Milimolar
NCBI	(National Center for Biotechnology Information). Centro Nacional de Información Biotecnológica
ng	Nanogramos
nt	Nucleótidos
Ori	Origen de replicación
PAUP	(Phylogenetic Analysis Using Parsimony). Análisis filogenético usando parsimonia
pb	Pares de bases
PCR	(Polimerase Chain Reaction). Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PSI	Pounds/square inches (libras/pulg ²)
RAPD	(Randomly Amplified Polymorphic DNA). Amplificación al azar del ADN polimórfico
RC	Región Común
RCR	Replicación por Circulo Rodante
REn	(Replication Enhancer) Proteína asociada en la eficiencia de la replicación codificada por el gen AC3
Rep	Proteína asociada a la replicación codificada por el gen AC1
RFLP	(Restriction Fragment Length Polymorphism). Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
RI	Región Intergénica
rpm	Revoluciones por minuto
SARH	Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos
TraP	(Transcriptional activator). Proteína asociada a la activación transcripcional codificada por el gen AC2

ABREVIATURAS DE GEMINIVIRUS

Virus	Acrónimo	No. de acceso al GenBank
Determinados en este estudio		
<i>Tomato chino La Paz virus</i>	ToChLPV	AY339618
<i>Tomato Chino Calandrio virus</i>	TChCV	AY336088
<i>Tomato chino Baja California Sur virus</i>	ToChBCSV	AY339619
<i>Pepper golden mosaic virus-La Paz</i>	PepGMV-[La Paz]	AY368336
Del banco de datos del GenBank		
<i>Abutilon mosaic virus-Hawaii</i>	AbMV	U51137
<i>African cassava mosaic virus-Kenia</i>	ACMV-KE	J02057
<i>Bean calico mosaic virus</i>	BCaMV	AF110189
<i>Bean golden mosaic virus-Guatemala</i>	BGMV-GA	M91604
<i>Bean golden yellow mosaic virus-México</i>	BGYMV	AF173555
<i>Cabbage leaf curl virus</i>	CaLCuV	U65529
<i>Chino del tomate virus</i>	CdTV	AF101476
<i>Cotton leaf crumple virus</i>	CLCrV	AF335426
<i>Cucurbit Leaf Curl Virus</i>	CuLCuV	AF224760
<i>Maize streak virus</i>	MSV	AF329885
<i>Melon chlorotic mosaic virus</i>	MCLCuV	AF325497
<i>Melon chlorotic leaf curl virus</i>	MCLCuV	AF325497
<i>Pepper golden mosaic virus- Tamaulipas</i>	PepGMV	AF077025
<i>Pepper huasteco yellow vein virus-Sinaloa</i>	PHYVV	AY044162
<i>Pepper mild tigré virus</i>	PepMTV	AF058023
<i>Potato yellow mosaic virus</i>	PYMV	D00940
<i>Rhynchosia golden mosaic virus</i>	RhGMV	AF239671
<i>Sida golden mosaic Honduras virus</i>	SiGMHV	Y11098
<i>Sida yellow mosaic virus</i>	SiYMV	AY090558
<i>Squash leaf curl virus</i>	SLCV	M38183
<i>Squash mild leaf curl virus</i>	SMLCV	AF421552
<i>Squash yellow mild mottle virus</i>	SYMMoV	AY064391
<i>South African cassava mosaic virus</i>	SACMV	AF155807
<i>Tomato geminivirus (Nicaragua)</i>	Sin nombre	AJ277061
<i>Tomato golden mosaic virus</i>	TGMV	K02029
<i>Tomato leaf curl virus</i>	ToLCV	AF084007
<i>Tomato leaf curl Sinaloa virus</i>	ToLCSinV	AF110516
<i>Tomato mild mottle virus</i>	ToMMoV	AF131071
<i>Tomato mosaic Barbados virus</i>	ToMBV	AF213013
<i>Tomato mosaic Habana virus</i>	ToMHV	Y14874
<i>Tomato mosaic Barbados virus</i>	ToMBV	AF213014
<i>Tomato mottle Taino virus</i>	ToMoTV	AF012300
<i>Tomato mottle virus-Florida</i>	ToMoV	L14460
<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	ToRMV	AF291705
<i>Tomato severe leaf curl virus-Guatemala</i>	ToSLCV	AF130415
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	TYLCV	X15656
<i>Tomato yellow mosaic virus</i>	ToYMoV	AF150742
<i>Tomato etch virus</i>	TEV	Ref.
<i>Tobacco mosaic virus</i>	TMV	Ref.
<i>Lettuce infectious yellows virus</i>	LIYV	Ref.
<i>Tomato infectious yellows crinivirus</i>	TIYCV	Ref.

NOTA: Ref= Secuencia no utilizada en los alineamientos múltiples, pero referida en el texto. En negritas, especies aceptadas por el ICTV. En letras normales, especies tentativa

I INTRODUCCIÓN

La región hortícola de la península de Baja California con una superficie cultivable de aproximadamente 10000 ha, es considerada como altamente tecnificada, donde más del 90% de la producción está destinado a exportación a los mercados de Estados Unidos y Canadá. (The Tomato Magazine, 1997). El cultivo del tomate en el estado de Baja California Sur (BCS) se encuentra entre los primeros cinco cultivos de hortalizas con más superficie cosechada por año entre 1993 y 1998. Durante ese período, el promedio del volumen de producción estatal fue de 310,000 toneladas. Además, Baja California Sur estuvo entre los primeros cinco estados con más superficie programada (1500 ha) para la siembra de tomate durante el ciclo otoño-invierno 2000-2001. (SEFOA, 2004). Según datos del censo del 2000 del Programa Nacional de Jornaleros Agrícolas (PRONJAG), existen alrededor de 20 mil jornaleros en la entidad que constituyen la mano de obra agrícola. Por otro lado, al igual que en otras regiones de la península, la mayor parte de la producción se destina a la exportación con lo que se generan importantes entradas de divisas al país. Además, la importancia de este cultivo se manifiesta también en la economía local por el alto consumo de insumos agrícolas. Los sistemas de producción en la península se consideran altamente tecnificados, contando con sistemas irrigación por goteo, fertirrigación automatizada, acolchados plásticos y manejo integrado de plagas y enfermedades (The Tomato Magazine, 1997). Sin embargo, uno de los factores limitantes más importantes en la rentabilidad de este cultivo es la presencia de enfermedades, sobre todo las de origen geminiviral, las cuales cada día están cobrando más importancia en todas las regiones hortícolas del mundo entero.

1.1. DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE GEMINIVIRUS

Los geminivirus se distribuyen principalmente en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, especialmente en las regiones mediterráneas, sudeste Asiático, Medio Oriente y África tropical, donde en las últimas décadas se ha convertido en un factor

limitante en la producción de tomate. Los síntomas se caracterizan por clorosis (amarillamientos), rizado de folíolos y enanismo de plantas. La incidencias de enfermedades geminivirales en América es relativamente reciente (Brown, 1990), presentándose el primer reporte de una enfermedad de este tipo en Brasil, a principios de 1960. El agente causal encontrado fue el virus del mosaico dorado del tomate *Tomato golden mosaic virus*-TGMV (Hamilton *et al.*, 1981). Hasta los 80 los únicos geminivirus determinados como causantes de infecciones en tomate en América fueron el TGMV en Brasil (Hamilton *et al.*, 1984), el virus del mosaico amarillo del tomate *Tomato yellow mosaic virus*-ToYMoV en Venezuela (Anzola y Lastra, 1985) y el chino del tomate *Chino del tomate virus*-CdTV en México (Brown y Nelson, 1988). A partir de ahí fue cuando comenzaron a aparecer epidemias de geminivirus en tomate en varias zonas tropicales del continente americano (Polston *et al.*, 1994), incluyendo el Caribe (Brown y Bird, 1992), Centroamérica (Nakhla *et al.*, 1994) y Norteamérica (Brown y Bird, 1992). Por las pérdidas ocasionadas en el cultivo del tomate y por la importancia epidemiológica de la relativa cercanía geográfica, tiene especial importancia la presencia de epifitias en Florida, EUA (Simone *et al.*, 1990; Schuster *et al.*, 1991; Abouzid *et al.*, 1992), Sinaloa y Tamaulipas, México (Brown y Nelson, 1988; Garzón-Tiznado *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1993; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Por otro lado, en casi toda América se están incrementando los reportes de aparición de nuevas enfermedades de supuesta etiología geminiviral, que están infectando cultivos de importancia comercial como: tomate, chile, calabaza, tabaco, algodón, yuca, frijol y papa, entre los más importantes (Polston y Anderson, 1997).

1.2. GEMINIVIRUS EN MÉXICO

Los geminivirus son unos de los patógenos más devastadores del cultivo del tomate, pudiendo ocasionar pérdidas totales, sobre todo cuando se presentan altas infestaciones de mosquitas blancas (*Bemisia tabaci* Gennadius), la cual es el vector transmisor de geminivirus, principalmente del genero *Begomovirus* (Simone *et al.*, 1990; Brown y Bird, 1992). En México, se ha estudiado con énfasis las enfermedades causadas por geminivirus en los cultivos de chile y tomate debido a que estos se encuentran en la mayoría de las áreas

hortícolas del país, y al parecer, existe un gran número de enfermedades en varios cultivos causadas por geminivirus que aún no se han caracterizado (Brown y Nelson, 1988; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Los geminivirus aislados o detectados en México en el cultivo del chile y tomate se presentan en el cuadro 1. Entre los más importantes por su distribución se encuentran el virus del mosaico dorado del chile *Pepper golden mosaic virus*-PepGMV y el virus huasteco del chile *Pepper huasteco yellow vein virus*-PHYVV (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Garzón-Tiznado *et al.*, 2001). El virus de la hoja enrollada del tomate de Sinaloa *Tomato leaf curl Sinaloa virus*-ToLCSinV y CdTV se han encontrado principalmente en Sinaloa (Brown y Nelson, 1988; Idris *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 2000). Tiene especial importancia la detección en Yucatán del virus del encrespamiento amarillo de las hojas del tomate *Tomato yellow leaf curl virus*-TYLCV, llegado de El Caribe (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 1999) y el cual se encuentra enlistado como plaga cuarentenada en Europa y la región mediterránea, región de donde se originó (Navot *et al.*, 1991). Recientemente en los estados de Yucatán, Campeche y Quintana Roo se detectaron los virus; moteado del tomate *Tomato mottle virus*-ToMoV, moteado Taino del tomate *Tomato mottle Taino virus*-ToMoTV, mosaico dorado del frijol *Bean golden mosaic virus*-BGMV y al virus del mosaico dorado del tomate *Tomato golden mosaic virus*-TGMV en el cultivo de chile tipo habanero (Díaz-Plaza *et al.*, 2002). Por otro lado en el Valle del Mayo (Sonora) se ha detectado el virus de la hoja enrollada (*Squash leaf curl virus*-SLCV) en el cultivo de la calabaza (Delgadillo *et al.*, 1989). En el cuadro 1 se presentan los geminivirus más importantes en detectados en México a la fecha. El estudio de los geminivirus es cada vez más complejo y complicado en razón de la presencia de complejos virales (Mansoor *et al.*, 2003), aunado a un rango de hospedantes cada vez más amplio y a la presencia de biotipos diferentes de mosquitas (Bedford *et al.*, 1994; Rosell *et al.*, 1997). Por otro lado, existen varios virus parcialmente caracterizados, lo que a veces hace difícil establecer parentescos filogenéticos bien definidos. La emergencia de enfermedades geminivirales ha sido asociada a la evolución de las poblaciones de mosquitas blancas, particularmente con la dispersión de *B. tabaci* en áreas tropicales. Con respecto al insecto vector se han determinado variantes o especies muy relacionadas con *B. tabaci* a los que se les ha llamado biotipos. Aunque estos biotipos coexisten juntos en la mayoría de los agrosistemas de América, existen diferencias

importantes por las implicaciones epidemiológicas que cada una ocasiona. En zonas tropicales y sub-tropicales, por ejemplo, la problemática se ha acrecentado debido a que las condiciones climáticas han incrementado las poblaciones de mosquitos blancos, sobre todo la del biotipo B, la cual se considera más agresiva que los biotipos endémicos de América (biotipo A). El biotipo B se ha adaptado y establecido bien en grandes extensiones debido al posible desarrollo de resistencia a insecticidas, alta tasa reproductiva y fuerte adaptación a diferentes familias de plantas, principalmente solanáceas (Brown *et al.*, 1990; Costa *et al.*, 1991).

1.3. GEMINIVIRUS EN BAJA CALIFORNIA SUR

A pesar de la alta tecnificación en los sistemas de producción de la península, los problemas de virosis se han presentado en forma recurrente. En las regiones hortícolas de la región sur de Baja California en muestreos preliminares, se detectaron plantas de tomate con sintomatología típica de infecciones geminivirales, además, de observar la presencia de altas poblaciones de mosquitos blancos (conocido vector de geminivirus). Posteriores diagnósticos en el Valle de El Carrizal (Agrícola Agrodulcías), evidenciaron la presencia de geminivirus (Laboratorio de Diagnóstico Fitopatológico del Campo experimental Valle de Culiacán). Los problemas con éste tipo de patógenos está ahora extendido en toda la península, principalmente en las regiones tomateras más importantes como; San Quintín, Vizcaíno y La Paz (Fig. 1). Los reportes de enfermedades geminivirales para la península de Baja California ha sido solamente para algunos virus cosmopolitas como los detectados en el Valle de Santo Domingo, localidad ubicada aproximadamente a 200 km al norte de La Paz, donde se reportó la presencia del virus jaspeado del tabaco *Tobacco etch virus*-TEV y el virus del mosaico del tabaco *Tobacco mosaic virus*-TMV (SARH, 1986; Cortéz-Mondaca, 1994). De forma sorprendente, los reportes de incidencias de enfermedades virales son escasos, imprecisos y limitados en información, sobre todo en lo concerniente a geminivirus, donde la información disponible es prácticamente nula.

Cuadro 1. Geminivirus más importantes detectados o aislados en México en el cultivo del tomate y chile.

Virus ¹	Sinónimos
CdTV	Se aísla en Sinaloa (Brown y Nelson, 1988). En 1994 se caracteriza el Tomato leaf crumple virus-TLCrV (Paplomatas <i>et al.</i> , 1994), hoy conocida como variante del CdTV
PepMTV	Se aísla en Tamaulipas, México (Brown <i>et al.</i> , 1989). Está propuesta como especie tentativa (ICTV)
PepGMV	Se detecta por primera vez en 1987 en Texas. Conocido originalmente como Texas pepper geminivirus-TPGV (Stenger <i>et al.</i> , 1990). El mismo año se identifica al Serrano golden mosaic virus-SGMV (Brown y Poulos, 1990), hoy conocida como una variante del PepGMV. En 1995 se aísla el Pepper jalapeño virus-PJV (Arguello-Astorga <i>et al.</i> , 1994b), hoy conocido también como una variante del PepGMV.
PHYVV	Se aísla en Tamaulipas. Anteriormente conocido como Pepper huasteco virus-PHV (Garzón-Tiznado <i>et al.</i> , 1993)
ToLCSinV	Se aísla en Sinaloa (Brown <i>et al.</i> , 1993). Anteriormente referido como Sinaloa tomato leaf curl virus-STLCV (Idris y Brown, 1998). Propuesta como nueva especie por el ICTV.
TYLCV	Se aísla originalmente en Israel (Navot <i>et al.</i> , 1991). Detectado recientemente en Yucatán, México (Ascencio-Ibáñez <i>et al.</i> , 1999).
ToMoTV	Se aísla en Cuba (Ramos <i>et al.</i> , 1997). Anteriormente referido como Taino tomato mottle virus-TTMoV. Detectado en Chile en México (Díaz-Plaza <i>et al.</i> , 2002).
ToMoV	Se aísla en Florida, EUA (Abouzid <i>et al.</i> , 1992). Detectado en Yucatán (Garrido-Ramírez y Gilbertson, 1998) y en Chile habanero en el sureste de México (Díaz-Plaza <i>et al.</i> , 2002).

¹ CdTV= *Chino del tomate virus*, TLCrV= *Tomato leaf crumple virus*, PepMTV= *Pepper mild tigre virus*, PepGMV= *Pepper golden mosaic virus*, SGMV= *Serrano golden mosaic virus*, PJV= *Pepper jalapeño virus*, TPV= *Texas pepper virus*, PHYVV= *Pepper huasteco yellow vein virus*, ToLCSinV= *Tomato leaf curl Sinaloa virus*, TYLCV= *Tomato yellow leaf curl virus*, ToMoTV= *Tomato mosaic Taino virus*, ToMoV= *Tomato mottle virus*. Nombres en cursivas corresponden a especies bien definidas de acuerdo al ICTV.

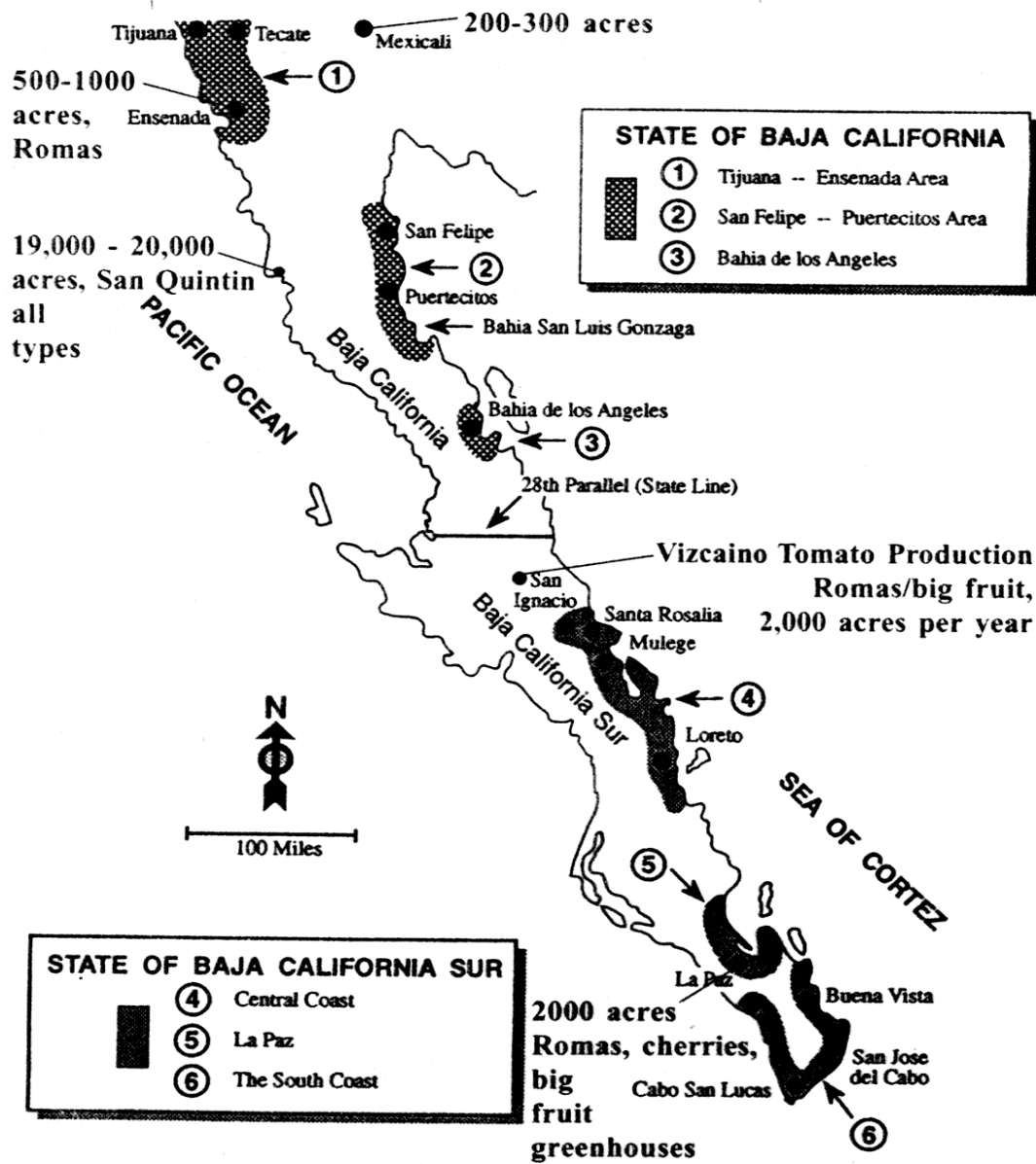


Figura 1. Distribución de la producción de tomate en la península de Baja California. Mexicali= 150 ha, Ensenada= 400 ha, San Felipe= 200 ha, San Quintín 9000 ha, Vizcaino 800 ha, Costa Sur de BCS= 1000 ha. (The Tomato Magazine, 1997).

En el cuadro 2 se presentan los eventos más relevantes de las cuatro últimas décadas en cuanto a la presencia de enfermedades geminivirales en México.

Cuadro 2. Eventos importantes de la presencia de enfermedades geminivirales en México.

Año	Evento
1973	Presencia de “enchinamientos” en tomate en Sinaloa (González y Cervantes, 1973).
1982	Se presentan en Tamaulipas serias epifitias ocasionadas por el síndrome “rizado amarillo del chile” (Garzón, 1987).
1984	El síndrome de la enfermedad del “chino” es estudiado por técnicas de microscopia y es asociado a infecciones por geminivirus. (Brown y Hine, 1984).
1985	Presencia del síndrome “planta atigrada” en Puebla en chiles tipo serranos. (Garzón-Tiznado y Galindo-Alonso, 1985).
1988	Identificación del CdTV en frijol en Sinaloa (Brown y Nelson, 1988).
1989	Identificación del PepMTV en chile como agente causal de la “planta atigrada” y donde al parecer está involucrado también CdTV (Brown <i>et al.</i> , 1989).
1990	Identificación del Texas pepper geminivirus-TPGV en Río Grande Valley, Texas (Stenger <i>et al.</i> , 1990). Hoy conocido como PepGMV.
1990	Se realizan transmisiones mecánicas del SGMV en chiles serranos en Sinaloa (Brown y Poulos, 1990). Aunque presenta algunas propiedades biológicas distintas hoy en día se considera una variante del PepGMV (anteriormente TPV).
1990	Presencia de epidemias de origen geminiviral en tomates y chiles Florida (Simone <i>et al.</i> , 1990; Gilbertson <i>et al.</i> , 1991).
1992	Identificación del ToMoV en Florida (Abouزيد <i>et al.</i> , 1992).
1993	Detección en Sinaloa del STLCV (Brown <i>et al.</i> , 1993). Hoy conocido como ToLCSinV.
1993	Secuenciación completa del Pepper huasteco virus-PHV como agente causal del “rizado amarillo” (Torres-Pacheco <i>et al.</i> , 1993; Garzón-Tiznado <i>et al.</i> , 1993). Hoy conocido como PHYVV.
1993	PHV es encontrado involucrado en la enfermedad de la “planta atigrada” (Garzón-Tiznado <i>et al.</i> , 1993).
1994	Identificación del Tomato leaf crumple virus- TLCrV en tomate en Culiacán, Sinaloa (Paplomatas <i>et al.</i> , 1994). Hoy considerado como una variante de CdTV.
1994	Identificación del Pepper jalapeño virus-PJV, aislamiento relacionado con el TPV (Arguello-Astorga <i>et al.</i> , 1994). Hoy considerada como una variante del PepGMV.
1995	Detección de interacción entre PHV y PJV, asociado a la enfermedad del “rizado amarillo” (Torres-Pacheco <i>et al.</i> , 1996).
1996	Detección de geminivirus en México y suroeste de Estados Unidos. PHV (Tamaulipas, Sinaloa, Guanajuato y Quintana Roo); CdTV (Sinaloa, Chiapas, Morelos, Tamaulipas); PJV-TPV (Sinaloa, Michoacán, Colima) (Torres-Pacheco <i>et al.</i> , 1996).
1997	Identificación del ToMoTV en tomate en Cuba (Ramos <i>et al.</i> , 1997).
1999	Detección de TYLCV y ToMoV en tomate en Yucatán. (Ascencio-Ibáñez <i>et al.</i> , 1999).
1999	Detección de CdTV y PHV en tomates de invernadero en Sonora. (Idris <i>et al.</i> , 1999).
2000	Detección de PepGMV en tomate-Costa Rica (Lotrakul <i>et al.</i> , 2000).
2001	Detección de PHV, TPV (PepGMV-[Tam]) y CdTV en chile en Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí. (Garzón- Tiznado <i>et al.</i> , 2001).
2002	ToMoV en chile en el sureste de México (Díaz-Plaza <i>et al.</i> , 2002).
2002	ToMoTV en chile en el sureste de México (Ramos <i>et al.</i> , 1997; Díaz-Plaza <i>et al.</i> , 2002).
Determinados en este trabajo	
2003	Detección de un aislamiento muy relacionado con el ToSLCV (Holguín-Peña <i>et al.</i> , 2003). Recientemente referido como Tomato chino Calandrio virus-TChCV
2003	Detección del PepGMV en La Paz, BCS (Holguín-Peña <i>et al.</i> , 2004a; Holguín-Peña <i>et al.</i> , 2004c).
2004	Identificación del ToChLPV y ToChBCSV como agentes causales del “enchinado foliar del tomate” de La Paz y El Carrizal, respectivamente (Holguín-Peña <i>et al.</i> , 2004b).

1.4. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS GEMINIVIRUS

Este tipo de virus están constituidos por ácidos nucleicos y proteínas que se propagan solo en el interior de células vivas y que tienen la capacidad de producir una enfermedad. Estos pueden ser de ácido ribonucleico (ARN) o de ácido desoxiribonucleico (ADN). En la mayoría de los virus vegetales este material genético está cubierto por una cápside proteínica. En el caso de los virus con genoma formado por ADN, este puede ser de cadena sencilla o de cadena doble. De todos los virus que tienen ADN como genoma, los virus de cadena sencilla son, por mucho, los más importantes desde el punto de vista agrícola. Dentro de este grupo se encuentran los geminivirus, los cuales se encuentran entre los patógenos más importantes que infectan al cultivo del tomate (Agrios, 1997). Bird y Maramorosch (1978) establecieron la inusual estructura de los geminivirus, con su par de cápsulas isométricas de 20 x 30 nm geminadas, las cuales se ven como dos icosaedros fusionados, rasgo único que caracteriza a este grupo de virus (Fig. 2).

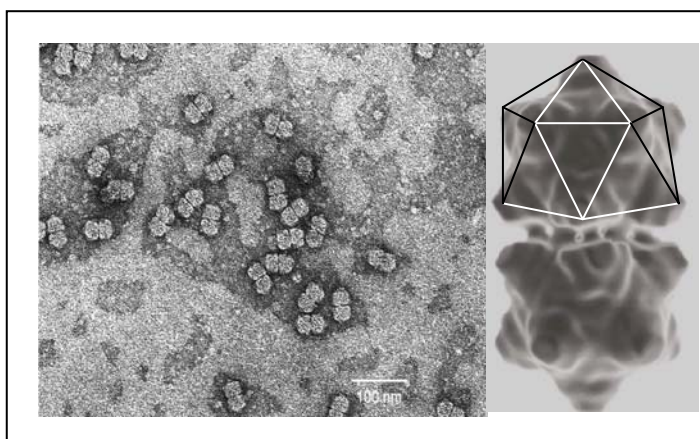


Figura 2. Micrografía electrónica de partículas geminivirales, mostrando la estructura geminada e icosaédrica (Büchen, 2004).

El genoma de los geminivirus está formado por ADN circular de cadena sencilla (ADNcs) entre 2.5 y 2.8 kb (Lazarowitz, 1992). El genoma de algunos geminivirus puede estar constituido por dos de éstas moléculas y aunque se encuentran encapsidadas en partículas

separadas (conocidos como componente A y B), ambos componentes genómicos son requeridos para la infección (Stanley y Gay, 1983). La cubierta proteínica de los geminivirus consiste de subunidades proteínicas con un peso molecular aproximado de 28 kDa (Rybicki *et al.*, 1994). Aunque algunos geminivirus pueden ser transmitidos experimentalmente utilizando inoculación mecánica, la forma natural de su diseminación es por medio de insectos vectores. Algunos geminivirus son transmitidos por chicharritas pertenecientes a las familias *Cicadellidae* y *Membracidae*; mientras que otros geminivirus son transmitidos por mosca blanca de la familia *Aleyrodidae* (Brown y Bird, 1992) y recientemente se reconoce como un grupo aparte a los geminivirus que son transmitidos por escamas de la familia *Membracidae* (Rybicki *et al.*, 2000).

1.5. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA FAMILIA *Geminiviridae*

Los geminivirus están divididos en cuatro grupos (Cuadro 3) de acuerdo al Comité Internacional en Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas en inglés). La agrupación taxonómica de estos virus está dada por la organización genómica y las propiedades biológicas (tipo de hospedante e insecto vector) (Pringle, 1999; Rybicki *et al.*, 2000; Fauquet *et al.*, 2003).

Cuadro 3. Clasificación de geminivirus basada en la especificidad del hospedante, tipo de vector y estructura genómica.

Grupo	Miembro tipo ¹	Tipo de hospedante	Vector/Familia	Genoma (DNAs)
<i>Mastrevirus</i>	MSV	Monocotiledóneas	Chicharritas (<i>Cicadellidae</i>)	Monopartita
<i>Curtovirus</i>	BCTV	Dicotiledóneas	Chicharritas (<i>Cicadellidae</i> , <i>Membracidae</i>)	Monopartita
<i>Begomovirus</i>	BGYMV	Dicotiledóneas	Mosquita blanca (<i>Aleyrodidae</i>)	Bipartita, Monopartita
<i>Topocuvirus</i>	TPCTV	Dicotiledóneas	Escamas (<i>Membracidae</i>)	Monopartita

¹ MSV = *Maize streak virus*, BCTV = *Beet curly top virus*, BGYMV = *Bean golden yellow mosaic virus* (anteriormente *Bean golden mosaic virus*-Puerto Rico), TPCTV = *Tomato pseudo curly top virus*.

La mayoría de los geminivirus que afectan al cultivo del tomate en América y en México, pertenecen al género más numeroso y mejor caracterizado, los *Begomovirus*. Estos geminivirus que infectan dicotiledóneas, son transmitidos por mosquitas blancas y la mayoría presenta genoma bipartita. A este grupo pertenecen también la mayoría de los geminivirus detectados en México como: PepGMV, PHYVV, CdTV, ToLCSinV y ToMoV. Exceptuando a TYLCV que es del tipo monopartita (Navot *et al.*, 1991). Cabe mencionar que existe un aislamiento de Tailandia (TYLCV-Th) ha sido reportado con dos componentes genómicos (Rochester *et al.*, 1990).

1.6. ORGANIZACIÓN GENÓMICA

Como se muestra en el diagrama de la figura 3, todos los geminivirus bipartitas que han sido secuenciados hasta la fecha pertenecen a los *Begomovirus* y tienen similar organización genómica conteniendo un total de seis a siete marcos de lectura abiertos (MLA) que corresponden a cada uno de los genes. En el componente A se encuentran de cuatro a cinco MLA en sentido reverso (complementario) y de uno a dos MLA en sentido directo o del virión. En el componente B (cuando está presente) se encuentran dos MLA. Ambos componentes son completamente diferentes en su secuencia excepto por unos ≈ 200 nt de la región intergénica no codificante localizados en la llamada región común. (Lazarowitz, 1992). La secuencia de la región común es idéntica tanto en el componente A como en el B de cualquier geminivirus simple bipartita, pero es diferente a cualquier otro geminivirus con excepción de una secuencia de ≈ 30 nt (G G C C A [t/a] C C G N [t/a] [t/a] **T A A T A T T A C C G G** [t/a] T G C C) (Fig. 4). El componente A contiene los genes requeridos para la encapsulación de la progenie o viriones y para la replicación del ADN viral y el componente B contienen los dos genes requeridos para el movimiento sistémico viral en la infección de la planta hospedante. En la región intergénica o región no codificante se encuentran la mayoría de las secuencias conservadas reguladoras (cajas TATA, cajas G, motivos CAAA, etc.) que permiten la transcripción de los genes de manera divergente y la estructura en horquilla con un tallo rico en G-C y un asa rica en A-T.

GEMINIVIRUS BIPARTITA

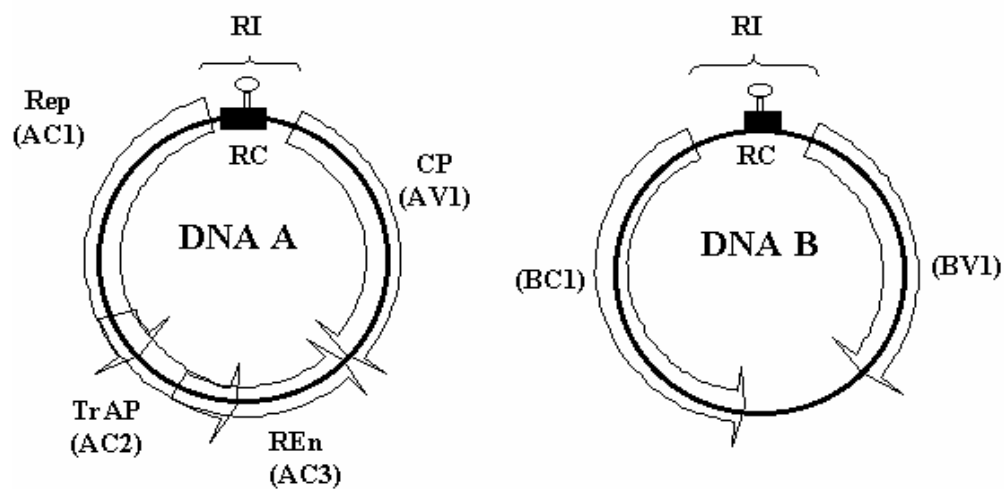
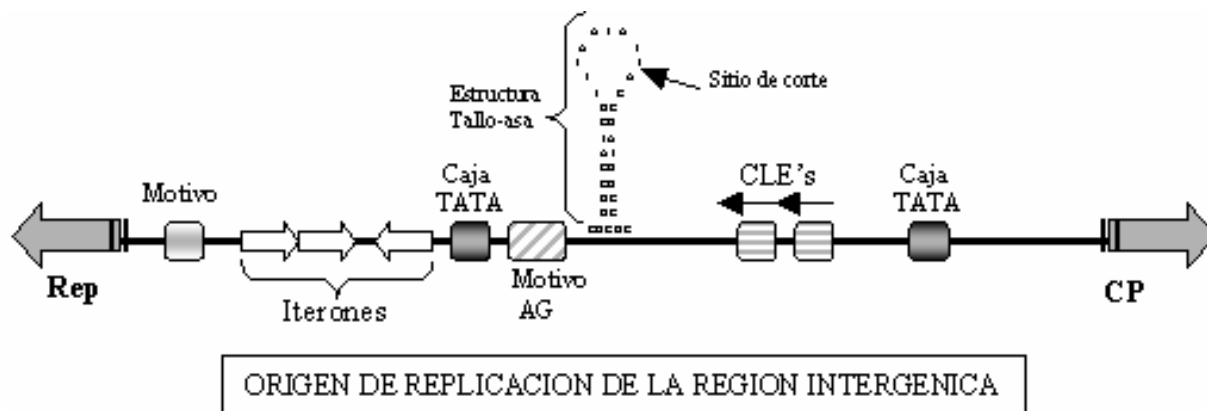


Figura 3. Organización genómica de los begomovirus bipartitas. DNA A= componente A de virus bipartitas; RC= región común, RI= región intergénica, AV1 (CP)= gen de la proteína de la cápside, AC1 (Rep)= gen de la replicación, AC2 (TrAP)= transactivador de la transcripción y de AV1 y BV1, AC3 (REn)= potenciador de la replicación y acumulación de ADN, AC4= posiblemente involucrado en la expresión de síntomas. DNA B= componente B; BC1= movimiento célula-célula, BV1= movimiento sistémico y expresión de síntomas (Lazarowitz, 1992).



ORIGEN DE REPLICACION DE LA REGION INTERGENICA

Figura 4. Esquema de la región intergénica del componente A de un geminivirus bipartita típico. 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.

En la estructura tallo-asa se encuentra el origen de replicación (TAATATT↓AC) y el punto de inicio (↓) de la síntesis de la cadena complementaria (Fig. 4). Además, en la misma región se han identificado secuencias adicionales involucradas en la replicación llamadas iterones o elementos repetidos. Estas secuencias son blancos de proteínas asociadas a replicación y constituyen el origen funcional de replicación (Arguello-Astorga *et al.*, 1994). Alternativamente se pueden nombrar los genes de acuerdo a la función de las proteínas codificadas. Aunque, es necesario hacer notar que algunas proteínas virales pueden ser polifuncionales, es decir varios genes pueden estar involucrados en la codificación de una proteína (Eagle *et al.*, 1994).

1.7. FUNCIONES GENÉTICAS

1.7.1. Replicación

La replicación y la regulación de la expresión génica de los geminivirus dependen en gran medida de los factores de la maquinaria fotosintética de la planta. Existen evidencias de la presencia de un motivo específico en Rep (LXCXE), el cual se une a sitios específicos en las células del retinoblastoma de la planta durante el ciclo celular (Xie *et al.*, 1995). La acumulación de partículas virales de geminivirus en el núcleo de las células vegetales sugiere que la replicación del ADN viral se lleva a cabo en ese organelo en donde la maquinaria de replicación del ADN del hospedante convierte el ADN de cadena sencilla a ADN de cadena doble o forma replicativa (ADN-FR). La forma replicativa del ADN entonces funciona ya sea como molde para la transcripción de genes virales o para la amplificación del genoma por replicación por círculo rodante (RCR) (Saunders *et al.*, 1991; Stenger *et al.*, 1991). La transcripción del genoma viral es bidireccional, iniciando ésta indistintamente en cualquier lado de la región intergénica. La existencia de una región intergénica común fue primero identificada en los geminivirus bipartitas y se demostró que AC1 es el único gen esencial en la replicación tanto en el componente A, como en el componente B en su posición trans (Elmer *et al.*, 1988). Presumiblemente, AC1 codifica la

proteína (Rep 40.2 kDa) que interactúa específicamente en la iniciación de la replicación del ADN viral (Etessani *et al.*, 1991). Por otra parte, estudios bioquímicos mostraron que la proteína Rep es una nucleasa sitio-específica que corta el ADN al inicio de la replicación de la cadena del virión en la secuencia nonanucleotídica conservada (Laufs *et al.*, 1995; Orozco *et al.*, 1996). Por su parte Lazarowitz. (1992), sugiere el potencial de la estructura tipo “horquilla” como esencial para la replicación del ADN viral, proceso mediante el cual se forma un círculo rodante de ADN que produce una banda multimérica complementaria (sentido negativo) y que este sirve de molde para la síntesis de bandas multiméricas originales (sentido positivo), las cuales se fragmentan después para formar bandas positivas de longitud unitaria. (Bisaro, 1996; Orozco y Hanley-Bowdoin, 1996). Por otro lado, Rep, la cual también es una ATPasa, no presenta alguna homología detectable con las ADN polimerasas conocidas, aunque sí cierta identidad con las ADN helicasas, lo que significa que la principal responsable de la síntesis de ADN del virus es la maquinaria de replicación de la planta huésped (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Aunque Rep es una proteína multifuncional, es muy específica y no intercambiable entre geminivirus, aún entre aquellos muy relacionados (Castellano *et al.*, 1999). Esta proteína presenta una alta homología con proteínas involucradas en la replicación por círculo rodante (RCR), las cuales se encuentran en plásmidos eubacterianos de ADNcs y con las que comparten actividad de topoisomerasa, ligasa, helicasa y ATPasa. (Koonin e Ilyna, 1992; Orozco *et al.*, 1997; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). La alta especificidad de Rep, es dada por su alta capacidad de reconocimiento a secuencias específicas dentro del origen de replicación, llamadas iterones (Arguello-Astorga *et al.*, 1994). Además Rep hidroliza el puente fosfodiéster del nonúmero 5' TAATATT ↓AC 3' y permanece unido covalentemente a la terminal fosfatada (5') y a la terminal hidroxilada (3') en la replicación (Stanley, 1995). AC3 codifica la proteína potenciadora de la replicación (REn) que regula la tasa replicativa viral, posiblemente por activación de genes tempranos (AV1) requeridos en la síntesis de ADN (Azzam *et al.*, 1994).

1.7.2. Transcripción

La transcripción del genoma viral es bidireccional, iniciando ésta indistintamente en cualquier lado de la región intergénica (RI) en geminivirus monopartitas o en la región común (RC), en caso de geminivirus de tipo bipartitas. El gen AC2 codifica la proteína de aproximadamente 19.6 kDa (TraP) la cual es responsable de la activación de la transcripción. Hoy se sabe que la regulación positiva que ejerce AC2 en la expresión de genes AV1 y BV1 es a nivel transcripcional, existiendo también la regulación de tipo temporal debido a la disposición de los genes que se encuentran sobrelapados y en sentidos opuestos o divergentes con respecto a la región común (Sunter y Bisaro, 1991; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Por lo tanto, en los geminivirus el proceso de transcripción es bidireccional, generándose ARNs mensajeros que corresponden a los MLA en sentido del virión y del complementario (Frischmuth y Stanley, 1991; Lazarowitz, 1992). Complementando, Hanley-Bowdoin *et al.* (1999) indican que los ARNs virales son transcritos por la ARN polimerasa II de la célula huésped.

1.7.3. Traducción

La región intergénica contiene el promotor divergente que dirige la expresión de genes codificados en sentido del virión y complementario. Los ARN mensajeros (ARNm) inician “río abajo” de las cajas TATA, indicando que son transcritos por la ARN polimerasa II de la célula huésped. (Eagle *et al.*, 1997; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Se piensa que los transcritos pueden ser policistronicos, encontrándose múltiples ARN sobrelapados (Lazarowitz, 1992; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). En el caso de mastrevirus, Rep es codificada por dos MLA, pero que son transcritos en un ARN mensajero (ARNm). Aparentemente se producen dos especies maduras de ARN, una de ellas es el resultado de la remoción de un pequeño intron que está sobrelapado entre los dos MLA y que es la que producirá la Rep funcional, mientras que otra especie es producida sin procesamiento (Palmer y Rybicki, 1998). Por todas estas propiedades, los geminivirus se han convertido en excelentes modelos para el estudio y el conocimiento de los mecanismos de replicación

del ADN en las plantas y el control de la expresión génica (Stanley, 1985; Timmermans *et al.*, 1994; Vega-Arreguin y Rivera-Bustamante, 2001).

1.7.4. Control de Expresión Génica

La expresión de los genes de geminivirus depende tanto de factores de transcripción del huésped como de proteínas virales. Así, la expresión de los llamados genes tempranos debe ser promovida primariamente por la maquinaria transcripcional del huésped, pero una vez que sus productos se han acumulado a un cierto nivel, éstos pueden afectar su propia transcripción o activar la expresión de otros genes virales hasta entonces inactivos llamados genes tardíos, como el de la CP y BV1 (codificados en sentido del virión). Sin embargo, no existen hasta el momento muchos estudios acerca de la regulación temporal y/o espacial de la expresión génica en geminivirus (Rivera Bustamante y Silva Rosales, 1997; Gutiérrez, 1999; Gutiérrez, 2000a; Gutiérrez, 2000b).

1.8. MOVIMIENTO SISTÉMICO DE GEMINIVIRUS

En los geminivirus bipartitas tres genes fueron originalmente identificados como necesarios para el movimiento sistémico en la planta: AC2, en el componente A y los únicos genes (BC1 y BV1) contenidos en el componente B (Elmer *et al.*, 1988; Etesami *et al.*, 1988). En 1989, Hull presentó evidencias genéticas que los virus de las plantas codifican para la elaboración de una especie de proteínas llamadas “móviles” que son requeridas para que el virus tenga movimiento sistémico en la planta. Esto sugiere que el mecanismo de acción de éstas proteínas es alterando el radio hidrodinámico del genoma viral a una forma desinflada de tal manera que pudiera pasar por el plasmodesma (Pascal *et al.*, 1994). Ahora se conoce que BC1 codifica para la proteína (29.6 kDa) necesaria para el movimiento célula-célula y que dicha proteína se localiza entre la pared celular y la membrana plasmática. Esta proteína tiene dominios de unión a ADN similares a los encontrados en chaperoninas, lo cual le confiere la capacidad de alterar el límite de exclusión de los plasmodesmos (Hull, 1989; Pascal *et al.*, 1993; Noueirry *et al.*, 1994). TrAP es otra proteína que es

indirectamente necesaria para el movimiento viral, su participación es necesaria para alcanzar los niveles adecuados de la proteína BV1 de aproximadamente 33.1 kDa (Sunter y Bisaro, 1991). La proteína codificada por el gen BV1 es necesaria para el movimiento a larga distancia y tiene la capacidad de unirse al ADN de cadena sencilla y moverlo a través de la membrana nuclear y a larga distancia mediante del sistema vascular de la planta (Lazarowitz, 1992; Pascal *et al.*, 1994; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

1.9. SINTOMATOLOGÍA

Los síntomas son los efectos visibles de la infección viral que ocasionan cambios fenotípicos en la planta. Los virus, por si mismos, no matan a las plantas. El daño se da porque se altera su fisiología y su metabolismo, lo cual se manifiesta por: disminución de la fotosíntesis, menor producción de hormonas de crecimiento, aumento de la respiración, reducción de la producción de compuestos nitrogenados y carbohidratados y aumento de sustancias inhibitoras de crecimiento. La sintomatología es comúnmente un medio visual de identificación, aunque tiene algunas limitantes, sin embargo, es un punto importante en cuanto al estudio epidemiológico de ésta enfermedad. Hoy en día, la observación de síntomas resulta no ser el mejor criterio de identificación, debido a la influencia de múltiples factores externos (clima, nutrición, genotipo, manejo, etc.) (Blancard, 1996), además de que recientemente se han encontrado infecciones mixtas en condiciones naturales, donde varios geminivirus (PHYVVV, PepGMV) al parecer están involucrados en la expresión de síntomas (Méndez-Lozano *et al.*, 2003), así como complejos geminivirales (Mansoor *et al.*, 2003). Los síntomas expresados en plantas de tomate pueden ser muy variados. Las plantas infectadas durante las etapas iniciales de desarrollo muestran un enanismo pronunciado y una reducción en el crecimiento de brotes y foliolos, los cuales asumen una posición erecta dándole un aspecto arbustivo y raquítico. Además, los foliolos que se desarrollan inmediatamente después de la infección se enrollan hacia fuera (epinastia), mientras que las hojas que se desarrollan posteriormente presentan clorosis y deformación con los bordes enrollados hacia arriba. Algunas veces se puede presentar un amarillamiento axial en las hojas (especialmente evidente en infecciones con CdTV y

ToLCSinV). En algunas solanáceas (chile) se pueden presentar patrones de mosaicos dorados muy definidos (como con PepGMV) y en ocasiones las hojas se pueden ver con apariencia acucharada y de un color amarillo brillante (como con TYLCV). Cuando las infecciones son por PHYVV se forma un reticulado muy fino y un amarillamiento que se extiende a toda la hoja, junto con severas malformaciones. Aunque al parecer no es muy común, pero la producción de frutos puede ser severamente afectada durante infecciones tempranas, debido al aborto floral y metabolismo deficiente de la planta, aunque los frutos ya formados cuando la infección ocurre se desarrollan de una manera aparentemente normal (Jones *et al.*, 1991; Agrios, 1997). Las infecciones tempranas ocasionan siempre pérdidas totales, aunque los frutos frecuentemente maduran normalmente cuando estos cuajan antes de que la planta haya sido infectada (Gabor y Wiebe, 1997). Diferentes síntomas han ocasionado diferentes nombres que ahora se conoce son de etiología geminiviral diferente, como el “rizado amarillo” (Torres-Pacheco *et al.*, 1993; Garzón-Tiznado *et al.*, 1993), “planta atigrada” del chile (Brown *et al.*, 1989), “chino del tomate” (Brown y Hine, 1984) y el “enchinado foliar” del tomate de BCS, reportado en este trabajo (Holguín-Peña *et al.*, 2003; Holguín-Peña *et al.*, 2004b).

1.10. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

Los efectos negativos de la mosquita blanca pueden ser directos debido al 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 en su capacidad de transmitir virus a sus hospedantes. La transmisión ocurre en forma circulativa, no propagativa. Las partículas virales pasan a través del estilete por la garganta y luego a la hemolinfa y glándulas salivares del insecto (Harrison *et al.*, 1985). Ésta fase se da en forma específica con el hospedante, existiendo varios elementos involucrados en la especificidad virus-vector como las características de la proteína de la cápside del virus (Azzam *et al.*, 1994) y por algunas características genéticas (genes dominantes ligados al sexo) del insecto

(Stenger *et al.*, 1992). El proceso se divide en dos etapas: 1) adquisición del virus e 2) inoculación del virus a la planta.

1.10.1. Adquisición

La adquisición de viriones por moscas blancas adultas no es una ingestión pasiva de la savia al insecto. Se sabe que la concentración de viriones en el cuerpo del insecto es al menos 1000 veces más que la concentración de viriones en la savia. Sin embargo, parece haber un número máximo de genoma viral que puede adquirir un vector el cual no puede ser más de 600 millones de genomas (1 ng ADN viral). Esto sugiere la existencia de un factor que controla el número de viriones presentes en un insecto (Zeidam y Czosnek, 1991). El virus puede ser adquirido después de que el vector se ha alimentado en la planta al menos durante 15 a 30 minutos. Hay un período de latencia del virus de al menos cuatro horas, tiempo durante el cual puede ser inoculado en una planta sana mientras su periodo de alimentación sea entre 15-20 minutos. El periodo de persistencia es de dos semanas, aunque bajo ciertas condiciones puede ser de unos cuantos días, incluso durante toda la vida del insecto (Timmermans *et al.*, 1994). Por otro lado Mehta *et al.* (1994), asentaron que *B. tabaci* transmite TYLCV después de un mínimo período de adquisición de 15 min pudiendo conservar su virulencia hasta por un periodo de dos semanas.

1.10.2. Inoculación

Para que la inoculación sea efectiva, el virus debe pasar al hemocele y a las glándulas salivales a través del canal alimenticio y tener un periodo mínimo de latencia de al menos cuatro horas (Rosell *et al.*, 1999). Por su parte, Atzmon *et al.* (1998) mencionan que algunos geminivirus pueden ser detectados en el sitio de inoculación de la planta a los 5 min después de la alimentación del vector con plantas infectadas. Mehta *et al.* (1994) reportan que la transmisión de un aislamiento de TYLCV de Egipto fue alcanzada con un solo adulto de *B. tabaci* por planta, pero que la eficiencia de la transmisión se incrementaba cuando el número se incrementaba a cinco insectos por planta.

1.11. MOSQUITAS BLANCAS E IMPLICACIONES EPIDEMIOLÓGICAS

Las mosquitas blancas se encuentran asociadas con alrededor de 500 especies y 74 familias de plantas en todo el mundo, incluyendo cultivos agrícolas, plantas ornamentales y maleza. Estos insectos son transmisores potenciales de virus, principalmente de las familias: *Geminiviridae*, *Potyviridae*, *Comoviridae* y los géneros: *Crinivirus*, *Closterovirus*, *Carlavirus*. Sobre los geminivirus en particular Büchen (2004) indica que las moscas blancas pueden transmitir alrededor de 80 especies diferentes. A principios de los noventas se detectaron altas poblaciones de moscas en Florida (Schuster *et al.*, 1990), California (Perring *et al.*, 1993), Texas y Arizona y Noreste de México (Brown y Bird, 1992). Dentro de este complejo estaba involucrado un nuevo biotipo o raza (*B. tabaci* biotipo B), conocida también como mosca de la hoja plateada (Perring *et al.*, 1993). Hoy en día *B. argentifolii* Bellows y Perring se considera como especie separada de *B. tabaci* (Bellows *et al.*, 1994), aunque dicha designación no es universalmente aceptada (Brown *et al.*, 1995). Los factores que han influido para su amplia y rápida distribución de ésta especie, al parecer, son varios: (i) condiciones ambientales favorables al vector en regiones tropicales y subtropicales; (ii) alta adaptabilidad a hospedantes de varias familias; (iii) hábitos alimenticios más voraces y altas tasas reproductivas; (iv) posible selección de poblaciones de mosquitas blancas resistentes a insecticidas (principalmente a organofosforados), (v) cambio climático de la tierra y (vi) uso inadecuado de estrategias de manejo (Bock, 1982; Brown y Bird, 1992). Las pérdidas económicas ocasionadas por infección de begomovirus pueden ser de hasta un 100%, reportándose ya a través de todo el continente americano grandes epifitias (Simone *et al.*, 1990; Nakhla *et al.*, 1994; Polston y Anderson, 1997). En México, en el valle de Mexicali se han presentado pérdidas de hasta 60 millones de pesos en el cultivo del algodón (Torres-Robledo *et al.*, 2000), mientras que en la regiones noreste y noroeste del país se han detectado enfermedades de origen geminiviral asociadas a altas poblaciones de moscas blancas (Torres-Pacheco *et al.*, 1996).

1.11.1. Clasificación de Biotipos de Mosquitas Blancas

Las mosquitas blancas transmisoras de virus, pertenecen a la familia *Aleyrodidae* (orden Homóptera) y están más relacionados a los áfidos, escamas y chicharritas que a las moscas verdaderas, sobre todo porque tienen dos pares de alas y son de metamorfosis incompleta (huevo, ninfa, adulto). Históricamente, la taxonomía de ésta familia ha sido poco atendida, lo que ha originado no pocas controversias la ubicación taxonómica de ciertas especies, sobre todo por la aparición de nuevos biotipos o sub-especies (Perring *et al.*, 1993; Bedford *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995). La oportuna identificación de especies es de suma importancia en la epidemiología de la enfermedad, sobre todo porque éstas difieren tanto en su biología como en el tipo de daño que ocasionan. La taxonomía convencional del grupo se basa principalmente en las características biológicas (morfología del cuarto instar del estado ninfal) y ecológicas (hospedantes, adaptación geográfica, patrones de comportamiento, etc.). Sin embargo, los problemas de identificación más comunes es que no existen claves completas para identificación de especies de adultos, además, el alto polimorfismo presentado por estos los hace extremadamente plásticos y variables para identificarlos eficientemente por claves morfológicas, sobre todo si los especímenes provienen de diferente hospedantes (De Barro y Driver, 1997). La existencia documentada de biotipos (Costa *et al.*, 1993; Perring *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1995) y su importancia epidemiológica ha llevado a la identificación de biotipos utilizando técnicas de biología molecular. Principalmente, análisis electroforético de proteínas (prueba de esterasas) y técnicas de amplificación de ADN al azar (RAPD-PCR por sus siglas en inglés) por PCR (De Barro y Driver, 1997). La primera técnica tiene la desventaja del delicado manejo de la muestra por la rápida degradación de las proteínas y el alto número (más de 50) de especímenes a coleccionar. En comparación, la segunda técnica tiene la ventaja de que moscas individuales pueden ser preservadas en alcohol (70% y almacenadas a -20°C) para su posterior análisis.

1.12. PROCESO DE INFECCIÓN Y CICLO VIRAL

Los virus de las plantas necesitan de una abertura mecánica en la pared celular para introducir así directamente una partícula del virus en la célula. Esto puede ser alcanzado por el vector asociado a la transmisión del virus o simplemente por daño mecánico de las células. La transferencia del virus por vectores en un medio determinado puede ocurrir de tal manera que los virus pueden ser transmitidos de una planta a otra. Los insectos que muerden, chupan o raspan tejidos finos de la planta son, por supuesto, los medios ideales para transmitir el virus. El ciclo geminiviral inicia cuando el insecto al estarse alimentando introduce la partícula viral en la planta y el virión (ADNcs) liberado es conducido al núcleo, donde utilizando los factores biosintéticos celulares del huésped da origen a la forma replicativa del virus, la cual consiste en ADN de cadena doble (ADNcd). Este a su vez es expresado para producir las proteínas virales (Rep) necesarias para iniciar la replicación por circulo rodante (RCR) cortando el ADN viral y uniéndose al extremo 5'-3'. En este momento la ADN polimerasa de la célula huésped sintetiza una nueva cadena de ADN a partir del extremo 3'-5'. Se vuelve a liberar Rep iniciando un nuevo ciclo usando como templado el ADNcd (Nagar *et al.*, 1995). Seguido de este proceso se produce la proteína CP para la encapsulación de los viriones de cadena sencilla y ser llevados fuera del núcleo con participación de la proteína BV1. Estos complejos virales pueden ser reconocidos por la proteína BC1 y llevados hacia los plasmodesmos donde tiene lugar el movimiento de célula a célula. Finalmente, las partículas virales encapsuladas llegan al floema donde son adquiridas por las mosquitas blancas (Fig. 5). Por otro lado, aunque no es común, existen evidencias de transmisión transovarica. Al respecto, Ghanim *et al.* (1998) utilizando técnicas de hibridación en la progenie de moscas blancas (huevos, ninfas de primero y segundo estadio y adultos) encontraron que éstas eran capaces de infectar plantas de tomate, encontrándose el ADN viral en huevos maduros y ovarios. Los mismos autores mencionan que TYLCV puede ser transmitido a través de huevos por al menos dos generaciones y que en ausencia de un hospedante disponible, la mosca blanca puede servir de reservorio del virus entre las épocas de cultivo. Por otro lado Rubinstein y Czosnek (1997) mencionan que la presencia del virus en el insecto reduce las expectativas de vida y

la capacidad reproductiva en el insecto, poniendo en evidencia la naturaleza entomopatógena de los geminivirus.

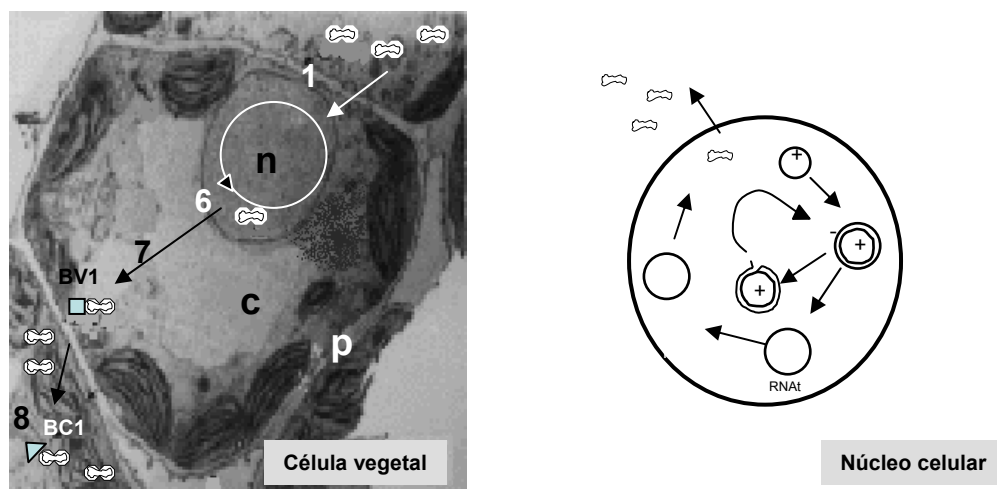


Figura 5. Esquema del proceso de infección geminiviral en la célula vegetal. 1= llegada al núcleo celular; 2= replicación utilizando la maquinaria replicativa de la planta; 3, 4= formación de la forma replicativa el cual sirve como intermediario de doble cadena para la formación de nuevos viriones o como molde necesario en la transcripción; 5= encapsulación y salida del núcleo; 7= movimiento célula-célula a través de plasmodesmos; 8= movimiento sistémico a través del floema. FR= forma replicativa, Rep, TraP, REn= proteínas necesarias para los procesos de replicación y transcripción, n= núcleo, c= citoplasma, p= pared celular, BC1, BV1= proteínas necesarias para el movimiento viral.

1.13. MALEZA, COMO HOSPEDANTES DE GEMINIVIRUS

Cuando el cultivo de tomate ocurre durante todo el año las mismas plantas son potencialmente la fuente de geminivirus. Además, la maleza susceptible a la infección viral puede actuar como reservorio del virus, sirviendo como puente entre las estaciones de cultivo. Entre las plantas arvenses que han sido reportadas como hospedantes sintomáticos de geminivirus se encuentran principalmente la familia de las solanáceas, malváceas y euforbiáceas. Epidemiológicamente, tiene especial relevancia la existencia de plantas que aunque no desarrollen síntomas son potencialmente capaces de transmitir el virus a una planta sana que sea sintomática (Ioannou *et al.*, 1987). Por otro lado, se ha estudiado la especificidad del virus del enrollamiento de la hoja de la calabaza (*Squash leaf curl virus-*

SLCV) con su hospedante natural (*Cucurbita pepo* L), encontrándose que existen unos 13 nucleótidos de la región común cerca del origen de replicación y tres aminoácidos de la proteína del movimiento (BV1) que le confieren la determinación del rango de hospedantes (Polston *et al.*, 1989).

1.14. IDENTIFICACIÓN DE GEMINIVIRUS

La identificación de geminivirus por métodos de virología tradicional no ha estado exenta de dificultades. Un factor importante es que la sintomatología se puede confundir con deficiencias de ciertos oligoelementos (Zn, Mo, Fe, etc.) y por infecciones de virus de ARN (*Potyvirus*, *Tobamovirus*). Todo esto hace que el síndrome observado en infecciones naturales sea un trabajo difícil, incluso para el fitopatólogo experto. Por otro lado, el uso de bioensayos con hospedantes experimentales con fines de identificación, es bastante limitado, debido a que mucho de los geminivirus de importancia económica no se pueden transmitir mecánicamente. Las técnicas de identificación tradicional de geminivirus han estado limitadas básicamente a las técnicas de inmunodetección o por serología (ELISA). Sin embargo, la producción de antígenos virales específicos para los begomovirus ha tenido las siguientes dificultades; (i) las propiedades físicas y químicas de la partícula las hace difícil de purificar en una forma estable; (ii) los viriones parecen ser poco inmunogénicos; y (iii) las proteínas de la cápside no son antigénicamente distintas con un policlonal disponible ni con la mayoría de los preparados con anticuerpos monoclonales. (Roberts *et al.*, 1984; Wyatt y Brown, 1996).

1.15. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE GEMINIVIRUS

Wyatt y Brown (1996), mencionan que las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) ofrecen una alta especificidad para la detección de geminivirus de tal manera que se ofrece como una técnica relativamente sencilla para detectar la diversidad geográfica en diversos cultivos, incluyendo maleza, además de requerirse un mínimo de muestra. La técnica de la PCR utilizando iniciadores de amplio

espectro se ha utilizado con evidente éxito para detección específica de begomovirus (Saiki *et al.*, 1988; Rojas *et al.*, 1993; Deng *et al.*, 1994; Wyatt y Brown, 1996). Sin embargo, estas técnicas cuentan con algunas limitantes: (i) la necesidad de tener altas cantidades de ADN viral purificado; (ii) los iniciadores inespecíficos no aseguran la amplificación de begomovirus poco relacionados genéticamente; (iii) interferencia de compuestos secundarios de la planta y (iv) degradación del ADN de las muestras debido al tiempo entre la recolección en campo y el procesamiento (Wyatt y Brown, 1996). Para la detección de geminivirus infectando solanáceas se han diseñado iniciadores específicos para algunos virus (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). En la actualidad pueden ser utilizados varios procedimientos sencillos y rápidos que mejoran la eficiencia de la PCR, ya sea para detección viral en plantas o insectos (Navas-Castillo, 1998). Por otro lado, las técnicas moleculares como la hibridación (Polston *et al.*, 1989; Gilbertson *et al.*, 1991), clonación y secuenciación han sido utilizadas exitosamente con fines de detección e identificación, así como para poder inferir sobre la relación entre quasiespecies (Torres-Pacheco *et al.*, 1993; Rybicki, 1994; Padidam *et al.*, 1995). Estas técnicas junto con los 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 del genoma viral han producido las herramientas e información genómica necesarias para la detección, identificación y caracterización genómica (Czosnek *et al.*, 1990; Accotto *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2001).

1.15.1. Purificación de ADN Viral

El aislamiento o como comúnmente se le denomina, purificación de los virus, se logra con mayor frecuencia con la ultra centrifugación de la savia de la planta. Este método comprende de 1 a 3 ciclos de velocidades altas (de 40000 a 100000 g o más) y bajas (de 3000 a 10000 g) alternadas. La ultra centrifugación concentra al virus y lo separa de los contaminantes de la célula huésped. En la actualidad se emplean varias modificaciones de la técnica de ultra centrifugación, particularmente la centrifugación por gradiente de densidad, la cuál se ha utilizado en la purificación de virus con excelentes resultados. La

utilización de un amortiguador de extracción con bajo pH, seguido de un paso de acidificación sirve comúnmente para desnaturalizar muchas proteínas de las plantas, las cuales son consideradas como contaminantes. Algunas técnicas alternas de extracción se han utilizado incubando con Triton X-100 para liberar las partículas virales de los cuerpos de inclusión, seguidas de dos pasos en centrifugación y purificación en un gradiente de sacarosa (Palmer *et al.*, 1998). Cabe mencionar que la mayor limitación de este método es que los viriones de los geminivirus son frecuentemente difíciles, más no imposibles de aislar y su producción es generalmente baja. El uso de ADNcs como un punto de comienzo en manipulaciones moleculares ha sido suplantado por el uso directo del ADN en su forma replicativa (ADN-FR). Los cuales son normalmente acumulados en grandes cantidades en los núcleos de las células infectadas (Idris y Brown, 1998).

1.16. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE GEMINIVIRUS

En la actualidad existen numerosas herramientas bioinformáticas para análisis de secuencias las cuales incluyen sofisticados programas computacionales (LASERGENE, DNASTAR, GENEWORKS), programas de alineamientos de secuencias (PILEUP, CLUSTALW, MACAW), herramientas vía Internet (BLAST, FASTA, GenWeb, ENTREZ) y acceso directo a los bancos de datos más importantes como el GenBank (NCBI/EMBL/DDBJ) y SWISSPROT (Brown, 2000; Page y Holmes, 1998). Para los análisis filogenéticos existen programas de algoritmos específicos, los cuales pueden utilizar diferentes métodos (distancias, máxima similitud y parsimonia) para la reconstrucción de cladogramas y/o filogramas (árboles filogenéticos). Los programas más utilizados para los análisis filogenéticos son: PHYLIP (Felsenstein, 1989), MacClade (Maddison y Maddison, 1989) y PAUP (Swofford, 1993). El problema del origen de los virus y su evolución se sigue debatiendo hoy en día, al igual que su posición como entes vivos. La dudosa simplicidad estructural de estas moléculas nos lleva unos 3,500 millones de años atrás y nos pone a pensar que al fin y al cabo, aún los virus comparten el mismo código genético que los organismos celulares más evolucionados. Dentro de las hipótesis más aceptadas del origen de los virus de ADN proponen que estos poseen numerosas

similitudes funcionales a algunos elementos genéticos celulares como los plásmidos y los transposones (Lazarowitz, 1992). Por otra parte, Arguello-Astorga *et al.* (1994b) mencionan que en la región no codificante de todos los geminivirus existen secuencias conservadas en relación al origen de replicación que son únicas para cada especie, pero que muestran un arreglo similar (número, orientación y espacio) con grupos filogenéticamente definidos. Las técnicas actuales de biología molecular y programas para análisis de secuencias nos permiten realizar comparaciones con el fin de establecer relaciones evolutivas, posible origen geográfico, tasa de cambios evolutivos y recombinaciones genéticas. Por otro lado, pruebas serológicas han mostrado que aunque todos los geminivirus están relacionados, algunos tienen epitopes únicos que los hace agruparse en dos grandes grupos: 1) begomovirus que infectan cultivos en el viejo continente (Europa, Asia, Australia y África) y 2) begomovirus que infectan cultivos en el continente Americano (Norte, Centro y Sudamérica) (Thomas *et al.*, 1986; Rybicki, 1991).

1.17. MANEJO INTEGRADO DE GEMINIVIRUS

El control de geminivirus presenta dificultades debido a varios factores. Primeramente, la aplicación intensiva de aspersiones de insecticidas solo puede controlar parcialmente las poblaciones de mosquitas. Esto, sin embargo, incrementa el riesgo potencial de desarrollo de resistencia del insecto vector a ciertos insecticidas, además, de que éste ha sido parcialmente efectivo y muy costoso (económica y ecológicamente). Otro factor que dificulta el control de ésta enfermedad es la presencia de maleza hospedante del virus, las cuales sirven como hospedantes alternos (Jones *et al.*, 1991; Agrios, 1997). Por otra parte, la mayoría de las variedades comerciales de tomate son susceptibles a enfermedades geminivirales, aunque se están estudiando alternativas para transferir tolerancia a partir de especies silvestres (Kasrawi, 1989; Pilowsky y Cohen, 1990; Zamir *et al.*, 1994). En algunos países como Israel se produce tomate bajo mallas anti-insectos en conjunción con aplicaciones de insecticidas. Sin embargo, las estrategias a usar para evitar pérdidas en producción por patógenos virales deben incluir: (i) uso de cultivares con resistencia o tolerancia si los hay disponibles; (ii) exclusión del patógeno del área de cultivo y de sus

cercanías removiendo aquellos hospedantes alternos y (iii) tratar de controlar al vector viral por medio de protecciones físicas e insecticidas (Stansly *et al.*, 1991). Algunas medidas de control consisten en separar las nuevas plantaciones en tiempo y espacio con relación a las plantaciones viejas y tomar en cuenta que la fecha de plantación deberá ser cuando la población de vectores se encuentre al mínimo o bien que sea factible el control químico. Por otro lado, Zaher (1986) indica que aplicaciones foliares de B, Mn, y Zn a plantas infectadas con TYLCV reduce el impacto de la infección al incrementar la altura y el área foliar de la planta.

1.17.1 Variedades Resistentes a Geminivirus

El tomate es una de las hortalizas en que se ha realizado más investigación acerca de mejoramiento genético, incluyendo la investigación sobre variedades resistente a virosis, especialmente a geminivirus. Hasta la fecha todas las variedades comerciales presentan susceptibilidad a ésta enfermedad, aunque cierto grado de tolerancia se ha encontrado en tomates silvestres (Valadéz, 1996). A su vez, Kasrawi (1989) en estudios hechos con tomates (*Lycopersicon pinpinellifolium* L.) resistentes al TYLCV, menciona que la resistencia es controlada por un gen dominante, aunque otros autores señalan que solo se trata de una tolerancia parcial más que una resistencia en sí (Zamir *et al.*, 1994). En México se ha logrado caracterizar los genes de chile involucrados en la resistencia a virus endémicos como el PHYVV (Godinez *et al.*, 2001). Actualmente, son numerosos los investigadores involucrados en el estudio de la resistencia utilizando plantas transgénicas modificadas con técnicas de ingeniería genética. Una de las estrategias utilizadas es por medio de la resistencia derivada por la regulación de transcritos de genes involucrados principalmente en la replicación y el movimiento viral (Baulcombe, 1996). Por su parte, Lucioli *et al.* (2003), demostraron que la expresión transgénica de un fragmento de la región amino-terminal (210 pb) de Rep confiere resistencia para el virus homólogo inhibiendo la transcripción y replicación viral. Otra estrategia prometedora es por medio de proteínas citotóxicas expresadas en plantas transgénicas y donde las células infectadas mueren impidiendo el avance de infección (Hong *et al.*, 1996).

JUSTIFICACIÓN

En algunas de las zonas hortícolas más importantes del país como Sinaloa, Tamaulipas y El Bajío se han presentado importantes epifitias ocasionadas por geminivirus. Hoy en día se conoce que la etiología de estas enfermedades es de origen geminiviral y que pueden estar involucrados varios geminivirus. En Baja California Sur (BCS) existe un riesgo potencial de que este tipo de virus se conviertan en un serio problema fitopatológico de dimensiones insospechadas si no se tienen métodos de identificación precisos que permitan un manejo adecuado esta enfermedad. Sobre la naturaleza del “enchinado foliar del tomate” solo se conoce que es de supuesta etiología geminiviral. La detección por serología (ELISA) es una de las alternativas de identificación más utilizadas en el diagnóstico de enfermedades virales, sin embargo, estas técnicas han presentado algunas limitantes en cuanto a la precisión y tiempo de diagnóstico. Además, en la región no existen estudios en cuanto a técnicas de detección, epidemiología y caracterización molecular, por lo que es importante una identificación precisa y un estudio integral del problema contemplando para ello aspectos de investigación básica (caracterización molecular) y aplicada (estudios epidemiológicos). En la actualidad los geminivirus asociados a solanáceas están considerados como plagas cuarentenadas en algunas regiones (Europa y Mediterráneo), debido a su alto riesgo fitopatógico (EPPO 2000/046A). Estos riesgos fitosanitarios se multiplican bajo ciertas condiciones climáticas, como las presentadas en Baja California Sur. Esta situación puede ser particularmente difícil bajo condiciones tropicales y subtropicales, ya que existe un incremento en las poblaciones de mosquitas (*Bemisia tabaci*). Las estrategias planteadas en este trabajo contemplan estrategias y técnicas de biología molecular como son: PCR, hibridación, electroforesis, biobalística, clonación, secuenciación y RFLP. Con este estudio se pretende establecer un antecedente en BCS del diagnóstico y estudio de geminivirus utilizando éstas técnicas, así como establecer una base en el estudio de la interacción: planta-vector-virus. Finalmente, se espera tener un panorama más amplio en cuanto al estudio y manejo de patosistemas geminivirales y contribuir al estudio básico de geminivirus que se está llevando actualmente en los principales centros de investigación del país y del mundo.

HIPÓTESIS

1. El síndrome del “enchinado foliar del tomate” en Baja California Sur es ocasionado por begomovirus bipartitas endémicos aún no identificados y por especies altamente relacionadas con el *Chino del tomate virus* y el *Tomato leaf curl Sinaloa virus*, ambos endémicos de Sinaloa.
2. Los begomovirus encontrados se transmiten específicamente por mosquitas blancas de las especies *Bemisia tabaci* y *Bemisia argentifolii* (biotipo B)
3. La maleza (principalmente de las familias solanáceas, malváceas y euforbiáceas) sirve como reservorio de los geminivirus presentes.

OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar los geminivirus presentes en el cultivo del tomate en Baja California Sur utilizando técnicas de biología molecular, así como estudiar las relaciones filogenéticas con otros geminivirus y determinar algunos de sus aspectos epidemiológicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificación de Geminivirus

1. Realizar la transmisión de síntomas de plantas infectadas con el síndrome del “enchinado foliar del tomate” de algunas regiones de Baja California Sur, utilizando diferentes hospedantes y con varios métodos de inoculación.
2. Detectar e identificar los geminivirus presentes por técnicas de electroforesis, PCR, hibridación molecular, RFLP, clonación y secuenciación.

Caracterización Molecular y Filogenia

3. Realizar el mapa genómico y la caracterización molecular por medio del análisis de secuencias.
4. Realizar estudios filogenéticos por algoritmos computacionales.
5. Detectar por técnicas de RFLP la posible heterogeneidad genética de poblaciones de diferentes regiones.

Epidemiología

6. Diseñar iniciadores específicos para la detección en campo de los geminivirus encontrados en la región.
7. Determinar los hospedantes naturales y los índices de patogenicidad que ocasionan los geminivirus en los patosistemas regionales.
8. Conocer la distribución espacio-temporal de geminivirus y la relación de *Bemisia tabaci* con la presencia de epifitias.
9. Identificar los biotipos de mosquitas presentes en la región.

ESTRATEGIA GENERAL

Para el desarrollo de los objetivos, se plantearon las siguientes estrategias:

Identificación

1. Muestreos dirigidos en las regiones donde se han observado enchinados foliares del tomate, síndrome de posible naturaleza geminiviral, aunado a la presencia de mosquitas blancas (*Bemisia tabaci* Gennadius), transmisor específico de geminivirus.
2. Bajo la premisa de que los begomovirus sólo pueden ser transmitidos por mosquitas blancas y que además pueden ser transmitidos a diferentes hospedantes, se realizaron transmisiones experimentales con mosquitas blancas (*Bemisia tabaci*), mecánicamente, por balística y por injerto.
3. Visualización del ADN viral en su forma replicativa (FR) por técnicas de electroforesis en gel de agarosa (BrEt).
4. Detección de la familia *Geminiviridae* por hibridación molecular en manchas (tipo “dot blot”, por medios no radiactivos), utilizando sondas generales y por técnicas de serología (ELISA).
5. Detección de geminivirus del genero Begomovirus por técnicas de PCR, utilizando iniciadores de amplio espectro, diseñados a partir de secuencias conservadas del gen de la proteína de la capsida (CP).
6. Utilización de iniciadores específicos para la posible detección de algunos de los geminivirus más distribuidos en México como; *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV), *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) y *Chino del tomate virus* (CdTV).
7. Identificación provisional del virus a partir del gen AV1 (CP).
8. Identificación del virus a partir del gen AC1 que codifica para la proteína de la replicación (Rep) y la región intergénica (RI).

Caracterización y Filogenia

9. Clonación de los productos de PCR amplificados
10. Secuenciación completa del ADN-A de los geminivirus de BCS.
11. Análisis de secuencias y caracterización molecular de los geminivirus presentes (componente A para virus bipartitas).
12. Estudios filogenéticos para establecer la relación con otros geminivirus.
13. Estudio de los iterones de la región intergénica para inferir sobre el posible origen geográfico.
14. Elaboración del mapa genómico.
15. Nombramiento de los virus y propuesta como especies nuevas de acuerdo a los lineamientos del ICTV
16. Deposito de las secuencias en bases de datos de interés mundial, incluyendo GenBank (NCBI), Gemini Detective, ICTVdb.

Epidemiología

17. Distribución y detección de geminivirus, utilizando iniciadores específicos y de amplio espectro.
18. Monitoreo y detección de geminivirus en maleza, plantas endémicas y cultivos alternativos.
19. Determinación de los índices de patogenicidad; incidencia y severidad
20. Relación del síndrome del “enchinado foliar” del tomate de BCS con la incidencia de mosquitas blancas y etapas críticas de infección.
21. Identificación de biotipos de mosquitas blancas.

II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. COLECTA DE CAMPO Y MANEJO DE MUESTRAS.

Los muestreos se realizaron del 2001 al 2003 en las principales áreas tomateras de la región sur de BCS y donde se han observado plantas con el síndrome de el “enchinado foliar del tomate”, asociado con la presencia de mosquitas blancas. El trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) en La Paz y en el Laboratorio de Ingeniería Genética de Plantas del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato (CINVESTAV-IPN). Para la recolección de muestras, se realizaron muestreos dirigidos en las localidades seleccionadas, tanto en variedades de crecimiento determinado (principalmente variedad Río Grande-Harris Moran), indeterminado (principalmente var. Tequila-Vilmorin) y tipo cherry (var. Cherry Grande-Fax), así como maleza y plantas arvenses. 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). Los muestreos se llevaron a cabo semanalmente, tanto en tomate, cultivos alternos y plantas arvenses, incluyendo las que no presentaron síntomas evidentes. Al mismo tiempo, se realizaron los monitoreos de mosquitas blancas. Las regiones muestreadas fueron: El Centenario, La Paz, El Cardonal, El Calandrio, El Carrizal, El Pescadero, Todos Santos, Melitón Albañez, Los Planes, Cabo San Lucas y San José del Cabo.

2.2. DETECCIÓN DE MOSQUITAS BLANCAS

Las trampas amarillas consistieron en cortes de polietileno amarillo de 20 x 30 cm y cubiertas con aceite quemado. Estas fueron puestas en algunas de las áreas de muestreo con el fin de detectar de forma cualitativa la presencia y el arribo de las mosquitas blancas a la zona de cultivo así como para monitorear la presencia de otras especies. Se pusieron un promedio de diez trampas por parcela (1 ha), orientadas hacia el noroeste a la altura de los

dos tercios superiores de la planta. Los muestreos fueron realizados durante toda la fenología del cultivo, incluyendo las etapas críticas del inicio de la floración hasta el desarrollo del tercer racimo.

2.3. TRANSMISIONES EXPERIMENTALES

Para el estudio del rango de hospedantes experimentales se realizaron colectas de semillas de plantas arvenses y maleza más comun de las áreas agrícolas estudiadas, las cuales incluyeron ocho familias botánicas, principalmente solanáceas. El mantenimiento de las plántulas germinadas que se utilizaron en los experimentos se llevó a cabo bajo condiciones de invernadero. Las condiciones durante toda la fase experimental fue de: temperatura $32^{\circ}\text{C} \pm 2$; fotoperíodo 12/12 h (luz/oscuridad); humedad relativa $60\% \pm 5$.

2.3.1. Transmisión por *Bemisia tabaci*

La transmisión con mosquitas blancas se realizó de acuerdo a Brown y Nelson (1988), utilizando como fuente de inóculo plantas infectadas de La Paz (LaPS) y de El Carrizal (CzalB). Se utilizaron de 30-50 mb/planta. El tiempo de adquisición (partículas virales) fue de 24 h. El tiempo de inoculación fue de 72 h. Todas las transmisiones experimentales fueron realizadas en jaulas con mallas antimosquitos en las condiciones antes mencionadas, hasta la aparición de síntomas (2-3 semanas). Como control experimental se utilizaron mosquitas libres de virus de la colección del CIBNOR. La transmisión experimental fue terminada fumigando con endosulfan (2 mL/litro de agua) al término del periodo de inoculación.

2.3.2. Transmisión Mecánica.

Aunque para la mayoría de los geminivirus la eficiencia de transmisión mecánica es muy baja, se han reportado mezclas virales con virus de ARN y que se pueden transmitir mecánicamente con cierta facilidad como el virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic*

virus, *Tobamovirus*, TMV), virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, *Cucumovirus*, CMV) y el virus del grabado del tabaco (*Tobacco etch virus*, *Potyvirus*, TEV) (Yáñez y Delgadillo, 1991). Además, para eliminar la presencia de virus de ARN que pudieran ser transmitidos por mosquitas blancas (por ejemplo, el virus del amarillamiento infeccioso de la lechuga [*Lettuce infectious yellow virus*, *Crinivirus*, LIYV]), se utilizaron plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) como indicadoras (Klassen *et al.*, 1995; Brown y Nelson, 1986). La inoculación mecánica se llevó a cabo macerando hojas de tomate infectadas (500 mg) en solución (5 mL) amortiguadora de fosfatos (Fosfato de sodio 0.02 M pH 7.0) o TNE (Tris-HCl 10 mM pH7, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS estéril). Los ácidos nucleicos se precipitaron con etanol absoluto a -20°C durante 16 h y re-disueltos en agua destilada estéril. Se utilizó un mL de la suspensión para frotar las hojas, principalmente en brotes terminales o en el segundo par de hojas verdaderas. Se utilizó tierra de diatomeas o Carburundum como abrasivo (Idris y Brown, 1998; Lotrakul *et al.*, 2000). En cada experimento se utilizaron de tres a cuatro repeticiones.

2.3.3. Transmisión por Biobalística

La transmisión por biobalística se llevó a cabo en el laboratorio de Ingeniería Genética de Plantas del CINVESTAV-Irapuato. La inoculación se realizó en plántulas de tomate y nicandra a los 10 días de crecimiento (dos a cuatro hojas verdaderas). La inoculación se llevó a cabo en los brotes terminales utilizando como inóculo el ADN total infectivo, el cual contenía la forma replicativa viral. La preparación de las partículas consistió en incorporar el ADN a partículas de tungsteno (50 μL) en una solución junto con CaCl_2 2.5 M y 20 μL de espiromidina 0.1 M y mezcladas por 1 min en un sonicador. El ADN fue fijado a las partículas con 60 μL de etanol 100%. Las partículas de tungsteno impregnadas con el ADN fueron proyectadas a 800 PSI (libras/pulg²) de presión de Helio. La incubación para la expresión de síntomas se llevó a cabo en una cámara de incubación a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$. En cada uno de los experimentos de transmisión se utilizaron de tres a cuatro repeticiones. Se consideró como indicativo de transmisión positiva la aparición de síntomas característicos a los 14 días después de la inoculación.

2.4. EXTRACCIÓN DE ADN VIRAL Y ELECTROFORESIS.

El proceso de extracción del ADN total utilizado en las reacciones de PCR se realizó por los métodos de extracción de Dellaporta *et al.* (1983), mientras que la purificación de geminivirus por el método de Palmer *et al.* (1998) se utilizó con el fin de obtener la forma replicativa (ADN viral de doble cadena), el cual fue visualizado en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, en solución amortiguadora TAE (Tris-HCl) a 80 volts.

2.5. DETECCIÓN POR SEROLOGÍA (ELISA).

Para la detección general de geminivirus se realizaron ensayos serológicos ligados a enzimas de doble sándwich (DAS-ELISA). Se analizaron 32 plantas de chile (variedad Anaheim) y 64 plantas de tomate (tipo cherry) y 13 especies de maleza colectadas en áreas aledañas a parcelas comerciales. Se utilizaron antisueros policlonales comerciales y el procedimiento se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Pathoscreen kit 3F7-Agdia, Indiana). Se tomaron datos de absorbancia de las reacciones antígeno-anticuerpo a los 60 min después de la adición del sustrato. Fue considerada como positiva la coloración observada en color amarillo o si la absorbancia fue igual o superior a la lectura del control positivo, incluido en el kit de detección serológica (Clark y Adams, 1977).

2.6. HIBRIDACIÓN MOLECULAR

2.6.1. Hibridación Molecular no Radiactiva.

Para la hibridación en mancha o gota (dot blot) se transfirieron 25 μ L (10 μ g de ADN genómico) de ADN total y se fijaron a la membrana (Amersham-Hybond-N) utilizando un transiluminador (XL 1500 UV Crooslinker; Spectronics Corporation). Para el marcaje y la detección se utilizaron los productos comerciales de Amersham Pharmacia Biotech (Gene image random prime labeling module y Gene Images CDP-Star detection module) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para el marcaje de la sonda se incorporó

fluoresceína-dUTP en 10 μ L de ADN viral más polimerasa Klenow con el fin de catalizar la reacción. La fluoresceína se detectó con un anticuerpo antifuoresceina conjugado con fosfatasa alcalina. Las condiciones de astringencia y lavado fueron de acuerdo a la sonda utilizada (Sambrook y Russell, 2001). Cuando se utilizó la sonda general se utilizaron condiciones de baja astringencia con temperaturas de 55°C y lavados de 16 h con 0.1X de solución amortiguadora (SPS 1 %, SSC [concentración salina de citrato a 0.1X]). Cuando se utilizó la sonda específica, las condiciones fueron de alta astringencia con temperaturas de 65°C y lavados de 16 h con SSC 0.5 %, SDS 0.1 %. Las autoradiografías se obtuvieron al colocar las membranas positivas (5 min) en una película tipo Kodak X-Omat.

2.6.2. Hibridación Molecular con Radioisótopos

Este tipo de hibridación se realizó por Southern blot (Southern, 1975). Se transfirieron por capilaridad 10 μ L de ADN a una membrana de nitrocelulosa (Nylon Hybond +, Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, UK) a partir de un gel de agarosa (0.8 %). La membrana fue marcada con dideoxinucleótidos radioactivos dCTP.₃₂P con la técnica de iniciadores al azar (random prime) del kit comercial Amersham Redi Prim y de acuerdo al manual de laboratorio de clonación molecular (Sambroock y Russell, 2001). Las condiciones de hibridación fueron con baja astringencia (100 mL a 42° C durante 16 horas). Los lavados se realizaron dos veces con una solución amortiguadora al 0.1X (SDS 1 %, SSC 0.1X). La exposición se realizó por digitalización de imagen en pantalla STORM por 16 horas.

2.6.3. Preparación de la Sonda

La sonda general se utilizó para la detección de un amplio rango de geminivirus. Esta fue diseñada a partir de la región altamente conservada del gen de la proteína de la cápside. El fragmento de aproximadamente 600 pb fue escindida de clones diméricos de PepGMV-A y PHYVV-A con la enzima *StyI*. La sonda específica fue diseñada a partir de la región

intergénica de un clon dimérico de PHYVV-A y PepGMV-A. Los fragmentos fueron liberados con *EcoRI*.

2.7. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para la detección general de begomovirus por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por las siglas en inglés), se utilizaron un par de iniciadores de amplio espectro AC1048-AV496 que amplifican la región altamente conservada del gen de la CP (Wyatt y Brown, 1996). Para la posible detección de los geminivirus más distribuidos en México, se utilizaron los iniciadores que reconocen específicamente a los virus PepGMV, CdTV y PHYVV (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Se utilizaron alternadamente el par de iniciadores PAL1v1978/PAR1c496 que amplifican un fragmento de 1.1 kb de la región intergénica (RI), incluyendo parte de la región aminoterminal de AC1 (Rep) y AV1 (CP). Estos iniciadores se utilizaron debido a que esta región se considera altamente informativa, debido a que ahí se encuentran las secuencias conservadas (iterones) involucradas en la regulación de la replicación y la transcripción y las cuales son altamente específicas aún en geminivirus muy relacionados. Se utilizaron otros iniciadores para amplificar fragmentos específicos de acuerdo a las necesidades propias de la investigación (Cuadro 4; Fig. 6). Las reacciones fueron realizadas en un termociclador PCR System 9700 (Perkin-Elmer Cetus). Las condiciones de tiempo y temperatura para la desnaturalización, alineamiento y extensión para cada uno de los iniciadores utilizados se presenta en anexos. Los clones positivos (PepGMV-Tam, PHYVV y TYLCV) fueron obtenidos de la geminoteca del CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato. Con los iniciadores PAR1c496 y PAL1v1978 se obtuvieron más datos que nos sugerían la presencia de geminivirus aún no caracterizados. Utilizando como base estos iniciadores, se diseñaron los iniciadores PALc1998/PARv478 en sentido reverso. Los iniciadores 2525/2527 y 2526/2528 se diseñaron para la amplificación de la región interna que no se alcanzó a secuenciar. Utilizando un programa de traslape de secuencias (GeneWorks, Intelligenetics) se conjuntaron todos los fragmentos virales del componente A (Fig. 6). Los iniciadores degenerados AV494/AC1048 y Mot1/MotCP se utilizaron para establecer una identidad provisional y para fines de diagnóstico. Los iniciadores

423/425, 425/426 y 240/241 se utilizaron para la detección específica de los geminivirus más importantes de México.

Cuadro 4. Iniciadores utilizados en las reacciones de PCR

No.	Iniciador	Región que amplifican	Referencia
1	AC 1048 AV 494	Iniciadores para detección general de begomovirus a partir de la CP	Wyatt y Brown, 1996
2	Mot1 Mot CP	Parte de la CP y la RI del componente A	Ascencio-Ibáñez <i>et al.</i> , 2002
3	240 241	PHYVV-A hacia la RI	Torres-Pacheco <i>et al.</i> , 1996
4	260 261	Componente A de begomovirus	Torres-Pacheco <i>et al.</i> , 1996
5	423 424	CdTV-A a partir de la RI	Torres-Pacheco <i>et al.</i> , 1996
6	425 426	PepGMV-A a partir de la RI	Torres-Pacheco <i>et al.</i> , 1996
7	PAR1c496 PAL1v1948	Componente A de begomovirus a partir de la CP	Rojas <i>et al.</i> , 1993
8	PARv478 PALc1998	Parte de región Rep y CP hacia TraP y REN	Diseñado a partir del No. 7
9	Abpv Abpc	Componente A completo de algunos begomovirus	Briddon <i>et al.</i> , 1993
10	Pr BV 1855 Pr BC 656	Región común del componente B	Idris y Brown, 1998
11	Pr BC 1876 Pr BV 637	Complemento de la región común del componente B	Diseñado a partir del No. 10
12	BCS 2525 BCS 2527	Región interna del aislamiento de El Carrizal (d21-F2)	Diseñado en CINVESTAV-Irapuato a partir del No. 8
13	LAP 2526 LAP 2528	Región interna del aislamiento de La Paz (PU1)	Diseñado en CINVESTAV-Irapuato a partir del No. 8
16	Lyc 18S F Lyc 18S R	Región 18S del ARN ribosomal del tomate utilizado como control interno.	Taberlet <i>et al.</i> , 1991
17	H16	Patrones de bandeo específicos para distinción de biotipos de mosquitas blancas	De Barro y Driver, 1997
19	BCS 374v	CP (374-761) de los geminivirus de BCS	Diseñado en el CIBNOR
20	BCS 761c	CP (374-761) de los geminivirus de BCS	Diseñado en el CIBNOR

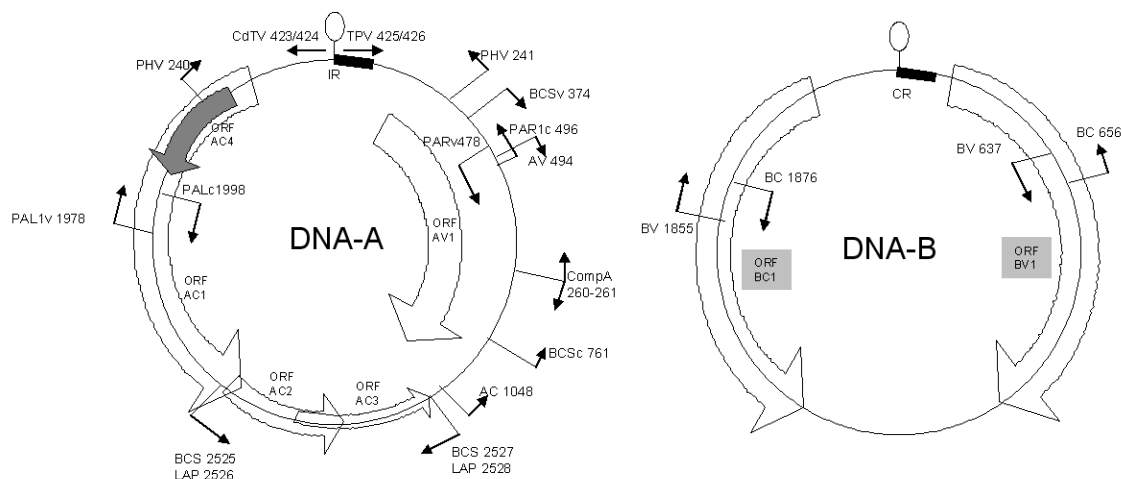


Figura 6. Sitios de amplificación por PCR del genoma de un geminivirus bipartita típico, utilizando como estrategia el uso de iniciadores de amplio espectro y específicos para la obtención de la secuencia completa.

2.8. CLONACIÓN

2.8.1. Ligación

Los diferentes productos de PCR amplificados fueron purificados con QIAquick purification kit (Qiagen, Hilden, Germany), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Una vez limpio, éste fue ligado y clonado directamente en el vector de clonación pCR 2.1 y pCR 4 (Topo TA cloning), siguiendo las instrucciones del fabricante Invitrogen, San Diego, CA. Ambos vectores tienen los genes que codifican para la beta-galactosidasa y los genes de resistencia a ampicilina y kanamicina para la selección de clonas en un medio de cultivo selectivo.

2.8.2. Transformación de Células-Competentes

Se prepararon células competentes con el fin de transformar el producto de ligación (vector y fragmento). Las células se prepararon con la cepa de *Escherichia coli* DH5 α , la cual es susceptible a ampicilina. La preparación de células fue de acuerdo a Sambroock y Russell

(2001) por medio de CaCl_2 y almacenadas a -80°C . Para la incorporación del plásmido con el inserto de interés (producto de la ligación), las células competentes se transformaron por medio de shock térmico ($0-42^\circ\text{C}$) y se incubaron a $37^\circ\text{C}/16\text{ h}/200\text{ rpm}$ para la recuperación de las células transformadas.

2.8.3. Transformación de Células Electro-Competentes

Para la transformación se utilizaron células electrocompetentes almacenadas a -80°C . La transformación se realizó por medio de shocks eléctricos en un electroporador. Una vez incorporado el producto de ligación inmediatamente se le adicionó medio de cultivo LB y se incubó a $37^\circ\text{C}/1\text{ h} / 200\text{ rpm}$. Para la recuperación de las células transformadas la siembra se realizó en placas Petri de acuerdo a la metodología anteriormente descrita. En lugar de ampicilina se utilizó carbenicilina o kanamicina. Las células recuperadas fueron sembradas por triplicado en cajas Petri en los siguientes medios selectivos: (i) LB; (ii) LB+ampicilina; (iii) LB-ampicilina+Xgal+IPTG. Previamente etiquetadas se incubaron a $37^\circ\text{C}/16\text{ h}$. Las clonas positivas se identificaron de acuerdo a coloración observada.

2.8.4. Extracción y Purificación de Plásmidos

Las colonias positivas (células transformadas con el inserto) seleccionadas se cultivaron en $100\ \mu\text{L}$ de medio nutritivo LB más ampicilina ($1\ \mu\text{L}/\text{mL}$) y se incubaron por $16\text{ h}/37^\circ\text{C}/200\text{ rpm}$. Las colonias seleccionadas a su vez se sembraron en cajas Petri más ampicilina y almacenadas a 4°C . La extracción de plásmido se realizó de acuerdo al método de extracción alcalina de Birboin y Doly (1979) y por medio de columnas de resina utilizando el producto comercial Wizard Minipreps DNA Purification Resin de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, U.S.A.). La verificación del fragmento clonado se hizo por digestión con *EcoRI* la cual corta específicamente en la región del sitio de multi-clonación del plásmido. Las clonas de interés fueron resembradas en medios selectivos (LB+ampicilina+Xgal-IPTG) y almacenadas en glicerol a -80°C .

2.9. RFLP

Para el estudio de posibles mezclas virales o variantes de algún virus, se utilizó la técnica de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés). Se seleccionaron algunas enzimas de restricción bajo el criterio de que éstas presentaran de uno a tres fragmentos en los virus en estudio. Las enzimas seleccionadas fueron: *EcoRI*, *HindIII*, *HincII*, *StyI* y *XbaI*. Para los análisis de RFLP se utilizaron los productos de PCR (1.1 kb) amplificados con PAL1v1978 y PAR1c496, los cuales generan determinados patrones de bandeo al analizarlos por electroforesis en gel de agarosa (1.2%), teñido con BrEt. Con el fin de poder inferir si las bandas generadas pudieran corresponder a posibles mezclas virales, los productos de PCR amplificados se compararon con los fragmentos similares, pero amplificados a partir de clones,

2.10. ANÁLISIS DE SECUENCIAS.

Las secuencias se obtuvieron en un analizador automatizado del Departamento de Ingeniería Genética de Plantas del CINVESTAV-Irapuato y en el Departamento de Secuenciación del CIBNOR por el método de espectrometría por fluorescencia de dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977). La secuenciación se realizó en ambas direcciones con iniciadores universales (M-13 directo y reverso). Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa SeqEdit (DNASTAR, Madison, WI) para la obtención de los posibles marcos de lectura y para la obtención de los aminoácidos deducidos. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias referidas en la base de datos del GenBank (NCBI). Para la obtención de las secuencias con las identidades más altas se utilizó la herramienta de búsqueda de alineamientos básicos locales (BLAST por sus siglas en inglés) (Altschul *et al.*, 1990). Para establecer el porcentaje de identidad de las secuencias de BCS con cada región homóloga de otros geminivirus, se utilizó el programa de algoritmos para alineamientos múltiples del MegAlign (DNASTAR, Londres) por el método de ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) y GeneWorks (Intelligenetics, Mountain View, CA).

2.11. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Los cladogramas obtenidos por Clustal fueron examinados siguiendo el procedimiento de análisis de máxima parsimonia de distancias con el programa de algoritmos computacionales (PAUP por sus siglas en inglés) versión 4.0 b 10 (Swofford, 1993). El soporte de las ramas filogenéticas fue evaluado seleccionando la opción de 500 repeticiones. Se designó como grupo externo al *Tomato yellow leaf curl virus*-TYLCV (genero *Begomovirus*; familia *Geminiviridae*) y al *Maize streak virus*-MZV (genero *Mastrevirus*; familia *Geminiviridae*). Se utilizó el método de vecino más cercano (Saitou y Nei, 1987). Las secuencias utilizadas en los análisis comparativos y cladogramas fueron obtenidas directamente de la base de datos del NCBI (GenBank).

2.12. DISEÑO DE INICIADORES ESPECÍFICOS

Se diseñaron un par de iniciadores específicos para amplificar selectivamente los geminivirus presentes en BCS. Estos fueron diseñados a partir de un consenso de la región conservada del gen de la CP del componente A. El diseño fue realizado en el programa PrimerSelect (DNASTAR, Londres).

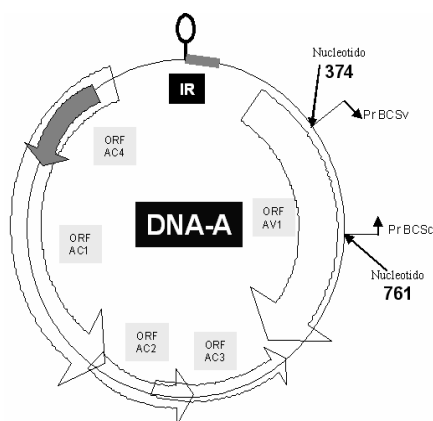


Figura 7. Componente A de los geminivirus de BCS, mostrando el sitio donde los iniciadores específicos inician la amplificación de la AV1 (CP).

2.13. DISTRIBUCIÓN DE GEMINIVIRUS

Para la detección de los geminivirus de BCS se realizaron muestreos dirigidos utilizando técnicas de PCR con iniciadores específicos y degenerados y técnicas de clonación y secuenciación. Estas se realizaron durante los ciclos agrícolas otoño-invierno 2002 y durante todo el 2003. Se analizaron un total de 400 plantas (promedio de 50 plantas por área homogénea muestreada) de las regiones hortícolas más importantes de BCS.

2.14. INCIDENCIA Y SEVERIDAD

Datos sobre incidencia fueron tomados durante los periodos normales de muestreo; primera etapa (noviembre 2001 a mayo 2002) y segunda etapa (marzo 2003-junio 2003). La detección de plantas infectadas se realizó por PCR con iniciadores de amplio espectro (Wyatt y Brown, 1996; Rojas *et al.*, 1993) y específicos (generados para este estudio). Para determinar los porcentajes de incidencia se procedió de acuerdo la fórmula:

$$\% \text{ incidencia} = (\text{numero de plantas infectadas} / \text{numero de plantas totales}) \times 100$$

Para la determinación de los índices de severidad se utilizó el criterio propuesto por Bolaños (1996) para la evaluación de virosis causadas por geminivirus en tomate. Este criterio esta basado en una escala numérica del cero al diez y de acuerdo a los síntomas presentados en cuadro 5.

2.15. RANGO DE HOSPEDANTES NATURALES.

Para la detección del rango de hospedantes se realizaron estudios en cultivos infectados en forma natural. Las especies en estudio consistieron en plantas cultivadas y plantas arvenses (principalmente maleza), pertenecientes a diferentes familias botánicas. La detección se llevó a cabo por PCR utilizando iniciadores específicos y de amplio espectro.

2.16. INFESTACIÓN Y DINÁMICA POBLACIONAL DE MOSQUITAS BLANCAS

Los muestreos se llevaron a cabo cada 7 días (± 2) durante los ciclos agrícolas 2001, 2002 y 2003. Estos se realizaron en plantaciones comerciales de tomate, incluyendo la maleza circundante a las áreas de cultivo en las principales regiones tomateras de la región. La abundancia media estacional de adultos de *B. tabaci* fue determinada por conteos en trampas adhesivas amarillas de acuerdo a Polston *et al.* (1996). Se pusieron un promedio de diez trampas por parcela y orientadas hacia el noroeste a la altura de los dos tercios superiores de la planta. Los muestreos fueron realizados durante la fase del cultivo que comprendía desde el inicio de la floración hasta el desarrollo del tercer racimo.

Cuadro 5. Escala numérica propuesta para la evaluación de virosis causada por geminivirus en tomate

Escala	Severidad de síntomas ¹
0	Sin daños aparentes
1	Imperceptibles
2	Hojas nuevas con mosaicos leves
3	Mosaico leve, lámina levemente corrugada
4	Hojas nuevas y lámina con mosaicos y arrugamientos moderados
5	Todo el follaje con mosaicos y arrugamientos
6	Lámina media con mosaicos y arrugamientos moderados
7	Mosaicos y arrugamientos intensos, ramas deformes, hojas pequeñas
8	Arrugamientos intensos, ramas deformes, hojas terminales pequeñas
9	Los mismos síntomas anteriores más enanismo y atrofia severa
10	Necrosis generalizada

¹ Propuesta por Bolaños (1996)

La dinámica poblacional alternadamente se determinó de acuerdo al índice medio de infestación (IMI) de adultos. Los muestreos se llevaron a cabo en el envés de la hoja del estrato superior de las plantas. Se utilizó la escala de valores de acuerdo a Andreas-Serra (1996), donde un valor numérico entero fue asignado de acuerdo al número de mosquitas encontradas.

Cuadro 6. Escala numérica propuesta por Andreas-Serra (1996) de acuerdo al número de adultos de *B. tabaci* por planta.

Escala	No. de adultos
0	Ningún adulto
0.5	1-12
1	13-25
2	26-50
3	51-75
4	76-100
5	≥100

Los datos de muestreo de los intervalos establecidos y la categoría de infestación fueron convertidos a Índice Medio de Infestación (IMI). Para calcularlo se registró la cantidad de muestras u observaciones en cada categoría de infestación (f_i), se multiplica por la cifra que tipifica a cada intervalo y la sumatoria se divide por el número total de muestras evaluadas (n) y donde:

$$IMI = f_{0.5}(0.5) + f_1(1) + f_2(2) + f_3(3) + f_4(4) + f_5(5) / n$$

2.17. IDENTIFICACIÓN DE BIOTIPOS DE MOSCAS BLANCAS

2.17.1. Identificación Morfológica

Para la identificación por medio de características morfológicas se recolectaron de campos infestados hojas con ninfas del cuarto instar. La observación de ninfas para la observación de setas pupales se realizó por medio del estereoscopio y microscopio compuesto (en montas permanentes en solución Hoyer). Para la identificación se utilizaron las claves

específicas para la identificación de mb inmaduros de la familia *Aleyrodidae* (Martin, 1987; Caballero, 1996). Para la identificación de especies, se seleccionaron criterios de apoyo basados en características biológicas de adultos como: (i) parámetros morfológicos (ii) asociación a hospedantes (iii) patrones conductuales (Perring *et al.*, 1993; Bedford *et al.*, 1994).

2.17.2. Identificación por RAPD

Para la identificación de biotipos por métodos moleculares, se recolectaron mosquitas blancas adultas y ninfas del cuarto instar. Los especímenes fueron preservados en alcohol (70%) y almacenados a -20°C . La identificación se realizó por PCR del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD por sus siglas en inglés). Se utilizó el iniciador H16 y las condiciones de PCR se llevaron a cabo de acuerdo a De Barro y Driver (1997).

III RESULTADOS

3.1. COLECCIÓN DE MUESTRAS

Se muestrearon un total aproximado de 900 ha que corresponden a la superficie sembrada de las once regiones y 30 localidades en estudio. Se realizó el escrutinio de alrededor de 600 muestras. En ocho regiones se encontraron evidencias de geminivirus (Cuadro 7).

De las muestras colectadas durante el 2002, sólo los aislamientos de La Paz y El Carrizal fueron identificados a especie, mientras que de las muestras colectadas durante el 2003, sólo se realizó la detección a nivel familia (*Geminiviridae*), en la regiones de Todos Santos, Pescadero, Meliton Albañez y El Cardonal. En la región de La Paz se detectó un geminivirus propuesto como nueva especie y nombrado en este estudio como *Tomato chino La Paz virus* (ToChLPV). En esta región también se encontró uno de los geminivirus más distribuidos en México, una variante muy relacionada al *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV). En la región de El Calandrio se detectó un geminivirus muy relacionado al *Tomato severe leaf curl virus* (ToSLCV), aunque de acuerdo a las evidencias presentadas es diferente de éste y ha sido nombrado tentativamente como *Tomato chino Calandrio virus* (TChCV). Finalmente, en El Carrizal se detectó la presencia de un geminivirus asignado como *Tomato chino Baja California Sur virus*, el cual está relacionado al ToChLPV.

3.2. SINTOMATOLOGÍA

En los muestreos dirigidos se observaron síntomas diversos como; enchinados (distorsión foliar), mosaicos, clorosis intervenal, brotes reducidos, enanismo, apariencia arbustiva, entrenudos cortos, amarotamiento axial de folíolos, epinastía y acucharamiento de hojas (Fig. 8, 9, 10). Similares síntomas han sido reportados en otras regiones del país donde ya se conoce que la etiología es de origen geminiviral (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2000; Garzón-Tiznado *et al.*, 2001).

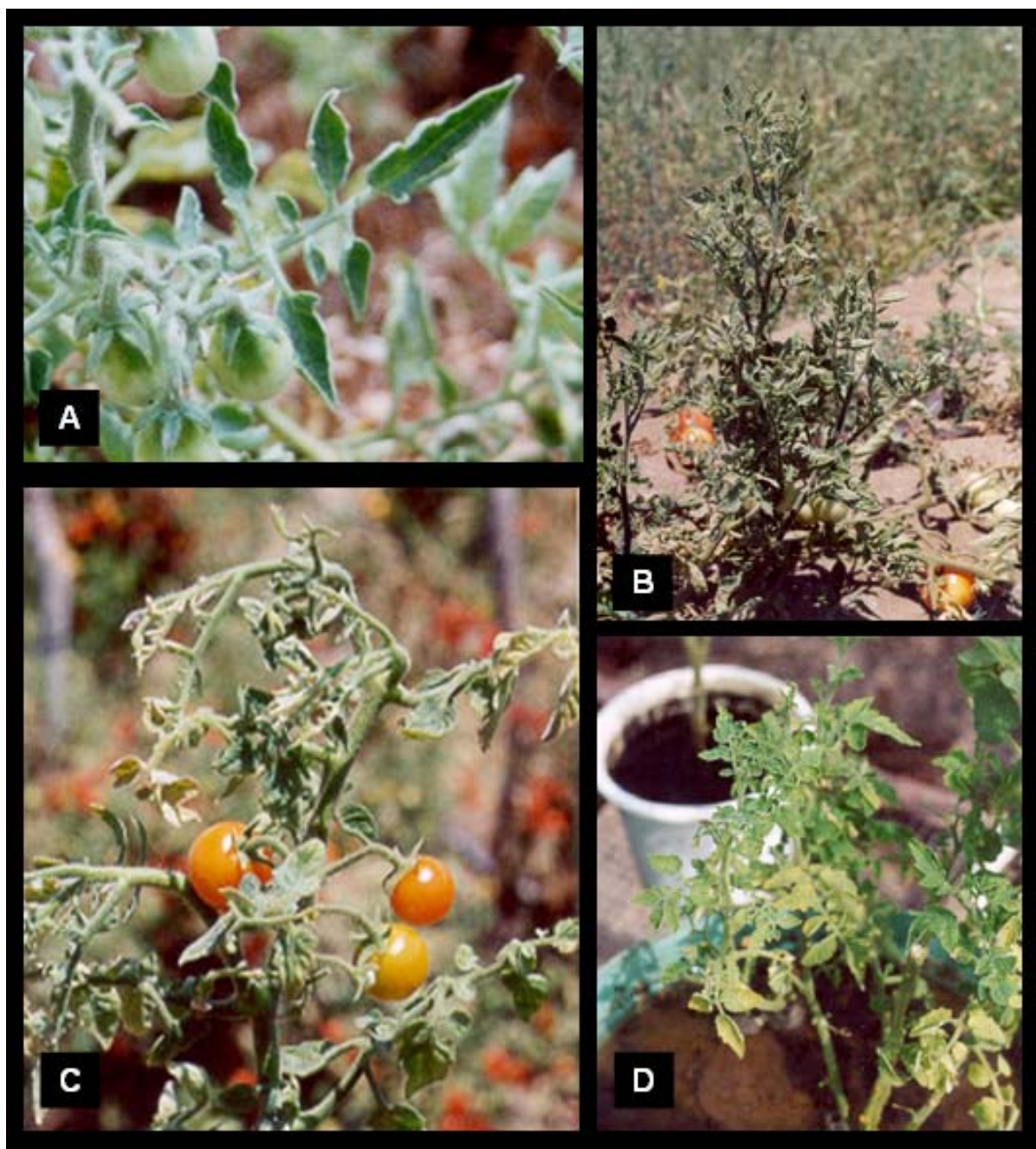


Figura 8. Síntomas asociados a infecciones por *Tomato chino La Paz virus* (ToChLPV) en tomate en La Paz. **A.** reducción de tamaño de hojas terminales y forma acucharada. **B.** Planta de aspecto erecto. **C.** Planta enchinada, entrenudos cortos, enanismo severo y hojas rugosas. **D.** Transmisión de síntomas en invernadero por medio de mosquitas blancas; nótese el acucharamiento de hojas y el tamaño reducido de las hojas.



Figura 9. Síntomas asociados a infecciones por el geminivirus Tomato chino Baja California Sur virus (ToChBCSV) en tomate en El Carrizal. **A.** Enchinado y rugosidad foliar **B.** Crecimiento detenido y maduración prematura de frutos. **C.** Reducción de tamaño de hojas terminales y abortos florales. **D.** Rizado de hojas inferiores y encrespamiento foliar **E.** Apariencia arbustiva y enanismo severo del síndrome del “enchinado foliar” del tomate de BCS. **F.** Transmisión experimental a tomate utilizando mosquitas blancas en condiciones de invernadero; nótese el encrespamiento general y la clorosis intervenal de brotes terminales.

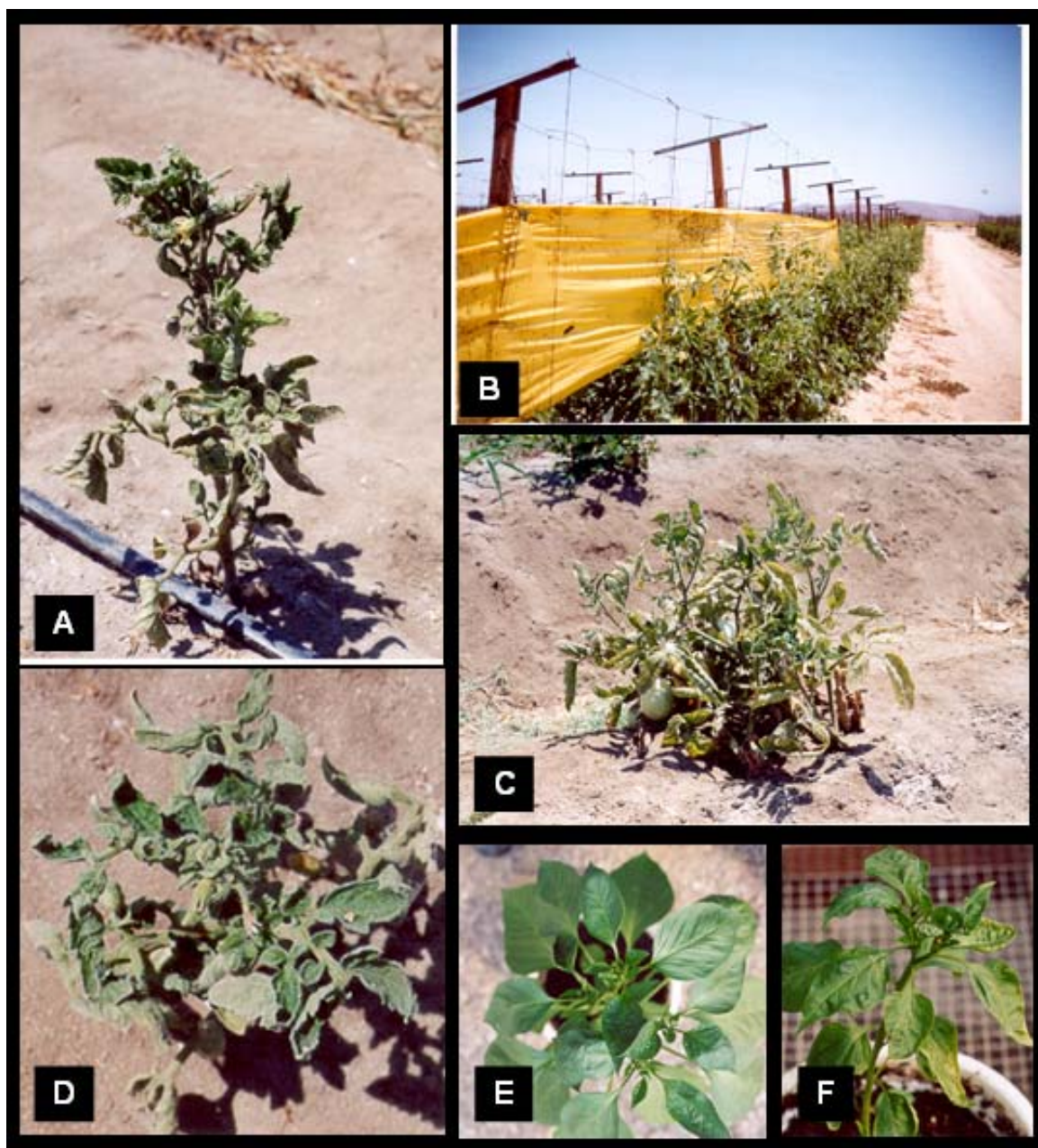


Figura 10. Síntomas ocasionados por Tomato chino Calandrio virus (TChCV) en plantas de tomate tipo Roma (saladet) en la región de El Calandrio, La Paz. **A.** Enchinado y enanismo severo. **B.** Trampas amarillas para monitoreos de mosquitas blancas involucrado con la diseminación de geminivirus. **C.** Clorosis generalizada y apariencia enana por infección severa de geminivirus. **D.** Enchinado de hojas, enanismo severo, entrenudos cortos y hojas rugosas. **E.** Transmisión experimental de geminivirus en chile utilizando mosquitas blancas. **F.** Mosaico dorado, clorosis y síntomas ligeros de enchinado en planta de chile inoculada experimentalmente por medio de mosquitas blancas.

Cuadro 7. Regiones y localidades de Baja California Sur, donde se encontraron evidencias de geminivirus.

Año	Región	Localidad	Síntomas ¹	Iniciadores ²	Virus
2002	El Carrizal	Agrodelicias	Mo, Ch, Ci, Ach, Ec, Ax, Ep, Cu	1, 2	ToChBCSV
	La Paz	UABCS	Mo, Ci, Ch, Br, Ach, Ec, Ax, Ep, Cu	1, 2	ToChLPV
		UABCS	Ci, Ch, Mo	1, 3	PepGMV
	El Calandrio	Pequeño propietario	Ch, Br, Ach, Ec, Ax, Ep, Cu, Ci	1, 2	ToChCV
2003	El Carrizal	Agrobionova	Mo, Ch, Ci, Ach, Ec, Ep	4	ToChLPV ToChBCSV
	Pescadero	Sueño Tropical	Mo, Ch, Ci, Ach, Ec, Ax, Ep, Cu	1	NI
	Meliton Albañez	Greenver	Mo, Ch, Ci, Ach, Ec, Ax, Ep, Cu	1	NI
	El Cardonal	Los Castro	Ch, Br, Ach, Ec, Ax, Ep, Cu, Ci	1	NI

- Ch= enchinado o distorsión foliar, Mo= mosaicos, Ci= clorosis intervenal, Br= hojas jóvenes y brotes reducidos, Ach= enanismo y apariencia arbustiva, Ec= entrenudos cortos, Ax= amarotamiento axial de foliolos, Ep= epinastia, Cu= acucharamiento de hojas.
- Iniciadores utilizados en la PCR; 1= AC1048/AV494, 2= PAL1v1978/PAR1c496, 3= 425/426, 4= BCS 374v/BCS 761c (para amplificación específica de ToChLPV o TChBCSV. NI= Begomovirus no identificado a especie (ver lista completa de los iniciadores utilizados en el cuadro 4).

3.2. TRANSMISIÓN EXPERIMENTAL

En las pruebas de transmisión experimental de síntomas, los resultados mostrados en el cuadro 8 nos indican que los geminivirus de BCS tienen un rango de hospedantes preferencial hacia la familia *Solanaceae*. En los experimentos con *B. tabaci* se observó una eficiencia de transmisión (EfT) del 25 al 83.3% y solamente se observaron infecciones en solanáceas, incluyendo al tomate (*Lycopersicon esculentum*), chile (*Capsicum annum*) y toloache (*Datura discolor*). En las transmisiones en forma mecánica la EfT presentada fue del 25 al 45%. Por este método, solamente se pudieron transmitir síntomas ligeros a plantas de tomate y chile (utilizando el ADN infectivo del aislamiento LaP-U3). Las transmisiones por biobalística se realizaron solamente en tres especies de solanáceas; tomate, nicandra (*Nicandra physaloides*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) presentando una EfT del 57.1 al

100%. Las transmisiones por injerto solamente se realizaron en tomates presentando una Eft del 100%. A pesar de la ligera sintomatología observada en ciertas especies (Cuadro 8) fue posible detectar la presencia de geminivirus por la PCR.

Cuadro 8. Eficiencia de la transmisión experimental de la enfermedad viral en varios hospedantes, utilizando diferentes métodos de inoculación.

Transmisión	Especie	Síntoma ¹	% Trans ²	Fuente de inóculo ³	PCR ⁴	
<i>B. tabaci</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Mo, Ch, Cl, Br, Ach, Ax, Ep	65	1, 2	+	
		Ch, Mo, Cl, Ec	83.3	3	+	
	<i>Capsicum annuum</i> L.	Mo, Ch, Cl (sl)	45	3	+	
	<i>Datura discolor</i> Bernh.	Mo, Cl (sl)	25	2	+	
	<i>Malva parviflora</i> L.	Mo (sl)	0	2	-	
	<i>Cucurbita pepo</i> L.	NS	0	2	-	
	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	NS	0	2	-	
	<i>Lactuca sativa</i> L.	NS	0	2	-	
	<i>Chenopodium album</i> L.	NS	0	2	-	
	<i>Nicotiana glauca</i> Graham	NS	0	2	-	
	<i>Portulaca oleracea</i> L.	NS	0	2	-	
<i>Xhantium strumarium</i> L.	NS	0	2	-		
Mecánica	<i>L. esculentum</i> L.	Mo, Ch (sl)	35	3	+	
		<i>Capsicum annuum</i> L.	Mo, D (sl)	25	3	+
		<i>Datura stramonium</i> L.	NS	0	--	-
		<i>Malva parviflora</i> L.	NS	0	--	-
Biobalística	<i>L. esculentum</i> L.	Ch, Cl, Br, Ach, Ep, Cu, Mo	100	2	+	
		<i>Nicandra physaloides</i> L.	Cl, D (sl)	75	1	+
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Ch, Mo, Ec	57.1	3		
		Cl, D	87.5	1	+	
Injerto	<i>L. esculentum</i> L.	Ch, Br, Ach, Ec, Ep	100	2	+	

1. Mo= mosaicos, Ch= rizado o enchinado, Cl= clorosis, Br = hojas jóvenes y brotes reducidos, Ach= enanismo y apariencia arbustiva, Ec= entrenudos cortos, Ax= amarotamiento axial de foliolos, Ep= epinastia, Cu= acucharamiento de hojas, D= distorsión foliar ligera, NS= no síntomas aparentes, (sl)= síntomas ligeros.
2. Porcentaje de transmisión= número de plantas infectadas/número de plantas totales X 100. Para todas las pruebas se utilizaron entre cuatro a ocho plantas y tres repeticiones.
3. La fuente de inóculo (ADN viral infectivo) fue de los siguientes aislamientos; 1= Czalb de El Carrizal, 2= LaPCh de La Paz, 3= LaP-U3 de La Paz, 4= LaPS-STD de El Calandrio.
4. (+)= reacción positiva, (-)= reacción negativa. La PCR se realizó con los iniciadores AV494-AC1048 (Wyatt y Brown, 1996). El control positivo fue un clon de *Pepper huasteco yellow vein virus*-PHYVV.

3.3. DETECCIÓN DE GEMINIVIRUS

Se analizaron varias técnicas de extracción para la obtención del ADN genómico y posterior purificación de ADN viral. De acuerdo a los análisis cuantitativos en el espectrofotómetro y a la determinación de la pureza de acuerdo a la absorbancia registrada (260nm/280nm) el mejor método de extracción fue el utilizado por Palmer *et al.* (1998), con una relación de 1.57 a 1.71 (Fig. 11 A, B). En el análisis electroforético se observó un fragmento de aproximadamente 2.8 kb que corresponde al tamaño del fragmento esperado para la forma replicativa. La FR se obtuvo solo en los aislamientos del Carrizal (d21-F1) (Fig. 11A) y en uno (UA4M) de La Paz (Fig. 11B).

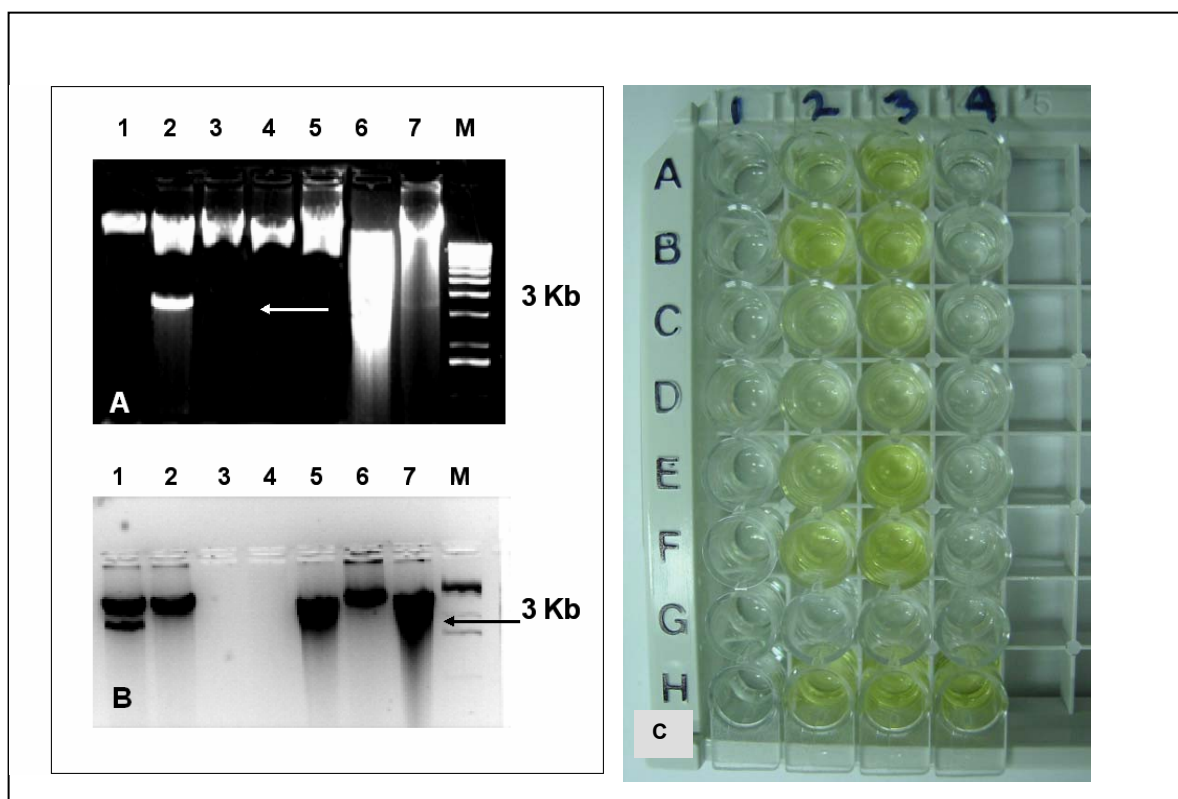


Figura 11. Patrón electroforético en gel de agarosa del ADN de plantas infectadas, mostrando el ADN geminiviral en su forma replicativa y análisis serológico. **A.** Carriles 1= ADN de planta sana; 2-7= ADN de plantas infectadas de El Carrizal, observándose la forma replicativa en la muestra d21F1 (carril 2) con tamaño aproximado de 2.8 kb. 6= ADN parcialmente degradado (almacenado cuatro meses a -80°C). **B.** Carriles 1, 5, 6, 7= ADN de plantas infectadas de La Paz, observándose la FR solo en la muestra UA4M (carril 1). 2= ADN de planta sana. M= marcador de peso molecular 1kb (Gibco BRL) **C.** Reacción (coloración amarilla) de diferentes aislamientos de BCS en el ensayo de inmunodetección por análisis serológico (ELISA). H1= control negativo, H2= control positivo (PepGMV), H3, H4= controles positivos (kit comercial), C2, D2, E2, F2, C3, D3= muestras de El Carrizal, A2, A3, B2, B3, E3, F3= muestras de La Paz (U1, U2, U3).

3.4 DETECCIÓN POR SEROLOGÍA

La técnica de serología utilizando anticuerpos comerciales (Agdia, Indiana) para detección general de geminivirus dio resultados positivos para las muestras de El Carrizal y para algunos lotes de La Paz (LaPS, LaPCh). Preliminarmente, estos resultados sugieren la limitada inmunogenicidad de la proteína de la cápside y nos muestra que los geminivirus de La Paz no son antigenicamente distintos a los de El Carrizal (Fig. 11C). Nuestros resultados concuerdan a lo encontrado por otros investigadores, en relación a la poca especificidad de esta prueba, por lo que esta técnica está limitada prácticamente para la detección a nivel de la familia *Geminiviridae* y no de especie (Roberts *et al.*, 1984; Wyatt y Brown, 1996).

3.5. HIBRIDACIÓN ADN-ADN

Se obtuvieron resultados positivos en un 29.7% de las muestras analizadas por hibridación. De las 176 muestras analizadas se obtuvieron 28 muestras positivas (29.7%) de la región de El Carrizal y 18 de la región de La Paz (Fig. 12). En la hibridación con la sonda específica para detección de PepGMV, se obtuvieron varias muestras positivas, aunque la intensidad de hibridación con respecto al control positivo (PepGMV) fue menor, se asume que pudo haber influido la conformación del ADN blanco a hibridar (Fig. 12A). En las hibridaciones con la sonda específica para detección de PHYVV se obtuvieron solamente dos muestras positivas, aunque la intensidad de hibridación fue mucho menor que el observado en el control positivo (PHYVV) (Fig. 12B). Las hibridaciones con la sonda general mostraron resultados positivos para las regiones de La Paz y El Carrizal cabe mencionar que las manchas de hibridación se presentaron con diferente intensidad, aunque todas menores a los controles positivos. Al utilizar la sonda general a partir de PepGMV se observó una reacción más intensa en algunas muestras de tomate cherry (U3) en relación a otras muestras infectadas (Fig. 12D).

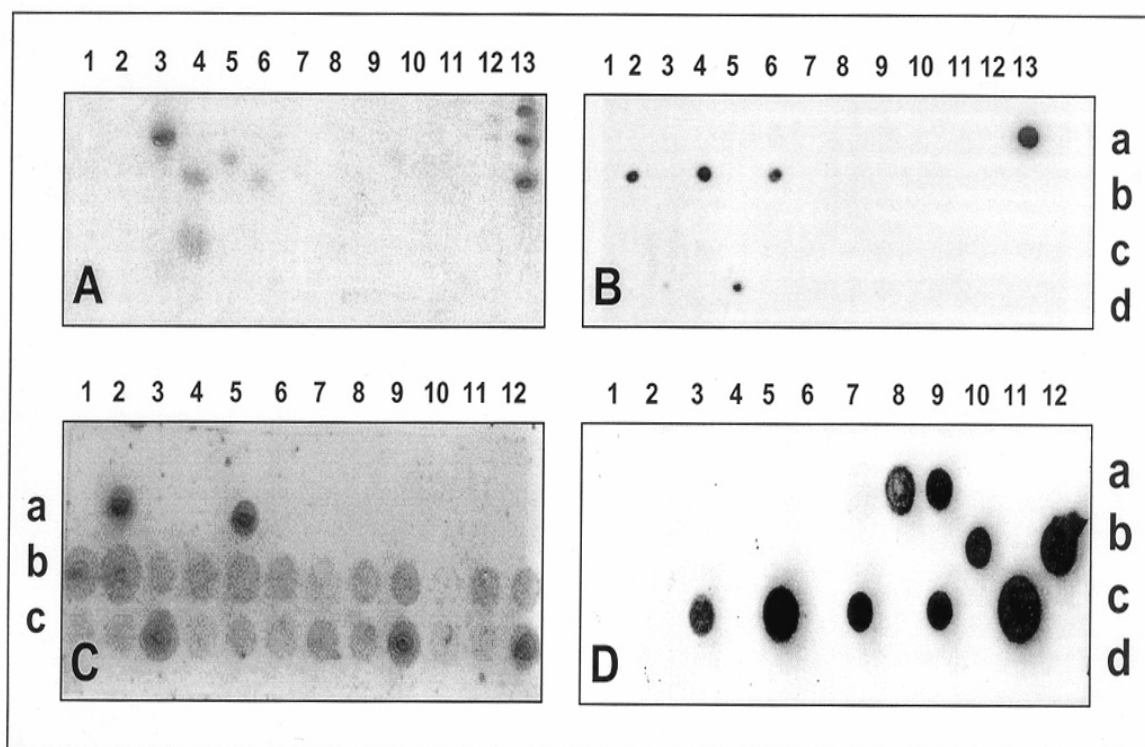


Figura 12. Hibridación molecular para detección general y específica de geminivirus en BCS. **A.** Análisis molecular por hibridación tipo Southern blot para detección específica de geminivirus relacionados con el PepGMV, utilizando como sonda parte de la región común (RC) del PepGMV: Carriles 1, 2= controles negativos; 3= control positivo (clon dimérico de PepGMV); 4, 5, 6= muestras de La Paz (U3); 7, 8, 9, 10, 11= geminivirus de El Carrizal, BCS; 12= Clon de PHYVV; 13= clon de PepGMV-Tam., sin digerir. **B.** Hibridación de ADN en gota por métodos no radiactivos para detección específica del PHYVV o aislamientos muy relacionados. Pocillos a1, a3= controles negativos; a13= control positivo (dimero de PHYVV); b2 y b4= controles positivos (plantas infectadas en forma natural); b6 y d5= muestras de La Paz. Los demás pocillos corresponden muestras negativas. **C.** Análisis molecular del ADN por hibridación en manchas para detección general de geminivirus utilizando como sonda general fragmento del gen AV1 del PHYVV. Carriles: a2= control positivo (ADN de planta infectada con PepGMV); a5= clon dimero de PHYVV; a7= control negativo (ADN de planta sana); a9= control interno (plásmido); a11= agua destilada; b1 a b6= aislamientos de La Paz (LaPU3); b7 a b12= aislamientos de tomate tipo bola de El Carrizal (CzalB-d21); c1 a c6= aislamientos de tomate tipo saladet de El Calandrio (LaPS); C7 a C12= aislamientos de tomate tipo cherry de La Paz (LaPCh). **D.** Hibridación en mancha utilizando el fragmento de la CP del PepGMV como sonda general, en condiciones de baja astringencia. 5c, 11c= control positivo (clon dimérico de PepGMV-Tam); 12b= planta infectadas con PepGMV; 8a, 9a, 10b, 7c, 9c= plantas de tomate (cherry) procedentes de la región La Paz (U3s); 3c= planta de tomate tipo Roma procedentes de El Calandrio (TU2).

3.6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En las reacciones de PCR con todos los iniciadores probados (Cuadro 4), solo se obtuvieron amplificaciones con las muestras procedentes de las regiones de La Paz y El Carrizal. En el cuadro 9 se muestran los iniciadores con los que se obtuvieron resultados positivos y el fragmento obtenido. Con los iniciadores AV494/AC1048 (Wyatt y Brown, 1996) se obtuvo una amplificación de aproximadamente de 560 pb, tamaño correspondiente para geminivirus bipartitas (dos componentes genómicos de ADN), mientras que para el geminivirus monopartita TYLCV (usado como referencia), se obtuvo un fragmento de aproximadamente 700 pb (Fig. 13). En la amplificación con iniciadores específicos para la detección de algunos geminivirus presentes en México, solo se obtuvieron amplificaciones con los iniciadores 425/426 (Torres-Pacheco *et al.*, 1996) con muestras de La Paz (U3). No se obtuvieron resultados positivos con los iniciadores para amplificar específicamente al *Chino del tomate virus*-CdTV, *Pepper huasteco yellow vein virus*-PHYVV (Fig. 13).

Cuadro 9. Amplificación por PCR utilizando iniciadores de amplio espectro y específicos para detección general de geminivirus.

No.	Iniciador	Fragmento amplificado ¹
1	AC1048/AV494	560 pb
2	Mot1/Mot CP	430 pb
3	240/241	350 pb
4	260/261	2.6 kb
5	423/424	NA
6	425/426	2.6 kb
7	PAR1c496/PAL1v1948	1.1 kb
8	PARv478/PALc1998	1.5 kb
9	Abpv/Abpc	NA
10	Pr BV 1855/Pr BC 656	NA
11	Pr BC 1876/Pr BV 637	NA
12	BCS 2525/BCS 2527	350 pb
13	LAP 2526/LAP 2528	350 pb
16	Lyc 18S F/Lyc 18S R	402 pb
17	H16	Varios fragmentos
18	pBCSV374v/pBCS761c	387 pb

¹ NA= no amplificado

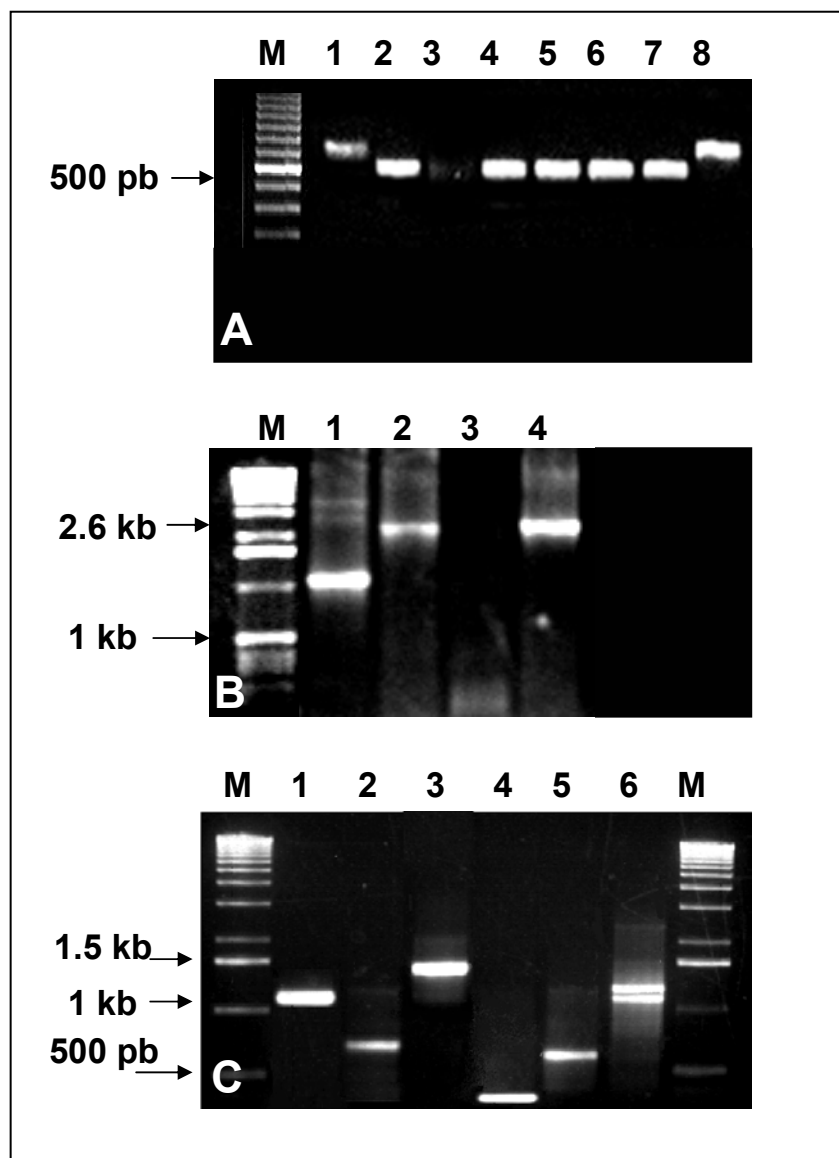


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de productos de PCR utilizando iniciadores generales y específicos que amplifican diversas regiones del genoma geminiviral. **A.** Amplificación de AV1 con los iniciadores AV494/AC1048: 1 y 8= controles positivos (*Tomato yellow leaf curl virus-TYLCV*) que amplifican aproximadamente 700 pb para geminivirus monopartita; 2= control positivo de geminivirus bipartita (*Pepper golden mosaic virus-PepGMV*); 3 a 7= amplificaciones de aproximadamente 560 pb de muestras de La Paz y El Carrizal; M= marcador de peso molecular (100 pb) **B.** Amplificación con iniciadores específicos para algunos geminivirus presentes en México; 1= control positivo (PepGMV); 2= amplificación de muestras de La Paz con iniciadores 425/426; 3= control negativo (planta sana); 4= control positivo (PepGMV amplificado con iniciadores 260/261). **C.** Amplificando geminivirus de BCS utilizando varios juegos de iniciadores: 1= producto de amplificación de \approx 1.1 kb de la región intergénica (RI) con iniciadores PAR1c496/PAL1v1978; 2= amplificación de \approx 580 de la región intergénica y parte de la CP con Mot1/MotCP; 3= amplificación de \approx 1.5 kb de la región AC2 con PARv478/PALc1998; 4= control positivo interno (amplifica la región ribosomal 18S de plantas); 5= región CP con AV494/AC1048; 6= detectando mezcla geminiviral con PAR1c496/PAL1v1978; M= marcador de peso molecular 1 kb-Gibco.

3.7. CLONACIÓN

En el cuadro 10 se presentan los clones obtenidos en estas dos regiones de muestreo, así como el tamaño del fragmento clonado. Para la secuenciación completa de los genomas de los clones d21-f2 (El Carrizal) y PU2 (La Paz), se obtuvieron las amplificaciones de ≈ 1.1 kb de la región intergénica y de ≈ 1.5 kb que amplifica hacia AC2 (Rep). Dado que no se alcanzaron a secuenciar las 1.5 kb por el tamaño del fragmento, se diseñaron dos pares de iniciadores internos (uno para cada clon) los cuales amplificaron aproximadamente 400 pb c/u. Todas las clonas positivas obtenidas se verificaron por PCR y por digestiones con enzimas seleccionadas (Fig. 14).

Cuadro 10. Aislamientos y clones de El Carrizal y La Paz obtenidos a partir de la PCR.

Clon ¹	Región	CP ²	RI ³	Rep ⁴ a CP	TraP ⁵ a REN ⁶
		560 pb	1.1 kb	1.5 kb	400 pb
Pd2-1	Carrizal	✓	NO	✓	NO
Pd-F2	Carrizal	✓	✓	✓	✓
PU3	Calandrio	✓	✓	NO	NO
PU1	La Paz	NO	✓	✓	✓
PU4	La Paz	NO	✓	NO	NO
No clonado	La Paz	✓	✓	NO	NO

1. Clones Pd2-1, PdF2 aislados de El Carrizal, BCS; PU3 aislado de El Calandrio (LaPS); PU1, PU4 aislado de La Paz (LaPCh);
2. CP= gen de la proteína de la cápside (AV1).
3. RI= región intergénica.
4. Rep= gen de la replicación (AC1).
5. TraP= gen transactivador de la transcripción (AC2)
6. REN= gen potenciador de la replicación (AC3).
NO= no amplificado.

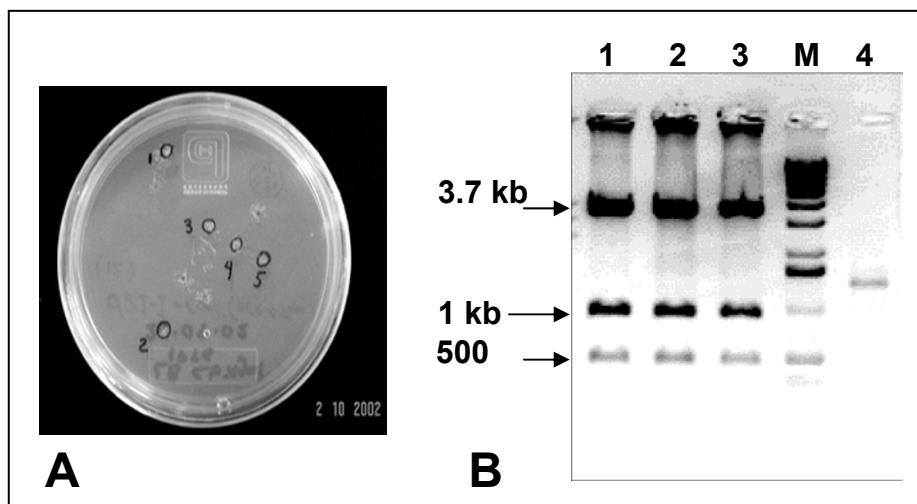


Figura 14. Selección y verificación de los fragmentos clonados. **A.** Crecimiento de colonias positivas blancas (*Escherichia coli* DH5 α + vector pCR 4 TOPO TA Cloning-Invitrogen + fragmento de PCR) y azules (plásmido sin el inserto) sembradas en medios selectivos (LB + carbenicilina + Xgal + Iptg). Las colonias numeradas 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a clonas positivas clonadas con el posible fragmento en estudio. **B.** Electroforesis en gel de agarosa (1.2%) de extracción de ADN plasmídico y digerido con la enzima *Eco*RI: 1, 2, 3= fragmentos liberados de 1 kb y 500 pb cortados en la región interna de AC2 (TraP) de los clones d21F2, d21F5 y LaPCh. La banda superior corresponde al tamaño del plásmido (3.7 kb); 4= producto de PCR sin digerir (1.5 kb); M= marcador de peso molecular 1 kb-Gibco

3.8. ANÁLISIS DE SECUENCIAS POR BLAST

De las secuencias analizadas, se obtuvieron cuatro secuencias diferentes (entre ellas y a otras reportadas). De la región de El Carrizal, se obtuvo el aislamiento CzalB del cual se clonaron (d21-F2) y secuenciaron un total de 2609 pb correspondientes al genoma completo del componente A. De la región de La Paz se obtuvieron tres secuencias. La primera fue correspondiente al aislamiento LaPCh del cual se secuenciaron 2606 pb, que corresponde al genoma completo del componente A. La segunda fue del aislamiento LaPS del cual se secuenciaron 1149 pb y la tercera fue del aislamiento U3 del cual se secuenciaron directamente de producto de PCR 1726 pb (Cuadro 11). De acuerdo a los porcentajes observados en la secuencia nucleotídica (Cuadro 12) y aminoácidos deducidos (Cuadro 13), las secuencias de BCS reportadas en este trabajo serán referidas en lo sucesivo de acuerdo al cuadro 14.

Cuadro 11. Nucleótidos secuenciados de cuatro aislamientos de geminivirus BCS.

Aislamiento ¹	Clon	Localidad	Región	Hospedante	Secuencia
CzalB	D21-F2	Agrodelicias	Carrizal	Tomate tipo “gordo”	2609 pb Comp. A “completo”
LaPCh	PU1	PP	La Paz	Tomate tipo cherry	2606 pb Comp. A “completo”
LaPS	TU2	El Calandrio	La Paz	Tomate tipo saladet	1148 pb RI, CP y Rep. Comp A
U3	No clonado	UABCS	La Paz	Tomate tipo cherry	1726 pb RI, CP y Rep. Comp A

¹ CzalB= Carrizal, tomate tipo “bola” o de mesa, LaPCh= La Paz, tomate tipo cherry, LaPS= La Paz tomate tipo Roma o “saladet”, LaPU3= La Paz, tomate tipo cherry del campo agrícola de la UABCS.

Cuadro 12. Porcentajes de identidad basados en la comparación de la secuencia nucleotídica.

Aislamiento	Identidad más alta	No. acceso GenBank	% Identidad ¹ nt	Bases comparadas
LaPCh	<i>Tomato severe leaf curl virus</i> ToSLCV	AF130415	92	1035/1121
			81	265/327
			86	130/151
			94	34/36
	Tomato geminivirus (Nicaragua)	AJ277061	96	512/533
CzalB	<i>Tomato mild mottle virus</i> ToMMoV	AF131071	95	423/450
			90	473/525
	<i>Tomato severe leaf curl virus</i> ToSLCV	AF130415	95	63/66
			91	1031/1122
			87	180/206
LaPS	<i>Tomato mild mottle virus</i> ToMMoV	AF131071	79	383/481
			95	780/821
	Tomato geminivirus (Nicaragua)	AJ277061	91	482/527
	<i>Tomato severe leaf curl virus</i> ToSLCV-GTS 96-1	AF130415	96	514/533
			93	649/697
LaPU3	<i>Cabbage leaf curl virus</i> CaLCuV	U65529	82	144/174
			88	61/69
	<i>Pepper golden mosaic virus</i> - Tamaulipas strain PepGMV-[Tam]	U57457	87	534/610
			91	751/817
			98	493/502
<i>Pepper golden mosaic virus</i> - Costa Rica PepGMV-[CR]	AF149227	95	785/824	
		92	462/502	
<i>Pepper golden mosaic virus</i> PepGMV	AF136404	92	1206/1303	

¹ El porcentaje fue calculado por la herramienta del BLAST (blastn) del NCBI. Los análisis se realizaron basados en toda la secuencia nucleotídica disponible en cada uno de los aislamientos.

Cuadro 13. Porcentajes de identidad basados en la comparación de secuencia de aminoácidos del gen AV1 (CP).

Virus comparado	Virus de más alta identidad	Referencia	% identidad aa	Bases comparadas
LaPCh	ToSLCV-GTS 96-1	AAD33453	84	213/251
	MCLCuV	AAK83146	84	212/251
	CLCrV	AAL96825	83	210/251
CzalB	ToSLCV-GTS 96-1	AAD33453	84	213/251
	MCLCuV	AAK83146	84	212/251
	CLCrV	AAL96825	83	210/251
LaPS	ToMMoV	AAD33472	97	47/48
	PepGMV	AAQ74382	79	38/48
	ToSLCV-GTS 96-1	AAD33453	79	38/48
LaPU3	PepGMV	AAQ74382	98	230/234
	Texas pepper virus TPV	AAC99394	97	228/234
	PepGMV-[CR]	AAF06955	97	227/234

Cuadro 14. Nombramiento provisional de las secuencias obtenidas, número de acceso al GenBank y número de referencia taxonómico del NCBI.

Aislado	Nombre propuesto	Acrónimo	GenBank	Taxón NCBI	ICTV ID
LaPCh	<i>Tomato chino La Paz virus</i>	ToChLPV	AY339618 GI:33520147	Db xref: 240492	1075610417 (401C8331)
CzalB	<i>Tomato Chino Baja California Sur virus</i>	ToChBCSV	AY339619 GI:33520153	Db xref: 240493	1076026871 (4022DDF7)
LaPS	<i>Tomato Chino Calandrio virus</i>	TChCV	AY336088 GI:33188205	Db xref: 239488	1076023582 (4022D11E)
LaPU3	<i>Pepper golden mosaic virus-La Paz</i>	PepGMV-[La Paz]	AY368336 GI:37039914	Db xref: 223301	1076041568 (40231760)

3.9. ALINEAMIENTOS MÚLTIPLES POR MEGALIGN

Los aislamientos que produjeron las identidades más altas por alineamientos BLAST del GenBank (incluyendo todos los geminivirus aislados o detectados en México) se compararon por alineamientos múltiples utilizando el programa computacional MegAlign (DNASTAR). Los aislamientos ToChLPV y ToChBCSV se compararon basados en la secuencia completa del componente A y de cada uno de los MLA, incluyendo la región intergénica, mientras que ToChCV y PepGMV se compararon basados en la región intergénica y parte de la región Rep. En la figura 15 se observa el alineamiento de los virus

de BCS con otros geminivirus detectados en México, donde el color rojo corresponde a las regiones altamente conservadas, mientras que el azul corresponden a regiones altamente variables. En las figuras 16 y 17 se muestran los alineamientos basados en la secuencia en aminoácidos de los genes CP y Rep, donde se observan en forma punteada las regiones altamente conservadas. Al realizar los alineamientos de los virus de BCS con otros geminivirus bien caracterizados de México y del mundo, se obtuvo que la región amino terminal de Rep, aunque presenta regiones muy conservadas, en algunas regiones la variabilidad es alta (Fig. 17). Los porcentos de identidad calculados por los algoritmos del programa MegAlign basados en la secuencia completa y en la región intergénica nos muestran que la comparación entre los geminivirus más relacionados, el porcentaje siempre es menor del 90% (Fig. 18). En los cuadros 15 y 16 se muestran los porcentajes de identidad de ToChLPV y TChCV. Se observa que los porcentajes más altos corresponden a comparaciones con geminivirus aún no caracterizados o parcialmente secuenciados.

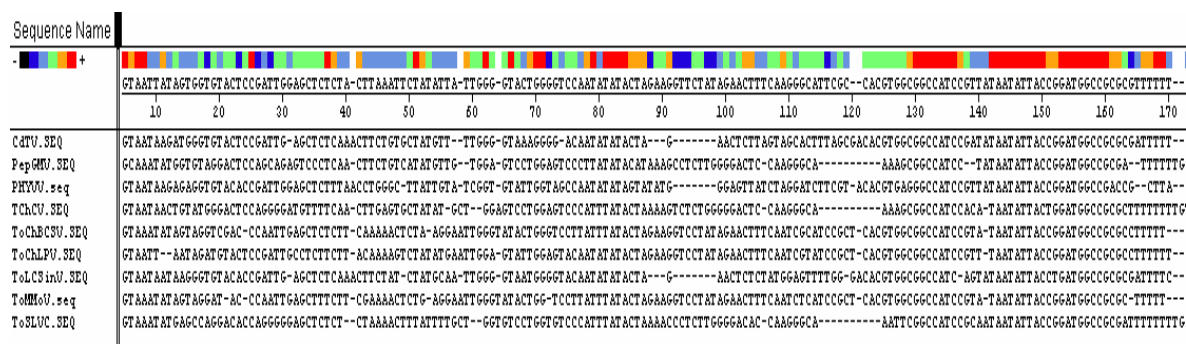


Figura 15. Alineamiento múltiple de los primeros 170 nucleótidos de la región intergénica de los geminivirus más recurrentes en México y algunos geminivirus Centro Americanos que comparten una alta identidad con los geminivirus de BCS. En color rojo se indica: 1) Región altamente conservada, pertenecientes al nonanucleótido TAATATTAC de la estructura de asa. 2) Secuencia palindromica CGGCCATC de la estructura del tallo. 3). Motivo estructural caja G y 4). Motivo estructural caja TATA. Regiones en azul pertenecen a las regiones menos conservadas entre los geminivirus comparados.

Cuadro 15. Comparación de ToChLPV basados en la secuencia completa del componente A con otras secuencias de geminivirus del género *Begomovirus*.

Virus	Comp A	RI ¹	AC1	AC2	AC3	AC4	AV1 (CP)
-------	--------	-----------------	-----	-----	-----	-----	----------

	nucleótido (nt)		(Rep)	(TraP)	(REn)	aminoácido (aa)	
Del GenBank							
BCaMV	64.3	38.7	63.9	68.0	80.3	25.9	85.1
BGMV	66.1	43.8	81.8	60.9	71.2	-	76.5
BGYMV-[MX]	65.5	34.4	76.0	64.1	76.5	-	91.3
CaLCuV	62.3	34.1	62.1	66.4	78.0	27.1	90.9
CdTV	68.9	36.6	80.6	57.0	73.5	68.2	76.9
CuLCuV	61.0	29.2	60.1	65.6	73.5	-	91.1
MCLCuV	61.8	33.6	59.5	58.6	77.3	12.9	92.2
PepGMV-[Tam]	61.2	35.2	59.2	64.1	74.2	-	91.5
PHYVV	61.6	38.3	62.7	50.8	62.9	16.5	89.7
PHYVV-[Sin]	61.6	39.3	63.0	49.2	65.9	16.5	89.7
PYMV	67.4	36.2	80.1	60.9	74.2	-	76.9
RhGMV	63.7	37.6	65.9	60.2	67.4	-	90.1
SACMV	52.3	23.5	66.2	45.3	44.7	50.6	78.7
SiGMHV	66.2	40.2	79.2	60.2	73.5	64.7	76.5
SiYMV	63.7	27.5	71.4	50.0	59.8	48.2	52.7
SLCV	59.9	30.6	59.2	61.7	75.8	-	91.3
SMLCV	62.7	29.0	63.3	63.3	74.2	-	-
ToLCVSiV	65.3	40.5	76.0	-	-	-	-
SYMMoV	62.0	35.8	58.7	61.7	75.0	-	90.9
TCSV	54.0	28.4	68.5	46.1	50.8	68.2	79.3
TGMV	67.8	42.2	79.5	64.1	77.3	65.9	91.3
ToLCV	55.5	26.5	67.9	44.5	42.4	58.8	78.9
ToMMoV prop inc	83.8	72.4	82.7	-	-	-	98.3
ToMHV	64.4	45.4	76.0	58.6	70.5	62.4	75.9
TomGem (Nic) cp	95.9	-	-	-	-	-	97.7
ToMoTV	68.2	40.9	76.0	56.2	70.5	-	76.7
ToMoV	64.6	46.1	77.7	55.5	74.2	-	76.1
ToRMV	66.1	36.7	80.3	64.1	72.7	12.9	77.9
ToSLCV	73.8	56.9	67.7	93.0	90.9	-	77.7
TYLCV	50.7	25.7	64.5	39.8	41.7	61.2	81.3
Determinados en este estudio							
PepGMV-[LaP]	52.4	35.2	51.1	-	-	-	92.8
Prop inc							
TChCV Prop inc	60.8	60.6	56.1	-	-	-	100.0
TChBCSV Prop	90.2	76.6	89.6	89.1	92.4	85.9	99.4
DNA-A							

¹ Comp A= Componente genómico A; RI= Región intergénica; nt= nucleótidos; aa= aminoácidos

Cuadro 16. Porcentaje de identidad de TChCV con otros geminivirus basados en la secuencia nucleotídica (Rep, RI y CP) y de aminoácidos.

Virus	DNA CR-A	Aminoácido AC1 (Rep)	Aminoácido AV1 (CP)
	%	%	%
ToSLCV-[GT96-1]	82.8	95.2	79.2
CaLCuV	48.9	90.0	70.8
BCaMV	68.7	89.6	64.6
SMLCV	69.9	85.2	72.9
CuLCuV	63.3	83.5	60.4
PepGMV-[Tam]	63.5	83.0	70.8
MCLCuV	60.5	82.2	72.9
SLCV	63.9	80.9	70.8
CdTV	45.9	54.3	60.4
TLCSinV	50.4	52.9	66.7
ToMoV	47.3	52.6	62.5
SiGMV	52.1	52.6	62.5
BGYMV-[MX]	47.4	52.2	70.8
ToMoTV	48.7	51.7	60.4
ToRMV	46.8	51.7	58.3
RhGMV	39.6	48.3	68.8
PYMV	19.9	47.0	64.6
PHYVV-[Sin]	39.5	46.5	58.3
TYLCV	36.0	43.9	29.2
ToMMoV	57.7	50.9	97.9
Tomato geminivirus	22.9	-	16.7
En este estudio			
TChLPV	60.7	56.1	100.0
TChBCSV	59.8	53.9	100.0
PepGMV-[BCS]	63.5	83.0	79.2

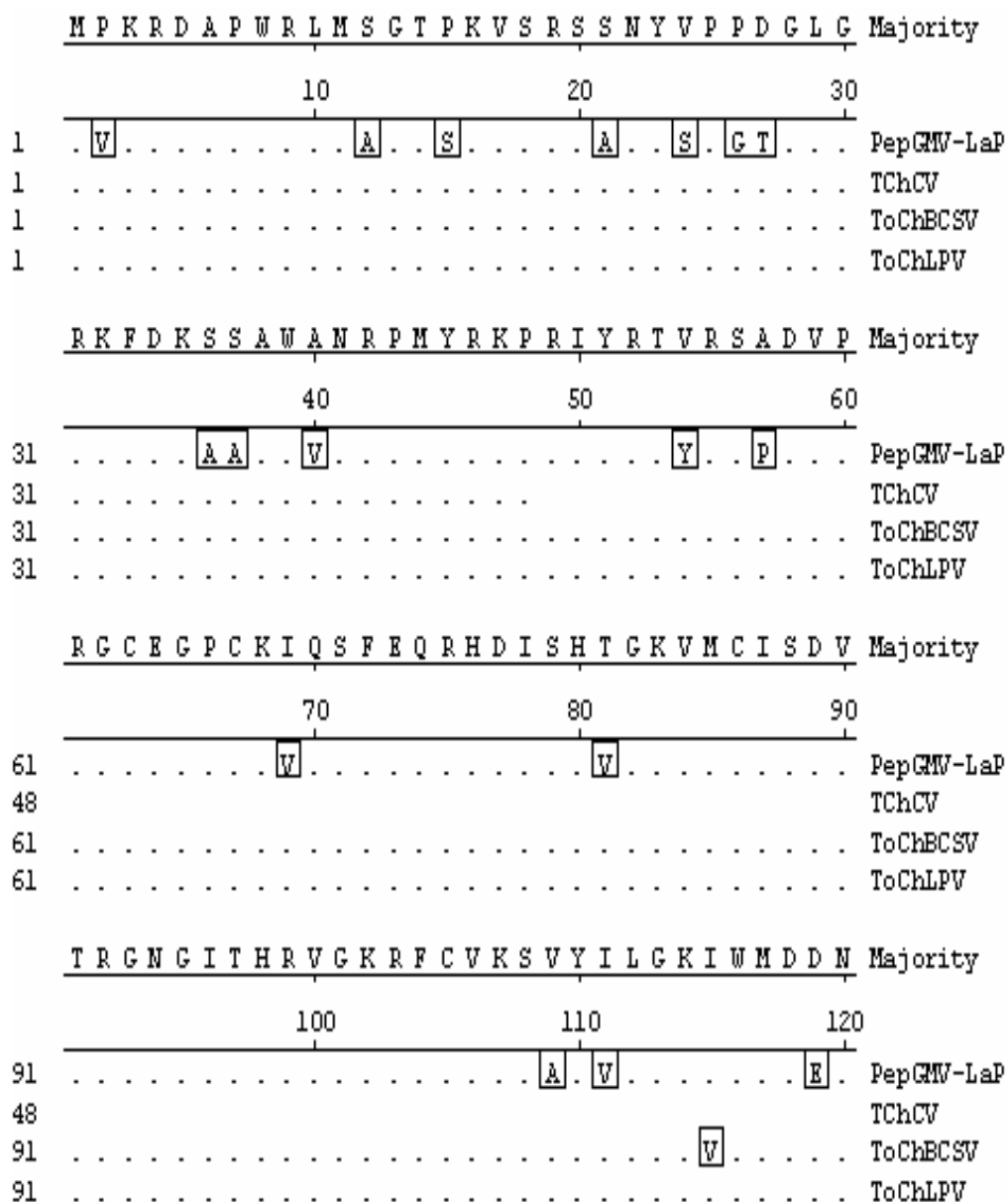


Figura 16. Alineamiento de la región aminoterminal de la CP de los geminivirus aislados en BCS. Los puntos indican los residuos conservados entre los geminivirus comparados. Las letras son referidas a los aminoácidos e indican la posición donde uno o más aminoácidos diferentes pueden ser encontrados.

	M	P	K	R	D	A	P	W	R	L	M	A	G	T	P	K	V	S	R	S	S	N	Y	S	P	R	T	G	L	G	Majority
	10										20										30										
1	L	.	.	.	S	I	.	.	.	S	.	.	.	N	A	G	.	S	.	CdTV.PRO		
1	.	V	S	.	.	G	.	A	.	.	R	G	.	M	.	PepGMV.PRO			
1	T	.	.	A	.	I	.	T	G	.	N	.	R	A	L	I	M	.	PHYVV.pro		
1	S	V	.	P	D	.	.	ToChBCSV.PRO		
1	S	V	.	P	D	.	.	ToChLPV.PRO		
1	S	F	.	A	.	S	N	A	M	.	ToLCSinV.PRO			
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Tomato GV.PRO		
1	S	A	V	.	P	D	.	.	ToMMoV.pro		
1	Q	T	.	ToSLCV.PRO	
	P	K	F	D	K	A	S	A	W	V	N	R	P	M	Y	R	K	P	R	I	Y	R	T	V	R	S	P	D	V	P	Majority
	40										50										60										
31	.	R	I	N	.	A	E	L	.	T	.	.	.	CdTV.PRO		
31	A	S	Y	PepGMV.PRO		
31	.	S	T	S	R	M	Y	.	T	.	.	.	PHYVV.pro	
31	R	S	.	.	A	A	.	.	ToChBCSV.PRO		
31	R	S	.	.	A	A	.	.	.	ToChLPV.PRO		
31	.	V	.	.	.	T	V	M	ToLCSinV.PRO		
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Tomato GV.PRO		
31	R	S	.	.	A	A	.	.	.	ToMMoV.pro		
31	H	A	W	.	T	.	.	ToSLCV.PRO	
	R	G	C	E	G	P	C	K	V	Q	S	F	E	Q	R	H	D	I	S	H	T	G	K	V	M	C	I	S	D	V	Majority
	70										80										90										
61	Y	CdTV.PRO		
61	.	X	V	PepGMV.PRO		
61	K	V	.	V	.	.	.	I	PHYVV.pro		
61	I	ToChBCSV.PRO		
61	I	ToChLPV.PRO		
61	K	Y	V	ToLCSinV.PRO		
12	I	Tomato GV.PRO		
61	I	ToMMoV.pro		
61	Y	V	ToSLCV.PRO		
	T	R	G	N	G	I	T	H	R	V	G	K	R	F	C	V	K	S	V	Y	I	L	G	K	I	W	M	D	E	N	Majority
	100										110										120										
91	CdTV.PRO		
91	A	.	V	PepGMV.PRO		
91	PHYVV.pro		
91	V	.	.	.	D	.	ToChBCSV.PRO	
91	D	.	ToChLPV.PRO
91	L	.	S	ToLCSinV.PRO		
42	V	.	.	D	.	Tomato GV.PRO	
91	V	ToMMoV.pro	
91	ToSLCV.PRO	

Figura 17. Alineamientos múltiples de los geminivirus detectados en BCS basados en la secuencia de aminoácidos de Rep con otros geminivirus reportados o aislados en México, incluyendo las secuencias más similares a los aislamientos de BCS.

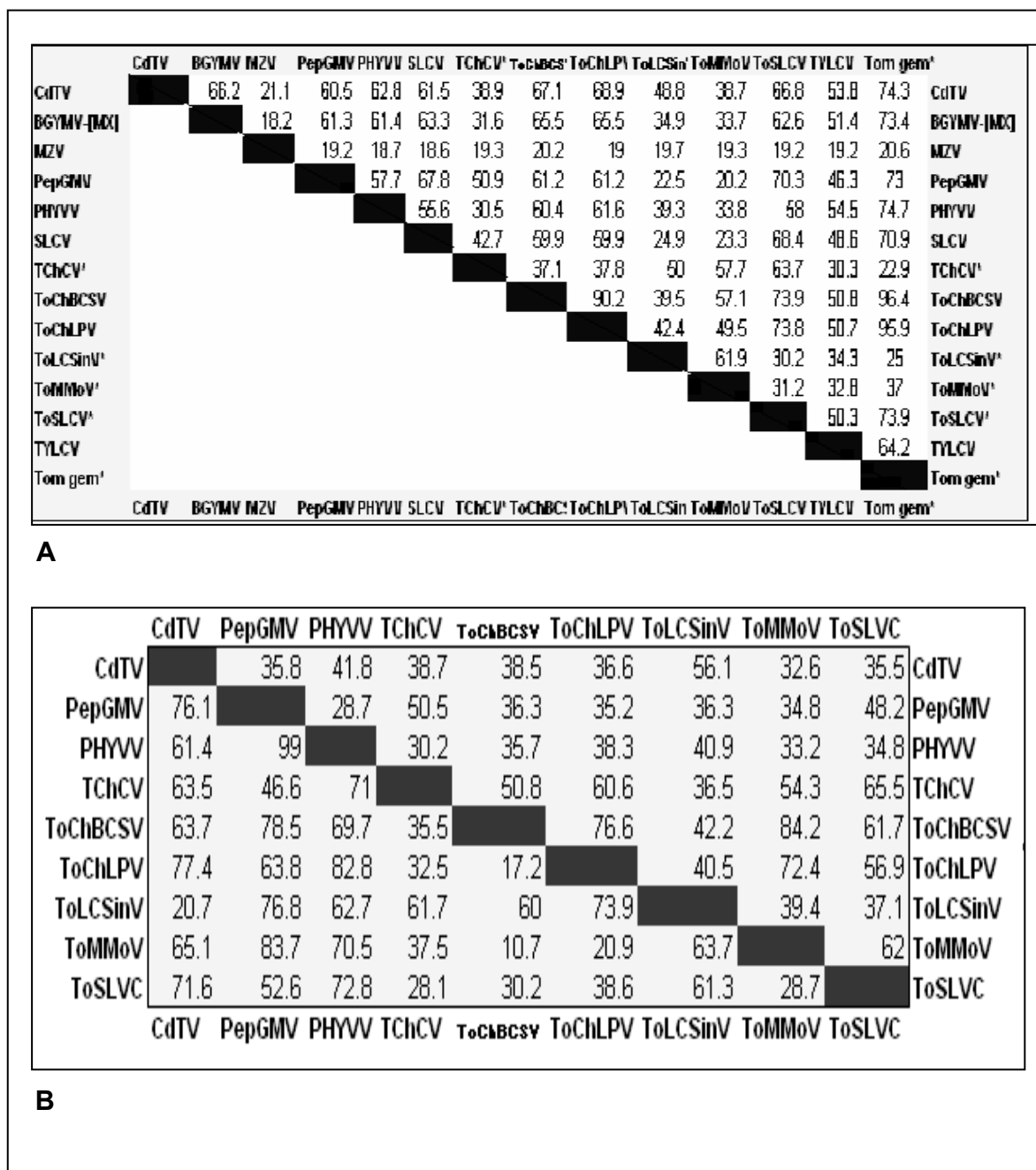


Figura 18. Porcentajes de identidad por alineamientos múltiples de varios geminivirus del género *Begomovirus*. **A**). Alineamiento basado en toda la secuencia nucleotídica disponible en el banco de datos. *= secuencia parcial. **B**). Alineamiento basado en la secuencia nucleotídica de la región intergénica de los geminivirus más importantes de México, incluyendo los geminivirus Centroamericanos relacionados con los aislamientos de BCS. El triángulo superior de cada figura representa el porcentaje de identidad y el triángulo inferior representa el porcentaje de divergencia.

3.10. MAPA GENÓMICO

Se obtuvieron dos mapas genómicos completos a partir del componente A de los geminivirus TChLPV y TChBCSV. Estos begomovirus de naturaleza bipartita tienen 5 MLA en el componente A y dos en el componente B (no secuenciados en el presente trabajo), además de poseer una región intergénica de alrededor de 325 pb. La secuencia positiva de el componente tiene un MLA (AV1) en sentido del virión con el codon de inicio ATG y cuatro MLA (AC1, AC2, AC3 y AC4) en sentido negativo (en la secuencia complementaria) con el anticodon de inicio CAT. En ambos componentes los MLA divergen en direcciones opuestas y con traslape de algunos genes (AC1, AC2, AC3, AC4) en el componente A.

En la Figura 19 se muestra el mapa genómico de ToChLPV y ToChBCSV en los cuales se señalan la posición nucleotídica de cada uno de los MLA y regiones de traslape. Los virus de BCS, al igual que la mayoría de los geminivirus bipartitas, tienen una región altamente conservada con secuencia TAATATT↓AC que forma la estructura de asa y la cual incluye el sitio de anclaje (↓). De este punto divergen dos secuencias de 11 nt que son complementarias entre ellas y que forman la estructura de tallo. También se encontró el motivo T (TTTTT), altamente conservado entre los virus de BCS a 16 nt de Ori hacia el gen CP. Todos los virus estudiados presentaron una caja TATA a 72 nt de Ori hacia Rep. Por otro lado PepGMV-BCS y TChCV presentan una caja G (GGGC) a 34 nt de Ori hacia Rep, mientras que ToChLPV y ToChCV presentan un motivo CAAA a los 103-104 nt de Ori hacia Rep (Fig. 20).

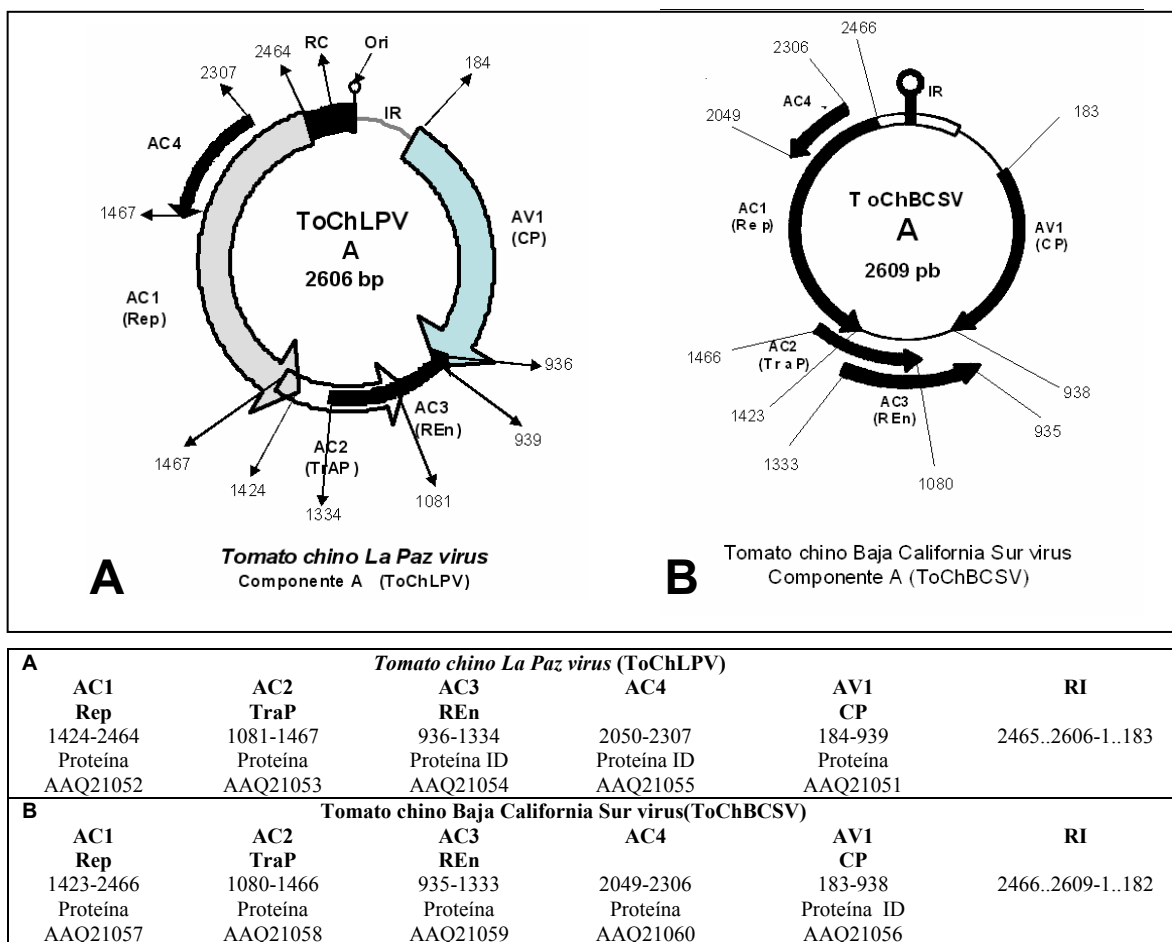


Figura 19. Mapa genómico de TChLPV y TChBCSV indicando la posición de los MLA de los genes que codifican para las proteínas Rep, TraP, REn, AC4 y CP

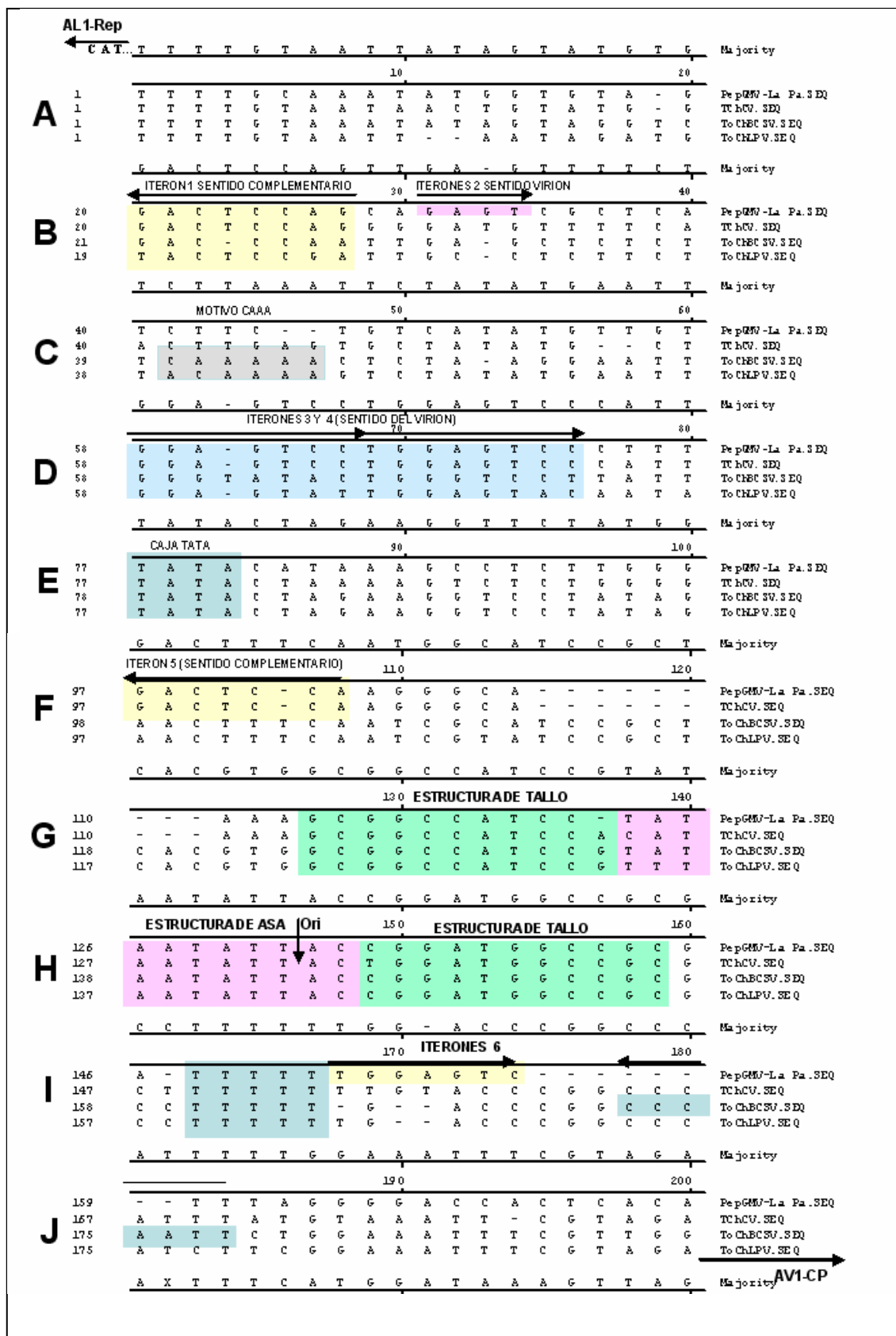


Figura 20. Alineamientos basados en las secuencias nucleotídicas de la región intergénica de los geminivirus aislados en BCS mostrando algunos motivos involucrados en la replicación. **A)** inicio del marco de lectura abierto del gen de la replicación -Rep) (en sentido complementario). **B)** región de iterones # 1 y 2 (en sentido complementario y de virión, respectivamente). **C)** motivos CAAA. **D)** región de iterones # 3 y 4 en sentido del virión (altamente conservados entre los *Begomovirus*). **E)** caja TATA (altamente conservada). **F)** región de iteron # 5 (presente solo en algunos geminivirus). **G, H)** región estructural de tallo-asa (altamente conservada en los geminivirus). Ori= sitio de inicio de replicación. **I)** motivo T, región del iteron # 6. **J)** hacia la región de la CP.

3.11. ORGANIZACIÓN DE ITERONES

Todas las secuencias analizadas en su región intergénica presentaron motivos conservados y repetidos entre 7-9 nt a ambos lados de Ori y en dirección divergente. De aquí en adelante dichas secuencias serán referidos como iterones, de acuerdo a Arguello-Astorga *et al.* (1994). Todos los geminivirus de BCS presentaron un arreglo similar a los del hemisferio occidental basados en tres de los iterones más conservados. Dos de ellos uno tras otro y en el mismo sentido y un tercero en sentido inverso a los 50 nt “río arriba” de la caja TATA (Fig. 20, 21). La búsqueda de secuencias homólogas en la RI reveló que los iterones de los geminivirus de BCS están delimitados a grupos filogenéticamente definidos (Fig. 22). En cuanto al estudio del arreglo de los iterones se obtuvieron los siguientes resultados. En cuanto al número de iterones, este fue variable; ToChLPV tiene tres iterones, PepGMV-La Paz cinco y ToChBCSV y TChCV tienen cuatro iterones cada uno. En cuanto a la dirección de los iterones todos los geminivirus presentes en BCS presentaron tres iterones conservados, mientras que los iterones de la caja TATA hacia CP son muy variables y distintivos entre ellos. Finalmente, la secuencia de los iterones fue conservada (en negritas) en la mayor parte de los 8 nt (t**TGGaGT**c/a). En la figura 22 se muestra el consenso de la secuencia y del arreglo de los iterones de los begomovirus más importantes conocidos hasta la fecha. De acuerdo a este criterio los geminivirus de BCS se agruparon en diferentes grupos. Uno con el grupo de la SLCV junto con algunos geminivirus que infectan cucurbitáceas, mientras que otros se agruparon principalmente con algunos geminivirus de Centroamérica (Fig. 22)

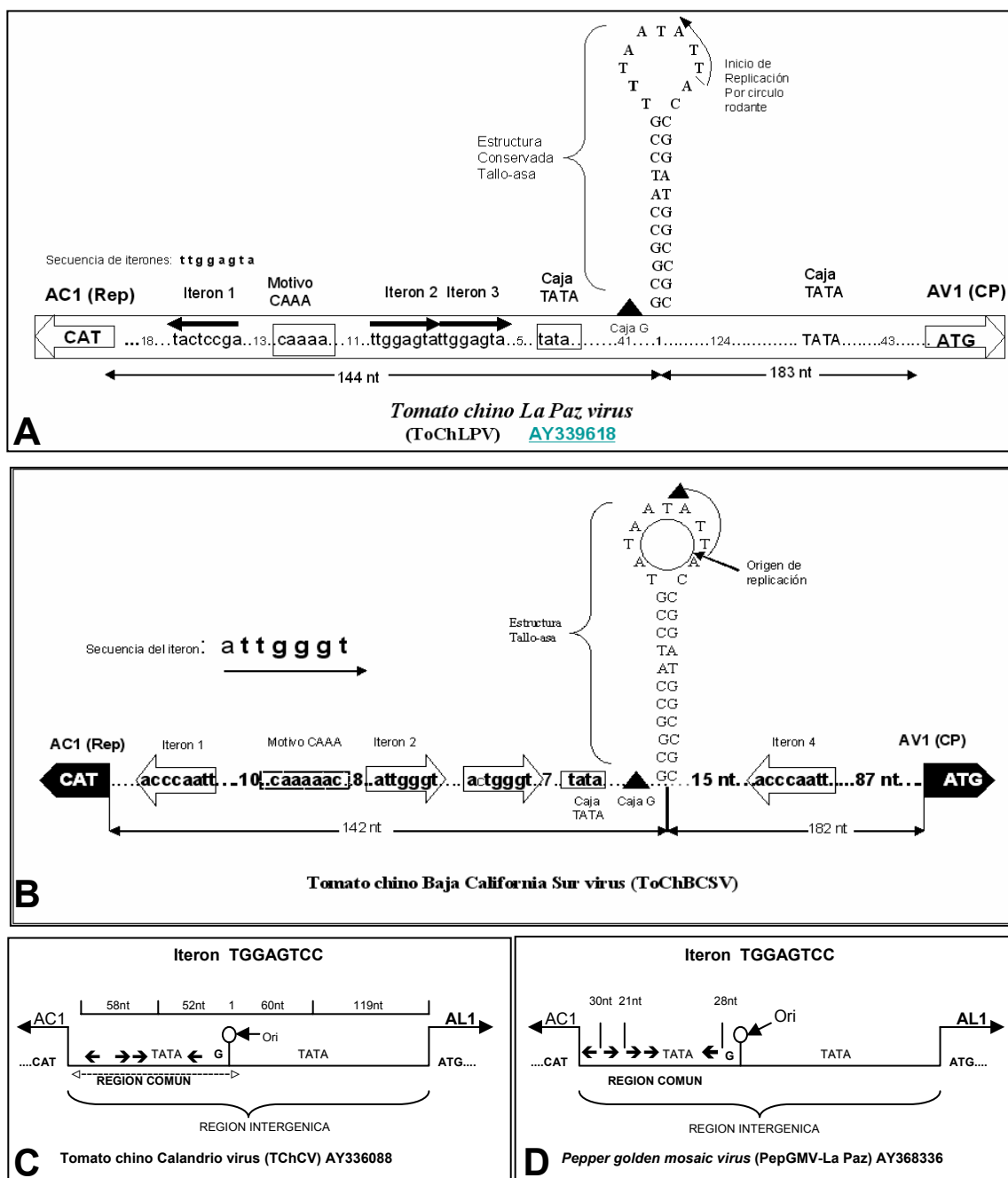


Figura 21. Representación esquemática de la organización genómica de la región intergénica de los geminivirus aislados en BCS, indicando el origen de replicación (ori), motivos de regulación (cajas CAAA, G, TATA), secuencias conservadas y arreglo de iterones e inicio de Rep y CP. A) ToChLPV. B) ToChBCSV. C) TChCV. D) PepGMV-La Paz.

Virus / grupo	Iteron 1	Iteron 2	Iteron 3	Iteron 4	Caja TATA	Iteron 5	EEC	Iteron 6	A
Grupo del hemisferio oriental (EH)									
TYLCV, TLCV, ACMV	⇒		⇒	⇒	TATA	⇐	TATT ↓ AC		
Grupo del hemisferio occidental (WH)									
WH-BGYMV ToMoV, BGYMV, PYMV, TGMV	⇐	⇐	⇒	⇒	TATA		TATT ↓ AC		
WH-México ToChLPV, CdTV, ToLCSinV, PHYVV, ToMoTV	⇐		⇒	⇒	TATA		TATT ↓ AC		
WH-Centro América TChCV, ToSLCV	⇐		⇒	⇒	TATA	⇐	TATT ↓ AC		
WH-BCS ToChBCSV ToMMoV	⇐		⇒	⇒ inc	TATA TATA		TATT ↓ AC TATT ↓ AC	⇐	⇐ inc
Grupo del SLCV									
SLCV, PepGMV	⇐	⇒	⇒	⇒	TATA	⇐	TATT ↓ AC	⇒	

VIRUS	Iteron 1	Iteron 3	Iteron 4	Caja TATA	Iteron 5	EEC	Iteron 6	B
ToChBCSV	←←←←←	→→→→→	→→→→→	TATA	←←←←←	TATT ↓ AC	→→→→→	GACCCAA ←
ToMMoV	GACCCAA	T T G G - G T C	T T G G - G T C	TATA		TATT ↓ AC		
ToChLPV	TACTCAA	T T G G A G T A	T T G G A G T A	TATA		TATT ↓ AC		
TChCV	GGACTCCA	T G G A G T C C	T G G A G T C C	TATA	GGACTCCA	TATT ↓ AC		
PepGMV	GGACTCCA	T G G A G T C C	T G G A G T C C	TATA	GGACTCCA	TATT ↓ AC		TGGAGTCC
ToMoV	ACTCCA	T G G A G T	T G G A G T	TATA		TATT ↓ AC		
AbMV	CTCCA _c TT	T T G G A G	T T G G A G	TATA				
CdTV	ACCCCAA	T T G G G G T	T T G G G G T	TATA		TATT ↓ AC		
ToMoTV	TTCCCCA	T G G G G G A A	T G G G G G A A	TATA		TATT ↓ AC		
PYMV		T T G G G G G A A	T T G G G G G A A	TATA				
ToLCSinV	TACCCCAA	T T G G G G T A	T T G G G G T A	TATA		TATT ↓ AC		
ToSLCV	GGACACCA	T G G T G T C C	T G G T G T C C	TATA	GGACACCA	TATT ↓ AC		
PHYVV	ATACACCG	C G G T G T A T	C G G T G T A T	TATA		TATT ↓ AC		
TYLCV	AtgACACC ▶	T C G G T G T a/c	T C G G T G T a/c	TATA	AtACACCG	TATT ↓ AC		
SLCV	GGACACCA	T G G T G T C C	T G G T G T C C	TATA	GGACACCA	TATT ↓ AC		TGGTGTCC
CONSENSO		T c/t G G a/t/g G T a/c	T c/t G G a/t/g G T a/c					

Figura 22. Agrupación y alineamiento de geminivirus basados en los motivos conservados de ≈ 8 nucleótidos (iterones) de la región intergénica. **A)** Agrupación de los geminivirus de BCS de acuerdo a la número, orientación y posición de los iterones asociados a la replicación. Los diversos arreglos de los iterones sugieren grupos bien definidos. EH= Eastern Hemisphere (hemisferio oriental), WH= Western Hemisphere (hemisferio occidental), SLCV= grupo del *Squash leaf curl virus*, WH-BGYMV= grupo del *Bean golden yellow mosaic virus*, WH-Mex= grupo de México (Sinaloa, Huastecas y La Paz), WH-CA= grupo de Centroamérica, WH-BCS= grupo de Baja California Sur. En los iterones 1 y 5 se muestra la secuencia complementaria (sentido negativo). **B)** Secuencia nucleotídica de los iterones presentes en varios geminivirus, mostrando en negritas el nucleótido diferente en una región altamente conservada y posición de iterones después de la caja TATA en sentido del virión. EEC= elemento estructural conservado de inicio de replicación, inc= iteron incompleto. Las flechas indican la orientación y la posición de los iterones. Las letras en

minúsculas indican las bases difieren del consenso. Las letras mayúsculas indican el consenso de los nucleótidos más conservados. Los números indican las bases entre cada iteron, la caja TATA y/o el EEC. El motivo TAATATT ↓ AC se encuentra presente como la estructura de asa del EEC, la cual es altamente conservada y es compartida por todos los geminivirus ↓ = sitio de anclaje de los factores de la replicación.

3.12. FILOGENIA

Los estudios filogenéticos se realizaron con cada uno de los marcos de lectura obtenidos. En el presente trabajo se presentan cuatro de los más representativos a nuestro criterio. Uno está basado en la secuencia completa de los componentes A (Fig. 23), dos están basados en la secuencia de aminoácidos de Rep (Fig. 24) y CP (Fig. 25) y uno basado en la región altamente variable o región intergénica (Fig. 26). El filograma derivado del alineamiento de la secuencia en aminoácidos de AL1 mostró una distribución similar reportados en otras investigaciones (Torres-Pacheco *et al.*, 1996), al igual que con AV1 (Wyatt y Brown, 1996; Brown *et al.*, 2001). El filograma realizado con la secuencia completa del componente A se observa como se agrupan ToChLPV y ToChBCSV, pero a su vez diferente de otros geminivirus mexicanos como CdTV, PHYVV y PepGMV. Como ya se ha observado anteriormente, PHYVV se agrupa más a los geminivirus del hemisferio oriental que a los del hemisferio occidental, de donde procede geográficamente (Torres-Pacheco *et al.*, 1993; Arguello-Astorga *et al.*, 1994b). Las secuencias fueron obtenidas directamente del banco de datos del NCBI como se indica en materiales y métodos. En el apéndice, se indican los virus con sus nombres, acrónimos y número de acceso del GenBank

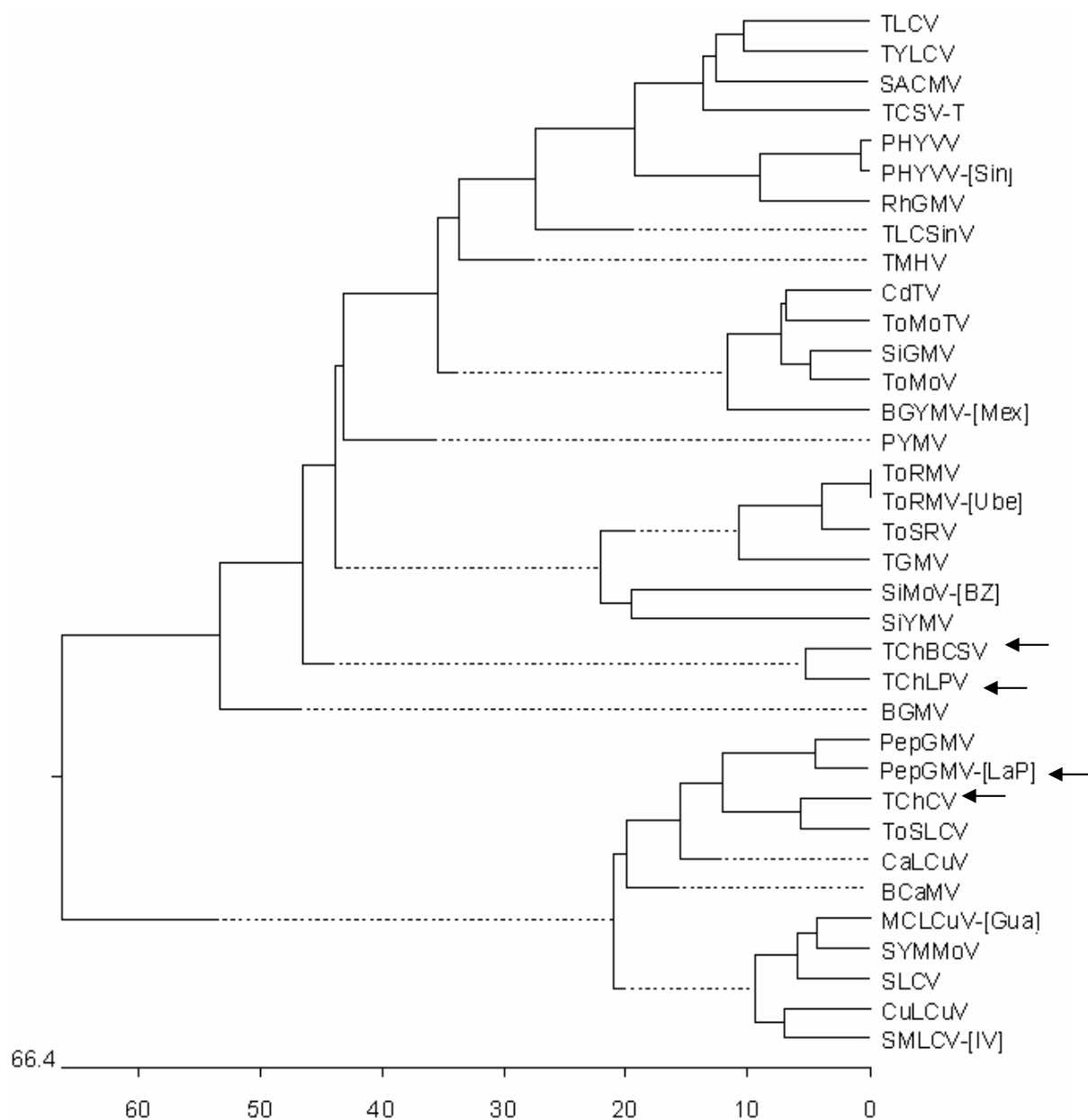


Figura 23. Filograma de los geminivirus de BCS utilizando la secuencia nucleotídica completa del componente A de geminivirus bien caracterizados en comparación con otros geminivirus utilizando el programa de análisis filogenético con máxima parsimonia (PAUP por sus siglas en inglés). Las flechas indican los geminivirus de BCS presentados en este trabajo.

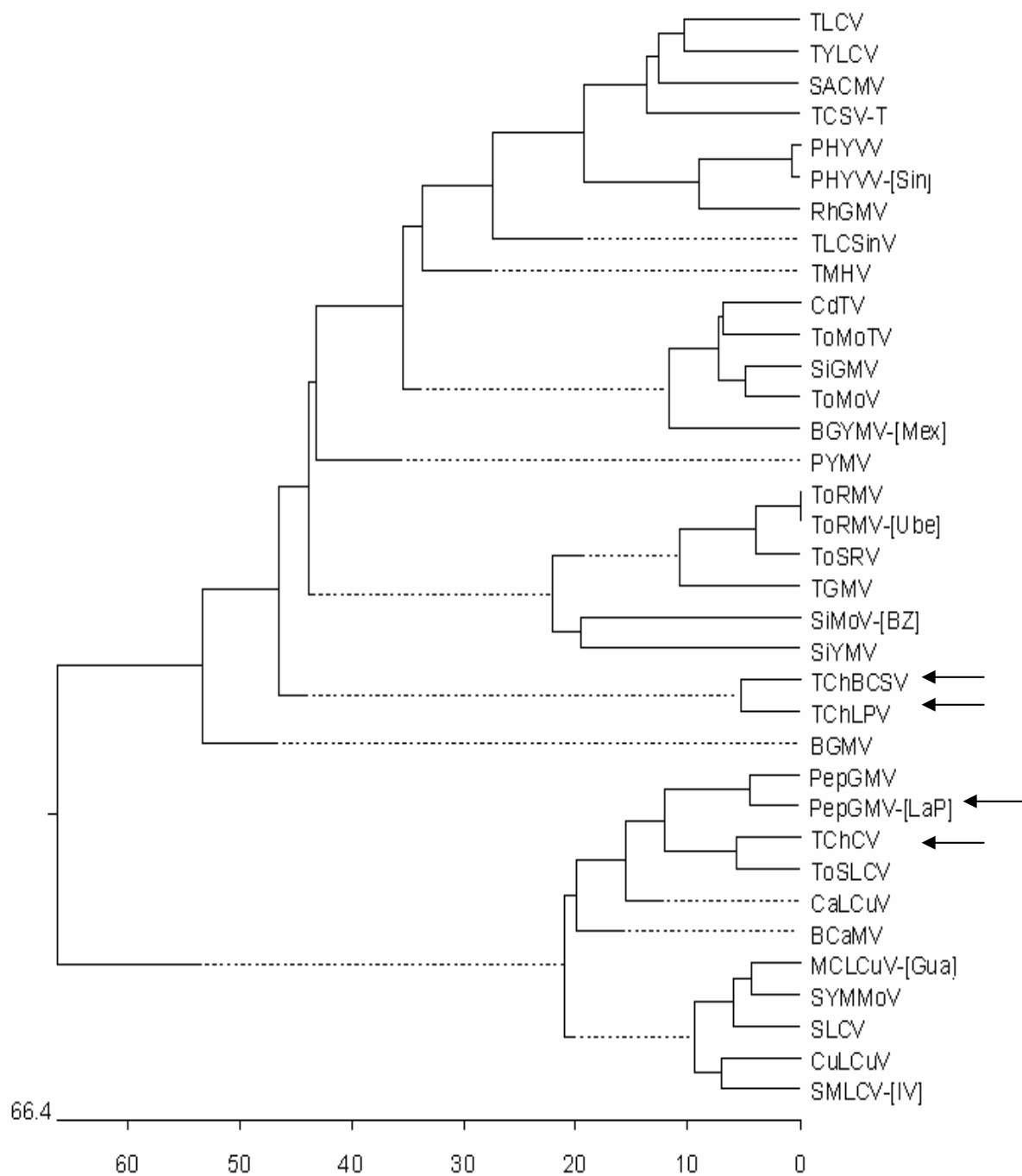


Figura 24. Filograma de los geminivirus de BCS utilizando la secuencia de aminoácidos del gen asociado con la replicación AC1 (Rep) en comparación con otros geminivirus. Las flechas indican los geminivirus de BCS presentados en este trabajo.

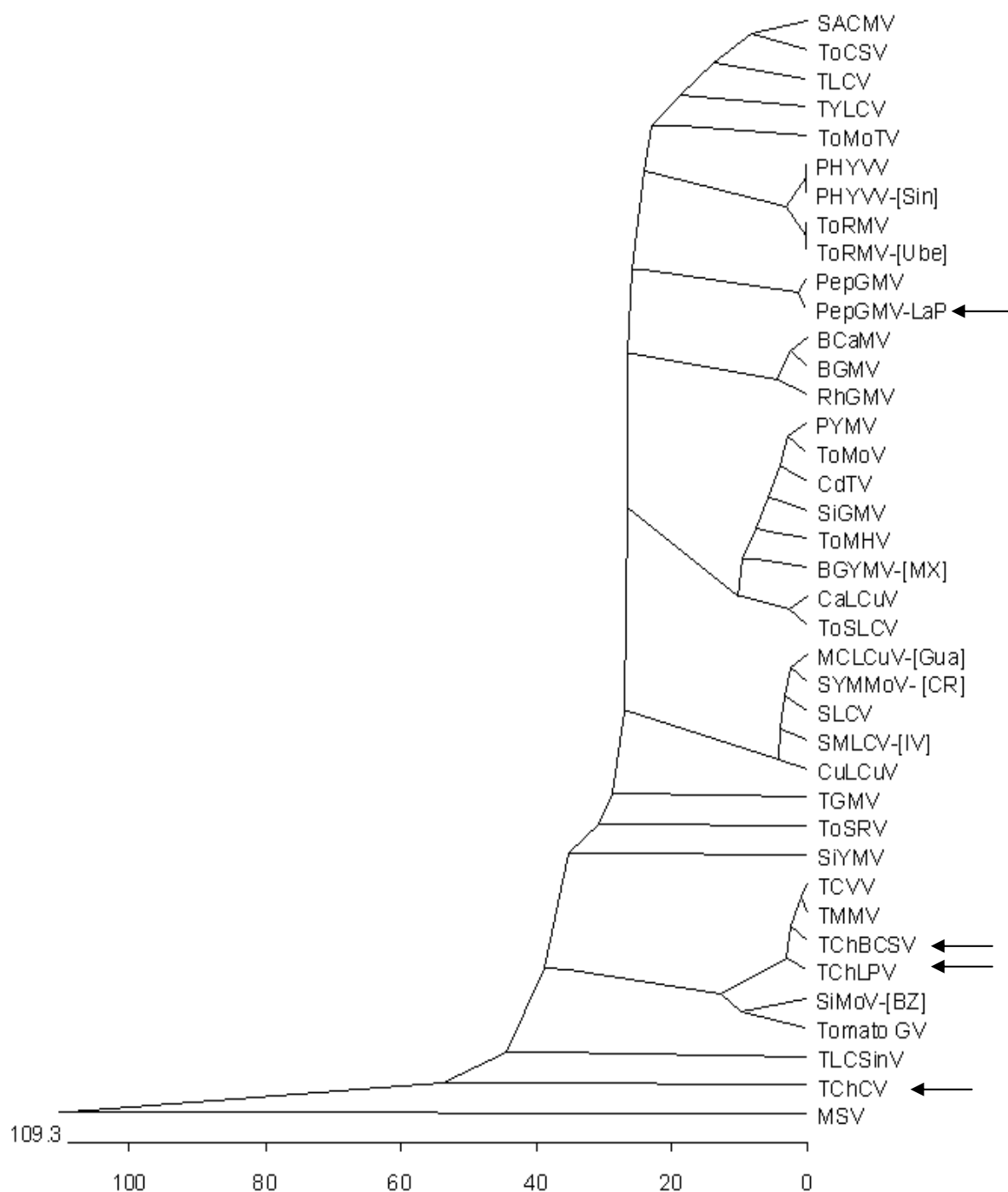


Figura 25. Filograma de los geminivirus de BCS utilizando la secuencia de aminoácidos del gen de la proteína de la cápside (AV1/CP) en comparación con otros geminivirus. Las flechas indican los geminivirus de BCS presentados en este trabajo.

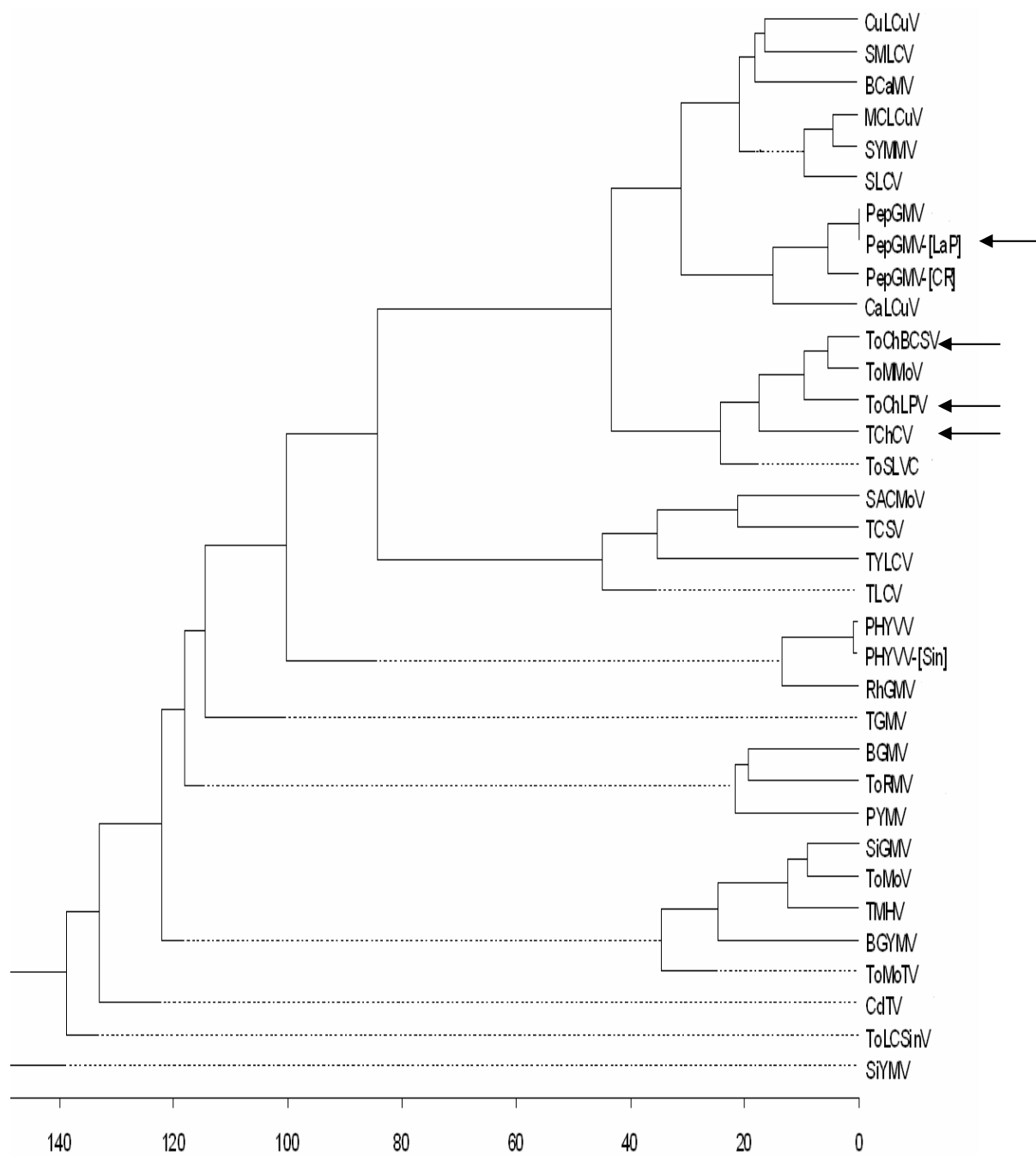


Figura 26. Filograma de los geminivirus de BCS utilizando la secuencia nucleotídica de la región intergénica (RI). Las flechas indican los geminivirus de BCS presentados en este trabajo.

3.13. DISEÑO DE INICIADORES ESPECÍFICOS

Los iniciadores diseñados con los programas EditSeq y PrimerSelect (DNASTAR, London) a partir de la secuencia nucleotídica de la CP del componente A de los aislamientos de BCS (Fig. 27A) amplificaron el fragmento esperado de 387 pb (Fig. 27B). Las muestras originales de ToChLPV y ToChBCSV amplificaron positivamente con los iniciadores pBCS374v y pBCS761c, mientras que no se obtuvo amplificación alguna con PHYVV (clon de referencia), lo que indica la especificidad de los iniciadores diseñados. Los iniciadores diseñados se denominaron como:

pBCS374v (5'-AGGGCCTTG CAAGATTCAGTCG-3') y pBCS761c (5'-CACCCGCCAAAACGCTTCACC-3').

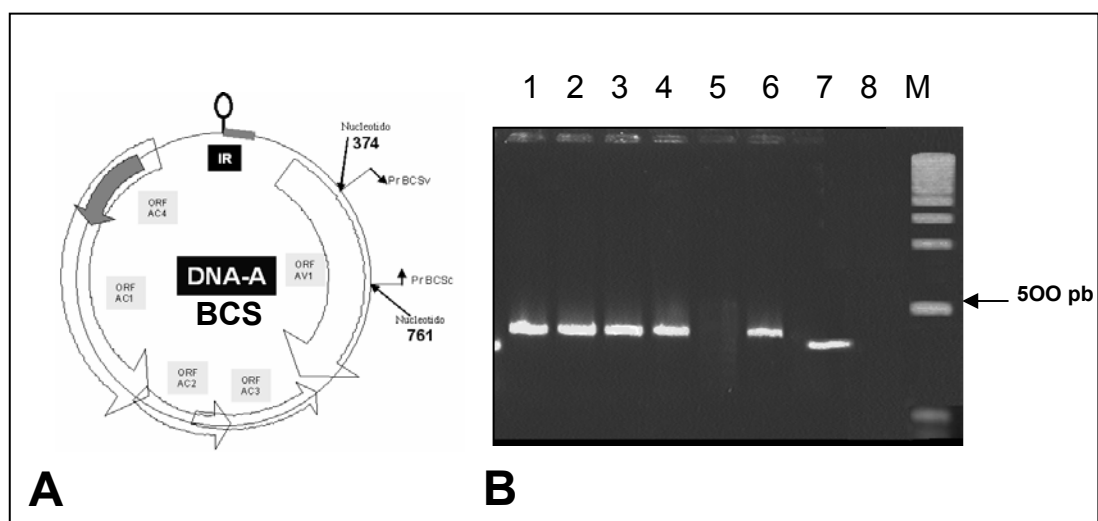


Figura 27. Diseño de iniciadores específicos para detección de los geminivirus de BCS. A) Figura esquemática de la posición de los iniciadores en sentido complementario y en sentido del virión en la región conservada del gen AV1. B) Amplificación por PCR de geminivirus de BCS. Carriles 1, 2, 3, 4, 6= bandas de aproximadamente 380 pb de muestras de la región de El Carrizal, 5= Virus control (PHYVV), 7= control interno (amplificación de la región 18s de plantas), 8= control negativo (agua), M= marcador de peso molecular 1 kb.

3.14 DISTRIBUCIÓN DE GEMINIVIRUS

En la segunda etapa de muestreo para detección y distribución de geminivirus se obtuvieron los siguientes resultados. El geminivirus ToChBCSV se encuentra distribuido solamente en la región de El Carrizal, mientras que ToChLPV se encuentra delimitado al área de La Paz, al igual que el TChCV (del Calandrio) y la variante de La Paz de PepGMV. En los muestreos del 2003 para detección específica de los geminivirus de BCS, estos solamente se detectaron en El Carrizal. Sin embargo, se lograron detecciones generales con los iniciadores AV496/AC1048 en las regiones de La Paz, Meliton Albañez, Pescadero y San Juan de la Costa. (Fig. 28).

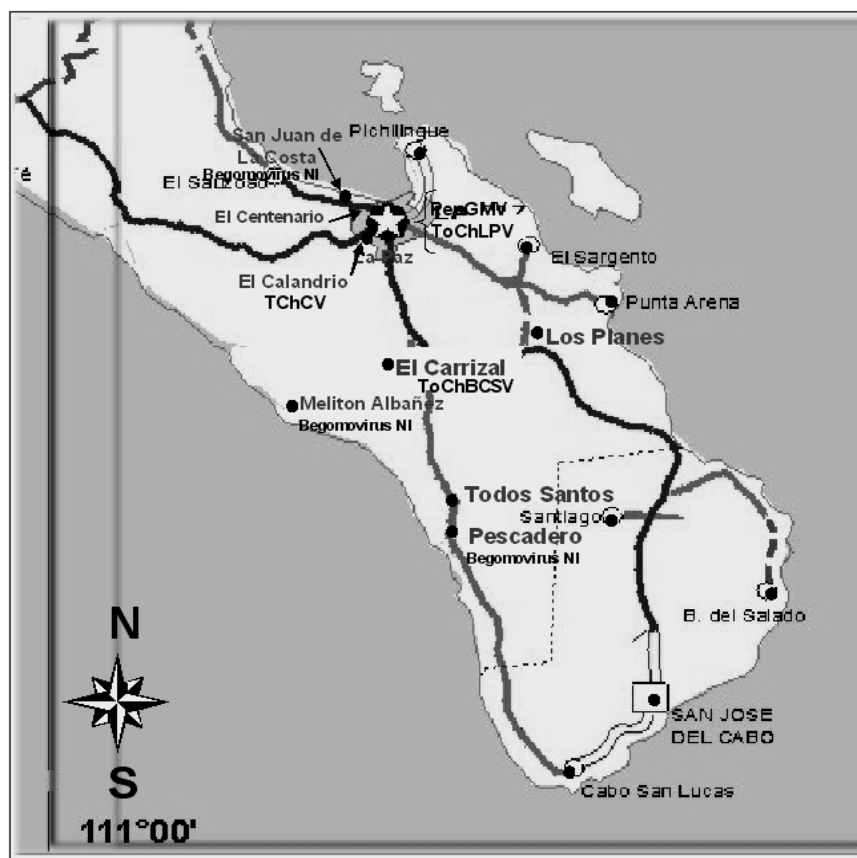


Figura 28. Mapa de distribución de geminivirus en la región tomatera de Baja California Sur, donde se detectó ToChLPV con iniciadores específicos durante los muestreos del 2003 y mostrando la ubicación de las regiones de El Carrizal donde se encontró al ToChBCSV durante el 2002.

3.15. DIVERSIDAD GENÉTICA DE GEMINIVIRUS EN BCS

Con el fin de detectar la diversidad de geminivirus presentes, se analizaron varias clonas individuales. Digestiones previas y análisis de secuencias preliminares nos indicaron el número de cortes esperados para algunas de las enzimas a utilizar. Mientras que con algunas enzimas se obtuvieron uno o dos sitios de corte (*EcoRI* y *HindIII*), con otras (*StyI*) se obtuvieron múltiples cortes (Fig. 29). Los geminivirus detectados en El Carrizal no presentaron variación en su población, mientras que en las muestras de La Paz se presentaron tres geminivirus (ToChLPV, TChCV, PepGMV), cada uno con sitios de corte específicos (Fig. 29). De acuerdo a setos análisis por RFLP se observó que los geminivirus de La Paz se encuentran bien diferenciados con respecto a los de El Carrizal.

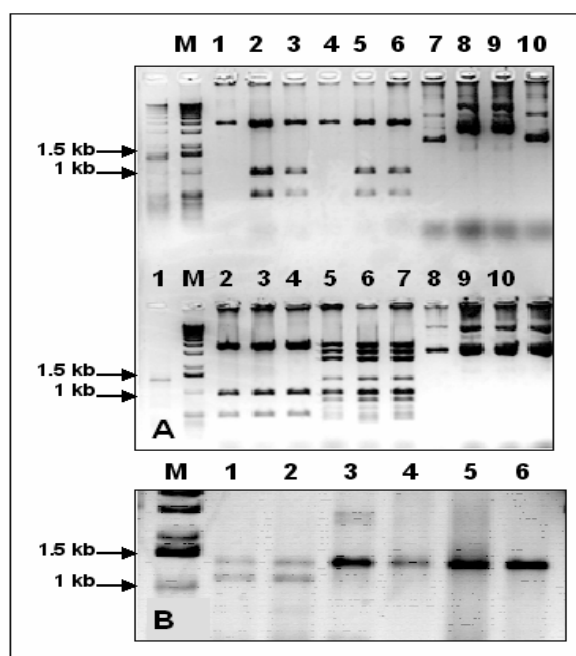


Figura 29 Análisis por RFLP con enzimas de restricción específicas para la detección de geminivirus de diferentes regiones. **A)** Patrones de restricción observados en productos de PCR (1.4 kb) de muestras de BCS digeridas con *EcoRI*; 1, 2, 5, 6= muestras de La Paz, 3, 4= muestras de El Carrizal, 7-10= plásmidos sin digerir. En la parte inferior del gel se observa; 1= producto de PCR sin digerir. Muestras de La Paz digeridas con: 2, 4= *EcoRI* y *XbaI*, 5, 7= *EcoRI* y *StyI*. Muestras de El Carrizal digeridas con: 3= *EcoRI* y *XbaI* 6= *EcoRI* y *StyI*. **B)** Digestión de productos de PCR digeridos con *HindIII*; 1, 2= muestras de La Paz (PU1), 3= PHYVVV, 4= PepGMV 5, 6= muestras de el Carrizal (d21, F5), M= marcador de peso molecular 1 kb-Gibco.

3.16. MEZCLAS VIRALES

Los análisis realizados con muestras de campo para detección de mezclas virales, muestran la presencia de diferentes geminivirus estrechamente relacionados. Mientras que en la región del Carrizal no se encontraron evidencias de mezclas virales, en la región de La Paz se encontraron mezclas en un mismo lote y ocasionalmente en la misma planta y en una proporción relativamente baja (menos del 1%). En la figura 30A se muestra la digestión de productos de PCR clonados. Se pueden apreciar los diferentes patrones de bandeo presentados al digerir con diferentes enzimas. En la figura 30B se muestra la evidencia de la presencia de geminivirus relacionados en la región de La Paz.

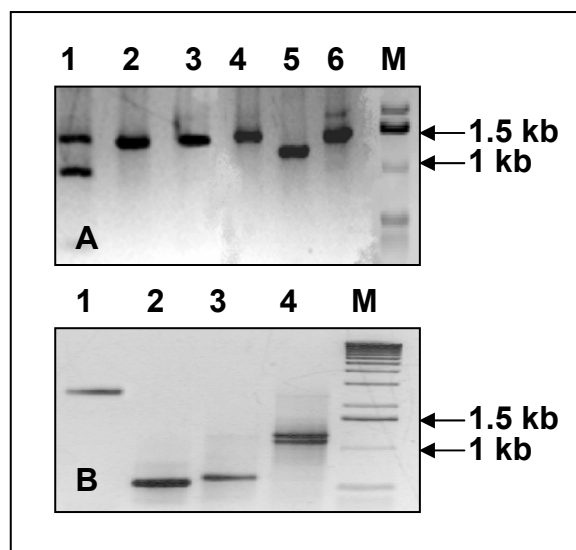


Figura 30. Detección de mezclas virales en muestras procedentes de La Paz. **A)** Digestiones específicas de clones (con el fragmento de la región intergénica) con diferentes enzimas de restricción. 1, 2 y 3 corresponden a los clones PU2, PU3 y PU4, respectivamente digeridos con *Hind*III y *Eco*RI; 4, 5 y 6 corresponden a los mismos clones, pero digeridos con *Xba*I. **B)** PCR de muestras de La Paz amplificadas con diferentes iniciadores: 1= clon de PHYVV como control de referencia; 2 y 3= ligera variación en el tamaño esperado de dos aislamientos de La Paz utilizando los iniciadores AV494/AC1048; 4= amplificación de mezcla geminiviral por PCR, mostrando una banda de aproximadamente 1.1 kb, amplificada con los iniciadores PAR1c496/PAL1v1948; M= marcador de peso molecular 1 kb.

3.17. RANGO DE HOSPEDANTES NATURALES

En el estudio de hospedantes naturales de geminivirus en BCS de las 13 familias y 21 especies en estudio se encontró solamente a la familia *Solanáceas* como hospedantes. La especie más susceptible fue el tomate al presentarse con altas eficiencias de transmisión, altos valores de incidencia y severidad y síntomas claramente definidos (Cuadro 8 y 17). Los hospedantes alternos encontrados fueron: chile, toloache, tomatillo y tabaquillo. En ésta última especie, aunque se obtuvo una reacción positiva (PCR), sin embargo, no se pudieron observar síntomas bien definidos o estos fueron muy ligeros (clorosis leves). El tabaquillo fue la única especie encontrada como hospedante asintomático. Por otro lado, aunque se observaron síntomas severos en calabacita y sandía, hasta el momento no se ha obtenido amplificación alguna que sugiera la presencia de geminivirus en esas especies. De todas las familias incluidas en ésta investigación, algunas no se encontraron hospedantes de mosquitas blancas (*Turneraceae*, *Portulacaceae*, *Labiatae*, *Zygophyllaceae*), mientras que las familias *Fabaceae*, *Chenopodiaceae*, *Apocynaceae*, *Asteraceae*, *Portulacaceae*, *Papaveraceae*, *Amaranthaceae* se encontraron como hospedantes de las mosquitas, pero no de geminivirus (Cuadro 17).

3.18. ÍNDICES DE PATOGENICIDAD Y FLUCTUACIÓN POBLACIONAL DE MOSCAS

En los muestreos del 2002 en el área de La Paz, los valores más altos (100%) de incidencia fueron observados durante los meses de junio y noviembre (Cuadro 18). Los valores más altos coincidieron con las últimas etapas fenológicas del cultivo, así como las incidencias más bajas correspondieron etapas iniciales del cultivo. En las evaluaciones del 2002 se observó un rápido incremento en las incidencias de la enfermedad (Fig. 31), posiblemente debido a la ausencia de aplicaciones de insecticidas que mantuvieran el control de mosquitas infectivas, lo que al final se reflejó en el alto número de moscas por trampa amarilla. Los niveles más altos de infestación se observaron durante la etapa de fructificación y en la maleza durante la etapa final del cultivo (independiente del estado fenológico de la maleza). Durante el 2003 las incidencias más altas de la enfermedad

fueron observadas en junio, coincidiendo con los niveles de poblaciones de moscas más altos (11.2 moscas adultas/hoja [mb/h]) registrados durante la etapa productiva del cultivo. La fluctuación de mb en *Nicotiana glauca* fue de 3.8 a 10 mb/h. Los índices de severidad observados fueron de 1 a 9 de acuerdo a la escala de Bolaños (1996). Los valores más altos se observaron en las plantas de tomate (Cuadro 18). Cabe mencionar que se observó una mayor severidad en los cultivos de tipo “orgánico” donde no se realizaron aplicaciones de insecticidas para el control del vector. Los síntomas más severos se vieron acentuados en las etapas finales del cultivo, apareciendo con un nivel de severidad 3 a partir de la primera etapa de floración (Cuadro 18).

Cuadro 17. Distribución temporal de geminivirus en BCS durante dos ciclos agrícolas.

Familia	Especie	(no. plantas analizadas / no. Plantas infectadas / fecha de muestreo) ¹									Síntomas ²	PCR ³	
		A	S	O	N	D	E	F	Mz	Ab			My
Solanáceas	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	23/20	15/10	17/17				12/11	32/6	27/12	8/0	Ch, Mo, Ar, R (S)	+
	<i>Capsicum annuum</i> L.		4/0	3/0		3/2		4/1	3/0	4/2		Ch, Mo (S)	+
	<i>Physalis ixocarpa</i>						3/0		3/1	3/1		Mo, R, Ch (L)	+
	<i>Datura discolor</i> Bernh			4/1	4/2	4/2				3/0	3/0	Mo (L)	+
	<i>Nicotiana glauca</i> R. Graham			3/0	6/1	4/1						NS	+
Cucurbitáceas	<i>Cucurbita pepo</i> L.							3/2	3/1			Ch, Mo (S)	ND
	<i>Citrullus lanatus</i> Thund.							3/1	3/0			Mo (S)	ND
	<i>Cucumis melo</i> L.								3/0	4/0		NS	-
Malváceas	<i>Malva parviflora</i> L.			3/0		4/0	4/0					NS	-
Fabaceae.	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.								3/0			NS	-
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium murale</i> L.		3/0		1/0	3/0		1/0				NS	-
Apocynaceae	<i>Vinca rosea</i> L.	3/0		3/0				3/0			3/0	NS	-
Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i> L.	3/0		3/0								NS	-
	<i>Taraxacum officinale</i> L.	3/0			3/0	3/0				3/0		NS	-
	<i>Sonchus oleraceus</i>		3/0	4/0				2/0	1/0			NS	-
Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i> L.	3/0							3/0	3/0		NS	-
Labiatae	<i>Origanum vulgare</i> L.						3/0		3/0			NS	-
Zygophyllaceae	<i>Larrea tridentata</i> Sessé y Moc.		2/0							2/0	1/0	NS	-
Turneraceae	<i>Turenera aphrodisiaca</i>			2/0						2/0		NS	-
Papaveraceae	<i>Argemone mexicana</i> L.				3/0	3/0	3/0					NS	-
Amaranthaceae	<i>Amaranthus watsonii</i> Standl.		3/0	3/0					3/0			NS	-

¹ A= agosto, S= septiembre, O= octubre, N= noviembre, D= diciembre, (2001) E= enero, F = febrero, Mz= marzo, Ab= Abril, My= Mayo (2002). El virus aislado de *Datura stramonium* y de *Nicotiana glauca* fue identificado como PepGMV. De *Lycopersicon esculentum* se identificaron el TChCV, ToChLPV y ToChBCSV. De *Capsicum annuum* se identificó PepGMV

² NS= no síntomas aparentes, L= síntomas leves, S = síntomas severos, Ch= enchinado de hojas, Mo= mosaicos, Ar= apariencia arbustiva, R= hojas reducidas.

³ (+) = hospedante, (-)= no hospedante, ND = no determinado

Cuadro 18. Fluctuación poblacional de mosquitas blancas e incidencia de geminivirus durante 2002 y 2003 en muestreos realizados en La Paz, Baja California Sur.

Mes	Sem.	PepGMV-La Paz (2002)			ToChLPV (2003)		
		Inc/sev ¹	mb/tpa (tomate) ²	mb/tpa (maleza) ³	Inc/sev	mb/hj (tomate) ⁴	mb/hj (maleza) ⁵
Marzo	1	N	50	27	N	N	N
	2	1.4/0	80	17	N	N	N
	3	2.2/0	130	35	17/2.2	2.1	4.3
Abril	1	3.8/1	98	42	24/3.8	1.7	4.7
	2	13.4/1.8	370	33	32/4.0	2.2	3.8
	3	20/3.2	425	21	52/5.4	2.8	4.0
Mayo	1	46/5.2	520	29	58/5.8	1.5	7.2
	2	51/6.0	480	52	64/6.8	3.8	6.8
	3	69/8.7	976	40	82/5.4	4.5	5.9
Junio	1	94/9	817	64	78/6.0	8.0	6.2
	2	100/9	504	101	92/6.2	11.2	10.0
	3	100/9	534	52	N	20.0	12.0
Julio	1	N	N	123	N	N	N
	2	N	N	158	N	N	N
	3	N	N	207	N	N	N
Agosto	1	6/0	35	62	N	N	N
	2	17/1.2	47	88	N	N	N
	3	25/3.6	38	123	N	N	N
Septiembre	1	46/4.0	104	89	N	N	N
	2	68/5.8	147	60	N	N	N
	3	70/7.2	204	87	N	N	N
Octubre	1	84/7.4	216	72	N	N	N
	2	85/8.6	425	107	N	N	N
	3	92/9	537	173	N	N	N
Noviembre	1	97/9	690	208	N	N	N
	2	100/9	740	313	N	N	N
	3	100/9	760	406	N	N	N
Diciembre	1	N	N	580	N	N	N
	2	N	N	370	N	N	N
	3	N	N	102	N	N	N

¹ La incidencia se calculó, inc= (plantas con síntomas/plantas totales) x 100. Sev= severidad de acuerdo a la escala de Bolaños (1996). Promedio de 100 plantas por parcela

² Adultos de mb/trampa amarilla (promedio de 4 repeticiones) de acuerdo a Polston *et al.* (1996).

³ Adultos de mb/trampa amarilla en la canopia de la maleza alrededor del cultivo.

⁴ mb/hj= Número de adultos de moscas blancas/hoja en *L. esculentum*.

⁵ En *Nicotiana glauca* (alrededor del cultivo).

N= No hubo cultivo para muestrear

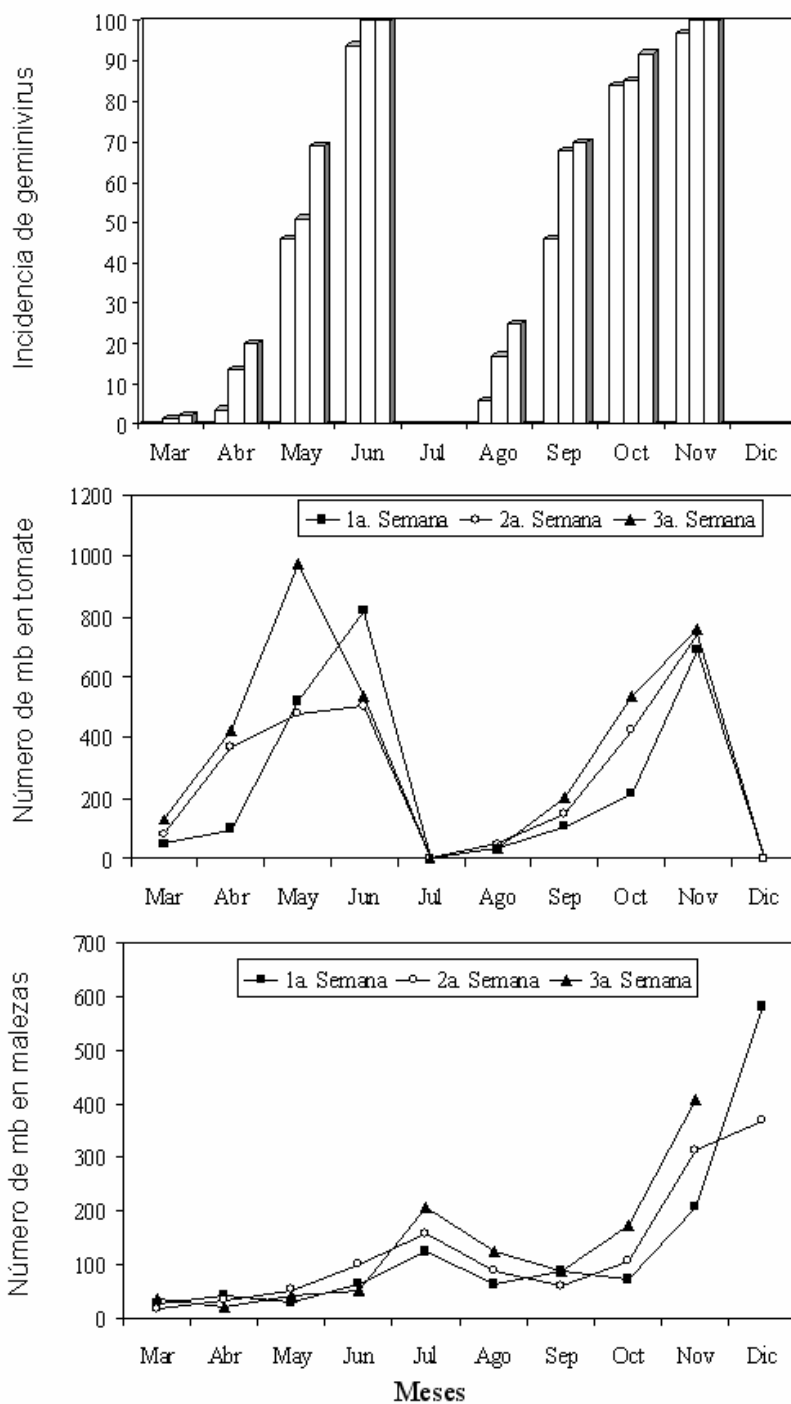


Figura 31. Incidencia de PepGMV-La Paz y dinámica poblacional de mosquitas blancas (*Bemisia tabaci*) durante dos ciclos agrícolas en el cultivo del tomate. Incidencia= plantas enfermas/plantas totales x 100. Número de mb= Número de adultos por trampa amarilla (promedio de 4 repeticiones) y de acuerdo a la metodología de Polston *et al.*, (1996).

En los muestreos realizados por trampas amarillas en la canopia del cultivo para el monitoreo de poblaciones de mb adultas, se observó que éstas se encontraron en niveles más altos en el tercio superior de la planta (Cuadro 19). Este comportamiento es debido a que el adulto prefiere las partes más jóvenes para la alimentación y la oviposición. Las poblaciones más altas encontradas en relación a la orientación se observó que están tenían un patrón de migración de acuerdo a la dirección del viento (noroeste-sureste). Por otro lado en los muestreos realizados con estados inmaduros (pupas de 4to. instar), se observó que estos se encontraron en mayores cantidades en el primer tercio o niveles inferiores (datos no mostrados), posiblemente debido a un desplazamiento a las partes inferiores al ir creciendo la planta, por lo que huevecillos depositados en las partes superiores, al termino de 15 días serán las pupas del cuarto estadio próximas a emerger en hojas inferiores.

Cuadro 19. Fluctuación poblacional de mosquitas blancas de acuerdo a la altura de la planta y la dirección del viento.

Región o localidad ¹	Altura de muestreo ²			Dirección del viento ³				Total mb/t ⁴
	TI	T2do	TS	N	S	E	O	
Floración del 1er. racimo								
El Centenario	5.0	3.7	8.0	3.0	2.0	1.0	6.2	4.12
El Carrizal AB	3.7	0.0	2.2	0.0	0.0	2.0	1.5	1.34
El Carrizal AD	0.0	2.0	5.0	5.2	3.2	2.0	3.7	3.01
La Paz	0.0	15.7	23	12.7	16.0	8.2	18.5	13.44
Floración del 3er. racimo								
El Centenario	2.0	4.2	12.0	3.7	1.0	1.0	2.0	3.7
El Carrizal AB	0.0	1.2	2.7	2.0	2.2	1.7	5.7	2.21
El Carrizal AD	5.0	2.0	5.0	6.2	4.0	2.0	8.0	4.6
La Paz	--	--	47	10.2	23.0	84.7	45.7	30.08
Floración del 5to. racimo								
El Centenario	6.0	16.7	23.0	3.2	4.0	12.7	2.0	9.65
El Carrizal AB	3.2	3.0	6.7	8.2	5.0	1.5	7.5	5.01
El Carrizal AD	5.0	2.0	5.0	10.5	1.5	2.0	2.0	4.0
La Paz	--	--	47	18.7	40.2	104.5	28.0	34.05

¹ La Paz (lote experimental de la Universidad Autónoma de Baja California Sur), El Centenario (Productora y Comercializadora del Valle-PROCOVA), El Carrizal AB (Agrobionova), el Carrizal AD (Agrodelicias).

² Ti = tercio inferior de la planta; T2do = segundo tercio; TS=tercio superior. Cada valor corresponde al promedio de cuatro repeticiones

³ N= norte, S= sur, E= este, O= oeste

⁴ Total mb/t= total de mosquitas blancas por trampa. Promedio de 20 trampas por lote (lecturas por semana).

3.19. IDENTIFICACIÓN DE MOSQUITAS BLANCAS

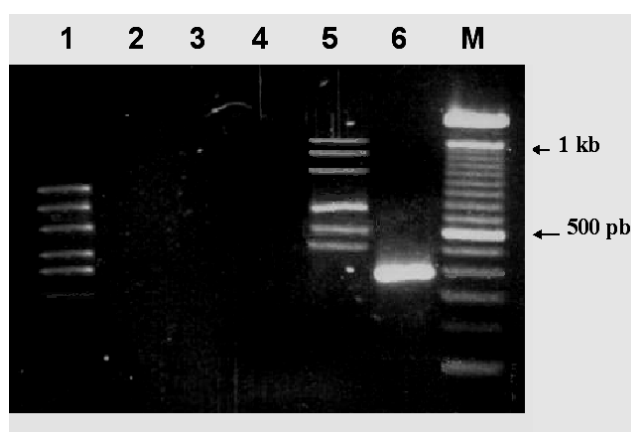
3.19.1. Identificación por morfología y Características Biológicas

Por medio de caracterizaciones morfológicas y biológicas se detectó la presencia de tres especies diferentes de moscas. La primera especie se determinó como *Bemisia tabaci* (Gennadius) o mosquita blanca del camote “Biotipo A” (sweetpotato whitefly), en razón de las siguientes características: (i) coloración de crema de la pupa (ii) la región submarginal anterior de la pupa no presenta 4ta seda o filamento (iii) la pupa tiene filamentos cerosos en la periferia (iv) en los adultos la venación desaparece a los 2/3 de las alas (v) los adultos tienen las alas en posición algo vertical y la coloración del cuerpo es visible entre las alas (vi) los adultos tienen un patrón de vuelo recto (vii) color del adulto ligeramente amarillento y (viii) presentan poca producción de mielecilla. La segunda especie, se determinó como *Bemisia argentifolii* Bellows y Perring o mosquita blanca de la hoja plateada “Biotipo B” (silverleaf whitefly) basados en los siguientes criterios: (i) la pupa tiene un color amarillento (ii) ausencia de filamentos cerosos en la periferia de la pupa (iii) la pupa presenta seda submarginal anterior (iv) en los adultos la venación de las alas desaparece a los 2/3 de las alas (v) los adultos tienen las alas en posición algo vertical muy similar a *B. tabaci*, aunque el cuerpo es menos visible entre las alas (vi) los adultos presentan patrón de vuelo desordenado y (vii) presentan alta producción de mielecilla. Finalmente, se detectó una tercera especie como *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) o mosquita blanca del invernadero (greenhouse whitefly) la cual se determinó por las siguientes características: (i) los adultos presentan venación de las alas en forma bifurcada (ii) los adultos tienen alas en posición algo horizontal y (iii) presentan aspecto polvoso-ceroso en el envés de la hoja.

3.19.2. Identificación de biotipos por RAPD

Se determinaron los posibles biotipos presentes de *B. tabaci*, en razón de la especie *B. argentifolii* aún es considerada por algunos como una subespecie o biotipo de *B. tabaci* y no es referida como especie separada (Brown *et al.*, 1995). Por otro lado, los patrones de

bandeo de los fragmentos amplificados por RAPD-PCR con el iniciador H16 (De Barro y Driver, 1997) correspondieron a los reportados para los biotipos A y B (Fig. 32). Como especie de referencia se utilizó a *B. tabaci* de la colección del CIBNOR y las referencias de Gawel y Barlett, 1993 y De Barro y Driver, 1997. Independientemente del estatus taxonómico de las moscas blancas, es importante desde el punto de vista epidemiológico detectar los biotipos presentes en BCS, así como realizar muestreos que nos permitan monitorear posibles desplazamientos del biotipo A, endémico de América.



32. Análisis de biotipos de moscas blancas presentes en BCS por RAPD. 1= *Bemisia argentifolii* o biotipo B; 2= control negativo; 3,4= controles negativos; 5= *B. tabaci* biotipo A; 6= detección específica de geminivirus de moscas virulíferas utilizando los iniciadores (pBCS374v, pBCS761c); M= marcador de peso molecular 1 kb (GIBCO).

IV DISCUSIÓN

4.1. ETIOLOGÍA DEL “ENCHINADO FOLIAR” DEL TOMATE DE BCS

El síndrome característico de enchinado encontrado en los cultivos de tomate de BCS se presenta muy similar a otras enfermedades reportadas en México desde mediados de los 70s (González y Cervantes, 1973). A partir de esa fecha pasaría una década para conocer que partículas virales geminadas estaban involucradas en la enfermedad del “chino” del tomate en Sinaloa (Brown y Hine, 1984) y otra década para más para la secuenciación completa del agente causal de este tipo de enfermedades en México (Torres-Pacheco *et al.*, 1993; Garzón-Tiznado *et al.*, 1993). Hoy en día se conoce que la etiología de estas enfermedades es ocasionada por geminivirus. Desde hace tres décadas que se estudian los complejos geminivirales en México. Como ejemplo tenemos al “chino del tomate”, detectado por vez primera en Sinaloa (González y Cervantes, 1973) y del cual se encontró al CdTV como agente causal (Brown y Nelson, 1988). En la enfermedad de la “planta atigrada” reportada por primera vez en chiles serranos en Puebla (Garzón-Tiznado y Galindo-Alonso, 1985) se encontraron involucrados los virus PepMTV y CdTV (Brown *et al.*, 1989). La enfermedad del “rizado amarillo” se reportó por primera vez en Tamaulipas en el año de 1982 infectando chile, identificándose poco tiempo después al PHYVV como el agente causal (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993; Torres-Pacheco *et al.*, 1993). Es posible que el termino “chino” más de una vez, haya ocasionado confusiones, debido a que el virus CdTV ocasiona la enfermedad de el “chino del tomate” en Sinaloa, sin embargo, el síndrome comúnmente conocido como “chino” puede ser ocasionado por varios geminivirus, incluyendo CdTV, PHYVV, PepGMV, además de los presentados en este estudio). Al observar en BCS síntomas similares a estos se eligió el termino de “enchinado foliar de BCS” para describir de alguna manera la sintomatología típica observada en campo, pero diferente a su vez de la ocasionada por el CdTV. Además, los geminivirus de BCS no ocasionan amoratamientos axiales tan marcados como el CdTV y ToLCSinV y por otro lado, no infectan frijol. A partir de la presente investigación se conoce ahora que el síndrome del “enchinado foliar” del tomate de BCS puede ser ocasionado por geminivirus

de naturaleza diferente como: ToChLPV, ToChBCSV y TChCV. Todos los geminivirus detectados en BCS pertenecen al genero *Begomovirus* (familia *Geminiviridae*).

4.2. SÍNTOMAS Y PRUEBAS DE TRANSMISIÓN

Los síntomas observados en las transmisiones experimentales con los geminivirus de BCS, corresponden a los observados en infecciones con otros geminivirus en varias zonas hortícolas de México, principalmente en la región de las huastecas, Tamaulipas (Garzón–Tiznado *et al.*, 1993; Torres-Pacheco *et al.* 1996) y Sinaloa (Brown y Nelson, 1988; Brown y Poulos, 1990; Idris y Brown, 1998). Ultimamente, en Yucatán se han detectado geminivirus exógenos como el ToMoV de Florida (Garrido-Ramírez y Gilbertson, 1998) y el TYLCV de Israel, introducido por el Caribe (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 1999). Además, en otras áreas hortícolas tropicales del sureste de México (Campeche y Quintana Roo) se ha detectado la presencia de BGYMV y al TGMV, infectando chile habanero (Díaz-Plaza *et al.*, 2002). Previos ensayos con transmisiones experimentales utilizando mosquitas blancas, nos indicaron la primera evidencia de la presencia de geminivirus. Los síntomas de enchinados foliares y mosaicos observados es esta fase correspondieron a los encontrados en infecciones naturales en la misma región. Por eso, el criterio del estudio del rango de hospedantes nos sirvió para anticipar la posible naturaleza de los geminivirus presentes. A continuación se discuten algunas de las propiedades biológicas de los geminivirus de BCS, en comparación con otros geminivirus similares previamente reportados.

- (i) El virus del mosaico del pepino (CMV-*Cucumber mosaic virus*), virus grabado del tomate (TEV-*Tomato etch virus*) y el virus del mosaico del tabaco (TMV-*Tobacco mosaic virus*) son virus de ARN que pueden ser transmitidos mecánicamente, pero no se transmiten por mosquitas blancas (Agrios, 1997). Todos los geminivirus de BCS se pueden transmitir por mb.
- (ii) El virus del amarillamiento infeccioso de la lechuga (*Lettuce infectious yellows virus-LIYV*) es un virus de ARNcs que puede ser transmitido por mosquitas

blancas (*B. tabaci*) en lechuga y cucurbitáceas al igual que el virus del amarillamiento infeccioso del tomate (*Tomato infectious yellows crinivirus-TIYCV*) que puede ser transmitido a tomate por *Trialeurodes vaporariorum*. (Klassen *et al.*, 1995; Rubio *et al.*, 1999). Ninguno de los geminivirus de BCS se puede transmitir a lechuga con mosquitas.

- (iii) PepGMV y TGMV se pueden transmitir por mb y están restringidas a las solanáceas, pero pueden ser transmitidos en forma mecánica a tomate, chile y tabaco causando mosaicos ligeros y atrofias foliares, a diferencia de la mayoría de los geminivirus que no se pueden transmitir de esta manera (Stenger *et al.*, 1990). Algunas variantes (SGMV) pueden ocasionar deformación de fruto y ocasionar mosaicos amarillentos en daturas (Brown y Poulos, 1990). Solamente un geminivirus, identificado después como una variante de La Paz de PepGMV, se pudo transmitir mecánicamente, aunque con una baja eficiencia en tomate (35%) y chile (25%).
- (iv) PHYVV se puede transmitir por mb y ocasiona severos arrugamientos foliares. Expresando los síntomas primero en la base de hojas jóvenes. PHYVV se ha reportado con una alta eficiencia de transmisión en chile y tabaco, pero con una baja eficiencia en tomate (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993; Torres-Pacheco *et al.*, 1993). Los geminivirus de BCS se transmitieron con una alta eficiencia al tomate (83.3-100%) y una eficiencia media en chile (45%).
- (v) CdTV se puede transmitir por mb, pero ocasiona síntomas con cierta facilidad en frijol, chile, malva y datura (Brown y Nelson, 1988; Idris y Brown, 1988). Algunas variantes (TLCrV) son transmisibles por medio de la savia e infectan frijol pero no chile (Papomatás *et al.*, 1994). Ninguno de los geminivirus de BCS se transmitió a frijol.

- (vi) PepMTV se puede transmitir por mb pero no se puede transmitir mecánicamente. Causa arrugamientos foliares ligeros en tomate y síntomas característicos, similares al rayado del tigre en chiles (Brown y Nelson, 1989).
- (vii) ToMoV se puede transmitir por mb, pero no se transmite eficientemente en daturas y se encuentra delimitado principalmente al área de Florida (Brown, 1990). Ninguno de los geminivirus de BCS presentó sintomatología típica (rayados) en Chile.
- (viii) TYLCV se puede transmitir por mb, pero la sintomatología es muy característica (hojas acucharadas y fuerte clorosis). El frijol y la malva se presentan como hospedantes asintomáticos (Brown y Nelson, 1988), delimitado originalmente al hemisferio oriental (Israel) (Navot *et al.*, 1991), pero ahora presente en varias partes del mundo, incluyendo México (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 1999). Ninguno de los geminivirus de BCS se transmitieron a frijol y malva, además de presentar síntomas diferentes a los presentados por TYLCV (Navot *et al.*, 1991)
- (ix) Los geminivirus de BCS se transmiten por medio de las mosquitas blancas (*B. tabaci*) con una alta eficiencia (65-83.3%). Se transmite con baja eficiencia a Chile y toloache. No se transmiten mecánicamente. No se transmite a frijol, malva y lechuga.

Bajo este criterio se establece que los geminivirus de BCS tienen algunas características biológicas (rango de hospedantes) y moleculares que los hacen diferentes a otros geminivirus hasta ahora detectados en México. Aunque estos datos indican que la enfermedad geminiviral de BCS es distinta, esta puede ser fácilmente confundida con otras enfermedades geminivirales si la diagnosis se basa solamente en los síntomas y rango de hospedantes experimentales (Idris y Brown, 1998).

4.3. TÉCNICAS MOLECULARES PARA IDENTIFICACIÓN DE GEMINIVIRUS

En las pruebas serológicas por DAS-ELISA, de acuerdo a la absorbancia y la coloración observadas se encontró la evidencia preliminar de la presencia de geminivirus en plantaciones comerciales de tomate. Por otro lado, diversos autores han indicado por medio de pruebas serológicas que todos los geminivirus están relacionados en cuanto a la conformación y propiedades de la cubierta proteínica, aunque existen dos grupos de epitopes únicos para dos grandes grupos de geminivirus. El primero es para los begomovirus que infectan cultivos en Europa, África, Asia y Australia (hemisferio oriental) y el segundo para los que infectan cultivos en Norteamérica, Sudamérica y Centroamérica (hemisferio occidental) (Thomas *et al.*, 1986). El ADN total de plantas infectadas analizado por electroforesis, se visualizó en forma de una banda de aproximadamente 2.7 kb, la cual corresponde a ADN viral en la forma replicativa (ADN-FR). Sin embargo, esta banda no pudo ser observada con claridad en todas las muestras analizadas, incluyendo donde los análisis de PCR fueron positivos. Se ha observado que son varios factores que pueden afectar la visualización de ADN viral, incluyendo: (i) edad del tejido (ii) baja concentración de carga viral (iii) método de extracción y (iv) tipo de planta. En Chile por ejemplo, se ha visto que el ADN viral en su forma replicativa es más fácil visualizarlo por medios electroforéticos que en tomate (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). En los análisis por PCR, de acuerdo a las amplificaciones obtenidas se pudo determinar la naturaleza bipartita de los geminivirus de BCS (630pb) en comparación con el virus monopartita TYLCV utilizado como referencia (770pb). En los ensayos de hibridación molecular realizados con sondas específicas y generales se detectó la presencia de un geminivirus muy relacionado con el PepGMV-Tam. Los análisis de hibridación tipo Southern revelaron diferentes bandas de hibridación unas que corresponden a clones (controles positivos) y otras ADN de plantas infectadas. En estas se pueden ver bandas que corresponden al tamaño genómico del componente A (2.7 kb) de la mayoría de los geminivirus bipartitas. Cabe mencionar que al realizar las hibridaciones con la sonda de la región intergénica del componente A del PepGMV esta reconoció (hibridación cruzada) regiones genómicas de PHYVV. Al respecto, ya se han encontrado evidencias de que el componente A de PepGMV puede

presentar hibridación cruzada con el componente A de otros geminivirus, pero no así el componente B (Stenger *et al.*, 1990). Esto ocurre debido a que en infecciones mixtas con PHYVV y PepGMV, El componente B de PHYVV es capaz de suplir la función de movimiento de PepGMV, pero no viceversa (Méndez-Lozano *et al.*, 2003). En los análisis por PCR con fines de diagnóstico, algunos investigadores han utilizado la región de la CP para fines de identificación, clasificación y predicción del posible origen geográfico (Rybicki, 1994; Padidam *et al.*, 1995; Wyatt y Brown, 1996), además, de ser un medio rápido para descubrir y determinar posibles nuevos virus (Idris y Brown, 1998). Sin embargo, esta estrategia se recomienda con carácter provisional y siempre es recomendable la obtención de la secuencia completa y clones infectivos, incluyendo el estudio de las propiedades biológicas y moleculares (Brown *et al.*, 2001). Por otro lado, para fines de identificación algunos investigadores recomiendan utilizar la región intergénica (RI), debido a que en estas regiones existe mayor variabilidad entre virus de diferentes especies a diferencia de la CP que es la región más conservada entre geminivirus. Además de la alta variabilidad en esta región (≈ 300 pb), aquí se encuentran los motivos estructurales llamados iterones. Estas secuencias reguladoras son muy informativas para establecer relaciones filogenéticas y para discernir sobre posibles variantes de geminivirus relacionados, aún entre especies muy cercanas (Arguello-Astorga *et al.*, 1994b; Eagle *et al.*, 1994). De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que para el estudio de un complejo geminiviral es recomendable la utilización de varios métodos alternadamente, a fin de evitar falsos negativos, falsos positivos y resultados ambiguos (Torres-Pacheco *et al.*, 1996)

4.4. ANÁLISIS DE SECUENCIAS

De acuerdo a los análisis de secuencias de los aislamientos de BCS, se obtuvo al menos una especie diferente (ToChLPV) a todos los geminivirus reportados hasta la fecha. Sin embargo, todos los geminivirus detectados en BCS pertenecen a la familia *Geminiviridae*; genero *Begomovirus* y son del tipo bipartita como la mayoría de los encontrados en México (Brown y Nelson, 1988; Brown *et al.*, 1989; Garzón-Tiznado *et al.*, 1993; Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Idris y Brown, 1998; Díaz-Plaza *et al.*, 2002). Por otro lado, estos virus son

transmitidos por mosquitas blancas (biotipo A y B) a plantas dicotiledóneas, principalmente de la familia *Solanaceae*. La posible ubicación taxonómica de acuerdo al nombramiento provisional para cada uno de los geminivirus detectados y algunas de sus propiedades biológicas y genómicas se discuten a continuación.

4.4.1. *Tomato chino La Paz virus (ToChLPV)*

ToChLPV (GenBank AY339618; GI33520147; NCBI Taxon 240492; ICTV ID 1075610417) es un begomovirus bipartita con arreglo genómico similar a los identificados en México. Este virus se encontró involucrado en la enfermedad del “enchinado foliar” del tomate de La Paz y produce síntomas similares a otros geminivirus reportados en México, aunque con características peculiares, entre los que destacan: (i) hojas algo acucharadas (ii) las plantas presentan un aspecto erecto (iii) ramilletes enchinados. Algunos de estos síntomas se han observado en infecciones con TYLCV, sin embargo, el aspecto general entre ambos es distinto y puede ser diferenciado a simple vista por ojo experto de un fitopatólogo. La secuencia completa del componente A del ToChLPV al ser comparada en la base de datos del GenBank nos dio las identidades más altas con el ToSLCV (81-96%), un geminivirus (de tomate) parcialmente caracterizado de Nicaragua (96%) y con el ToMMoV (90-95%), aunque estos porcentajes de identidad se consideraron como provisionales en razón de que los alineamientos con la herramienta de búsqueda por alineamientos básicos locales o BLAST del GenBank, están basados en todas las regiones con la más alta identidad y no en la secuencia completa a comparar. Sin embargo, al realizar las comparaciones basados en la secuencia deducida de aminoácidos, estas fueron realizadas con los 251 aa que corresponden al la CP, obteniendo la similitud más alta con CP del ToSLCV (84%) (AAD33453). La secuencia completa del componente A del ToChLPV comparada por alineamientos múltiples, así como basados en los genes AC1, AC2, AC3, AC4 y AV1, incluyendo la región intergénica. La identidad más alta observada fue del 83.8 % con respecto al ToMMoV (AF131071) de Centroamérica (Honduras), aunque dicha identidad fue en relación solo a los 1345 pb disponible. Aunque el ToMMoV esta ahora propuesta como especie tentativa es necesario la secuenciación completa de ese

virus para poder establecer que tan relacionado esta con el ToChLPV. La identidad más alta obtenida con la secuencia completa fue del 73.8% con el ToSLCV, mientras que al comparar con la región intergénica el porcentaje más alto (76.6%) correspondió con ToChBCSV (también presentado en este estudio). De acuerdo a la identidad observada con ToMMoV (72.4%) y ToSLCV (56.9%) nos indican la alta variabilidad de esta región con respecto a las regiones codificantes. ToChLPV tiene el gen AC4 involucrado con la replicación con los geminivirus, característica que comparte con: CdTV, PHYVV, CaLCuV, MCICuV, TGMV, TLCV, TYLCV, ToMHV, TCSV, ToRMV y TYLCV, mientras que los geminivirus que no presentan AC4, se encuentran: BGYMV-[Mex], PepGMV, SLCV, ToMoTV, ToMoV y ToSLCV. Interesantemente, de acuerdo al arreglo los iterones, ToChLPV se agrupa junto con otros begomovirus mexicanos como PHYVV, ToLCSinV y CdTV, incluyendo otros begomovirus del hemisferio occidental como; AbMV, BCTV, BGMV, TGMV y ToMoTV. Sin embargo, cuando ToChLPV se comparó basado en la secuencia iterónica (TTGGAG), este se agrupó con PepGMV, BGMV, ToMoV y AbMV. Estos datos sugieren diferentes posibles agrupaciones de acuerdo a ciertas características comunes, ya sea en arreglo o en secuencia de los iterones. De acuerdo al filograma basados en la secuencia completa del componente A y el gen Rep, ToChLPV se agrupó en forma separada junto con ToChBCSV del resto de los geminivirus hasta ahora conocidos y disponibles en la base de datos del GenBank. El análisis de los filogramas basados en la proteína de CP y la región intergénica también agrupa a ToChLPV junto con ToChBCSV. Estos datos sugieren que estos dos geminivirus de BCS, aunque difieren en arreglos y secuencias de los iterones, se encuentran estrechamente relacionados. Interesantemente se encontró que ToChBCSV y ToChBCSV están relacionados con los geminivirus centroamericanos como el ToSLCV de Guatemala, ToMMoV de Honduras y un geminivirus de Nicaragua (parcialmente caracterizado). En este punto es importante mencionar que aunque ToChLPV comparte ciertas características de los iterones (número, orientación y arreglo) con los virus endémicos de México (CdTV, ToLCSinV y PHYVV), estos están filogenéticamente más relacionados a los geminivirus de Centroamérica que a los mismos de México. Para la demarcación de nuevas especies virales, el ICTV se basa en los siguientes criterios: (i) identidad del genoma completo del componente A menores al

89% corresponde a especies separadas, mientras que valores superiores corresponde a una variante de una misma especie; (ii) propiedades biológicas; (iii) estrategia de replicación; (iv) rango de hospedantes y (v) distribución geográfica. De acuerdo a este criterio se infiere que ToChLPV es una especie nueva y que esta relacionado con los geminivirus de Centroamérica. *Tomato chino La Paz virus* fue considerado como propuesta taxonómica por el subcomité del grupo de estudio de la familia *Geminiviridae* del ICTV (propuesta 2002.P109.02).

4.4.2. *Tomato chino Baja California Sur virus (ToChBCSV)*

ToChBCSV (GenBank AY339619; NCBI Taxon 240493; ICTV ID 1076023582) es un begomovirus bipartita muy relacionado al ToChLPV y al ToMMoV. Este virus se encontró involucrado con la enfermedad del “enchinado foliar” en la región de El Carrizal, BCS en tomate de mesa (tipo gordo). La sintomatología presentada por este virus aunque tiene cierta similitud con los ocasionados por otros geminivirus, aunque este presenta arrugamientos o enchinados característicos con presencia de epinastia, clorosis en brotes terminales y engrosamiento de la lamina media de la hoja. Esta particularidad hace que las hojas sean de aspecto grueso quebradizo. La secuencia completa del componente A (2609 pb) al ser comparada en la base de datos del NCBI nos dio las identidades más altas con AJ276061 (96%) ToMMoV (95%) y ToSLCV (91%). Sin embargo, como se vio con ToChLPV, estos porcentajes corresponden a fragmentos alineados de 206 a 1122 pb y no basados en la secuencia completa. Al realizar el alineamiento en MegAlign basados en la secuencia de aminoácidos de la CP, éste fue idéntico ToChLPV, seguido del ToSLCV (84%). En la figura 15 vemos el alineamiento de ToChLPV y ToChBCSV y donde podemos ver la alta identidad de la CP de ambos virus, difiriendo solo en los aminoácidos 115; isoleucina (I) para ToChLPV y valina (V) para ToChBCSV arginina para ToChLPV. Cabe mencionar que ambos aminoácidos son considerados como neutros o alifáticos y presentan las características de ser poco reactivos y fuertemente hidrofóbicos. Estos aa hidrofóbicos tienden a ocupar la parte central de las proteínas globulares, de modo que minimizan su interacción con el disolvente. En ToChLPV los aminoácidos 198 y 202

corresponden a arginina (R) y glutamina (G), mientras que ToChBCSV en la misma posición tiene triptofano (W) y histidina (H), respectivamente. La identidad más alta para ToChBCSV basados en la secuencia completa del componente A fue con ToChLPV (90.2%). Basados en los criterios establecidos por el ICTV, este virus podría considerarse una variante del ToChLPV. Además, como se discutió anteriormente, filogenéticamente ambos virus se agrupan juntos y a su vez forman un grupo separado con respecto a otros geminivirus. Sin embargo, de acuerdo a los siguientes criterios se propone al ToChBCSV como especie separada:

1. ToChLPV y ToChBCSV pertenecen a dos regiones geográficas distintas (separadas por 100 Km.).
2. Mientras que ToChLPV se aisló de La Paz, ToChBCSV se aisló de la región de El Carrizal.
3. En los alineamientos basados en la secuencia nucleotídica de la región intergénica los porcentajes de identidad de ambos virus es del 76.6%. Mientras que los porcentajes basados en la secuencia de aminoácidos fue de 89.6% para Rep, 89.1% para TraP, 92.4% para REn, 85.9% para AC4 y 99.4% para CP (Cuadro 15). En la figura 20 y 21 podemos ver la variabilidad entre estos dos virus, especialmente en la región de los iterones hacia el sentido complementario de la caja TATA. En cuanto al estudio de los iterones tenemos que la secuencia de ToChLPV es TTGGAGTA, mientras que para ToChBCSV es TTGGGTC. En cuanto al arreglo estructural de los iterones TChBCSV tiene arreglos similares al ToMMoV, aunque éste último tiene dos iterones incompletos (Cuadro 20), aunque ambos coinciden en cuanto a la posición y a la orientación. ToChBCSV junto con ToMMoV difieren del resto de los geminivirus comparados, ya que estos presentan los iterones con secuencia única y con arreglos estructurales también diferentes. Ambos geminivirus presentan un iteron adicional (con respecto a ToChLPV) en sentido complementario a 15 bases del inicio de la estructura de asa. De manera interesante al realizar los alineamientos con la RI, Rep y CP, ToChBCSV se agrupa primero con ToMMoV antes que con ToChLPV. Esto nos indica que ToChBCSV está más relacionado con el ToMMoV, aislado en Honduras que de los geminivirus aislados en BCS, incluyendo los geminivirus endémicos de México, como el CdTV, ToLCSinV y PHYV. Dado el

relativo aislamiento geográfico de la península es posible que eventos meteorológicos (huracanes, vientos, tormentas) hayan influido en la aparición (posiblemente hace miles de años) de geminivirus en la península. Por otro lado, aunque los geminivirus de Centroamérica y los de BCS comparten ciertas características genómicas y propiedades biológicas lo que hace suponer que en algún momento compartieron un ancestro común, existen también diferencias genómicas importantes que hoy en día se separan como especies diferentes. Dadas las propiedades biológicas y genómicas se propone para este aislamiento el nombre de Tomato chino Baja California Sur virus. Dicha propuesta será sometida al ICTV para ser considerada en el grupo de estudios para la última revisión taxonómica para la demarcación de especies de la familia *Geminiviridae* del ICTV.

4.4.3. *Tomato chino Calandrio virus (TChCV)*

El TChCV (GenBank AY336088; NCBI Taxón 239488; ICTV ID 1076026871) de acuerdo a las 1148 pb hasta ahora secuenciadas se infiere que es un begomovirus del tipo bipartita. Este geminivirus fue aislado de la región de Ejido El Calandrio, municipio de La Paz. La sintomatología ocasionada por este virus corresponde a severos arrugamientos y abarquillamientos de las hojas. Los mosaicos definidos con fuertes clorosis en la parte axial de las hojas y hojas pequeñas son menos evidentes que en ToChLPV. Este virus fue aislado de tomate tipo Roma o saladet. El fragmento secuenciado y analizado por BLAST (NCBI) nos indica que TChCV tiene las identidades más altas (82, 88, 93%) con el ToSLCV y con el ToMMoV (85, 91, 94%) (Cuadro 16). Cuando se realizaron basados en las comparaciones de la CP (aa) las identidades fueron del 97% con el ToMMoV y 79.2% con el PepGMV y el ToSLCV. Sin embargo, al realizar las comparaciones del TChCV por alineamientos múltiples basados en los aminoácidos deducidos de la CP y Rep los resultados son por demás interesantes en el sentido que cuando se comparan basados en la Rep (95.2%) y la RI (65.5%), estos presentan su identidad más alta con ToSLCV, mientras que cuando se comparan basados en la CP las identidades más altas corresponden con ToChLPV y ToChBCSV en un 100% y al ToMMoV en un 97.9%. Estos resultados sugieren una alta identidad de regiones homólogas entre las proteínas de ToChBCSV,

ToChLPV, TChCV y ToMMoV. Sin embargo el porcentaje de identidad del TChCV con el ToMMoV basados en la secuencia nucleotídica (1148) total es de solo 57.7% y del 63.7% con el ToSLCV. En los análisis de los iterones, tenemos que TChCV junto con ToSLCV tienen un arreglo único que no comparten ninguno de los geminivirus comparados lo que hace suponer que evolutivamente compartieron un ancestro común. El iteran se encuentra entre la estructura conservada de tallo-asa y la caja TATA en sentido complementario. Sin embargo, las secuencias de los iterones de estos dos virus son ligeramente distintas (en una sola base). Mientras que TChCV tiene la secuencia TGGAGTCC, ToSLCV tiene la secuencia TGGTGTCC (Fig. 20, 21). Por otro lado TChCV posee las secuencias de los iterones idénticas a las encontradas en TChLPV, PepGMV, ToMoV, BGMV y AbMV. Dadas las evidencias hasta aquí presentadas podemos inferir que este TChCV es distinto a los begomovirus ToSLCV y ToMMoV, incluyendo los geminivirus ToChLPV y ToChBCSV. Aunque de acuerdo a los criterios del ICTV sería necesaria la secuenciación completa para ver si pertenece a una especie separada. Por lo pronto, se propone tentativamente como Tomato chino Calandrio virus.

4.4.4. *Pepper golden mosaic virus- La Paz (PepGMV-[La Paz])*

PepGMV-[La Paz] (GenBank 368336; NCBI taxón 223301; ICTV ID 1076041568) es un begomovirus de tipo bipartita de amplia distribución nacional. Este virus fue aislado en la región de La Paz en plantas de tomate tipo cherry. El PepGMV se encontró involucrado con la enfermedad conocida como “mosaico dorado”. En plantas de tomate la sintomatología es característica debido a sus mosaicos bien definidos, además de presentar arrugamientos foliares. Aunque PepGMV se aisló originalmente de Chile, en este estudio se obtuvieron más altas eficiencias de transmisión (incluyendo la mecánica) en tomate. De acuerdo a los alineamientos múltiples realizados, basados en la secuencia nucleotídica se obtuvo un 98% de identidad con el PepGMV, un 97% con PepGMV-Tamaulipas, un 97% con PepGMV-Costa Rica y un 92% con el Serrano golden mosaic virus (SGMV), este último considerado actualmente como una variante del PepGMV (Rybicki *et al.*, 2000). Resultados similares fueron obtenidos al realizar alineamientos basados en su deducido en

aminoácidos de los genes CP (92-98%) y Rep (92-93%). Los análisis basados en los iterones nos indican que los aislamientos de PepGMV de La Paz tienen regiones homólogas estructurales (arreglos y orientación de los iterones) similares a todas las variantes reportadas hasta ahora del PepGMV, así como una alta identidad en la secuencia conservada (TGGAGTCC), aunque con ligeros cambios de una a dos bases. El aislamiento del PepGMV de La Paz comparte con el PepGMV-Tamaulipas una relación filogenética más cercana que a las variantes reportadas de Centroamérica (Costa Rica y Guatemala). Por otro lado, de acuerdo al filograma y a las características de los iterones nos sugiere que PepGMV, se encuentra relacionado con los begomovirus de cucurbitáceas (SLCV, CalCuV, CuLCuV, MCLCuV, SMLCV). Cabe mencionar que en estudios previos, este grupo ha sido denominado del SLCV y forman un grupo separado de otros geminivirus del hemisferio occidental (Arguello-Astorga *et al.*, 1994). La incidencia de la enfermedad del “mosaico dorado” fue desde 1.4-100%. Los valores más altos fueron en el mes de junio para el ciclo primavera-verano y en el mes de noviembre para el ciclo otoño invierno. La aparición de síntomas a las tres semanas después del trasplante coincidió con el inicio del aumento de las poblaciones de mosquitos blancos (adultos), lo que permaneció en constante aumento de acuerdo al tiempo transcurrido. La máxima abundancia media de adultos de *B. tabaci* ocurrió en los meses de mayo (976 mb/trampa) y noviembre (760 mb/trampa) para cada uno de los ciclos. La incidencia en las malezas circundantes fue variable, con las poblaciones más altas en los meses de julio (207 mb/trampa) y diciembre (580 mb/trampa), etapa de maduración del cultivo, lo que indica la naturaleza migratoria de las mosquitos blancos hacia hospedantes alternos. Aunque no se determinó el grado de agregación se ha reportado que no existe relación entre la incidencia y el grado de agregación, pero sí existe una relación directa entre la infestación de *B. tabaci* y la fenología del cultivo y que esta es un factor determinante sobre todo en climas tropicales o sub-tropicales, como las presentadas en La Paz (Polston *et al.*, 1996). El rango de hospedantes de las 10 familias botánicas en estudio, solo las solanáceas resultaron hospedantes susceptibles del PepGMV-La Paz. El tomate, chile y toloache resultaron ser los hospedantes naturales más susceptibles, mientras que el tabaquillo silvestre (*Nicotiana glauca* L.) fue la única especie natural susceptible asintomática. En PepGMV [La Paz] fue el único virus que se pudo

transmitir en forma mecánica al tomate y chile, aunque su eficiencia de transmisión no es muy buena (25-35%). Las demás especies se consideraron como no susceptibles (inmunes) o no hospedantes de mosquitos blancos. Estos resultados nos muestran el reducido rango y la alta especificidad del PepGMV a la familia *Solanaceae* y donde el tomate resultó ser el hospedante más eficaz (83.3-100 %). Similares resultados se han obtenido por otros investigadores, donde se observaron síntomas generalizados de malformación foliar, mosaicos, clorosis intervenal y entrenudos cortos (Stenger *et al.*, 1990; Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Garzón-Tiznado *et al.*, 2001). La distribución del PepGMV-La Paz se encontró delimitada sólo al área hortícola de La Paz (ejido el Calandrio). En algunas plantas se logró detectar mezclas (PepGMV-[La Paz] con otros geminivirus) (Holguín-Peña *et al.*, 2003). La presencia de mezclas virales tiene implicaciones muy serias debido a que complican la identificación del agente causal y dificulta el entendimiento de los factores epidemiológicos que ocasionan una epifitía, como ha ocurrido en algunas de las regiones más importantes de México (Garzón-Tiznado *et al.*, 2001; Díaz-Plaza *et al.*, 2002; Méndez-Lozano *et al.*, 2003).

4.5. FILOGENIA DE GEMINIVIRUS AISLADOS EN MÉXICO

4.5.1. *Pepper golden mosaic virus.*

Aunque el PepGMV se detecta por primera vez en 1987 en Texas y conocido originalmente como Texas pepper geminivirus-TPGV (Stenger *et al.*, 1990), éste se encuentra entre los geminivirus más distribuidos en México (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Otras variantes de este virus se han encontrado en Sinaloa (Brown y Poulos, 1990) y Tamaulipas (Arguello-Astorga *et al.*, 1994b). Filogenéticamente PepGMV se encuentra dentro del grupo del SLCV, aunque en los análisis basados en la secuencia nucleotídica de Rep y CP se separan claramente de este grupo. Tomando en cuenta que hace años no se presentan epifitias en Texas (lugar de donde originalmente fue aislado) y por otro lado la amplia distribución en el territorio nacional, es posible que este geminivirus sea endémico de México, siendo posible que cuando se detectó en Texas, ya estaba presente en México involucrado en otras

enfermedades de tipo geminiviral como las ocasionadas por el virus del mosaico dorado del chile serrano (SGMV) en Sinaloa (Brown y Poulos, 1990) y el virus tejano del chile (TPV, renombrado como PepGMV) en Tamaulipas (Arguello-Astorga *et al.*, 1994b). Actualmente se han detectado variantes de este virus en Costa Rica y otras regiones de Centroamérica (Lotrakul *et al.*, 2000).

4.5.2. *Pepper huasteco yellow vein virus.*

El PHYVV (anteriormente PHV) interesante se tiende a agrupar más a los geminivirus del hemisferio oriental que a los del hemisferio occidental, de donde procede geográficamente. De acuerdo a estos análisis PHYVV está muy relacionado al RhGMV. PHYVV se encontró como agente causal de la enfermedad del “rizado amarillo” (Torres-Pacheco *et al.*, 1993; Garzón-Tiznado *et al.*, 1993) y se encuentra también entre los geminivirus más distribuidos en México (Torres-Pacheco *et al.*, 1996).

4.5.3. *Chino del tomate virus.*

CdTV se agrupa con el ToMoV de Florida y con los virus ToMoTV y ToMHV (aislados en Cuba), aunque a su vez se separa de estos y otros posibles geminivirus relacionados. Aunque ya se tenían reportes de la enfermedad del “chino” del tomate en Sinaloa (González y Cervantes, 1973), no fue sino hasta 1988 que se caracteriza parcialmente al CdTV como agente causal de la enfermedad (Brown y Nelson, 1988). En 1994 se caracteriza una especie muy relacionada con el CdTV, el Tomato leaf crumple virus-TLCrV (Paplomatas *et al.*, 1994), aunque luego se reconocería como una variante del CdTV (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Este virus también se ha encontrado involucrado con la enfermedad de la “planta atigrada” (Brown *et al.*, 1989).

4.5.4. *Tomato leaf curl Sinaloa virus.*

ToLCSinV no se comparó basados en el componente A, dado que solamente esta reportado una parte de la secuencia. Sin embargo, en todos los filogramas basados en AR1 y la RI se separa de todos los geminivirus hasta ahora conocidos. ToLCSinV se aísla originalmente en Sinaloa (Brown *et al.*, 1993; Idris y Brown, 1998) y actualmente es propuesta como nueva especie por el ICTV.

4.5.5. *Pepper mild tigre virus.*

PepMTV no se comparó. Por la escasa información disponible, el ICTV la propone como especie tentativa. Se aísla en Tamaulipas, México y se encuentra involucrado con la enfermedad de la planta atigrada del chile (Garzón-Tiznado y Galindo-Alonso, 1985; Brown *et al.*, 1989).

4.6. ANÁLISIS DE ITERONES

Los iterones son motivos estructurales altamente conservados de entre seis y nueve bases que se encuentran asociados en la replicación. En estos motivos estructurales es donde se da el reconocimiento específico de las proteínas de la replicación con varios sitios los cuales pueden ser divergentes. Los cuatro geminivirus de BCS presentaron una homología estructural en relación a la similitud de algunos motivos conservados como, cajas TATA, cajas CAAA, caja G, estructura de tallo-asa (asociado al origen de replicación), además presentaron similitud en la orientación de los primeros iterones “río arriba” de la caja TATA (hacia Rep) e identidad en la secuencia conservada TGGAGT. Sin embargo, la diversidad genética más evidente esta dada principalmente por el número y orientación de algunos iterones (Fig. 20). Estos arreglos estructurales son una herramienta útil para el análisis y el estudio de relaciones, además para poder inferir sobre el posible origen geográfico y relaciones filogenéticas (Howarth y Vandemark, 1989; Arguello-Astorga *et al.*, 1994a; Arguello-Astorga *et al.*, 1994b; Eagle *et al.*, 1994). Se ha observado que el

número de iterones varia de un linaje a otro, existiendo típicamente 3 en los curtovirus y begomovirus del hemisferio occidental (GHOc), 4 en los begomovirus del hemisferio oriental (GHOOr) y 5-6 en los del grupo del SLCV (Arguello-Astorga *et al.*, 1994b). Por otro lado análisis sobre los dominios relacionados con los iterones han revelado que existe una correlación entre los residuos específicos de Rep y ciertos nucleótidos de su iteron análogo, sugiriendo que una estructura secundaria de Rep tiene un subdominio en hoja β , el cual le confiere la capacidad de reconocimiento del ADN (Arguello-Astorga y Ruiz-Medrano, 2001). Dado que todas las agrupaciones incluyen geminivirus del tipo bipartita y monopartita, se sugiere que la forma de organización de cada tipo ha ocurrido independientemente (Arguello-Astorga *et al.*, 1994b).

4.7. DISTRIBUCIÓN Y DETECCIÓN ESPECÍFICA EN GEMINIVIRUS DE BCS

La enfermedad de el “enchinado foliar” en BCS tiene diferentes agentes causantes. De los tres geminivirus encontrados (ToChLPV, ToChBCSV, TChCV), aunque relacionados, estos se consideraron especies distintas. Tal aseveración fue confirmada por técnicas de RFLP, donde pudieron ser observados patrones de bandeo específicos para cada uno de los virus. ToChBCSV fue encontrado en el área hortícola de El Carrizal, mientras que ToChLPV fue detectado en el área de La Paz (ambas regiones separadas por alrededor de 100 Km.). TChCV se encontró en el ejido El Calandrio, municipio de la Paz y solamente distanciado como 5 Km. de donde se encontró ToChLPV y PepGMV. El estudio de estos virus utilizando iniciadores específicos para detección específica de ToChLPV y ToChBCSV, solamente se obtuvieron resultados positivos en El Carrizal en razón del 80% de 40 muestras analizadas, lo que demuestra la alta especificidad de la prueba de PCR utilizando iniciadores específicos. En la región de La Paz no se realizó el estudio porque no hubo siembra de tomate para la temporada 2003. Sin embargo, además de la región de El Carrizal, se encontraron evidencias de geminivirus en Todos Santos, Pescadero y Meliton Albañez. Todos los geminivirus detectados en México en el cultivo del tomate, hasta la fecha pertenecen al género *Begomovirus* (Brown y Nelson, 1988; Brown y Poulos, 1990; Stenger *et al.*, 1990; Torres-Pacheco *et al.*, 1993; Garzón-Tiznado *et al.*, 1993; Paplomatas *et al.*,

1994; Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Idris y Brown, 1998; Idris *et al.*, 1999), exceptuando al TYLCV, el cual es el único *Begomovirus* de tipo monopartita detectado en Yucatán, México (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 1999).

4.8. HOSPEDANTES NATURALES

Los hospedantes naturales de los geminivirus de BCS se encontraron delimitados a la familia de las solanáceas, donde el tomate se encontró como el hospedante más susceptible, seguido del chile (*Capsicum annuum*), toloache (*Datura discolor*) y tomatillo (*Physalis ixocarpa*). Solamente se encontró al tabaquillo (*Nicotiana glauca*) como hospedante asintomático. Otras investigaciones han sugerido que las plantas asintomáticas o inmunes a la expresión viral dentro de la planta es restrictivo al movimiento de partículas virales dentro de la planta más que a efectos de replicación (Maxwell, 2001). En cuanto al estudio de malezas como hospedantes de virus se tiene detectado que las principales malezas hospedantes de geminivirus en México se encuentran las solanáceas, entre las que se encuentran *Malva parviflora* y diferentes especies de daturas, los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en relación a la alta especificidad de geminivirus hacia solanáceas. Aunque se detectó la presencia de mezclas virales, los bajos porcentajes encontrados (menores del 1%) no se consideran importantes como para que influyan en la expresión de síntomas general. Los geminivirus a menudo aparecen en infecciones complejas en tomate ya sea como infecciones mezcladas con dos o más geminivirus como ha ocurrido con PHYVVV y PepGMV (Méndez-Lozano *et al.*, 2003) o con presencia de recombinantes de componentes genómicos de geminivirus bipartitas relacionados (Guzmán *et al.*, 1997, Paplomatas *et al.*, 1994, Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Estos complejos no son exclusivos del tomate y se ha informado de su presencia en otros cultivos como el chile (Brown y Nelson 1988, Garzón-Tiznado *et al.*, 1993, Polston *et al.*, 1989). Últimamente se han encontrado geminivirus asociados a satélites virales de ADN (Mansoor *et al.*, 2003).

4.9. INCIDENCIA DE GEMINIVIRUS E INFESTACIÓN DE MOSQUITAS

Las incidencias más altas presentadas por geminivirus en BCS fueron del 100%, registradas en los meses junio y noviembre del 2002 y de un 92% presentados en junio del 2003. Los valores de severidad en todos los casos se consideraron altos con un promedio de 4.2 para el ciclo primavera-verano y de un 6.15 para el ciclo otoño-invierno (cuadro 18). Las índices de infestación (IMI) más altos de moscas blancas se presentaron en mayo (2003) y junio (2002). Cabe mencionar que antes de alcanzar altos niveles del IMI, ya se tenían incidencias del 100% de la enfermedad y altos valores de severidad. Esto nos indica que infecciones tempranas (primera semana después del trasplante) y una infestación alta de moscas virulíferas, son factores determinantes para la presencia de epifitias severas. Se ha argumentado ampliamente que altas poblaciones de mosquitos depende de la abundancia y fenología del hospedante, así como de las condiciones climáticas (Polston *et al.*, 1996). Después de la ocurrencia del huracán Juliet, en septiembre del 2001 en las costas de BCS, la incidencia fue temporalmente suprimida. Sin embargo, desde entonces, las mosquitos blancas y la presencia de enfermedades de supuesta etiología geminiviral se han incrementado, aunque se han descrito migraciones de mosquitos (del biotipo B) a distancias cortas, no se han reportado estudios bien documentados de mosquitos a largas distancias (Byrne *et al.*, 1996). Por otro lado, se ha especulado que los huracanes y los vientos pueden facilitar el movimiento de estos insectos a largas distancias, sobre el agua. La evidencia circunstancial sobre esta posibilidad es la determinación de que la misma cepa del PYMV, con pocas variaciones en su secuencia fue encontrada en las islas del Caribe ubicadas a 600 km entre ellas. Mientras que, TYLCV es detectado en Jamaica (McGlashan *et al.*, 1994) aproximadamente un año después de su aparición en República Dominicana (Nakhla *et al.*, 1994) y recientemente en Florida (Momol, 1999). De igual manera, BGMV apareció en el sur de Florida dos meses después del huracán Andrés (Blair *et al.*, 1995).

4.10. BIOTIPOS DE MOSCAS PRESENTES EN BCS

Desde 1991 el biotipo B es considerada como plaga cuarentenada en México a partir de las epizootias presentadas en Mexicali y San Luis Río Colorado, Sonora (Fú y Silva, 1997; Garzón-Tiznado, 1998). La Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) a través de Centro Nacional de Referencia y Diagnóstico Fitosanitario (CNRDF) determina que el complejo de biotipos A y B se encuentra distribuido en todo el territorio nacional, incluyendo BCS (Torres-Robledo *et al.*, 2000). Los dos biotipos detectados en BCS tienen un rol importante en la transmisión de geminivirus en BCS. Sin embargo, es importante notar que las poblaciones del biotipo B se han ido incrementando. En América ya se tienen reportes de que el biotipo B introducido del mediterráneo ha ido desplazando al biotipo endémico del continente americano (biotipo A). Este fenómeno se ha incrementado especialmente en áreas tropicales sobre todo cuando el tomate tiene características de monocultivo. Estos desplazamientos han implicado la introducción de virus endógenos en nuevos agrosistemas. Por ejemplo, en República Dominicana y Jamaica el virus cuarentenado TYLCV ha reemplazado a los geminivirus endémicos de tipo bipartita. Mientras que en Florida TYLCV ha llegado considerarse más importante que ToMoV (Maxwell, 2001). En 1993, se generaliza la presencia del biotipo B en casi toda América Central y para 1994 este fue encontrado en la costa oeste de Sinaloa (Brown *et al.*, 1995). Es importante mencionar que aunque los dos biotipos muestran pocas diferencias morfológicas existen diferencias biológicas significativas, especialmente en los hábitos alimenticios, reproductivos y patrones conductuales, lo que ha sugerido que los biotipos hasta ahora existentes (A, B, E, J, N) pertenecen a un complejo de especies y no a especies separadas (Byrne *et al.*, 1990; Schuster *et al.*, 1990; Perring *et al.*, 1993; Bedford *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995). En 1993 esta variante (biotipo B) es considerada como especie separada y es denominada como *Bemisia argentifolii* Bellows y Perring (Perring *et al.*, 1993; Bellows *et al.*, 1994). Sin embargo, Barlett y Gewel (1993) criticaron esa decisión en razón de que: (i) las diferencias genéticas reportadas pudieron ser por efectos de laboratorio (ii) ausencia de estimación del error estándar del estadístico utilizado para determinar las

distancias genéticas entre especies (iii) no existen indicaciones si las poblaciones estaban en equilibrio Hardy-Weinberg. Por su parte Wool *et al.* (1993) utilizando la prueba de esterasas observaron que la heterogeneidad en la frecuencia alélica correspondía a poblaciones tratadas o no-tratadas con insecticidas. Finalmente, Gewel y Barlett (1993) usando RAPDs determinaron que esta técnica era útil para distinguir organismos muy relacionados, pero no para determinar un estatus taxonómico. Por otro lado, se ha determinado que como plaga directa la mosquita blanca en la actualidad no representa un serio problema para los cultivos de México, como plaga directa, por lo que la campaña ha pasado de prioridad nacional a campaña emergente, aunque sujeta a normatividad (NOM-020-FITO-1995). Sin embargo, debido a la creciente aparición de enfermedades geminivirales (como las presentadas en este trabajo) sería importante regionalizar las campañas fitosanitarias federales. Del mismo modo sería importante que las instancias federales correspondientes realizaran estudios de análisis de riesgos y por último revisar la normatividad vigente a fin de adecuarla a las situaciones particulares de cada región.

CONCLUSIONES

- ✓ El “enchinado foliar” del tomate de BCS es ocasionado por ToChLPV, ToChBCSV, TChCV; geminivirus bipartitas pertenecientes al género *Begomovirus* con alta especificidad hacia la familia *Solanaceae*.
- ✓ Los geminivirus de BCS están más relacionados a los geminivirus de Centroamérica que a los nativos de México lo que implica su posible origen geográfico.
- ✓ Se detectó una variante del PepGMV; begomovirus ampliamente distribuido en México, pero no relacionado filogenéticamente con los otros virus de BCS.
- ✓ La distribución de ToChLPV, ToChBCSV en BCS esta delimitada a la región del Carrizal y La Paz.
- ✓ Hasta el presente trabajo las regiones de El Centenario, El Cardonal, El Pescadero, Todos Santos, Melitón Albañez, Los Planes, Cabo San Lucas y San José del Cabo se encuentran libres de geminivirus.
- ✓ La incidencia de geminivirus en BCS esta relacionado a las infestaciones de mosquitas blancas en las primeras etapas fenológicas del cultivo.
- ✓ Los geminivirus de BCS se transmiten más eficientemente al tomate y en menor grado a chile, toloache, tomatillo y tabaquillo (asintomático).
- ✓ Las mosquitas blancas biotipo A (*Bemisia tabaci*) y biotipo B (*Bemisia argentifolii*) se encuentran asociadas a la transmisión de begomovirus.

PERSPECTIVAS

1. Dado la importancia de la presencia de geminivirus nuevos en los agrosistemas de BCS, es necesario la secuenciación y caracterización completa de todos los geminivirus reportados en este trabajo, incluyendo la obtención de clones infectivos para un estudio más completo de las propiedades biológicas de estos virus.
2. Desde el punto de vista fitopatológico es importante mencionar la necesidad de investigación dirigida al entendimiento de los factores que determinan una epidemia y el cual sentará un valioso precedente para el entendimiento de este grupo de patógenos de plantas que nos lleven a desarrollar estrategias puntuales de manejo integral regional.
3. Independientemente del estatus taxonómico de la mosquita blanca es importante mantener monitoreos periódicos que nos permitan conocer la participación de cada biotipo en la presencia de epifitias.
4. Es importante involucrar y sensibilizar al sector productivo y dependencias federales del riesgo potencial que este tipo de virus implican.
5. La problemática nacional y mundial con éste tipo de patógenos nos obliga a establecer líneas de investigación interinstitucionales de tal forma que nos garantice un impacto real en la sociedad científica y el sector productivo.

BIBLIOGRAFIA

Abouzeid, A.M., Polston, J.E., and Hiebert, E. 1992. The nucleotide sequence of Tomato mottle virus, a new geminivirus isolated from tomatoes in Florida. *Journal of General Virology* 73:3225-3229.

Accotto, C.P., Navas-Castillo, J., Noris, E., Moriones, E., and Louro, E. 2000. Typing of Tomato yellow leaf curl viruses in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 106:179-186.

Agrios, G.N. 1997. *Plant Pathology*. Fourth Edition. Academic Press. San Diego, CA, USA. 656 p.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.

Andreas Serra, C. 1996. Muestreo de moscas blancas (pp. 22-29). *In: Metodología para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus*. Luko Hilje (ed.). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Unidad de Fitoprotección. Turrialba Costa Rica. 133 p.

Anzola, D., and Lastra, R. 1985. Whitefly population and its impact on the incidence of Tomato yellow mosaic virus in Venezuela. *Journal of Phytopathology* 112: 363-366.

Arguello-Astorga, G.R., Herrera-Estrella, L., and Rivera-Bustamante, R.F. 1994a. Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Molecular Biology* 26:553-556.

Arguello-Astorga, G.R., Guevara-González, R.G., Herrera-Estrella, L.R., and Rivera-Bustamante, R.F. 1994b. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology* 203:90-100.

Arguello-Astorga, G.R. and Ruiz-Medrano. 2001. An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Archives of Virology* 146:1465-1485.

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.

- Atzmon, G., Van Oss, H., and Czosnek, H. 1998. PCR-amplification of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) DNA from squashes of plants and whitefly vectors: application to the study of TYLCV acquisition and transmission. *European Journal of Plant Pathology* 104:189-194.
- Azzam, O., Frazer, J., De la Rosa, D., Beaver, J.S., Ahlquist, P., and Maxwell, D.P. 1994. Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of Bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* 204:289-296.
- Balcoumbe, D.C. 1996. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *The Plant Cell* 8:1833-1844.
- Barlett, A.C., and Gawel, N.J. 1993. Determining whitefly species. *Science* 261:133-134
- 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..
- Bellows, T.S. Jr, Perring, T.M., Gill, R.J., and Headrick, D.H. 1994. Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America* 87:195-206.
- Birboin, H.C., and Doly, J.C. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research* 7:1513-1523.
- Bird, J., and Maramorosch, K. 1978. Viruses and virus diseases associated with whiteflies. *Advances in Virus Research* 22:55-110.
- Bisaro, D.M. 1996. Geminivirus replication. *In: DNA replication in eukaryotic cells*. M. de Pamphilis (ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 833-854.
- Blair, M.W., Bassett, M.J., Abouzid, A.M., Hiebert, E., Polston, J.E., McMillan, R.T. Jr., Graves, W., and Lamberts M. 1995. Occurrence of Bean golden mosaic virus in Florida. *Plant Disease* 79(5):529-533.
- Blancard, D. 1996. Enfermedades del tomate. Trad. del francés por Antonio Peña Iglesias. Mundi-Prensa. México 212 p.
- Bock, K.R. 1982. Geminivirus diseases in tropical crops. *Plant Disease* 66:266-270.
- Bolaños, A. 1996. Germoplasma (pp. 42-50). *In: Metodología para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus*. L. Hilje (ed.). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Unidad de Fitoprotección. Turrialba, Costa Rica 133 p.

- Briddon, R.W., Prescott, A.G., Lunness, P., Chamberlin, L.C., and Markham, P.G. 1993. Rapid production of full-length, infectious geminivirus clones by abutting primer PCR (AbP-PCR). *Journal of Virology Methods* 43(1):7-20.
- Brown, J.K. and Hine, R.B. 1984. Geminiate particles associated with the leaf curl or "chino" disease of tomatoes in coastal areas of western Mexico. (Abstr.) *Phytopathology* 74: 844.
- Brown, J.K., and Nelson M.R. 1986. Whitefly-borne viruses of melons and lettuce in Arizona. *Phytopathology* 76:236-239.
- 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 Nelson, M.R. 1989. Two whitefly-transmitted geminiviruses isolated from pepper affected with tigre disease. (Abstr.) *Phytopathology* 79:908.
- Brown, J.K., Campodonico, O.P., and Nelson, M.R. 1989. A whitefly-transmitted geminiviruses from peppers with tigre disease. *Plant Disease* 73-610.
- Brown, J.K. 1990. An update on the whitefly-transmitted geminiviruses in the Americas and the Caribbean Basin. *FAO, Plant Protection Bulletin* 39:5-23.
- 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., and Bird, J. 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Disease* 76:220-225.
- 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 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, S.M. 2000. Bioinformatics: A biologist's guide to biocomputing and the internet. Eaton Publishing. Natick, MA. 108p.

Büchen, O.C. 2004. Geminiviridae *In*: International Committee on Taxonomy of Viruses. Web page generated from ICYVdb by DELTA systems. www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVbB.

Byrne, D.N., Bellows, T.S., Thomas, S., and Parrella, M.P. 1990. Whiteflies in agricultural systems. *In*: Whiteflies: Their bionomics, pest status, and management. D. Gerling (ed.). Intercept Ltd, Andover. United Kingdom pp. 227-261.

Byrne, D.N., Rathman, R.J., Orum, T.V., and Palumbo, J.C. 1996. Localized migration and dispersal by the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Oecologia* (Berlin) 105(3):320-328.

Caballero, R. 1996. Identificación de moscas blancas *In*: Metodología para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus. Luko Hilje (ed.). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba C. R. CATIE. Unidad de Fitoprotección pp.1-10.

Castellano, M.M., Sanz-Burgos, A.P., and Gutiérrez, C. 1999. Initiation of DNA replication in a eukaryotic rolling-circle replicon: identification of multiple DNA-protein complexes at the geminivirus origin. *Journal of Molecular Biology* 290:639-52.

Clark, M.F., and Adams, A.M. 1977. Characteristics of microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34:475-483.

Cortéz-Mondaca, E., 1994. La mosca blanca en el Valle de Santo Domingo, B. C. S. y las estrategias para su manejo integrado. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Centro de Investigación Regional del Noroeste. Campo Experimental Valle de Santo Domingo. Cd. Constitución, Baja California Sur. 46p.

Costa, H.S., Brown, J.K., and Byrne, D.N. 1991. Host plant selection by the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: *Aleyrodidae*) under greenhouse conditions. *Journal of Applied Entomology* 112:146-152.

Costa, H.S., Johnson, M.W., Ullman, D.E., Omer, A.D., and Tabashnik, B.E. 1993. Sweetpotato whitefly (Homoptera, *Aleyrodidae*): analysis of biotypes and distribution in Hawaii. *Environmental Entomology* 22:16-20.

Czosnek, H., Navot, N., and Laterrot, H. 1990. Geographical distribution of tomato yellow leaf curl virus, a first survey using specific DNA probes. *Phytopathology Mediterranean* 29:1-6.

- De Barro, P.J., and Driver, F. 1997. Use of RAPD PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Australian Journal of Entomology* 36(2):149-152 .
- Dellaporta, S.J., Wood, J., and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA minipreparation, version II. *Plant Molecular Biology* 1:19-21.83.
- 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., McGrath, P.F., Robinson, D.J., and Harrison, B.D. 1994. Detection and differentiation of whitefly-transmitted geminiviruses in plants and vector insects by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Annals of Applied Biology* 125:327-336.
- 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.
- Eagle, P.A., Orozco, B.M., and Hanley-Bowdoin, L. 1994. A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. *The Plant Cell* 6:1157-1170.
- Eagle, P.A., Hanley-Bowdoin, L. 1997. Cis Elements that contribute to geminivirus transcriptional regulation and efficiency of DNA replication. *Journal of Virology* 71:6947-6955.
- Elmer, J.S., Brand, L., Sunter, G., Gardiner, W., Bisaro, D.M., and Rogers, S.G. 1988. Genetic analysis of Tomato golden mosaic virus. II. The conserved AL1 ORF product is essential for replication. *Nucleid Acids Research* 16:7043-7060.
- Etessami, P., Callis, R., Ellwood, S., and Stanley, J. 1988. Delimitation of essential genes of Cassava latent virus DNA. *Nucleid Acids Research* 16, 4811.
- Etessami, P., Saunders, K., Watts, J., and Stanley, J. 1991. Mutational analysis of complementary-sense genes of African cassava virus DNA. *American Journal of General Virology* 72:1005-1012.
- 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.

- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP-phylogeny inference package (Version 3.2). *Cladistic* 5:164-166.
- Friedmann, M., Lapidot, M., Cohen, S., and Pilowsky, M. 1998. A novel source of resistance to tomato yellow leaf curl virus exhibiting a symptomless reaction to viral infection. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123:1004-1006.
- Frischmuth, T., and Stanley, J. 1991. African cassava mosaic virus DI-DNA interferes with the replication of both genomic components. *Virology* 183:808-811.
- Fu, C.A.A., y Silva, S.F.C. 1997. Manejo integrado de la mosquita blanca de la hoja plateada (*Bemisia argentifolii*). Folleto técnico No. 13. INIFAP-PRODUCE. Hermosillo, Sonora. 59p.
- 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.
- Garrido-Ramírez, E.R., and Gilbertson, R.L. 1998. First report of Tomato mottle geminivirus infecting tomatoes in Yucatan, Mexico. *Plant Disease* 82: 592.
- Garzón-Tiznado, J.A., y Galindo-Alonso, J. 1985. La “planta atigrada” del chile (*Capsicum annuum*) en la región de Valsequillo, Puebla. *Revista Mexicana de Fitopatología* 3:10-13.
- Garzón-Tiznado, J.A. 1988. Geminivirus transmitidos por la mosquita blanca. *In: Temas selectos para el manejo integrado de la mosquita blanca. Memoria científica No. 6. Unidad de Difusión Técnica. Campo Experimental Valle del Yaqui. SAGAR-INIFAP-CIRNO. Cd. Obregón, Sonora. 115p.*
- Garzón-Tiznado, J.A. 1987. Presencia de virus en los cultivos de chile y tomate en México. *En temas de virología II. Sociedad Mexicana de Fitopatología pp. 156-172.*
- Garzón-Tiznado, J.A., Torres-Pacheco, I., Ascencio-Ibáñez, J.T., Herrera-Estrella, L., and Rivera-Bustamante, R.F. 1993. Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by biolistic procedure. *Phytopathology* 83: 514-521.
- 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.
- Gawel, N.J., and Barlett, A.C. 1993. Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. *Insect Molecular Biology* 2:33-38.

- 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.
- Gilbertson, R.L., Hidayat, S.H., Martinez, R.T., Leong, S.A., Faria, J.C., Morales, F.J., and Maxwell, D.P. 1991. Differentiation of bean-infecting geminiviruses by nucleic acid hybridization probes and aspects of Bean golden mosaic in Brazil. *Plant Disease* 75:336-342.
- Godinez, H.Y., Anaya, L.J.L., Díaz, P.R., González, C.M., Torre, P.I., Rivera, B.R.F., and Guevara, G.R.G. 2001. Characterization of resistance to Pepper huasteco geminivirus in chili peppers from Yucatan, Mexico. *Hortscience* 36(1):139-142.
- 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.
- Gutiérrez, C. 1999. Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56:313-329.
- Gutiérrez, C. 2000a. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminivirus. *EMBO Journal* 19:792-799.
- Gutiérrez, C. 2000b. Geminivirus and the plant cell cycle. *Plant Molecular Biology* 43:763-772.
- Guzmán, P., Arredondo, C.R., Emmatty, D., Portillo, R.J., and Gilbertson, R.L. 1997. Partial characterization of two whitefly-transmitted geminiviruses infecting tomatoes in Venezuela. *Plant Disease* 81(3):312.
- Hamilton, W.D.O., Sanders, R.C., Coutts, R.H.A., and Buck, K.W. 1981. Characterization of Tomato golden mosaic virus as a geminivirus. *FEMS Microbiology Letters* 11:263-267.
- Hamilton, W.D.O., Stein, V.E., Coutts, R.H.A., and Buck, K.W. 1984. Complete nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of Tomato golden mosaic virus: potential coding regions and regulatory sequences. *EMBO Journal* 3:2197-2205.
- 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.

- Holguín-Peña, R.J. Vázquez-Juárez, R., and Rivera-Bustamante, R.F. 2003. First report of a geminivirus associated with leaf curl in Baja California Peninsula tomato fields. *Plant Disease* 87(11):1397.
- Holguín-Peña, R.J., Vázquez Juárez, R., and Rivera-Bustamante, R.F. 2004a. *Pepper Golden mosaic virus* affecting tomatoes crops in the Baja California Peninsula, Mexico, *Plant Disease*. 88(2):221.
- Holguín-Peña, R.J. Vázquez-Juárez, R., Mejía Ruiz, C.H., Garzón-Tiznado, J.A., y Rivera-Bustamante, R.F. 2004b. Geminivirus en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Baja California Sur, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* (En prensa).
- Holguín-Peña, R.J., Vázquez Juárez, R., y Rivera-Bustamante, R.F. 2004c. Rango de Hospedantes, Incidencia y Filogenia del Pepper golden mosaic virus en Baja California Sur. *Revista Mexicana de Fitopatología* (En prensa).
- Hong, Y., Saunders, K., Hartley, M.R., and Stanley, J. 1996. Resistance to geminivirus infection by viurs-induced expression of dianthin in transgenic plants. *Virology* 220:119-127.
- Howarth, A.J., and Vandemark, G.J. 1989. Phylogeny of geminiviruses. *Journal of General Virology* 70: 2717-2727.
- Hull, R. 1989. The movement of viruses in plants. *Annual Reviews of Phytopathology* 27:213.
- Idris, A.M., Fletcher, D.C., and Brown, J.K. 1993. Identification and partial characterization of Sinaloa tomato leaf curl virus (STLCV), a new whitefly transmitted geminivirus affecting tomato and pepper from Sinaloa, Mexico. (Abstr.) *Phytopathology* 83:692.
- Idris, A.M., and Brown, J.K. 1998. Sinaloa tomato leaf curl geminivirus: biological and molecular evidence for a new Subgroup III virus. *Phytopathology* 88:648-657.
- Idris, A.M., Lee, S.H., and Brown, J.K. 1999. First report of Chino del tomate and Pepper huasteco geminiviruses in greenhouse-grown tomato in Sonora, Mexico. *Plant Disease* 83:1396.
- Ioannou, N., Kyriakou, A., Hadjinicolis, A. 1987. Host range and natural reservoirs of tomato yellow leaf curl virus. *Plant Pathology* 36:367.
- 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.

- Kasrawi, M.A. 1989. Inheritance of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in *Lycopersicon pinpinellifolium*. *Plant Disease* 73:435-437.
- Klassen, V.A., Boeshore, M., Koonin, E.V., Tian, T., and Falk, B.W. 1995. Genome structure and phylogenetic analysis of Lettuce infectious yellows virus, a whitefly-transmitted closterovirus. *Virology* 208:99-110.
- 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.
- 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.
- Lazarowitz, S.G. 1992. Geminiviruses: genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11(4):327-349.
- Lotrakul, P., Valverde, R.A., De La Torre, R., Sim, J., and Gómez, A. 2000. Occurrence of a strain of Texas pepper virus in tabasco and habanero pepper in Costa Rica. *Plant Disease* 84:168-172.
- Lucioli, A., Noris, E., Brunetti, A., Tavazza, R., Ruzza, V., Castillo, A.G., Bejarano, E.R., Accotto, G.P., and Tavazza, M. 2003. Tomato yellow leaf curl Sardinia virus Rep-derived resistance to homologous and heterologous geminiviruses occurs by different mechanisms and is overcome if virus-mediated transgene silencing is activated. *Journal of Virology* 77(12):6785-6798.
- Maddison, W.P., and Maddison, D.R. 1989. Interactive analysis of phylogeny and character evolution using the computer program McClade. *Folia Primatol. (Basel)* 53:190-202.
- Mansoor, S. Briddon, R.W., Zafar, Y., and Stanley, J. 2003. Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *Trends in Plant Sciences* 8:128-134.
- Markam, P.G., Bedford, S.L., and Pinner, M.S. 1994. The transmission of geminivirus by *Bemisia tabaci*. *Pesticide Science* 42:123-128.
- Martin, J.H. 1987. An identification guide to common whitefly pest species of the world (Homoptera-Aleyrodidae). *Tropical Pest Management* 33(4):298-322.
- Maxwell, D.P. 2001. Molecular characterization on tomato-infecting geminiviruses in Central America and an overview of the tomato crisis in the Dominican Republic. *Tomato Breeders* (www.oardc.ohio-state.edu/tomato/maxwell.pdf)

McGlashan, D., Polston, J.E, and Bois, D. 1994. Tomato yellow leaf curl geminivirus in Jamaica. *Plant Disease* 78:1219.

Mehta, P., Wyman, J.A., Nakhla, M.K. and Maxwell, D.P. 1994. Transmission of Tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci* (Homoptera, Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology* 87(5):1291-1297.

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.

Momol, T. 1999. Tomato yellow leaf curl virus on tomato in North Florida and South Georgia. University of Florida Pest Alert WWW site, 1999-04-03
<http://extlab1.entnem.ufl.edu/pestalert/tmm-0304.htm>

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.

Nagar, S., Pedersen, T.J., Carrick, K.M., Hanley-Bowdoin, L., and Robertson, D. 1995. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* 7:705–719.

Nakhla, M.K., Mazyad, H.M., Maxwell, D.P. 1993. Molecular characterization of four Tomato yellow leaf curl virus isolates from Egypt and development of diagnostic methods. *Phytopathology Mediterranean* 32:163-173.

Nakhla, M.K., Maxwell, M.D., Hidayat, S.H., Lange, D.R., Loniello, A.O., Rojas, M.R., Maxwell, D.P., Kitajima, E.W., Rojas, A., Anderson, P., and Gilbertson, R.L. 1994a. Two geminiviruses associated with tomatoes in Central America. (Abstr.). *Phytopathology* 84(10):1155.

Nakhla, M.K., Maxwell, D.P., Martínez, R.T., Carvalho, M.G., and Gilbertson, R.L. 1994b. Occurrence of the eastern Mediterranean strain of Tomato yellow leaf curl geminivirus in the Dominican Republic. (Abstr.). *Phytopathology* 84:1072..

Navas-Castillo, J., Díaz, J.A., Sánchez-Campos, S., and Moriones, E. 1998. Improvement of the print-capture polymerase chain reaction procedure for efficient amplification of DNA virus genomes from plants and insects. *Journal of Virological Methods* 75(2):195-198.

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.

Noueiry, A.O., Lucas, W.J., and Gilbertson, R.L. 1994. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* 76:925-932.

Orozco, B.M., and Hanley-Bowdoin, L. 1996. A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. *Journal of Virology* 70:140-158.

Orozco, B.M., Miller, A.B., Settlage, S.B., Hanley-Bowdoin, L. 1997. Functional domains of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry* 272:9840-9846.

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.

Page, R.D.M., and Holmes, E.C. 1998. *Molecular evolution: a phylogenetic approach*. Blackwell Science. Oxford, UK. 346p.

Palmer K.E., and Rybicki, E.P. 1998. The molecular biology of mastreviruses. *Advances in Virus Research* 50:183-234.

Palmer, K.E., Schnippenkoetter, H.W., and Rybicki, E.P. 1998. Geminivirus isolation and DNA extraction. *In: Plant Virology Protocols*. G. Foster and S. Taylor (eds.). Humana Press, Totowa, New Jersey. Vol. 81, 567 p.

Paplomatas, E.J., Parel, V.P., Hou, Y.M., Noueiry, A.O., and Gilbertson, R.L. 1994. Molecular characterization of a new-transmissible bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. *Phytopathology* 84:1215-1224.

Pascal, E., Goodlove, P.E., Wu, L.C., and Lazarowitz, S.G. 1993. Transgenic tobacco plants expressing the geminivirus BL1 protein exhibit symptoms of viral disease. *The Plant Cell* 5:795-807.

Pascal, E., Sanderfoot, A.A., Ward, B.M., Medville, R., Turgeon, R., and Lazarowitz, S.G. 1994. The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. *The Plant Cell* 6:995-1006.

Perring, T.M., Cooper, A., and Kazmer, D.J. 1992. Identification of the poinsettia strain of *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidea) on broccoli by electrophoresis. *Journal of Economic Entomology* 85:1278-1284.

Perring, T.M., Cooper, A.D., Rodríguez, R.J., Farrar, C.A., and Bellows, T.S. 1993. Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science* 259:74-77.

Polston, J.E., Dodds, J.A., and Perring, T.M. 1989. Nucleic acid probes for detection and strain discrimination of cucurbit geminiviruses. *Phytopathology* 79:1123-1127.

- Polston, J.E., Bois, D., Serra, C.A., and Concepción, S. 1994. First report of a Tomato yellow leaf curl-like geminivirus in the western hemisphere. *Plant Disease* 78(8): 831.
- Polston, J.E., Chellemi, D.O., Schuster, D.J., McGovern, R.J., and Stanley, P.A. 1996. Spatial and temporal dynamics of Tomato mottle virus and *Bemisia tabaci* (Genn.) in Florida tomato fields. *Plant Disease* 80:1022-1028.
- Polston, J.E., and Anderson, P.K. 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease* 81(12):1358-1369.
- Polston, J.E., McGovern, R.J. and Brown, L.G. 1999. Introduction of Tomato yellow leaf curl virus in Florida and implications for the spread of this and other geminiviruses of tomato. *Plant Disease* 83(11):984-988.
- Pringle, C.R. 1999. Virus taxonomy. *Archives of Virology* 144:2065-2070.
- Ramírez, P., and Maxwell, D. 1995. Geminivirus transmitidos por moscas blancas. *Manejo Integrado de Plagas, Costa Rica* 36:22-27.
- Ramos, P.L., Guerra, O., Pera, R., Oramas, P., Guevara-González, R., and Rivera-Bustamante, R.F. 1997. Taino tomato mottle virus, a new bipartite geminivirus from Cuba. *Plant Disease* 81:1095.
- Rivera-Bustamante, R.F. y Silva-Rosales, L. 1997. Virus de plantas: ¿terribles patógenos o interesantes modelos de estudio? *Avance y Perspectiva*. Hemeroteca Virtual ANUIES. [http://www.hemerodigital.unam.mx/ANUIES.Asociación Nacional de Universidades e Instituciones de Educación Superior](http://www.hemerodigital.unam.mx/ANUIES.Asociación_Nacional_de_Universidades_e_Instituciones_de_Educación_Superior) <http://www.anui.es.mx>.
- 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.
- Rochester, D.E., Kositratana, W., and Beachy, R.N. 1990 Systemic movement and symptom production following agroinoculation with a single DNA of Tomato yellow leaf curl geminivirus (Thailand). *Virology* 178, 520-526.
- 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., and Maxwell, D.P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77:340-347.

- Rosell, R.C., Bedford, I.D., Frohlich, D.R., Gill, R.J., Markham, P.G., and Brown, J.K. 1997. Analysis of morphological variation in distinct populations of *Bemisia tabaci*. *Annals of the Entomological Society of America* 90:575-589.
- Rosell, R.C., Torres-Jerez, I., and Brown, J.K. 1999. Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph, and honeydew. *Phytopathology* 89:239-246. 1999.
- 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.
- Rubio, L., Soong, J., Kao, J., and Falk, B.W. 1999. Geographic distribution and molecular variation of isolates of three whitefly-borne closteroviruses of cucurbits: Lettuce infectious yellows virus (LIYV), Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) and Beet pseudo-yellows virus (BPYV). *Phytopathology* 89:707-711.
- Rybicki, E.P. 1991. The use of serological differentiation indices for the phylogenetic analysis of plant virus relationships. *Archives of Virology* 119:83-94.
- Rybicki, E.P., 1994. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. *Archives of Virology* 139:49-78.
- Rybicki, E.P., Briddon, R.W., Brown, J.K., Fauquet, C.M., Maxwell, D.P., Harrison, B.D., Markham, P.G., Bisaro, D.M., Robinson, D., and Stanley, J. 2000. Family *Geminiviridae*. In: *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 285–297. M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner (eds.). San Diego: Academic Press. 469 p.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Ehrlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839):487-91.
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution* 4:406-425.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, Vol. 1, 999p. Chapter 6 (6.33-6.64).
- Sanger, F., Nicklenis, S., and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:5463-5467.

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.

Schuster, D.J., Mueller, T.F., Kring, J.B., and Price, J.F. 1990. Relationship of the sweetpotato whitefly to a new tomato fruit disorder in Florida: *HortScience* 25:1618–1620.

Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 1986. Guía para Asistencia Técnica Agrícola. Área de Influencia del Campo Agrícola Experimental Valle de Santo Domingo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Centro de Investigaciones Agrícolas del Pacífico Norte. Campo Agrícola Experimental Valle de Santo Domingo. Cd. Constitución, Baja California Sur, México 56p.

Secretaria de Fomento Agropecuario. www.sfa.gov.mx/bcs/estadistica/agricola. (31 de junio 2004)

Simone, G.W., Brown, J.K., Hiebert, E., and Cullen, R.E. 1990. New geminivirus epidemic in Florida tomatoes and peppers. (Abstr.) *Phytopathology* 80:1063.

Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98:503-517.

Stanley J., and Gay M.R. 1983. Nucleotide sequence of Cassava latent virus DNA. *Nature* 301:260-262.

Stanley, J. 1985. The molecular biology of geminiviruses. *Advances in Virus Research* 30:139-177.

Stanley, J. 1995. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology* 206:707-712.

Stansly, P.A., Schuster, D.J., and Leibe, G.I. 1991. Management strategies for the sweet potato whitefly. Proceedings, Florida Tomato Institute. C.S. Vavrina (ed.). *Vegetal Crops Special Series*. University of Florida, Gainesville pp. 20-42.

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

Stenger, D.C., Revington, G.N., Stevenson, M.C., and Bisaro, D.M. 1991. Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 8029 - 8033.

Stenger D.C., Stevenson MC, Hormuzdi S.G., Bisaro D.M., 1992. A number of subgenomic DNAs are produced following agroinoculation of plants with Beet curly top virus. *Journal of General Virology* 73:237-242.

Sunter, G., and Bisaro, D.M. 1991. Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. *Virology* 180: 416 - 419.

Swofford, D.L. 1993. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Illinois Natural History Survey, University of Illinois, Champaign. 302 p.

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., and Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17:1105-1109.

The Tomato Magazine. 1997. State of the art tomato production in Baja California. Columbia Publishing and Design. Yakima, Washington, USA. pp.4-9.

Thomas, J.E., Massalski, P.R., and Harrison, B.D. 1986. Production of monoclonal antibodies to African cassava mosaic virus and differences in their reactivities with other whitefly-transmitted geminiviruses. *Journal of General Virology* 67:2739:2748.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. 1994. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* 22:4673-4680.

Timmermans, M.C.P., Das, O.P., and Messing, J. 1994. Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45:79-112.

Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J.A., Herrera-Estrella, L., and Rivera-Bustamante, R.F. 1993. Complete nucleotide sequence of Pepper huasteco virus: analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *Journal of General Virology* 74:2225-2231.

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-Robledo, C., Martínez-Carrillo, J.L., y Ramírez-Sagahon, J.C. 2000. Informe de México p. 2-5. *In: Informes nacionales sobre moscas blancas y geminivirus*. L. Hilje (ed). Panamá. 74 p.

Valadéz, L. A. 1996. Producción de hortalizas. LIMUSA. México, pp. 197-211.

Vega-Arreguin, J.C., y Rivera-Bustamante, R.F. 2001. Los virus: complicados para desifrar procesos moleculares en las plantas. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV). Irapuato, Gto. Avance y Perspectiva 20:349-355

Vidavsky, F., and Czosnek, H. 1998. Tomato breeding lines resistant and tolerant to Tomato yellow leaf curl virus issued from *Lycopersicon hirsutum*. Phytopathology 88:910-914.

Wool, D., Gerling, D., and Bellotti, A.C. 1993. Esterase electrophoretic variation in *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hom., Alyrodidae) among host plants and localities in Israel. Journal of Applied Entomology 115:185-196.

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

Xie, Q., Suárez-López, P., and Gutiérrez, C. 1995. Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication. EMBO Journal 14:4073-4082.

Yáñez, M.M.J. y Delgado, S.F. 1991. Virus transmitidos por mosquita blanca al chile serrano (*Capsicum annuum* L.) en el sur de Tamaulipas, Memorias del XVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Puebla, Puebla, México, p. 2.

Zaher, N.A.M. 1986. Response of Tomato yellow leaf curl virus diseased plants to spraying with some microelements. Egyptian Journal of Phytopathology 17(1):73-82.

Zamir, D., Ekstein-Michelson, I., Zakay, Y., Navot, N., Zeidan, M., Sarfatti, M., Eshed, Y., Harel, E., Plebam, T., van-Oss, H., Kedar, N., Rabinowitch, H. D., and Czosnek, H. 1994. Mapping and introgression of a Tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, TY-1. Theoretical and applied genetics 88:141-146.

Zeidan, M., and Czosnek, H. 1991. Acquisition of Tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci*. Journal of General Virology 72(11):2607-2614.