

# Identificación de un nuevo begomovirus en melón (*Cucumis melo* L.) en Lara, Venezuela

Pilar Ramírez<sup>1</sup>  
Mauricio Chicas<sup>1</sup>  
Jorge Salas<sup>2</sup>  
Douglas Maxwell<sup>3</sup>  
James Karkashian<sup>1</sup>

**RESUMEN.** Se recolectaron muestras de ápices foliares de plantas de melón (*Cucumis melo* L.) que mostraban síntomas de mosaico clorótico en campos cultivados del Estado Lara, Venezuela. Con el objetivo de identificar geminivirus, se utilizaron iniciadores generales y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la parte superior del componente A y la región hipervariable del componente B del genoma viral. En cuatro muestras representativas, se obtuvieron fragmentos de 1400 y 400 pares de bases, respectivamente. Dichos fragmentos fueron clonados y secuenciados. Las secuencias obtenidas se compararon con otras secuencias de geminivirus en la base de datos GenBank, determinándose una similitud máxima (82%) con el virus del enrollamiento de la hoja del ayote (*squash leaf curl virus*, SLCV). Estos análisis de secuencia indican que se identificó un nuevo geminivirus en melón en el estado Lara, Venezuela, para el cual se propuso el nombre de *melon chlorotic mosaic virus* (MCMV). Se reportó la secuencia obtenida al GenBank (número de acceso AF453447, 11 de diciembre del 2001). Además, se generó una sonda molecular específica para el MCMV, que se utilizará para estudios epidemiológicos futuros.

**Palabras clave:** *Bemisia tabaci*, geminivirus, melón, *melon chlorotic mosaic virus* (MCMV), *squash leaf curl virus* (SCLV), Venezuela.

**ABSTRACT. Identification of a new begomovirus in melon (*Cucumis melo* L.) in Lara, Venezuela.** Foliar apex samples were collected from melon (*Cucumis melo* L.) plants that showed chlorotic mosaic symptoms in cultivated fields of Lara, Venezuela. In order to identify geminivirus, universal primers and the polymerase chain reaction (PCR) technology were used for amplifying the top part of the A component and the hypervariable region of the B component of the viral genome. Fragments of 1400 and 400 base pairs in four representative samples were obtained. The abovementioned fragments were cloned and sequenced. The sequences obtained were compared with other geminivirus sequences from the GenBank database. A maximum similarity (82%) with the squash leaf curl virus (SLCV) was observed. These sequence analyses indicate that a new geminivirus was identified in melon cultivars from Lara, Venezuela. We propose the name of *melon chlorotic mosaic virus* (MCMV) for the new geminivirus and the obtained sequence was submitted to the GenBank database (accession number AF453447, December 11, 2001). A molecular specific probe was generated to detect MCMV and it will be useful for future epidemiological studies.

**Key words:** *Bemisia tabaci*, geminivirus, melon, *melon chlorotic mosaic virus* (MCMV), *squash leaf curl virus* (SCLV), Venezuela.

## Introducción

Desde 1986, varios cultivos en Centroamérica y el Caribe se han visto afectados por geminivirus transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae). En el presente, millones

de kilómetros cuadrados de tierras aptas para la agricultura sufren el ataque de más de treinta geminivirus en 20 países diferentes (Morales y Anderson 2001).

<sup>1</sup> Escuela de Biología y PROGEMINI, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica, **Costa Rica.** pramirez@biologia.ucr.ac.cr

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones Agrícolas del Estado Lara, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), **Venezuela.** cialara@cantv.net

<sup>3</sup> Department of Plant Pathology, University of Wisconsin-Madison, **EUA.** dpmax@plantpath.wisc.edu

Las infecciones por geminivirus dentro de los agroecosistemas son dinámicas y de interacciones complejas, pues involucran diversos factores cambiantes, como el tipo de geminivirus, el ambiente y el biotipo del vector (Zúñiga y Ramírez 2002). Los geminivirus se caracterizan por presentar una enorme diversidad (Padidam *et al.* 1995), y su rápida proliferación y diseminación en América Latina pueden ser consecuencia de los cambios drásticos en los sistemas de cultivo (Morales y Anderson 2001), así como de su capacidad de recombinación (Gilbertson *et al.* 1993). La presencia de una población diversa de geminivirus en una región incrementa la probabilidad de epidemias en otros cultivos. Este problema tiene como componentes el uso de cultivares élite, el movimiento de material infectado y la introducción de los insectos vectores (Mansoor *et al.* 2003).

Los begomovirus son virus bipartitos con genomas de ADN de una sola cadena. Este genoma está constituido por dos moléculas circulares, llamadas “ADN A” y “ADN B”, que poseen un tamaño de 2,5 a 3 Kb. En ambas moléculas, los genes están separados por una región intergénica, que contiene una secuencia de 200 nucleótidos, conservada entre los dos componentes virales, llamada “región común” (CR). Esta región contiene los elementos modulares del origen de replicación (*ori*) (Lazarowitz *et al.* 1992, Fontes *et al.* 1994a, 1994b, Orozco *et al.* 1997). La secuencia de *ori* consiste de una estructura conservada en forma de horquilla y un sitio de unión para la proteína Rep localizado corriente arriba de la horquilla (Fontes *et al.* 1994a, 1994b, Argüello-Astorga *et al.* 1994). Además, en la región intergénica se encuentran los motivos de unión de la proteína asociada a la replicación en geminivirus, los cuales constan de secuencias cortas y reiterativas, denominadas “iterones” (Mansoor *et al.* 2003).

El ADN A codifica para la proteína de la cápside y las proteínas necesarias para la multiplicación y regulación genética (Sunter *et al.* 1987, Elmer *et al.* 1988, Hanley-Bowdoin *et al.* 1990). La proteína Rep de 41 kD es la única proteína esencial y conservada. (Fontes *et al.* 1992, Lazarowitz 1992). La proteína TrAP de 15-20 kD es necesaria para la expresión de los genes *av1* y *bv1* (Sunter *et al.* 1990, Lazarowitz 1992, Sunter y Bisaro 1992). La proteína REn de 14-16 kD incrementa la eficiencia de la replicación y actúa como un factor accesorio que promueve la acumulación del ADN viral (Orozco *et al.* 1997). La proteína de cubierta (CP) de 27-30 kD está relacionada con la especificidad del

insecto vector. La proteína Rep ha sido muy estudiada recientemente, pues interactúa con la proteína retinoblastoma (Rb); además, el dominio de interacción con Rb muestra tener influencia sobre la determinación de síntomas y especificidad de la infección viral (Kong *et al.* 2000, Argüello-Astorga *et al.* 2004). Asimismo, la secuencia nucleotídica que codifica para el extremo aminoterminal de Rep ha sido utilizada con éxito en la obtención de plantas transgénicas resistentes a geminivirus (Chatterji *et al.* 2001, Lucioli *et al.* 2003). Esto puede estar relacionado con el hecho de que los elementos claves para la especificidad de la proteína se encuentran en los primeros 10 aminoácidos de la región aminoterminal (Ramos *et al.* 2003). Resultados similares se han observado cuando se utiliza parte de la secuencia nucleotídica de la región intergénica (Yang *et al.* 2004).

El ADN B codifica para las funciones asociadas con el movimiento viral (Revington *et al.* 1989, Noueirry *et al.* 1994, Frischmuth *et al.* 1997). El gen *mp* codifica para una proteína de 34 kD, relacionada con el movimiento del virus de célula a célula a través de plasmodesmos, el transporte intercelular selectivo de ADN doble banda, el rango de hospedantes y el desarrollo de síntomas. La proteína Mp se localiza en la pared celular y en la membrana plasmática. El gen *nsp* codifica una proteína de 30 kD, que se relaciona con el tipo de hospedantes y con el movimiento hacia afuera del núcleo, pues potencia la salida de ADN doble banda y ADN simple banda a través de la membrana nuclear hacia el citoplasma y hacia las células adyacentes del floema (Noueirry *et al.* 1994, Frischmuth *et al.* 1997).

Las enfermedades inducidas por geminivirus en cucurbitáceas son un problema fitosanitario importante en el sur de Estados Unidos, México, Guatemala, Honduras (Brown *et al.* 2002) y Costa Rica (Karkashian *et al.* 2001).

En el presente trabajo se describe la identificación de un nuevo geminivirus en melón en Venezuela. A través de análisis filogenéticos y comparación de secuencias se define la relación del *melon chlorotic mosaic virus* (MCMV) con otros geminivirus.

## Materiales y métodos

### Recolección de muestras

La recolección de muestras foliares se realizó en campos de melón ubicados en San José de los Ranchos, Parroquia Espinoza de los Monteros, Municipio To-

res del Estado Lara, Venezuela, ubicado a 10°15'N y 69°45'O, y a 525 msnm. La zona pertenece a la clasificación de Monte Espinoso Tropical (Holdridge 1967); presenta condiciones climáticas promedio de 250 a 500 mm de precipitación, 24 °C y humedad relativa de entre 40% y 60%, dependiendo de la época del año. Se observaron moscas blancas en la región, lo cual sugirió probables infecciones con geminivirus.

Con un sacabocados limpio, se recolectaron muestras de hojas jóvenes de melón que presentaban un mosaico clorótico y se transfirieron a tubos Falcon de 50 mL (Falcon® Becton Dickinson, NJ, EUA), los cuales contenían sílica gel en forma de perlas (Merck, cat. 7735). Las muestras se almacenaron hasta sus análisis moleculares.

### Extracción de ácidos nucleicos

Los análisis moleculares fueron realizados en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas y Virus, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica. Los ácidos nucleicos totales fueron extraídos de las hojas de melón según una versión modificada del método de Dellaporta *et al.* (1983). Se maceraron dos discos de tejido vegetal seco en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, con micro-pistilos Kontes™ estériles (Kontes Glass, Vineland, NJ, EUA) a temperatura ambiente y en presencia de 500 µL de buffer de extracción Dellaporta. A este homogenizado se le agregaron 33 µL de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 20%. Después de incubar por 10 minutos a 65 °C, se agregaron 160 µL de acetato de potasio 5M, se agitó vigorosamente y se centrifugó por 5 minutos a 10000 rpm. Al sobrenadante, previamente transferido a un tubo limpio, se agregaron 500 µL de fenol-cloroformo-isoamilo (25:24:1) y se centrifugó por 5 minutos a 10000 rpm. A 500 µL del sobrenadante, transferido a otro tubo limpio, se agregaron 225 µL de isopropanol para promover la precipitación del ADN. Después de incubar 5 minutos y centrifugar 5 minutos a 10000 rpm, el precipitado obtenido se lavó con etanol al 70%. Luego de secar el precipitado, se resuspendió en 50 µL de TE (10mM Tris-HCL, pH 7,5; 1mM EDTA, pH 8,0).

### Reacciones de PCR

Cada reacción de PCR de 25 µL contenía 0,25 mM deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 1X buffer para Taq polimerasa (Promega, Madison, WI, EUA), 0,25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega Madison, WI, EUA), 0,5 unida-

des de Taq polimerasa, 0,2 µM del iniciador viral, 2,50 µM del iniciador complementario y 0,2 µL de ADN. Las reacciones de PCR se efectuaron en un termociclador Perkin-Elmer™ (Perkin-Elmer Inc., Shelton, CT, EUA).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 95 °C por 1 minuto; 30 ciclos de 94 °C por un minuto; 55 °C por dos minutos y 72 °C por tres minutos. Estos ciclos fueron seguidos por una fase de extensión final, a 72 °C por siete minutos. Las muestras se mantuvieron a 18 °C hasta su análisis. Se utilizaron iniciadores generales para geminivirus, los cuales corresponden a regiones conservadas en el genoma de este grupo de virus. El par de iniciadores PAL1v1978 y PAR1c715 amplifica la región superior del componente A, y el par PCRc2 y PBL1v2039 amplifica la región hipervariable del componente B (Rojas *et al.* 1993). Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% (SIGMA, cat. A9539). Los productos de PCR que mostraron las bandas esperadas se limpiaron con el kit QIAquick® (QIAGEN, cat. 28106), según las especificaciones de la casa comercial.

### Clonaje

El clonaje de los productos de PCR limpios se realizó mediante el kit pGEM®-T Easy (Promega, cat. A1380). Se utilizaron 25 ng del fragmento de la región superior del componente A y 5 ng del fragmento de la región hipervariable. Se transformaron por choque térmico 100 µL de células competentes XL-1 Blue, preparadas según el método de cloruro de calcio (Sambrook *et al.* 1989). Cada producto de ligación mezclado con células competentes se incubó sobre hielo durante 30 minutos, a 42 °C por 1,5 minutos, y en hielo por 10 minutos. Luego se añadió 1 mL de medio de cultivo 2xYT y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Se cultivaron 200 µL de la suspensión celular transformada en placas de Petri, que contenían 50 µg/mL de ampicilina, 10 µg/mL de tetraciclina, 10 µL de isopropil-b-D-tiogalactósido 0,1 M (Fisher Biotech, cat. BP1755-1) y 40 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosido al 20% (Eppendorf, cat. A-02E01). Las colonias blancas obtenidas en las cajas de Petri se cultivaron a su vez en 3 mL de medio de cultivo 2xYT, a 37 °C y 250 rpm (Orbital Shaker H 2410; Hotech Instrument Corp.) durante 20 horas (Sambrook *et al.* 1989). A partir de estas suspensiones celulares se extrajeron los plásmidos con el kit QIAprep® Miniprep

(QIAGEN, cat. 28106). La presencia de insertos dentro de los plásmidos recombinantes se evaluó por electroforesis en gel de azarosa, después de digerir con la enzima de restricción *EcoRI* (Promega, cat. R6911).

### Secuenciación y análisis de las secuencias

Los insertos obtenidos se secuenciaron usando el kit Big Dye Sequencing™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), en un secuenciador automático ABI PRISM 377 (Perkin-Elmer). La comparación de las secuencias fue realizada por medio del programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Se obtuvieron los índices de identidad nucleotídica al comparar los genes *cp* y *rep* del virus encontrado y algunos representantes de los geminivirus.

Se utilizó parte de la secuencia del *cp* obtenido para comparar filogenéticamente el virus encontrado con otros geminivirus. El alineamiento de las secuencias fue realizado con el algoritmo Clustal del programa BioEdit (Hall 1999), y el análisis filogenético se hizo con el programa MEGA 3 (Kumar *et al.* 2004).

La región hipervariable muestra tanta diversidad entre los diferentes geminivirus que puede ser utilizada como sonda específica con la técnica de hibridación molecular. Por tal motivo, el clon de la región hipervariable del MCMV será utilizado como sonda específica en estudios epidemiológicos futuros.

### Resultados y discusión

En el Estado Lara, Venezuela, se observaron plantas de melón con síntomas de mosaico clorótico en las hojas, así como la presencia de moscas blancas; por ello, se sospechó que podría existir infección por geminivirus en dichas plantas.

Se logró amplificar ADN viral con los iniciadores descritos, y las tallas de los fragmentos amplificados fueron las esperadas para geminivirus bipartitas (1400 pb y 400 pb para el ADN A y el ADN B, respectivamente). Por lo tanto, se comprueba que las plantas de melón observadas estaban infectadas con geminivirus.

Se obtuvieron dos clones de la parte superior del componente A para dos muestras diferentes y tres clones de la región hipervariable para una de las muestras.

**Cuadro 1.** Geminivirus utilizados en los análisis de comparación de secuencias con los respectivos números de acceso del GenBank.

Nombre del virus	ADN A	ADN B	Abreviatura
African cassava mosaic virus	NC001467	NC001468	ACMV
Bean calico mosaic virus	AF110189	AF110190	BCaMV
Bean dwarf mosaic virus	M88179	M88180	BDMV
Bean golden mosaic virus – [Brazil]	M88686	M88687	BGMV-[BZ]
Bean golden yellow mosaic virus	NC001439	NC001438	BGYMV
Chino del tomate virus	U57458	AF007823	ToLCrV
Chayote yellow mosaic virus	AJ223191		ChaYMV
Cucurbit leaf curl virus	AF224760	AF224761	CuLCuV
Dicliptera yellow mottle virus	AF170101	AF139168	DiYMoV
Macroptilium yellow mosaic Florida virus	AY044135	AY044136	MaYMFV
Okra yellow vein mosaic virus – [201]	AJ002451		OYVMV-[201]
Pepper golden mosaic virus	U57457	AF499442	PepGMV
Potato yellow mosaic virus – Venezuela	D00940	D00941	PYMV-VE
Rhynchosia golden mosaic virus	AF239671		RhGMV
Sida golden mosaic virus	AF049336	AF039841	SiGMV
Sida mottle virus – [Brazil]	AY090555		SiMoV-[BZ]
Sida yellow mosaic virus – [Brazil]	AY090558		SiYMV-[BZ]
Sida yellow vein virus	Y11099	Y11100	SiYVV
Squash leaf curl virus	M38182	M38183	SLCV
Squash mild leaf curl virus – [Imperial Valley]	AF421552	AF421553	SMLCV-[IV]
Squash yellow mild mottle virus – [CR]	AY064391	AF440790	SYMMoV-[CR]
Tomato golden mosaic virus –Yellow vein	K02029	K02030	TGMV-YV
Tomato mottle virus – [Florida]	L14460	L14461	ToMoV-[FL]
Tomato rugose mosaic virus	NC002555	NC002556	ToRMV
Tomato yellow leaf curl virus	X15656		TYLCV
Watermelon chlorotic stunt virus	AJ012081	AJ012082	WmCSV

**Cuadro 2.** Comparación de secuencias nucleotídicas del genoma de MCMV con otros geminivirus de los principales grupos filogenéticos. Los números indican el porcentaje de identidad en la secuencia nucleotídica del gen de la proteína asociada a la replicación (*rep*) y el gen de la proteína de cubierta (*cp*).

REP		CP	
Geminivirus	Identidad	Geminivirus	Identidad
MCMV	1,000	MCMV	1,000
SMLCV-IV	0,791	BCaMV	0,821
CuLCuV	0,766	SLCV	0,818
SLCV	0,742	CuLCuV	0,810
BCaMV	0,736	SMLCV-IV	0,810
SYMMoV-CR	0,722	SYMMoV-CR	0,808
PepGMV	0,697	PepGMV	0,781
OYVMV-201	0,567	SiMoV-BZ	0,778
ToLCrV	0,562	SiGMV	0,776
DiYMoV	0,555	SiYMV-BZ	0,774
TGMV-YV	0,555	BGMV-BZ	0,773
BDMV	0,551	RhGMV	0,773
SiGMV	0,551	TGMV-YV	0,770
ToMoV-FL	0,547	MaYMFV	0,770
BGYMV	0,540	BDMV	0,766
BGMV-BZ	0,539	ToLCrV	0,760
SiYV	0,539	PYMV-VE	0,757
PYMV-VE	0,535	BGYMV	0,748
TYLCV	0,532	ToMoV-FL	0,746
MaYMFV	0,530	SiYV	0,743
RhGMV	0,529	ToRMV	0,735
SiYMV-BZ	0,526	DiYMoV	0,730
SiMoV-BZ	0,522	OYVMV-201	0,639
ChaYMV	0,520	TYLCV	0,591
ToRMV	0,520	WmCSV	0,586
WmCSV	0,505	ACMV	0,574
ACMV	0,500	ChaYMV	0,568

De acuerdo con los índices de identidad obtenidos al comparar las secuencias con las de otros geminivirus (Cuadro 1), el virus encontrado comparte menos de un 82% de identidad (Cuadro 2), lo cual está por debajo del límite establecido por el Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas en inglés) para especies de geminivirus diferentes

(Mayo y Pringle 1998). Por tal motivo, se nombró este nuevo virus como “virus del mosaico clorótico del melón” (*melon chlorotic mosaic virus*, MCMV) y se introdujo la secuencia de la parte superior del componente A del genoma viral en la base de datos GenBank (*National Center of Biotechnology Information*, NCBI) bajo el número de acceso AF 453447 (11 de diciembre del 2001).

Al alinear la secuencia de la proteína Rep del nuevo virus con secuencias homólogas en otros geminivirus, se observa una inserción de cinco aminoácidos cerca del extremo aminoterminal, lo cual no se observa en otras proteínas Rep, salvo en el caso del SYMMoV, que posee una inserción de 10 aminoácidos en la misma posición que el MCMV (Fig. 1). No se conoce la función que pueda tener esta inserción, aunque otros geminivirus poseen pequeñas inserciones en otros sitios de la proteína Rep (tal como el CuLCuV). Esto podría indicar que la estructura de la proteína Rep soporta un cierto grado de variación en la secuencia de aminoácidos.

Según los análisis filogenéticos, el MCMV se encuentra en el mismo grupo que los geminivirus SYMMoV y SLCV, los cuales infectan cucurbitáceas. No obstante, muestra cierta homología con el virus BCaMV (Fig. 2), que infecta frijol, pero Brown *et al.* (1999) mencionan que pertenece al mismo subgrupo de los geminivirus que infectan cucurbitáceas.

La proteína Rep del MCMV presentó poca similitud con respecto a otras proteínas Rep, considerando que, generalmente, se trata de una proteína muy conservada entre los diferentes geminivirus (Cuadro 2).

Al comparar la región intergénica del MCMV con la región intergénica de los geminivirus que se encuentran en el grupo del SLCV, se observan los mismos motivos de unión a Rep, iniciación de replicación e iterones. No obstante, se destaca la ausencia de 11 nucleótidos corrientes abajo del promotor del gen *rep*, que solo es compartida por el SMLCV-IV (Fig. 3).

El MCMV comparte particularidades con varios virus del grupo del SLCV, por lo que es posible que se hayan llevado a cabo varios eventos de recombinación en el origen de este virus.



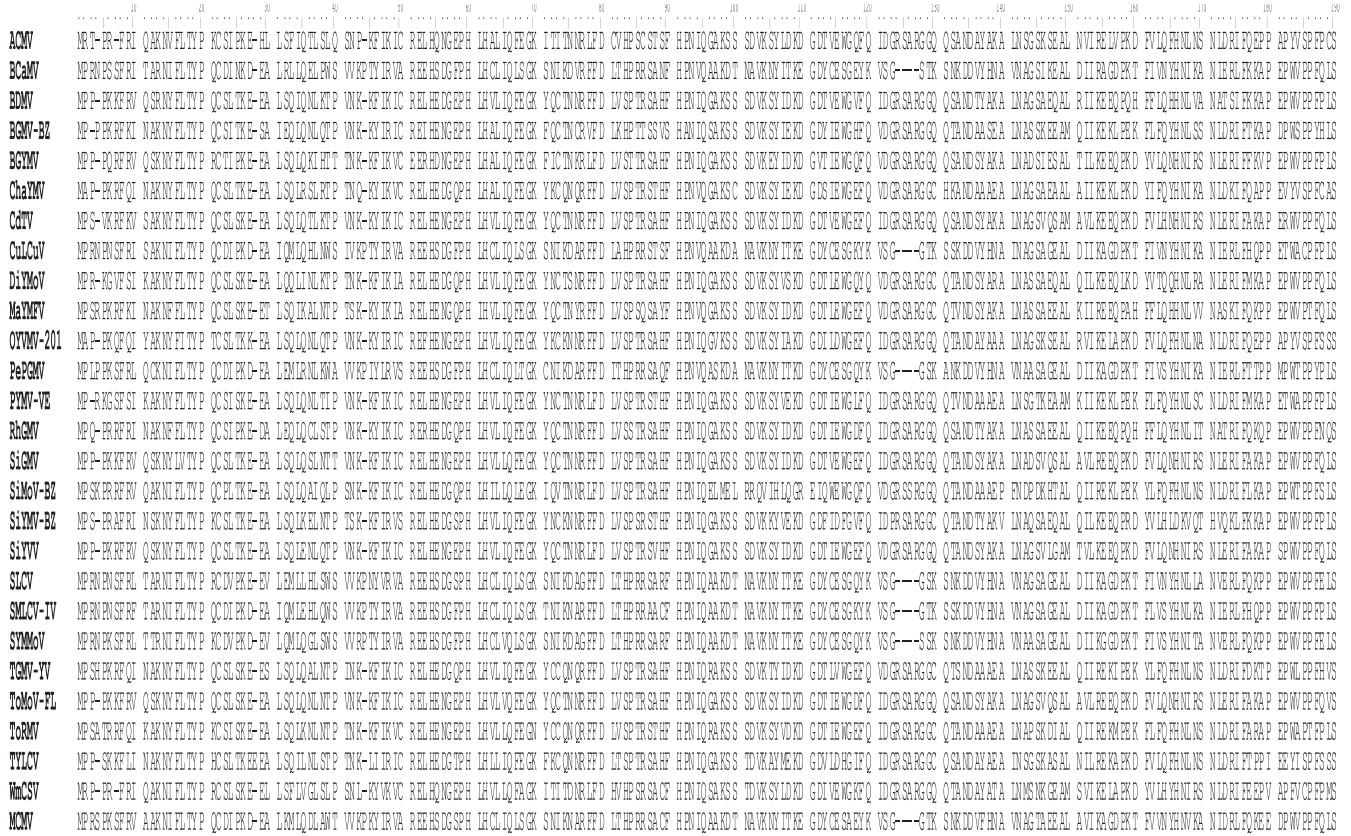
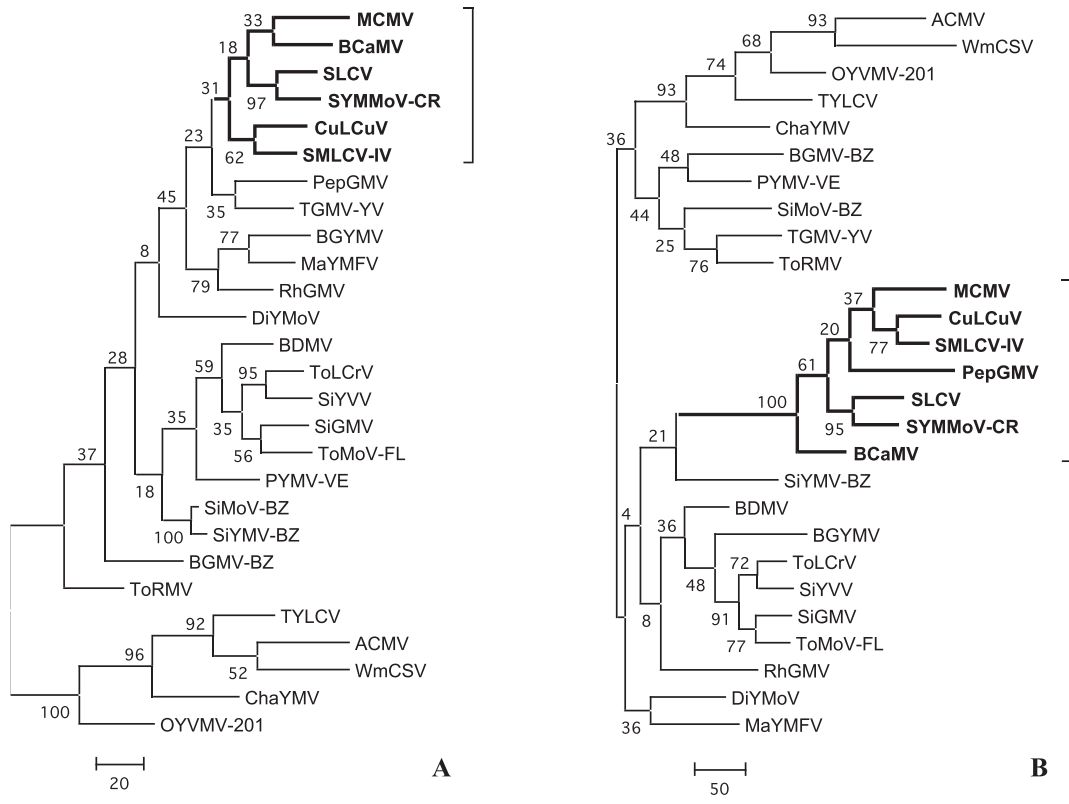
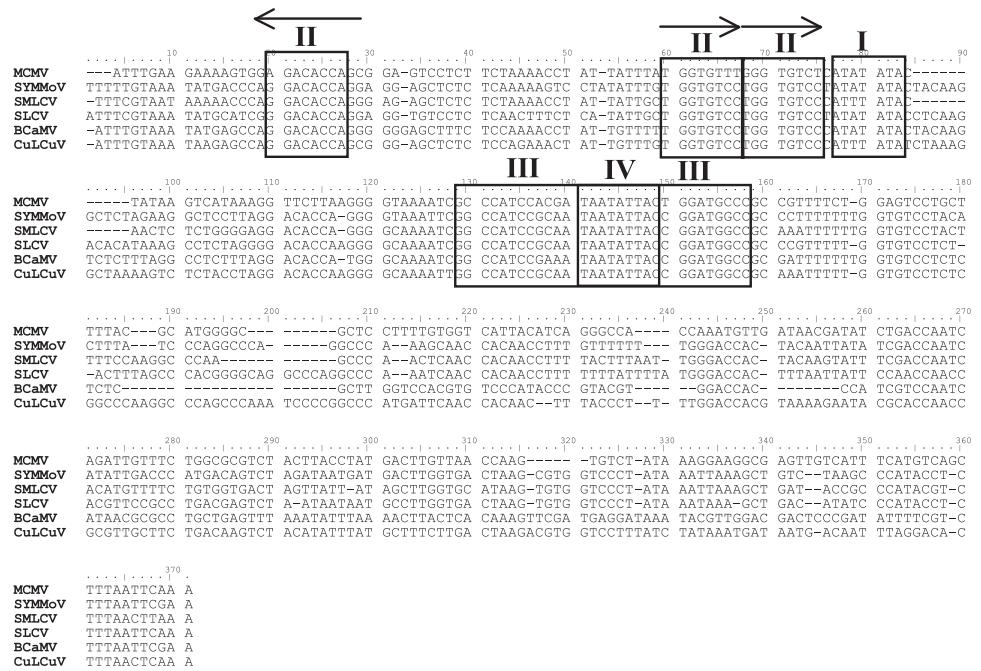


Figura 1. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región aminoterminal de la proteína Rep para diferentes geminiviruses.



**Figura 2.** Árboles filogenéticos obtenidos a partir de las secuencias nucleotídicas parciales de los genes *cp* (A) y *rep* (B) para 27 geminivirus. Los árboles filogenéticos fueron obtenidos por el método de máxima parsimonia del programa MEGA 3 (Kumar *et al.* 2004). Los parámetros utilizados fueron los predeterminados, con la excepción de una prueba con 500 bootstrap con un valor aleatorio inicial de 64348. La escala bajo el árbol es una medida de la distancia relativa entre las secuencias y los números entre las ramas corresponden a los bootstraps.



**Figura 3.** Secuencias de las regiones intergénicas de los begomovirus que pertenecen al grupo del SCLV. Se destacaron la caja TATA del promotor para el gen *rep* (I), los iterones o sitios de unión de la proteína Rep (II) y la estructura conservada de tallo (III) y asa (IV).

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por el *International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Collaborative Research Programme* 2002. Los autores agradecen la colaboración de Rafael Rivera-Bustamante (CINVESTAV, Irapuato, México) por sus sugerencias.

## Literatura citada

- Arguello-Astorga, GR; Guevara-Gonzalez, RG; Herrera-Estrella, LR; Rivera-Bustamante, RF. 1994. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: A model for replication. *Virology* 203:90-100.
- \_\_\_\_\_; Lopez-Ochoa, L; Kong, LJ; Orozco, BM; Settlege, SB; Hanley-Bowdoin, L. 2004. A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. *Journal of Virology* 78(9):4817-4826.
- Brown, JK; Ostrow, KM; Idris, AM; Stenger, DC. 1999. Biotic, molecular, and phylogenetic characterization of *bean calico mosaic virus*, a distinct begomovirus species with affiliation in the squash leaf curl virus cluster. *Phytopathology* 89:273-280.
- \_\_\_\_\_; Idris, AM; Alteri, C; Stenger, D. 2002. Emergence of a New Cucurbit-Infesting Geminivirus Species Capable of Forming Viable Reassortants with Related Viruses in the *Squash leaf curl virus* Cluster. *Phytopathology* vol 92:7:734-742.
- Chatterji, A; Beachy, R; Fauquet, CM. 2001. Expression of the oligomerization domain of the replication-associated protein (rep) of tomato leaf curl New Delhi virus interferes with DNA accumulation of heterologous geminiviruses. *The Journal of Biological Chemistry* 276(27):25631-25638.
- Dellaporta, SL; Wood, J; Hicks, JB. 1983. A Plant DNA Miniprep. *Plant Molecular Biology Reporter* 4:19-21.
- Elmer, JS; Brand, L; Sunter, GE; Gardiner, E; Bisaro, DM; Rogers, SG. 1988. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus II. The product of the AL1 coding region is required for replication. *Nucleic Acids Research* 16:7043-7060.
- Fontes, EPB; Luckow, VA; Hanley-Bowdoin, L. 1992. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell* 4:597-608.
- \_\_\_\_\_; GladFelter, HJ; Schaffer, RL; Petty, ITD; Hanley-Bowdoin, L. 1994a. Geminivirus replication origin has a modular organization. *Plant Cell* 6:405-416.
- \_\_\_\_\_; Eagle, PA; Sipe, PS; Luckow, VA; Hanley-Bowdoin, L. 1994b. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for virus replication. *The Journal of Biological Chemistry* 269:8459-8465.
- Frischmuth, T; Engel, M; Lauster, S; Jeske, H. 1997. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted, *Sida* infecting bipartite geminiviruses in Central America. *Journal of General Virology* 78:2675-2682.
- Gilbertson, RL; Hidayat, SH; Paplomatas, EJ; Rojas, MR; Hou, YM.; Maxwell, DP. 1993. Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses. *Journal of General Virology* 74:23-31.
- Hall, TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hanley-Bowdoin, L; Elmer, JS; Rogers, SG. 1990. Expression of functional replication protein from tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 87:1446-1450.
- Holdridge, LR. 1967. Life zone ecology. San José, CR, Tropical Science Center. 216 p.
- Karkashian, JP; Maxwell, DP; Ramírez, P. 2001. Squash yellow mottle virus: a new cucurbit-infesting geminivirus from Costa Rica. *Reunión Anual APS-CD (41, 2001, Cuba). Memorias. Varadero, CU.* p. 68.
- Kong, LJ; Orozco, BM; Roe, JL; Nagar, S; Ou, S; Feiler, HS; Durfee, T; Miller, AB; Grussem, W; Robertson, D; Hanley-Bowdoin, L. 2000. A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infected plants. *The EMBO Journal* 19(13):3485-3495.
- Kumar, S; Tamura, K; Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics. (En revisión).*
- Lazarowitz, SG. 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11:327-349.
- Lucioli, A; Noris, E; Brunetti, A; Tavazza, A; Valentino, Ruzza; Araceli, G; Bejarano, E; Acotto, GP; Tabaza, M. 2003. Tomato yellow leaf curl Sardinia virus rep-derived resistance homologous and heterologous geminivirus occurs by different mechanisms and is overcome if virus-mediated transgene silencing is activated. *Journal of Virology* 77(12):6785-6798.
- Mansoor, S; Bridson, RW; Zafar, Y; Stanley, J. 2003. Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *Trends in Plant Science* 8(3):128-134.
- Morales, F; Anderson, P. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology* 146:415-441.
- Mayo, MA; Pringle CR. 1998. *Virus Taxonomy-1997*. *Journal of General Virology* 79:649-657.
- Nouzeiry, AO; Lucas, WJ; Gilbertson, RL. 1994. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* 76:925-932.
- Orozco, BM; Miller, AB; Settlege, SB; Hanley-Bowdoin, L. 1997. Functional domains of geminivirus replication protein. *The Journal of Biological Chemistry* 272:9840-9846.
- Padidam, M; Beachy, RN; Fauquet, CM. 1995. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology* 76:249-263.
- Ramos, PL; Guevara-González, RG; Peral, R; Ascencio-Ibañez, JT; Polston, JE; Arguello-Astorga, GR; Vega-Arregún, JC; Rivera-Bustamante, RF. 2003. Tomato mottle virus pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: Implications for the delimitation of cis- and trans-acting replication specificity determinants. *Archives of Virology* 148:1697-1712.
- Revington, GN; Sunter, G; Bisaro, DM. 1989. DNA sequences essential for replication of the B genome component of tomato golden mosaic virus. *Plant Cell* 1:985-992.



- Rojas, MR; Gilbertson, RL; Russell, DR, Maxwell, DP. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77:340-347.
- Sambrook, J; Fritsch, EF; Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2 ed. New York, US, Cold Spring Harbor Laboratory. 574 p.
- Sunter, G; Hartitz, MD; Hormuzdi, SG; Brough, CL; Bisaro, DM. 1990. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology* 179:69-77.
- \_\_\_\_\_; Bisaro, DM. 1992. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell* 4:1321-1331.
- \_\_\_\_\_; Gardiner, WE; Rushing, AE; Rogers, SG; Bisaro, DM. 1987. Independent encapsidation of tomato golden mosaic virus A component DNA in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 8:477-484.
- Yang, Y; Sherwood, TA; Patte, CP; Hiebert, E; Polston, JE. 2004. Use of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) rep gene sequences to engineer TYLCV resistance in tomato. *Phytopathology* 94(5):490-496.
- Zúñiga-Vega, C; Ramírez, P. 2002. Los geminivirus, patógenos de importancia mundial. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 64:25-33.