

# Los geminivirus, patógenos de importancia mundial

Claudia Zúñiga-Vega<sup>1</sup>  
Pilar Ramírez<sup>2</sup>

**RESUMEN.** Actualmente, América Latina ha sido la región más afectada por el complejo geminivirus-mosca blanca, tanto por el número de cultivos afectados como por las pérdidas por cosecha y el área agrícola devastada. Las infecciones por geminivirus dentro de los agroecosistemas son dinámicas, porque son interacciones complejas que involucran factores diversos que son cambiantes, como: los geminivirus, los sistemas de producción, el ambiente y los biotipos del vector. Por tanto, la identificación de geminivirus debe ser un proceso permanente, dado que los nuevos patógenos requieren cambios continuos en las estrategias de manejo. En esta revisión se analiza la organización del genoma en *Begomovirus*, la multiplicación general y estrategias de transcripción viral, así como la diversidad filogenética y las hipótesis más recientes que intentan explicar la variabilidad molecular de estos patógenos. También se revisa la transmisión por el insecto vector y el uso de técnicas moleculares como herramientas para el diagnóstico y caracterización de los geminivirus. Se incluyen además estrategias por ingeniería genética para el manejo del complejo geminivirus-mosca blanca.

**Palabras clave:** Geminivirus, América Latina, Diversidad molecular, Diagnóstico molecular, Ingeniería genética.

**ABSTRACT Geminivirus, pathogens of worldwide importance.** At present, Latin America has been the region most affected by the whitefly-geminivirus complex, both by number of crops affected and by yield losses, and the agricultural area devastated. Infections by geminivirus within agrosystems are dynamic, because they are complex interactions that involve various factors that can change, such as: the geminivirus, the systems of production, the environment and the biotypes of the vector. For this reason, identification of the virus must be a permanent process, given that new pathogens will require continuous change in management strategies. In this review the organization of the genome in *Begomovirus*, general multiplication and viral transcription strategies as well as phylogenetic diversity and the most recent hypotheses that try to explain the molecular diversity of these pathogens, is analyzed. Also transmission by the insect vector and the use of molecular techniques as tools for identification and characterization of geminivirus, are reviewed. Furthermore, genetic engineering strategies for the management of the geminivirus-whitefly complex are included.

**Key words:** Geminivirus, Latin America, Molecular diversity, Molecular diagnosis, Genetic engineering.

## Introducción

Desde 1986, varios cultivos en América Central y el Caribe se han visto afectados por geminivirus, transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci*, Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae). En la actualidad, Latinoamérica ha sido la región más afectada por el complejo geminivirus-mosca blanca, tanto por el número de cultivos afectados como por las pérdidas de cosecha y el área agrícola devastada. Millones de kilómetros cuadrados de tierra apta para la agricultura, en 20 países, sufren el ataque de más de treinta geminivirus (Morales y Anderson 2001). Por décadas, los

geminivirus y su insecto vector coexistieron en esta región geográfica, sin afectar seriamente las especies de plantas cultivadas, pero actualmente, este complejo es considerado "la plaga del siglo" (Morales y Anderson 2001).

*B. tabaci* ha causado problemas como plaga directa o como vector de geminivirus, en al menos 17 cultivos, tanto de consumo básico (frijol, tomate, chile dulce, ayote), como industrial y de exportación (algodón, soya, melón entre otros); por lo que muchos agricultores se han visto forzados a abandonar sus cultivos (Hilje 1995, 1998).

<sup>1</sup> Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. czuniga@itcr.ac.cr

<sup>2</sup> Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. pramirez@cibem.ucr.ac.cr

Las infecciones por geminivirus dentro del agroecosistema son dinámicas, porque son interacciones complejas que involucran diversos factores cambiantes, tales como los geminivirus, los sistemas de producción, el ambiente y los biotipos del vector (Maxwell 2001)<sup>3</sup>. Por ejemplo dentro de los sistemas productivos pueden variar las plantas hospedantes, las prácticas de manejo y los tipos de insecticidas. También pueden variar la variación en los biotipos del vector y los tipos de geminivirus por introducción accidental, como es el caso del virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) introducido desde el Mediterráneo a República Dominicana, el cual ha llegado a sustituir el virus nativo (Nakhla *et al.* 1994, Czosnek y Laterrot 1997).

Las recientes epidemias causadas por geminivirus son el producto de una conjunción de factores como plantas, insecto-vector y virus. Tales epidemias resultan de la coinfección de diferentes begomovirus en la misma planta, lo que induce la aparición de mayor variación viral. En estos patrones de variación y evolución, estos virus se diferencian de los virus de plantas con genoma ARN (Harrison y Robinson 1999).

Entre las hipótesis que intentan explicar la aparición de nuevos virus, Brown *et al.* (1999) señalan que podría estar relacionada con el aumento en las prácticas agrícolas y con el surgimiento de poblaciones de *B. tabaci* del biotipo B; mientras Hammond *et al.* (1999) indican que podría deberse al paso de una población viral hacia una especie diferente de hospedante o hacia un nuevo ecosistema. También se ha sugerido la recombinación como un factor poderoso en la evolución de los geminivirus transmitidos por mosca blanca (Gilbertson *et al.* 1993), la cual se demostró que ocurrió naturalmente entre los geminivirus que atacan la yuca en Uganda (Zhou *et al.* 1997).

La variación genómica de los geminivirus es el resultado de mutaciones amplificadas por la adquisición de componentes extra del ADN, pseudorecombinación (Hou y Gilbertson 1996, Hou *et al.* 1998) y recombinación, ambas intraespecíficas e interespecíficas entre diferentes geminivirus de la misma región geográfica (Harrison *et al.* 1997, Harrison y Robinson 1999).

Otros autores consideran que la proliferación y diseminación rápida de los geminivirus transmitidos por moscas blancas en América Latina es consecuencia de cambios drásticos en los sistemas de cultivos (Morales y Anderson 2001).

Por tanto, la identificación de geminivirus debe ser un proceso permanente y continuo, porque los nuevos patógenos requieren cambios continuos en las estrategias de manejo, debido a que la eficiencia de transmisión de los mismos por los insectos vectores también cambia. Además, las variedades de cultivos involucrados podrían presentar diferentes respuestas a los nuevos virus.

Estudios recientes muestran que las diferencias biológicas de la población del vector pueden influenciar la diseminación de los geminivirus en los cultivos y en las plantas silvestres (Brown 2000).

Aunque es difícil de cuantificar el impacto económico de las infecciones causadas por el complejo mosca blanca-geminivirus en la producción agronómica, las pérdidas alcanzan millones de dólares. La severidad de dichas infecciones ha aumentado en los últimos años (Blair *et al.* 1995, Brown y Bird 1992, Cohen y Antignus 1994, Hanson y Maxwell 1999, Mehta *et al.* 1994a, 1994b, Navot *et al.* 1992). Según Polston y Anderson (1997) han llegado a ser el grupo principal de patógenos de hortalizas en el subtrópico y trópico del hemisferio Occidental.

Además, debe sumarse el aumento en los costos de producción, ocasionados principalmente por el incremento en el uso de insecticidas; los cuales se utilizan en forma indiscriminada, y las aplicaciones se hacen con mucha frecuencia. Esto causa riesgos de residuos en los alimentos y el agua, de intoxicaciones de personas y animales, de disminución de resistencia y de enemigos naturales del insecto vector, cuyo valor es prácticamente imposible de cuantificar (Hilje 1995, 1998).

En esta revisión se analiza la biología molecular, la diversidad filogenética y el uso de técnicas moleculares como herramientas para el diagnóstico y caracterización de los geminivirus.

## Conceptos y fundamentos

### Clasificación taxonómica

Los geminivirus comprenden una numerosa y diversa familia (Geminiviridae) de virus de plantas, cuyo genoma es un ADN simple banda (sb), que se duplica usando moléculas intermediarias de ADN doble banda (db) dentro de las células vegetales infectadas (Bridson y Markham 1995). Los viriones están constituidos por un par de icosaedros y cada uno consta de 110 subunidades de proteína de cubierta, de 29-30kD cada una. Estos virus contribuyen sólo con unos po-

<sup>3</sup> Maxwell, D. 2001. Comunicación personal. Department of Plant Pathology, University of Madison, Wisconsin.

cos factores para su duplicación y transcripción y son dependientes de las ARN y ADN polimerasas nucleares de la planta hospedante (Hamilton *et al.* 1983, Harrison 1985, Davies y Stanley 1989, Bisaro *et al.* 1990, Fauquet y Fargette 1990, Lazarowitz 1992, Mayo y Martelli 1993, Fontes *et al.* 1994b, Laufs *et al.* 1995).

Los geminivirus se clasifican en tres géneros, previamente denominados subgrupos, que se caracterizan por el tipo de insecto vector, las plantas hospedantes y la estructura del genoma que poseen (Rybicki 1994, Padidam *et al.* 1995). Los géneros son:

**Mastrevirus:** Tienen genoma monopartita y son transmitidos por saltahojas a plantas monocotiledóneas. El virus del estriado del maíz (*Maize streak virus*, MSV) representa a este género (Bock 1974, Harrison *et al.* 1977, Rybicki y Huges 1990).

**Curtovirus:** Poseen genoma monopartita y son transmitidos por saltahojas a plantas dicotiledóneas. El virus del encrespamiento apical de la remolacha (*Beet curly top virus*, BCTV) es el representante de este género (Bridson *et al.* 1989, Mumford 1974).

**Begomovirus:** Presentan genomas bipartitas ADN A y ADN B, excepto algunos aislamientos del TYLCV (Navot *et al.* 1991) y son transmitidos por la mosca blanca *B. tabaci* a plantas dicotiledóneas. El virus del mosaico dorado del frijol (*Bean golden mosaic virus*, BGMV) es el representante de este género (Gálvez y Castaño 1976). En América Latina, la mayoría de los geminivirus encontrados pertenecen al género Begomovirus y son bipartitas. Sin embargo, recientemente se ha informado de la presencia de begomovirus monopartitas.

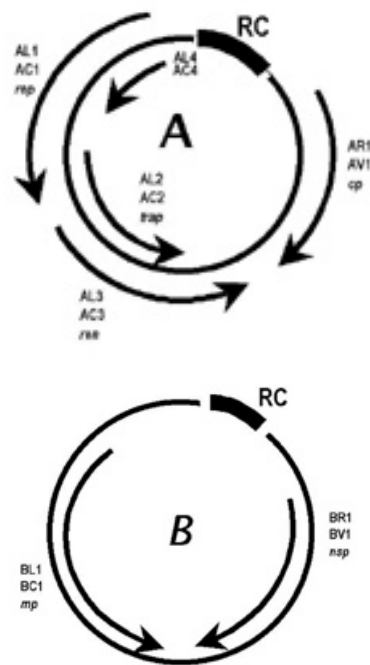
### Organización del genoma de los Begomovirus

Los begomovirus bipartitas tienen genomas de ADN (ADN viral A y B) de simple banda de 2,5 a 3 kb y presentan genes tanto en las bandas virales (V) como en las bandas complementarias (C), producto de la duplicación. Se localizan cinco genes en la molécula de ADN A (AC1, AC2, AC3, AC4, AV1) y dos genes en la molécula de ADN B (BC1, BV1) (Davies y Stanley 1989, Lazarowitz 1992, Hanley-Bowdoin *et al.* 1999) (Fig.1). De manera similar a lo que ocurre en el virus del simio (*Simian vacuolating virus*, SV40) y otros virus ADN, los genes localizados en la banda complementaria se expresan temprano en el ciclo de vida del patógeno y los que están en la banda viral, en forma tardía (Xiong 1998). Los begomovirus monopartitas tienen un genoma de 2,7-2,8 kb.

Se utilizan varias nomenclaturas para nombrar los genes de los geminivirus (Cuadro 1):

- La que indica si los genes están localizados en el ADN encapsidado en el virión (V), o en la banda complementaria de ADN (C) y si están en el componente A o B.
- La que se refiere a la posición del gen con respecto al extremo 5' de la región intergénica, que puede ser a la derecha (R) o izquierda (L) y si se localizan en el componente A o B.
- Actualmente también el gen AL1 se designa como *rep*, el AL2 como *trap*, el AL3 como *ren*, el AV1 como *cp*, el BC1 como *mp* y el BV1 como *nsp*.

Una vez que el virus es inoculado en la planta por el insecto vector, se despoja de la proteína de cubierta y alcanza el núcleo celular; donde sintetiza la banda complementaria a partir de la banda viral que ingresó a la célula vegetal. Esta síntesis se realiza completamente con la maquinaria de multiplicación del hospedante y utilizando un imprimador de una secuencia



**Figura 1.** Esquema que representa la organización del genoma de *Begomovirus*. Se indica la región común (RC) o región intergénica que está conservada en los componentes A y B. Las flechas representan la localización de los genes, las diferentes nomenclaturas que se utilizan para denominarlos y la dirección de la transcripción.

**Cuadro 1.** Nomenclatura, localización, sentido de la transcripción y función de los genes de *Begomovirus bipartitas*.

Nomenclatura			Función	Localización	Sentido de la transcripción
AC1	AL1	<i>rep</i>	Duplicación del ADN	Componente A	Complementario
AC2	AL2	<i>trap</i>	Transactivación de AV1 y BV1	Componente A	Complementario
AC3	AL3	<i>ren</i>	Incrementa la eficiencia de la multiplicación	Componente A	Complementario
AC4	AL4		No se conoce	Componente A	Complementario
AV1	AR1	<i>cp</i>	Proteína de cubierta	Componente A	Viral
BC1	BL1	<i>mp</i>	Movimiento del virus de célula a célula por plasmodesmos	Componente B	Complementario
BV1	BR1	<i>nsp</i>	Movimiento del virus hacia afuera del núcleo	Componente B	Viral

corta de ribonucleótidos, complementario a nucleótidos localizados en la región común (Xiong 1998). Esto le permitirá al virus expresar los genes que se localizan en la banda complementaria, multiplicarse por medio del mecanismo del círculo rodante y posteriormente expresar los genes situados en la banda viral, para continuar con su ciclo de vida.

El ADN A codifica para las proteínas necesarias para la multiplicación (Elmer *et al.* 1988, Hanley-Bowdoin *et al.* 1990) y la encapsidación del ADN viral (Sunter *et al.* 1987). El gen *rep* codifica la única proteína esencial, la proteína Rep de 41 kD, que posee una fuerte conservación en la secuencia de aminoácidos (Fontes *et al.* 1992, Lazarowitz 1992). Dentro de sus funciones están: dirigir el complejo enzimático de duplicación hacia el origen de replicación en la molécula de ADN (Fontes *et al.* 1992), separar la doble banda de ADN y cortar el ADN para iniciar la multiplicación por el mecanismo del círculo rodante (Koonin e Ilyina 1992, Stanley 1995), separar el genoma reproducido en monómeros circulares de una unidad de longitud, para la producción de la progenie de viriones (Koonin e Ilyina 1992) y suprimir la expresión de su propio promotor (Sunter *et al.* 1993).

El gen *trap* codifica para la proteína activadora transcripcional (TrAP) de 15-20 kD, necesaria para la expresión de los genes AV1 y BV1 (Lazarowitz 1992, Sunter *et al.* 1990, Sunter y Bisaro 1992).

El gen *ren* por medio de la proteína REN de 14-16 kD incrementa la eficiencia de la reproducción y actúa como un factor accesorio que promueve la acumulación del ADN viral (Orozco *et al.* 1997). El gen AC4 no tiene efectos detectables sobre la multiplicación (Hanley-Bowdoin *et al.* 1999).

El gen *cp* codifica para la proteína de cubierta (CP) de 27-30 kD relacionada con la especificidad del

insecto vector y la más conservada dentro de los begomovirus (Brown 2000). Noueiry y colaboradores (1994) indican que a pesar de que en la mayoría de los virus ARN la proteína de cubierta se requiere para la infección sistémica, en el caso de los geminivirus el mecanismo es diferente, pues las proteínas de movimiento codificadas por los genes *mp* y *nsp* son las encargadas del transporte. Brown (2000) sugiere que la secuencia de aminoácidos de la CP de los diferentes geminivirus podría utilizarse para estudios filogenéticos de los geminivirus. Además, usando esa información se encontró relación entre los árboles filogenéticos de los begomovirus y los de los biotipos de las moscas blancas (Brown 2000).

El ADN B codifica para las funciones asociadas con el movimiento viral (Revington *et al.* 1989, Noueiry *et al.* 1994, Frischmuth *et al.* 1997). El gen *mp* codifica una proteína de 34 kD, relacionada con el movimiento del virus de célula a célula a través de plasmodesmos, el transporte intercelular selectivo del ADNdb, el ámbito de hospedantes y el desarrollo de síntomas; 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 hospedante y con el movimiento hacia afuera del núcleo, pues potencia la salida de los ADNdb y ADNsb a través de la membrana nuclear hacia el citoplasma y hacia las células adyacentes del floema (Noueiry *et al.* 1994, Nagar *et al.* 1995, Frischmuth *et al.* 1997).

En *Begomovirus*, ambos componentes son necesarios para una infección eficiente y el ADN B no puede duplicarse en la ausencia del ADN A (Gilbertson *et al.* 1991, Hamilton *et al.* 1983, Liu *et al.* 1997, Stanley 1983).

Los geminivirus también poseen dentro de su genoma una región intergénica altamente conservada

que comprende unos 200 nucleótidos, idéntica entre el ADN A y el ADN B de cada virus, lo que se conoce como región común. En este sitio se localiza una secuencia de nueve nucleótidos, **TAATATTAC**, flanqueada por repeticiones invertidas que potencialmente podrían formar una horquilla; esta estructura se identifica como esencial para la reproducción de todos los miembros de esta familia viral (Argüello-As-torga *et al.* 1994, Laufs *et al.* 1995).

### **Multiplicación general y estrategias de transcripción viral**

Los geminivirus utilizan el mecanismo del círculo rodante para amplificar sus genomas de ADN simple banda y producir ADN doble banda, que sirve como un molde para la transcripción y la multiplicación (Saunders *et al.* 1991). Esta estrategia de reproducción la utilizan algunos ADNs virales y factores de fertilidad bacterianos, el fago X174, plásmidos de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como los parvovirus y circovirus, constituidos por ADNs b, con hospedantes en animales y vegetales (Fontes *et al.* 1994a, Saunders *et al.* 1991, Xiong 1998).

### **Transmisión de *Begomovirus***

Según Harrison (1985) y Polson y Anderson (1997) la transmisión de los begomovirus por *B. tabaci* es circulatoria o persistente y no propagativa. Este tipo de transmisión tiene dos fases: la de adquisición, cuando el insecto se alimenta de la planta y el virus se transporta del aparato bucal al hemoceloma del insecto, probablemente a través de la pared del intestino. Y la segunda fase de inoculación a la planta, que involucra el paso del virus desde la hemolinfa hacia las secreciones salivares del insecto, lo que permite la transmisión del patógeno cuando el insecto se alimenta de la planta (Liu *et al.* 1997).

El tiempo aproximado en que el virus llega a ser circulativo en el insecto es de 4-8 horas después de que lo adquiere (Mehta *et al.* 1994). El periodo de transmisión incluye el tiempo durante el cual el patógeno circula dentro del vector hasta la transmisión del virus (Harrison 1985).

No todos los hospedantes son igualmente preferidos, *B. tabaci* es polífaga y tiene preferencias por ciertas familias. Ataca a 16 cultivos y a 70 hospedantes en 39 familias, predominando las Compositae, Solanaceae, Cucurbitaceae, Malvaceae, Euphorbiaceae y Fabaceae (Hilje 1995).

### **Estrategias por ingeniería genética para el manejo del complejo geminivirus-mosca blanca**

Debido a las pérdidas económicas que provoca este complejo y a la escasa resistencia natural para controlar las enfermedades producidas por geminivirus, se han investigado diversas estrategias por ingeniería genética para producir plantas resistentes a estos patógenos (Hanson *et al.* 1995). Kunik *et al.* (1994) demostraron que plantas transformadas con el gen *cp* del TYLCV presentaron síntomas tardíos y se recuperaron de la enfermedad, cuando se sometieron a inoculación viral mediada por moscas blancas. Guevara-González *et al.* (1999) estudiaron mediante la técnica de complementación génica, la función del gen de la cápside proteica del virus del chile huasteco (*Pepper huasteco virus*, PHV). En ese estudio inocularon mutantes del PHV dentro de plantas transgénicas que expresaban al gen *cp* silvestre del PHV bajo el control, ya sea de su propio promotor o del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV). Estos investigadores encontraron que la complementación observada podría ser el resultado de varias características propias del promotor de los geminivirus, como especificidad tisular y transactivación por proteínas virales. Estas características podrían ser una alternativa interesante para usos específicos para protección de cultivos.

Por su parte, Stanley *et al.* (1990) transformaron plantas de tabaco con ADN subgenómico del ADN B del virus del mosaico de la yuca africana (*African cassava mosaic virus*, ACMV), las cuales desarrollaron síntomas menos severos que las plantas no transformadas, cuando se enfrentaron al virus.

Antignus y Cohen (1994) utilizaron un ADN simple banda extraído del TYLCV, que sirvió como molde para la síntesis *in vitro* de una molécula ADN doble banda. La agroinoculación del hospedante con una población de este ADN viral clonado del TYLCV resultó en una infección sistémica, pero con síntomas más leves que los inducidos por el virus nativo.

Aragao *et al.* (1998) clonaron en sentido contrario ("antisense") los genes *rep*, *trap*, *ren* y *mp* del aislamiento brasileño del mosaico dorado del frijol, bajo el control transcripcional del promotor 35S del CMV. Esta construcción genética fue usada para transformar por biobalística plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Las plantas transgénicas obtenidas de la generación R3 y R4 se inocularon con este geminivirus brasileño, usando moscas blancas virulíferas. Como resultado se obtuvo, que algunas de las líneas de

las plantas analizadas mostraron tolerancia a la infección viral.

Sangaré *et al.* (1999) construyeron una mutación en el ADN A del ACMV, para alterar el sitio de unión NTP en el gen que codifica a la proteína asociada con la duplicación del ADN viral (*rep*). Las plantas transformadas de *Nicotiana benthamiana* que expresaban el gen *rep* mutado se infectaron con el mencionado virus. Estas plantas se comportaron como tolerantes a la infección y acumularon menos ADN viral, que las plantas no transgénicas infectadas.

Hanson y Maxwell (1999) informaron de la habilidad de los genes *rep* con mutaciones letales dentro de los dominios de unión NTP y de corte del ADN, para funcionar como inhibidores transdominantes de la duplicación de estos virus. Los resultados muestran que la inhibición transdominante de la multiplicación de geminivirus requiere y puede ser controlada por proteínas Rep no funcionales. La generación de resistencia de amplio espectro para geminivirus es un objetivo importante, dada la gran diversidad que existe y los diferentes cultivos que afectan. Los resultados presentados sugieren que la resistencia de amplio espectro se puede obtener usando mutantes de *rep* transdominantes y en asociación con otras secuencias.

Sinistera *et al.* (1999) transformaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) con un gen *cp* mutado del virus del moteado del tomate (*Tomato mottle virus*, ToMoV). Estas plantas transgénicas mostraron una respuesta a la infección viral desde susceptibilidad hasta inmunidad. En ninguna de las plantas se identificó el producto proteico del transgen, únicamente al ARN transcrito, lo cual indica que la respuesta de resistencia parece estar mediada vía ARN.

Las plantas superiores utilizan el silenciamiento de genes por ARN como un sistema adaptativo de defensa antiviral, el cual es transmitido sistemáticamente como respuesta a una infección viral localizada. Los virus de plantas han elaborado una variedad de medidas contradefensivas para sobreponerse a la respuesta del silenciamiento del hospedante. Una de estas estrategias consiste en producir proteínas, que se dirijan a los diferentes pasos del sistema del silenciamiento de genes (Voinnet 2001). Según Voinnet (2001), la proteína AC2 (Cuadro 1), además de las funciones descritas, también está involucrada en este mecanismo. La investigación activa en este campo, se presenta como una oportunidad para diseñar mejores medidas de control contra las enfermedades virales en plantas.

### **Importancia de la aplicación del diagnóstico molecular en el manejo de enfermedades virales en plantas**

El proceso de identificar correctamente la causa de una enfermedad es indispensable para dirigir adecuadamente las prácticas de manejo (Arauz 1998). La identificación de ciertos virus, aún para un fitopatólogo experimentado, incluye en muchos casos la realización de pruebas adicionales de laboratorio para asegurar un diagnóstico definitivo (Arauz 1998), en donde la detección temprana es fundamental para evitar la diseminación de la enfermedad (Araya 2000).

Por la importancia que han alcanzado los geminivirus como patógenos a escala mundial (Polston y Anderson 1997, Hanson y Maxwell 1999) se necesita de métodos rápidos y seguros para su detección y posterior identificación, lo cual facilitan los estudios de epidemiología y de diversidad genética del grupo. Esta información podría tener consecuencias importantes para el diseño de estrategias relacionadas con la resistencia a enfermedades y el manejo integrado (Rojas *et al.* 1993). La identificación precisa del virus y del vector, así como el conocimiento de la distribución del patosistema podría facilitar un mejor control de la plaga. Además el reconocimiento de la identidad y la distribución de los begomovirus, utilizando técnicas moleculares permitirá el desarrollo y utilización de cultivos resistentes a la enfermedad (Brown 2000).

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es muy sensible y específica para la detección e identificación de patógenos de plantas y se puede usar para investigar en forma precisa la composición y organización de los genomas virales, la composición de sus poblaciones y su diversidad genética (Rojas *et al.* 1993). Teóricamente una molécula de ADN podría amplificarse un millón de veces en 20 ciclos de duplicación (Sambrook *et al.* 1989), lo que permite detectar la enfermedad con niveles mínimos de infección.

Los fragmentos virales amplificados a partir de PCR se pueden usar en hibridaciones moleculares como sondas universales, muy útiles para el diagnóstico y como sondas específicas, que además permiten localizar infecciones mixtas. Dentro de los geminivirus, las infecciones mixtas podrían ser comunes, por lo que su detección y caracterización serán una de las aplicaciones más importantes de las técnicas de PCR (Rojas *et al.* 1993).

También, los métodos moleculares se aplican para evaluar la resistencia de plantas, las diferencias en

las concentraciones de los ácidos nucleicos en cultivos infectados con geminivirus, la diversidad existente y para determinar reservorios de malezas de estos patógenos (Hanson y Maxwell 1999).

La identificación de las secuencias de nucleótidos que componen los geminivirus cobra especial importancia en este grupo, en el cual la recombinación se ha sugerido como un factor poderoso en su evolución (Navas-Castillo *et al.* 1999).

### Consideraciones finales

Los geminivirus son virus de plantas, que están causando enfermedades limitantes de la producción en dicotiledóneas ampliamente usadas como alimento, fibras y ornamentales. El potencial de estos virus y sus vectores para diseminarse en nuevas localidades e infectar nuevos hospedantes a nivel mundial es alarmante. El diagnóstico molecular se perfila como una herramienta valiosa que permitirá el reconocimiento temprano de los problemas que se asocian con estos patógenos y sus vectores.

Por tanto, es necesario que la identificación sea un proceso permanente, ya que los nuevos complejos geminivirus-vector requieren cambios continuos en las estrategias de manejo.

### Literatura citada

Antignus, Y; Cohen, S. 1994. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of a mild isolate of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). *Phytopathology* 84:707-712.

Aragao, FJL; Ribeiro, SG; Barros, LMG; Basileiro, ACM; Maxwell, DP; Rech, EL; Faria, JC. 1998. Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L) engineered to express viral antisense RNAs show delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. *Molecular Breeding* 4:491-499.

Arauz, LF. 1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. San José, Costa Rica, Editorial de la Universidad de Costa Rica. 467 p.

Araya, CM. 2000. Estatus de las principales enfermedades del cultivo de frijol y posibilidades organizativas para su manejo integrado en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 55:6-11.

Argüello-Astorga, GR; Guevara-González, 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.

Bisaro, DM; Sunter, G; Revington, GN; Brought, CL; Hormuzdi, GG; Hartitz, M. 1990. Molecular genetics of tomato golden mosaic virus replication: Progress toward defining gene functions, transcription units and the origin of DNA replication. In Pirone, TP; Shawm JG. Ed. *Viral genes and plant pathogenesis*. New York, Springer-Verlag. p 89-105.

Blair, MW; Basset, MJ; Abouzid, AM; Hiebert, E; Polston, JE; McMillian, RT; Graves, W; Lamberts, M. 1995. Occurrence of bean golden mosaic virus in Florida. *Plant Disease* 79: 529-533.

Bock, KR. 1974. Maize streak virus. In CMI/AAB Descriptions of plant viruses No 133. New England, Commonwealth Mycology Institute. p.4.

Briddon, RW; Watts, J; Markam, PG; Stanley, J. 1989. The coat protein of beet curly top virus is essential for infectivity. *Virology* 172:628-633.

Briddon, RW; Markham, PG. 1995. Family Geminiviridae. In Murphy, FA; Fauquet, CM; Bishop, DHL; Ghabrial, SA; Jarvis, AW; Martelli, GP; Mayo, MA; Summers, MD. Ed. *Virus taxonomy sixth report of the international committee on taxonomy of viruses* Vienna, Austria, Springer-Verlag. p. 158-165

Brown, JK. 2000. Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-Begomovirus complexes. *Virus Research* 71:233-260.

Brown, JK; Bird, J. 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Disease* 76: 220-225.

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.

Cohen, S; Antignus, Y. 1994. Tomato yellow leaf curl virus, a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. *Advanced Disease Vector Research* 10:259-288.

Czosnek, H; Laterrot, H. 1997. A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Archives of Virology* 142: 1391-1406.

Davies, JW; Stanley, J. 1989. Geminivirus genes and vectors. *Trends in Genetics* 5: 77-81.

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.

Fauquet, C; Fargette, D. 1990. African cassava mosaic virus: etiology, epidemiology, and control. *Plant Disease* 74:404-411

Fontes, EPB; Luckow, VA; Hanley-Bowdoin, L. 1992. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell* 4:597-608.

Fontes, EPB; Eagle, PA; Sipe, PS; Luckow, VA; Hanley-Bowdoin, L. 1994a. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *Journal of Biological Chemistry* 269:8459-8465.

Fontes, EPB; Gladfelter, HJ; Schaffer, RL; Petty, ITD; Hanley-Bowdoin, L. 1994b. Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell* 4:597-608.

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.

Gálvez, GE; Castaño, MJ. 1976. Purification of the whitefly-transmitted bean golden mosaic virus. *Turrialba* 26:205-207.

Gilbertson, RL; Faria, JC; Hanson, SF; Morales, FJ; Ahlquist, P; Maxwell, DP; Russell, DR. 1991. Cloning of the complete DNA genomes of four bean infecting geminiviruses and determining their infectivity by electric discharge particle acceleration. *Phytopathology* 81:980-985.

- 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.
- Guevara-González, RG; Ramos, PL; Rivera-Bustamante, RF. 1999. Complementation of coat protein mutants of pepper huasteco geminivirus in transgenic tobacco plants. *Phytopathology* 89:540-545.
- Hamilton, WDO; Bisaro, DM; Coutts, RHA; Buck, KW. 1983. Demonstration of the bipartite nature of genome of a single-stranded DNA plant virus by infection with the cloned DNA components. *Nucleic Acids Research* 11:7387-7396.
- Hammond, J; Lecoq, H; Raccah, B. 1999. Epidemiological risks from mixed virus infections and transgenic plants expressing viral genes. *Advances in Virus Research* 54:189-314.
- 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 Sciences, USA* 87:1446-1450.
- Hanley-Bowdoin, L; Settlege, SB; Orozco, BM; Nagar, S; Robertson, D. 1999. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18:71-106.
- Hanson, SF; Hoogstraten, RA; Ahlquist, P; Gilbertson, RL; Russell, DR; Maxwell, DP. 1995. Mutational analysis of a putative NTP-binding domain in the replication-associated protein (AC1) of bean golden mosaic geminivirus. *Virology* 211:1-9.
- Hanson, SF; Maxwell, DP. 1999. *trans*-Dominant inhibition of geminiviral DNA replication by bean golden mosaic geminivirus *rep* gene mutants. *Phytopathology* 89:480-486.
- Harrison, BD. 1985. Advances in geminivirus research. *Annual Review of Phytopathology* 23:55-82.
- Harrison, BD; Barker, H; Bock, KR; Guthrie, EJ; Meredith, G; Atkinson, M. 1977. Plant viruses with circular single-stranded DNA. *Nature* 270:760-762.
- Harrison, BD; Liu, YL; Khalid, S; Hameed, S; Otim-Nape, GW; Robinson, DJ. 1997. Detection and relationships of cotton leaf curl virus and allied whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Pakistan. *Annals of Applied Biology* 130: 61-75.
- Harrison, BD; Robinson, DJ. 1999. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (Begomoviruses). *Annual Review of Phytopathology* 37:369-398.
- Hilje, L. 1995. Aspectos bioecológicos de *Bemisia tabaci* en Mesoamérica. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 35: 46-54.
- Hilje, L. 1998. Un modelo de colaboración agrícola internacional para el manejo de moscas blancas y geminivirus en América Latina y el Caribe. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 49:1-9.
- Hou, YM; Gilbertson, RL. 1996. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *Journal of Virology* 70:5430-5436.
- Hou, YM; Paplomatas, EJ; Gilbertson, RL. 1998. Host adaptation and replication properties of two bipartite geminiviruses and their pseudorecombinants. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 11:208-217.
- Koonin, EV; Ilyina, TV. 1992. Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA initiator proteins. *Journal of General Virology* 73:2763-2766.
- Kunik, T; Salomon, R; Zamir, D; Navot, N; Zeidan, M; Michelson, I; Gafni, Y; Czosnek, H. 1994. Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. *Biotechnology* 12:500-504.
- Laufs, J; Traut, W; Heyraud, F; Matzeit, V; Rogers, SG; Schell, J; Gronenborg, B. 1995. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 92:3879-3883.
- Lazarowitz, SG. 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11: 327-349.
- Liu, S; Bedford, ID; Briddon, RW; Markham, PG. 1997. Efficient whitefly transmission of African cassava mosaic geminivirus requires sequences from both genomic components. *Journal of Virology* 78:1791-1794.
- Mayo, MA; Martelli, GP. 1993. New families and genera of plant viruses. *Archives of Virology* 133:496-498.
- Mehta, P; Wyman, JA; Nakhla, MK; Maxwell, DP. 1994a. Polymerase chain reaction detection of viruliferous *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) with two tomato-infecting geminiviruses. *Journal of Economic Entomology* 87:1285-1290.
- Mehta, P; Wyman, JA; Nakhla, MK; Maxwell, DP. 1994b. Transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology* 87:1291-1297.
- Morales, FJ; Anderson, PK. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminivirus in Latin America. *Archives of Virology* 146:415-441.
- Mumford, DL. 1974. Purification of beat curly top virus. *Phytopathology* 64:136-139.
- Nagar, S; Pedersen, T; Carrick, KM; Hanley-Bowdoin, L; Robertson, D. 1995. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* 7:705-719.
- Nakhla, MK; Maxwell, DP; Martínez, RT; Carvalho, MG; Gilbertson, RL. 1994. Widespread occurrence of the eastern Mediterranean strain of tomato yellow leaf curl geminivirus in tomatoes in the Dominican Republic. *Plant Disease* 78:928.
- Navas-Castillo, J; Sánchez-Campos, S; Díaz, JA. 1999. Tomato yellow leaf curl virus is causes a novel disease of common bean and severe epidemics in tomato in Spain. *Plant Disease* 83:29-32.
- Navot, N; Pichersky, R; Zeidan, M; Zamir, D; Czosnek, H. 1991. Tomato yellow leaf curl virus: A whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. *Virology* 185:151-161.
- Navot, N; Zeidan, M; Pichersky, E; Zamir, D; Czosnek, H. 1992. Use of the polymerase chain reaction to amplify tomato yellow leaf curl virus DNA infected plants and viruliferous whiteflies. *Phytopathology* 82:1199-1202.
- Noueiry, 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. *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.
- Polston, JE; Anderson, PK. 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease* 81:1358-1369.
- 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.
- Rybicki, EP; Huges, FL. 1990. Detection and typing of maize streak virus and other distantly related geminiviruses of grasses by polymerase chain reaction amplification of a conserved viral sequence. *Journal of General Virology* 71: 2519-2526.
- Rybicki, EP. 1994. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of geminiviridae. *Archives of Virology* 139:49-77.
- Sambrook, J; Fritsch, EF; Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2 ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sangaré, A; Deng, D; Fauquet, CM; Beachy, RN. 1999. Resistance to African cassava mosaic virus conferred by a mutant of putative NTP-binding domain of the *rep* gene (AC1) in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Biology Reports* 5:95-102.
- Saunders, K; Lucy, A; 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.
- Sinistera, XH; Polston, JE; Abozouid, AM; Hiebert, E. 1999. Tobacco plants transformed with a modified coat protein of tomato mottle Begomovirus show resistance to virus infection. *Phytopathology* 89:701-706.
- Stanley, J. 1983. Infectivity of the cloned geminivirus genome requires sequences from both DNAs. *Nature (London)* 305: 643-645.
- Stanley, J; Frischmuth, T; Ellwood, S. 1990. Defective viral DNA ameliorates symptoms of geminivirus infection in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 87:6291-6295.
- Stanley, J. 1995. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonnucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology* 206:707-712.
- Sunter, G; 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.
- 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.
- Sunter, G; 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.
- Sunter, G; Hartitz, MD; Bisaro, DM. 1993. Tomato golden mosaic virus leftward gene expression: Autoregulation of geminivirus replication protein. *Virology* 195:275-280.
- Voynet, O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics*. 17(8):449-459.
- Xiong, Z. 1998. "Single-stranded DNA viruses: Geminiviruses and their relatives". <<http://ag.arizona.edu/~zxiong/gemini.html>> (7 marzo 1999).
- Zhou, X; Liu, Y; Calvert, L; Muñoz, C; Otim-Nape, GW; Robinson, DJ; Harrison, BD. 1997. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of General Virology* 78:210-211.