



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN  
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
UNIDAD SINALOA  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA AGRICOLA**



# **Caracterización genómica de begomovirus en ecosistemas naturales y agroecosistemas con riesgo potencial de transmisión a cultivos hortícolas en el noroeste de México.**

Alumno:

**M.C. Gustavo Domínguez Durán**

Directores de Tesis:

**Dr. Jesús Méndez Lozano**

**Dra. Analilia Arroyo Becerra**

**Guasave, Sinaloa; México Junio del 2018.**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

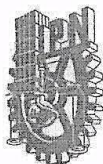
**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa el día 19 del mes de Diciembre del año 2017, el alumno Gustavo Domínguez Durán inscrito al programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de boleta B120397, adscrita al CIIDIR Unidad Sinaloa, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Jesús Méndez Lozano y Dra. Analilia Arroyo Becerra y cede los derechos del trabajo titulado “Caracterización genómica de begomovirus en ecosistemas naturales y agroecosistemas con riesgo potencial de transmisión a cultivos hortícolas en el noroeste de México.”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones [dominguezdurang@gmail.com](mailto:dominguezdurang@gmail.com); [jmendezlozano@gmail.com](mailto:jmendezlozano@gmail.com) y [analilia\\_arroyo@hotmail.com](mailto:analilia_arroyo@hotmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**ATENTAMENTE**

  
Gustavo Domínguez Durán  
Alumno



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 13:22 horas del día 08 del mes de Enero del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa

para examinar la tesis titulada:

Caracterización genómica de begomovirus en ecosistemas naturales y agroecosistemas con riesgo potencial de transmisión a cultivos hortícolas en el noroeste de México

Presentada por el alumno:

Gustavo Domínguez Durán  
Apellido paterno Apellido materno

Nombre(s)

Con registro: 

B	1	2	0	3	9	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

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

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Jesús Méndez Lozano

Dra. Norma E. Leyva López

Dr. Héctor M. González Ocampo

Dra. Analilia Arroyo Becerra

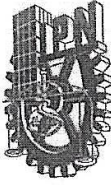
Dr. Carlos L. Calderón Vázquez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Héctor M. Esparza Leal



**CIIDIR - IPN**  
UNIDAD SINALOA  
DIRECCION



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 18 de Enero del 2018

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-Sinaloa en su sesión ordinaria No. 1 celebrada el día 17 del mes de Enero conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

<u>Domínguez</u>	<u>Duran</u>	<u>Gustavo</u>							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre (s)							
Con registro: <table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>B</td><td>1</td><td>2</td><td>0</td><td>3</td><td>9</td><td>7</td></tr></table>			B	1	2	0	3	9	7
B	1	2	0	3	9	7			

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:  
Caracterización genómica de begomovirus en ecosistemas naturales y agroecosistemas con riesgo potencial de transmisión a cultivos hortícolas en el noroeste de México.

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:  
Caracterización de begomovirus en plantas no cultivadas y cultivadas en el Noroeste de México  
Determinar la presencia de begomovirus en las principales familias de plantas no cultivadas en el estado de Sinaloa  
Análisis del riesgo potencial de transmisión a cultivos hortícolas

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:  
Dr. Jesús Mendez Lozano y Dra. Analilia Arroyo Becerra

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:  
CIIDIR Unidad Sinaloa  
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Dr. Jesús Mendez Lozano

Aspirante

Gustavo Domínguez Duran

Directores de Tesis

Dra. Analilia Arroyo Becerra

Presidente del Colegio

Dr. Héctor M. Esparza Leal

**CIIDIR - IPN**  
UNIDAD SINALOA  
DIRECCION



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología Molecular del Departamento de Biotecnología Agrícola, del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (CIIDIR-IPN), bajo la dirección del Dr. Jesús Méndez Lozano y la Dra. Analilia Arroyo Becerra.

Para la realización del proyecto, se recibió financiamiento por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través del proyecto PDCPN2013-01. 214950 y del Instituto Politécnico Nacional SIP. 20131613, SIP2014128, SIP20151969 y SIP20164812. El autor agradece al CIIDIR- IPN Unidad Sinaloa por su apoyo e infraestructura prestados para la realización del presente trabajo de investigación. Al CONACYT e IPN por las becas otorgadas (BEIFI).

## **DEDICATORIA**

**A mi María Jimena.**

**Mena, a través de este párrafo te saludo y te dedico el arduo trabajo que implicó la culminación de esta tesis, eres muy pequeña para comprender la fuente de inspiración que significas en mi vida. Gracias por**

**ser la fuente de energía y motor de vida. Finalizo diciéndote, que espero comprendas la recompensa que espera al sacrificio que realizamos entre tu yo.**

**A mi Nadia Rubí.**

**Siendo la mayor motivación al éxito, eres el ingrediente perfecto para poder culminar esta dichosa y muy merecida victoria en la vida, el poder finalizar esta tesis con éxito, y poder disfrutar el privilegio de decirte GRACIAS, ser grato contigo que siempre estuviste y estas al tanto de mi en cada momento y siempre buscando nuestro mejor porvenir. Te agradezco por tantas ayudas y tantos aportes no solo para el desarrollo de mi tesis, sino también para mi vida; eres mi inspiración y mi motivación.**

**A mis padres**

**Por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.**

**Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.**

**A mis suegros.**

**Suponen los cimientos de mi desarrollo, todos y cada uno de ustedes –mi familia– han destinado tiempo para enseñarme nuevas cosas, para brindarme aportes invaluable que servirán para toda mi vida. Especialmente estuvieron presentes en la evolución y posterior desarrollo total de mi tesis, les agradezco con creces.**

## **Agradecimientos**

El presente trabajo fue realizado bajo la tutela del Dr. Jesús Méndez, a quien le expreso mi mas profundo agradecimiento, por hacer posible la culminación de este estudio. Además, de agradecer su paciencia, tiempo y dedicación que tuvo para finalizar de forma exitosa. Mas de allá de ser mi profesor, es mi amigo.

Dra. Analilia, mi segunda directora, muchas gracias por su tiempo, consejos, paciencia y dedicación para lograr que culminara mi estudio de doctorado. Siempre atenta y pendiente sobre mis avances y desarrollo. Gracias.

Edgar, siempre dispuesto para ayudar y explicar sobre prácticamente cualquier tema, dentro y fuera del laboratorio. Además de un excelente maestro, me llevo un buen amigo.

Erika y Juanjo, ya varios años conviviendo dentro y fuera del laboratorio, siempre dispuestos en ayudar y sobre todo aconsejar sobre cualquier aspecto. Muy buenos recuerdos y una gran amistad.

Lucy, gracias por tu guía y ayuda durante el presente estudio.

Mis compañeros de laboratorio, Cindy, Betty, Gadiela, Karina, Adriana, Krisia, Nataniel, Antonella, Marco, Marielos, Paulina, que fueron parte de momentos alegres y tristes, gracias por apoyarme y estar siempre ahí.

A mis amigos fuera del CIIDIR, Marco, Nane, Adriana, Jesús, Gabriela, que muchas veces sin saberlo fueron de gran apoyo para sopesar momentos difíciles en el periodo en el cual realizaba mi estudio Doctoral.

Además, me gustaría darles las gracias a mis tutores Dra. Norma, Dr. Carlos y Dr. Héctor, por su valiosa ayuda. Definitivamente me brindaron su apoyo y herramientas necesarias para completar mi trabajo satisfactoriamente.

A mis amigos Alex, Ricky y Maury, que estuvieron presentes durante toda o la mayor parte de la realización y el desarrollo de esta tesis, gracias por todo su apoyo.

Nadia, gracias por tu apoyo, no dejarme caer durante muchas ocasiones, siendo mi mayor confidente y consejera me ayudaste a ir por el camino que culminaría en la finalización exitosa de mi tesis. Eres mi motor y motivación.

María Jimena, que sin tener la menor idea de lo que significa esto, eres el motor de mis días, el mayor de mis motivos para luchar día a día y así poder finalizar mi Doctorado. En algún momento de la vida podrás leer este breve párrafo y darte cuenta lo que hacías por mi en estos momentos.

Finalmente, agradezco a todas las personas que conocí durante este trayecto, algunas pasajeras otras que se convirtieron en grandes amigos. No solo por haber estado ahí para apoyarnos en los momentos difíciles, sino que también por las charlas sobre otras cosas no relacionadas con investigación y artículos científicos.

El desarrollo de esta tesis no lo puedo catalogar como algo fácil, pero lo que sí puedo hacer, es afirmar que durante todo este tiempo pude disfrutar de cada momento, que cada investigación, proceso, y proyectos que se realizaron dentro de esta, lo disfruté mucho, y no fue porque simplemente me dispuse a que así fuera, fue porque mis amigos siempre estuvieron ahí, fue porque la vida misma me demostró que de las cosas y actos que yo realice, serán los mismos que harán conmigo.

Siembra una buena y sincera amistad, y muy probablemente el tiempo te permitirá disfrutar de una agradable cosecha.



# Índice

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>3</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>3</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>6</b>
<b>2.1 ECOSISTEMAS Y RESERVAS NATURALES DEL ESTADO DE SINALOA</b> .....	<b>8</b>
<b>2.2 AGROECOSISTEMAS DEL ESTADO DE SINALOA</b> .....	<b>11</b>
<b>2.3 LOS VIRUS Y SU ECOLOGÍA</b> .....	<b>12</b>
<b>2.4 LA FAMILIA <i>GEMINIVIRIDAE</i></b> .....	<b>15</b>
<b>2.4.1 GÉNERO BECURTOVIRUS</b> .....	<b>15</b>
<b>2.4.2 GÉNERO TURNCURTOVIRUS</b> .....	<b>16</b>
<b>2.4.3 GÉNERO ERAGROVIRUS</b> .....	<b>16</b>
<b>2.4.4 GÉNERO MASTREVIRUS</b> .....	<b>16</b>
<b>2.4.5 GÉNERO CURTOVIRUS</b> .....	<b>16</b>
<b>2.4.5 GÉNERO TOPOCOVIRUS</b> .....	<b>16</b>
<b>2.4.6 GÉNERO CAPULAVIRUS</b> .....	<b>17</b>
<b>2.4.7 GÉNERO GRABLOVIRUS</b> .....	<b>17</b>
<b>2.4.8 GÉNERO BEGOMOVIRUS</b> .....	<b>17</b>
<b>2.5 GÉNERO BEGOMOVIRUS: ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y SU DISTRIBUCIÓN EN PLANTAS CULTIVADAS Y NO CULTIVADAS</b> .....	<b>18</b>
<b>2.6 DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DE BEGOMOVIRUS EN DIFERENTES FAMILIAS DE PLANTAS</b> .....	<b>18</b>
<b>2.8 IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS NO CULTIVADAS COMO FUENTE DE INFECCIÓN PRIMARIA DE VIRUS</b> .....	<b>23</b>
<b>2.9 PLANTAS NO CULTIVADAS EN MÉXICO</b> .....	<b>24</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>25</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	<b>26</b>
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>5.1 OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>27</b>
<b>5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>27</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>49</b>
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>63</b>
<b>VI. CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	<b>86</b>

<b>VII. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>87</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONALES.....</b>	<b>88</b>

## **5.1**

## GLOSARIO

**Amarillamiento.** Destrucción de la clorofila de los tejidos verdes. Normalmente aparece previamente, simultáneamente o después de la marchitez y muchas veces rodean tejidos necróticos.

**Amplificación.** Aumento del número de copias de un gen o de una secuencia de DNA.

**Amplificación por círculo rodante (RCA, por sus siglas en inglés).** Técnica que permite la amplificación y obtención de numerosas copias en tándem de genomas circulares mediante la DNA polimerasa Phi 29.

**Clonación molecular.** Involucra la modificación del genoma de una(s) célula(s) por incorporación de un gen de interés. Las etapas comprenden la obtención del gen de interés, unión a un vector de clonación, introducción a célula(s) huésped y selección de células huésped recombinantes.

**Clona.** Grupo de células o de organismos de idéntica constitución genética entre sí y con el antepasado común, del que proceden por división binaria o por reproducción sexual.

**Diversidad genética.** Variación en la composición de los genes que posee una especie tanto dentro de una población como entre sus poblaciones.

**DNA (ácido desoxirribonucleico).** Polímeros compuestos de cuatro unidades moleculares diferentes, denominadas desoxirribonucleótidos (A, G, C y T) que contienen el azúcar desoxirribosa.

**DNA Ligasa.** Enzima que une extremos de las cadenas de DNA, mediante la formación de enlaces fosfodiéster entre ellos.

**DNA Polimerasa.** Enzima que agrega nucleótidos a una cadena de DNA en sentido 5' – 3' durante su replicación.

**Electroforesis.** Método de separación de moléculas que consiste en someter la mezcla a un campo eléctrico de manera que las moléculas migrarán de acuerdo a su tamaño y su carga eléctrica.

**Enzimas de restricción.** Son endonucleasas de origen bacteriano, que constituyen en estos organismos un mecanismo de defensa contra los DNA extraños. Son enzimas que cortan los enlaces fosfodiéster del material genético a

partir de una secuencia que reconocen. Las mismas permiten cortar DNA de hebra doble, donde reconocen secuencias palindrómicas (secuencias que se leen igual en ambas direcciones).

**Evolución.** Proceso continuo de transformación de las especies a través de cambios producidos en sucesivas generaciones, y que se ve reflejado en el cambio de las frecuencias alélicas de una población.

**Gen.** Secuencia completa de ácidos nucleicos necesaria para la síntesis de un producto génico funcional (polipéptido o RNA).

**Genoma.** Toda la información genética contenida en una célula, incluyendo a los genes y a otras secuencias de DNA.

**Horquilla de replicación.** Durante la replicación, es la región del DNA en la cual las cadenas progenitoras se separan y la DNA polimerasa copia los modelos originales.

**Infección.** Establecimiento de un parásito dentro de una planta hospedante. Infección sistémica. Infección en la que el patógeno está distribuido por todo el organismo, en vez de concentrarse en una zona.

**Inoculación.** Arribo o transferencia de un patógeno sobre su hospedante.

**Inóculo.** Patógeno o partes de él que causan infección; partes de los patógenos que entran en contacto con el hospedante.

**Inóculo primario.** Patógeno o esporas de éste que sobreviven al verano o invierno y que causan la infección primaria.

**Kilobase (Kb).** Unidad de longitud de ácidos nucleicos correspondiente a 1000 nucleótidos. Se abrevia como kb para ácidos nucleicos de hebra simple.

**Mapa de restricción.** Conjunto de puntos de corte, que un DNA (desde el de un plásmido hasta un cromosoma entero) tiene para un conjunto de endonucleasas de restricción.

**Marcador molecular.** Cualquier segmento de DNA cuya secuencia nucleotídica varía (es polimórfica) en distintos organismos y que por eso mismo puede servir para reconocerlos.

**Mutación.** Cambio, delección o inserción de nucleótidos en un sitio particular de una secuencia de DNA o RNA, que es heredable y que puede o no tener efecto en el fenotipo del organismo donde se ha presentado.

**Nucleótidos.** Unidades moleculares elementales, que enlazados uno a continuación de otro, constituyen los ácidos nucleicos. Químicamente están formados por un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada.

**Oligonucleótidos “primers”.** Secuencia corta de ácido nucléico, necesaria para el inicio de la amplificación de una región genómica específica.

**Origen de replicación.** Sitio específico de DNA en el cual se inicia su replicación.

**Pares de bases (pb).** Nucleótidos complementarios en una molécula de DNA o RNA.

**Plásmido.** Molécula de DNA cerrada, circular que se multiplica de forma autónoma en la célula y puede pasar de unas células a otras. Es bastante común en las bacterias.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).**

Técnica de amplificación genética que permite obtener millones de copias de un determinado fragmento de DNA o RNA.

**Recombinación genética.** Formación de moléculas quiméricas de ácidos nucleicos mediante el intercambio de fragmentos de dos moléculas distintas.

**RFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción).** En este procedimiento el DNA es fragmentado mediante enzimas de restricción. El resultado arroja diferentes fragmentos de DNA de distinta longitud que son separados mediante electroforesis en gel de agarosa.

**RNA (ácido ribonucleico).** Polímero compuesto de cuatro unidades moleculares diferentes denominadas ribonucleótidos (A, G, C y U), que contienen el azúcar ribosa.

**Secuencia.** Forma en que se encadenan los nucleótidos a lo largo de las cadenas de DNA o RNA (o los aminoácidos en una proteína).

**Sinergismo.** Parasitismo concurrente que sufre un hospedante por dos patógenos, en el que los síntomas u otros efectos producidos son más notables que en el caso del conjunto de síntomas que causa cada patógeno por separado.

**Síntoma.** Reacciones o alteraciones internas y externas que sufre una planta como resultado de su enfermedad.

**Variabilidad genética.** Variación en el material genético de una población o especie.

## Índice figuras

<b>Figura 1.</b> Diferentes tipos de climas en el estado de Sinaloa .....	9
<b>Figura 2.</b> Distribución de virus de las plantas por familia .....	14
<b>Figura 3.</b> Distribución de los begomovirus en las diferentes familias de plantas reportadas en la ICTV.. .....	19



## Resumen

El conocimiento sobre la diversidad de los Geminivirus proviene principalmente del estudio de infecciones observadas en plantas de importancia agronómica, pero en la actualidad, las investigaciones se han enfocado en las plantas no cultivadas, porque se ha observado que la diversidad de Geminivirus en estas es muy amplia. Además, las plantas no cultivadas pueden actuar como reservorio tanto de virus “nativos” adaptados a ellas, como de virus ya identificados que son conocidos por sus devastaciones causadas en plantas de interés agrícola, lo cual podría producir la aparición de enfermedades emergentes en los cultivos. En el presente trabajo, se realizaron colectas de plantas no cultivadas en los diferentes ecosistemas naturales y agroecosistemas del noroeste de México. Las familias de plantas no cultivadas, *Asteraceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae* y *Solanaceae* resultaron ser las predominantes en los puntos de colecta y en el 78% de muestras se detectó la presencia de begomovirus.

La especie *Rhynchosia minima* (perteneciente a la familia *Fabaceae*) la encontramos distribuida por todo el estado de Sinaloa y además comúnmente presenta síntomas asociados a begomovirus. Por lo cual, nos enfocamos en caracterizar molecular y biológicamente al begomovirus asociado a los síntomas observados en campo, obteniendo el aislado RhGMV-[Sin]. Nosotros llevamos a cabo bioensayos donde pudimos corroborar que RhGMV-[Sin] asociado con otros begomovirus puede desencadenar una enfermedad emergente. Por último, para dar mayor comprensión a este tipo de enfermedades ocasionadas por begomovirus, se analizaron molecularmente muestras de sandía, donde obtuvimos la caracterización de WmCSV-[Mx], cabe señalar que este es el primer reporte de este virus en el continente americano, lo cual es de suma importancia por su potencial riesgo en generar una enfermedad emergente al asociarse con begomovirus nativos.

## Abstract

The knowledge on the diversity of the Geminiviruses comes mainly from the study of infections observed in plants of agronomic importance, but at present, the investigations have focused on the noncultivated plants, because it has been observed that the diversity of Geminivirus in these is very wide. In addition, uncultivated plants can act as reservoirs of both "native" viruses adapted to them, and of already identified viruses that are known for their devastation caused in plants of agricultural interest, which could produce the appearance of emerging diseases in crops. . In the present work, collections of non-cultivated plants were carried out in the different natural ecosystems and agroecosystems of northwestern Mexico. The families of non-cultivated plants, *Asteraceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae* and *Solanaceae* were found to be predominant in the sampling points and in 78% of samples the presence of begomovirus was detected.

The species *Rhynchosia minima* (belonging to the family *Fabaceae*) is found distributed throughout Sinaloa and also commonly presents symptoms associated with begomovirus. Therefore, we focused on molecularly and biologically characterization of the begomovirus associated with the symptoms observed in the field, obtaining the isolate RhGMV-[Sin]. We carried out bioassays where we could corroborate that RhGMV-[Sin] associated with other begomoviruses can develop an emerging disease. Finally, to give greater understanding to this type of diseases caused by begomovirus, watermelon samples were molecular analyzed, where we obtained the characterization of WmCSV-[Mx], this is the first report of this virus in the American continent, which is of great importance because of its potential risk in generating an emerging disease when associated with native begomoviruses.

# Capítulo 1

## I. Introducción general

Los estudios de virus en las plantas se han enfocado principalmente a las enfermedades que afectan los cultivos agrícolas dejando como actores secundarios a las plantas no cultivadas; así mismo los estudios ecológicos se han dirigido intensamente a los sistemas naturales, alejándose de la perspectiva agrícola (Malmstrom, *et al.*, 2011). Por lo general, los ecosistemas naturales se asocian a la imagen de una diversa vegetación natural, en cambio un agroecosistema se traduce a un denso campo de cultivo.

La aparición de los virus en las plantas es un proceso complejo, parcialmente comprendido, ya que involucra múltiples factores ecológicos y genéticos que pueden considerarse como eventos consecutivos: primero, el encuentro entre el virus y el nuevo huésped; segundo, el virus debe adaptarse al nuevo huésped para que la infección sea lo suficientemente efectiva para asegurar su transmisión; y, por último, la dinámica epidemiológica debe cambiar para optimizar la transmisión al nuevo huésped (Sherwood, 1997).

Durante más de 50 años se ha estudiado el papel que desempeñan las plantas no cultivadas en la ecología de los virus que infectan los cultivos de importancia económica (Anderson *et al.*, 2004). La importancia epidemiológica de una especie no cultivada como reservorio de virus para cualquier cultivo es frecuentemente incierto, ya que, incluso cuando se reconoce como un huésped natural de virus, la planta sólo juega un papel secundario en su mantenimiento. En este caso estas plantas se consideran de menor importancia, ya que en muchas ocasiones no presentan síntomas (Malmstrom *et al.*, 2005).

La biología de los virus se altera principalmente por la expansión en el rango de huéspedes naturales, una mayor adaptación para poder infectar huéspedes introducidos, introducción de vectores nuevos y más eficientes y la introducción de variantes de los biotipos ya existentes en el ecosistema (Jeger *et al.*, 2006). Estos factores se deben considerar como parte del origen de la diversidad de virus y enfermedades emergentes, incluyendo al cambio climático,

demografía humana, cambios de población, cambios en el uso del suelo y control de los huéspedes naturales de los virus. Específicamente, se considera que la baja biodiversidad en los agroecosistemas, en términos de riqueza en especies de plantas de cultivo y su genética, favorecerá positivamente la aparición de enfermedades emergentes (Stukenborck, et al, 2008 and Burdon, et al, 1982).

La interacción de un ecosistema natural con un agroecosistema produce diferentes escenarios que pueden ocasionar enfermedades emergentes. Estos pueden ser variados: la emergencia de un virus puede provenir de la flora nativa y propagarse naturalmente por vectores (*B. tabaci*); los virus se pueden propagar mediante vectores en plantas introducidas que estaban infectadas en su ecosistema nativo; la introducción de vectores más eficientes puede infectar diversas plantas; plantas introducidas tienen el potencial de infectar mediante vectores de virus de la flora nativa; el aumento de reservorios de virus se puede incrementar por la introducción de plantas.

La aparición de una enfermedad emergente requiere que un virus infecte a un nuevo huésped desde el reservorio, esto es, el huésped natural puede ser una planta no cultivada o un cultivo hortícola. Este primer encuentro entre el virus y el huésped se denomina "*spillover*". La adaptación del virus al nuevo huésped resulta en la dinámica de la infección haciéndose independiente desde el primer encuentro (*spillover*) (Sherwood, 1997), y eventualmente el virus podrá regresar del nuevo huésped al huésped natural.

Para una mejor comprensión en la emergencia de nuevas enfermedades es importante estudiar su ecología en reservorios naturales y su interacción con los agroecosistemas, donde los cambios en las prácticas agrícolas han jugado un papel en la promoción de las enfermedades emergentes. Estos cambios incluyen la intensificación, extensión y diversificación de las siembras; introducción de nuevos y cultivos vulnerables; pérdida de diversidad genética de los cultivos; fragmentación de la vegetación endógena; el uso excesivo de control químico; el empleo de irrigación en áreas secas para abastecer los cultivos en todas las épocas del año (Roger, 2009).

Así como las plantas no cultivadas, los cultivos hortícolas son afectados severamente por las infecciones causadas por begomovirus. Estos virus ocasionan enfermedades las cuales generan importantes pérdidas económicas en los cultivos (Fargette *et al.*, 2006; Rybicki and Pietersen, 1999; Seal *et al.*, 2006). Los begomovirus causan enfermedades extremadamente severas en un amplio rango de cultivos alrededor del mundo, Casava en Africa, frijol, tomate, chile, pepino en America y algodón en Asia (Nagata, *et al.*, 2016).

## II. Marco Teórico

Los estudios de virus en plantas se han enfocado principalmente a las enfermedades que afectan los cultivos agrícolas dejando como actores secundarios a las plantas silvestres; así mismo los estudios ecológicos se han dirigido intensamente a los sistemas naturales, alejándose de la perspectiva agrícola. Sin embargo; el trabajo en conjunto de estas ciencias generaría una mejor comprensión de la evolución de las enfermedades basándose en una perspectiva ecológica y adicionalmente generaría grandes avances en la biología básica o aplicada. Con la finalidad de conjugar nuevamente la ecología y virología. Mike Thresh en 1978 creó el Comité Internacional de la Sociedad para la Patología de Plantas, organizándose el primer simposio en 1981 en Oxford, lugar donde se le designó a dicho comité responsable del estudio de enfermedades en poblaciones de plantas silvestres (Malmstrom, *et al.*, 2011).

Para una mejor comprensión en la evolución de los virus y emergencia de nuevas enfermedades es importante estudiar su ecología en reservorios naturales y su interface con los agroecosistemas, basándose en el complejo sistema de interacción virus-huésped-vector, para la búsqueda de fuentes de infección que afectan los cultivos comerciales. Durante más de 50 años se ha estudiado el papel que desempeñan las plantas silvestres en la ecología de los virus que infectan los cultivos de importancia económica (Anderson *et al.*, 2004). La importancia epidemiológica de una especie silvestre como reservorio de virus para cualquier cultivo es frecuentemente incierto, ya que, incluso cuando se reconoce como un huésped natural de virus, la planta sólo juega un papel secundario en su mantenimiento. En este caso estas plantas se consideran de menor importancia, ya que en muchas ocasiones no presentan síntomas. En las poblaciones mixtas de especies de plantas silvestres, los virus pueden tener un impacto sobre la estructura y la dinámica de la comunidad por la disminución de la capacidad competitiva y reproductiva de las plantas infectadas (Malmstrom *et al.*, 2005). Entre la interface de un ecosistema natural y un agroecosistema se producen

diferentes escenarios que pueden ocasionar enfermedades emergentes. Estos pueden ser variados: la emergencia de un virus puede provenir de la flora nativa y es propagado naturalmente por vectores; los virus se propagan mediante vectores en plantas introducidas que estaban infectadas en su ecosistema nativo; por la introducción de vectores más eficientes para infectar diversas plantas; plantas introducidas se infectan mediante vectores de virus de la flora nativa; el aumento de reservorios de virus se incrementa por la introducción de plantas. Además, la intensificación, diversificación y extensión agrícola aumentan el contacto entre los cultivos y la flora nativa (Roger, 2009; Thresh, 2006; Anderson, *et al.*, 2004). Para una mejor comprensión en la aparición de enfermedades emergentes que ocasionan epidemias en las diversas poblaciones de plantas, requiere del conocimiento de la biología del parásito, en este caso los begomovirus (Dobson *et al.*, 2001).

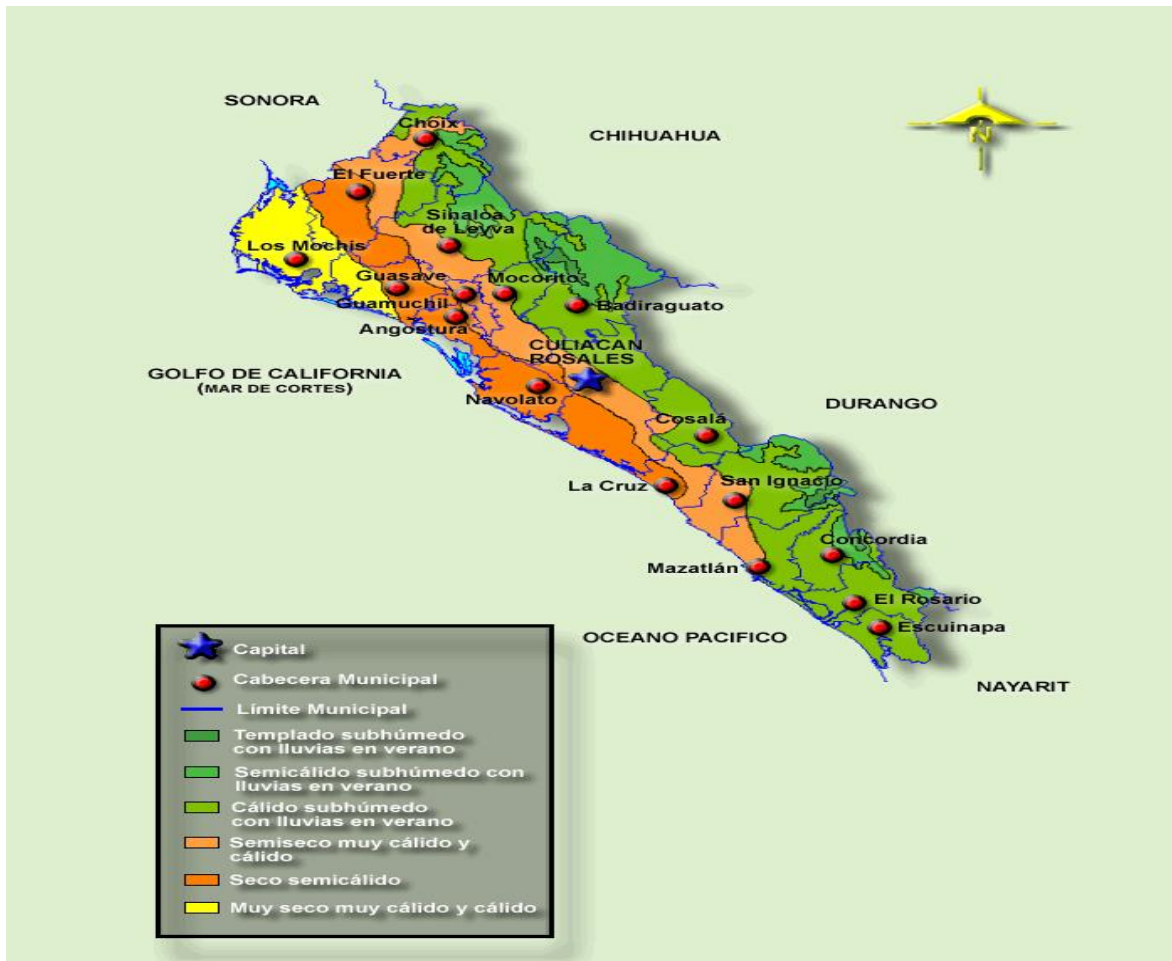
La biología de los virus se altera principalmente por la expansión en el rango de huéspedes naturales, una mayor adaptación a infectar huéspedes introducidos, introducción de nuevos y más eficientes vectores y la introducción de vectores variantes de los biotipos a existentes en el ecosistema (Jeger *et al.*, 2006). El intercambio genético que se produce durante la recombinación y pseudorecombinación se ha asociado frecuentemente con los cambios y la expansión del rango de huéspedes, así como la aparición de enfermedades causadas por virus nuevos (Gibbs *et al.*, 2008). Otros factores involucrados incluyen la adaptación de variantes más agresivas existentes dentro de las poblaciones de virus, sinergismo, cambios genéticos resultantes del aislamiento geográfico y la presencia satélites de ácidos nucleicos (Roger, 2009). La dinámica de las epidemias de virus de plantas y las pérdidas que provocan son propensos a ser influenciados, en gran medida, por factores ambientales, tales como el cambio en las precipitaciones, el aumento de la temperatura y mayores velocidades de viento; indirectamente, también son influenciados por las alteraciones regionales en las áreas cultivadas y la diversificación de los cultivos, así como los cambios en la distribución, abundancia y actividad de los vectores.



## **2.1 Ecosistemas y Reservas naturales del Estado de Sinaloa**

La altitud en Sinaloa va desde los 0 hasta los 2800 mts sobre el nivel del mar y se encuentra ubicado geográficamente en zonas subtropicales e intertropicales, lo que cual ocasiona que gran parte de su territorio presente altas temperaturas; mientras que el resto, con mayor altura sobre el nivel del mar, muestra temperaturas más bajas. Esta característica ambiental, en relación con la precipitación que va de menos de 300 a más de 1 500 mm, ha dado lugar a la presencia de climas cálido subhúmedo con lluvias en verano, semiseco muy cálido y cálido, seco muy cálido y cálido, semicálido subhúmedo con lluvias en verano, muy seco muy cálido y cálido, templado subhúmedo con lluvias en verano y seco semicálido. Sinaloa tiene una superficie de 58,092 km<sup>2</sup> y se ubica en el noroeste de México, entre los paralelos 22°30'40" y 27°02'42" de latitud norte y entre los meridianos 105°23'20" y 109°28'48" de longitud oeste (INEGI, 2010). En este territorio es posible observar la zona de la llanura costera que se ubica entre los 0-100 msnm, la zona de pie de monte que se localiza de los 1,300 msnm y, la zona montañosa que llega hasta los 2,780 msnm en su punto más alto.

Rzedowski (1978) considera 10 tipos de vegetación para México y siete de estos se presentan en Sinaloa, los cuales son el bosque espinoso, bosque tropical caducifolio, bosque de coníferas, bosque de encinos y vegetación acuática y subacuática; y en menor área el bosque mesófilo y el bosque tropical subcaducifolio.



**Figura 1.** Diferentes tipos de climas en el estado de Sinaloa

Dada la gran diversidad de ecosistemas en el Estado de Sinaloa, se cuenta con 11 reservas naturales (Tabla 1), las cuales se definen como el área dentro de un territorio, que se encuentra protegida porque ostenta una inconmensurable importancia para el mantenimiento y desarrollo de la flora, fauna y vida silvestre del lugar en el cual está emplazada. En Guasave, se ubica la reserva natural de La Uba, donde el principal atractivo es la belleza de su paisaje siempre verde y fresco con una gran variedad de árboles frondosos, follaje espeso de plantas de poca altura. La zona de reserva es un terreno con una extensión de 18 hectáreas que no están explotadas, carece de caminos por donde circular y no es lugar para acampar. Esta reserva se ubica en el centro del corazón agrícola de México, ya que el municipio cuenta con 210,000 has. altamente productivas en alimentos. El

área presenta un suelo aluvial compuesto en su mayoría de arena sin material gravoso, es permeable con materiales no consolidados, el manto se localiza a 3 metros de profundidad. Se desarrolla vegetación riparia compuesta por álamos principalmente, vegetación natural secundaria que representan a la selva baja caducifolia. Tiene una topografía plana con pequeñas ondulaciones y talud variable a orillas del Río Sinaloa. El clima es seco, muy cálido.

Áreas Naturales protegidas de control estatal del Estado de Sinaloa		
Nombre	Superficie	Ubicación
Mineral de Nuestra Señora de la Candelaria	1256-01-00 Has.	Municipio de Cosalá
Navachiste	13,937-51-38.961 Has.	Municipio de Guasave y Ahome
Islas del Municipio de Mazatlán identificadas como: Islas Pájaros; Islas Venados; Islas Lobos; Isla Cordones; Isla Hermano del Norte; Isla Hermano del Sur; Isla Piedra Negra; Isla Roca Tortuga; La Playa el Verde Camacho	---	Municipio de Mazatlán
Cerro de la Máscara	3-19-24.59 Has.	Municipio de El Fuerte
La Cueva del Murciélago del Ejido Topo Viejo	6,020 M2- 00-60-20 Has.	Municipio de Ahome
La Uba	17-88-00 Has.	Municipio de Guasave
"La Alameda" o "Álamos Cuates"	27-00-00 Has.	Municipio de Mocorito
Surutato	31,242-16-54.068 Has.	Municipio de Badiraguato
Isla de Orabá	4-00-00 Has.	Municipio de Culiacán
Vado Hondo y Gruta Cosalá	3,842-49-67.481 Has.	Municipio de Cosalá
El Palmito	4,954-06-44.530 Has.	Municipio de Concordia

**Tabla 1.** Reservas naturales ubicadas en el estado de Sinaloa

## **2.2 Agroecosistemas del Estado de Sinaloa**

Los Agroecosistemas son sistemas antropogénicos, es decir, su origen y mantenimiento van asociados a la actividad del hombre, que ha transformado la naturaleza para obtener principalmente alimentos. La excesiva intensificación de las actividades agrícolas ha comportado, en muchos casos, la drástica transformación del paisaje, el empobrecimiento de los suelos y la aceleración de los procesos irreversibles de erosión (Romero et. al., 2005). Uno de los aspectos más interesantes es que cinco de las doce familias de cultivos proporcionan aproximadamente el 75% del suministro mundial de alimentos y las mismas cinco familias pertenecen a las plantas no cultivadas que sugieren que los cultivos tienen un origen taxonómico y quizás común.

Sinaloa es un estado que destina la mayor parte de su territorio a actividades agrícolas y anualmente sus cultivos son severamente afectados por enfermedades virales que se reflejan en marcadas pérdidas económicas. La investigación de estas enfermedades se ha enfocado principalmente en los cultivos; sin embargo, la ecología del estado es muy diversa, teniendo microecosistemas que van desde zonas serranas hasta zonas costeras. En dichos ecosistemas naturales, podemos encontrar agroecosistemas aledaños que están en contacto directo con la flora nativa que pueden ser hospederos naturales de virus; por lo que sería de gran importancia tomar en cuenta el punto de vista ecológico para la comprensión de las enfermedades virales emergentes y así poder predecir la aparición de una enfermedad emergente. Tales influencias modifican la geografía del estado y por ende la abundancia relativa de los virus, sus rangos de propagación, la efectividad de la resistencia a la infección por virus por parte de los huéspedes, la fisiología de la interacción virus-huésped, el ritmo de la evolución del virus y la adaptación del huésped. Sin embargo, la magnitud de tales efectos sobre la frecuencia y duración de la epidemia viral puede variar dependiendo del fitosistema y la región geográfica, por lo que es difícil generalizar (Garrett et al, 2006).

### **2.3 Los virus y su ecología**

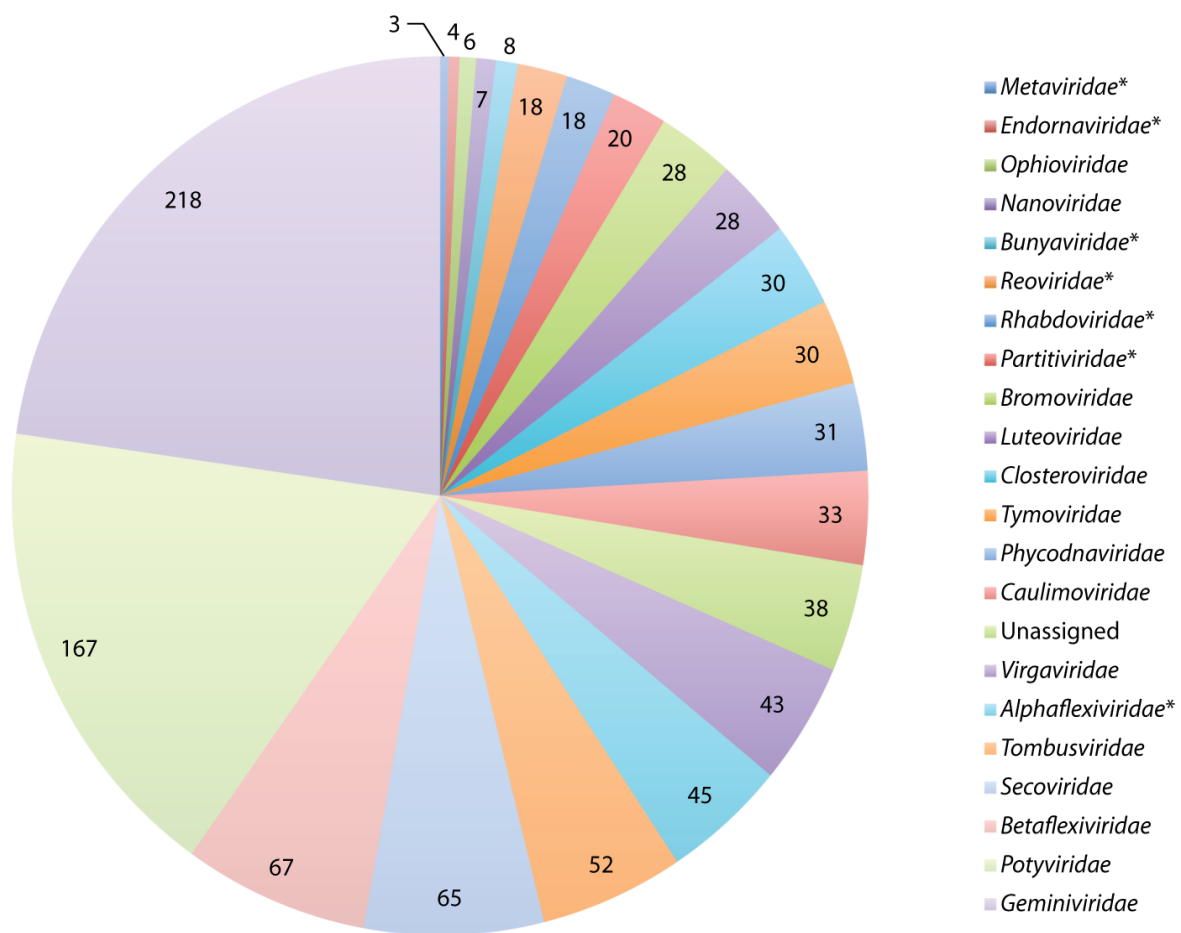
El término virus involucra el significado de cualquier sustancia nociva y eventualmente se utilizó para designar todas las infecciones causadas por microbios (Webster y Granoff, 1994). Sin embargo, según Strange (2006), el significado de virus en latín es veneno. Se componen generalmente por ácido ribonucleico (RNA) de cadena simple y en algunos casos por ácido desoxirribonucleico (DNA) de cadena simple o doble. Los virus normalmente están encapsulados en una capa proteica o lipoproteínas y no forman una estructura celular (Agrios, 2005).

Actualmente, existen más de 2800 especies de virus reconocidos en el mundo por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) (ICTV, 2013). Los virus de las plantas están muy extendidos en la naturaleza donde operan en asociación íntima con sus hospederos y tienen un enorme potencial para causar efectos ecológicos imprevistos (Anderson et al., 2004). Los problemas son desafiantes. Como unidades genéticas transportables, los virus fluyen a través de las comunidades de plantas en los ecosistemas naturales, los cuales evolucionan a medida que interactúan entre sí, con sus hospederos, y con frecuencia con vectores. La capacidad de los virus de las plantas para causar enfermedades y recombinarse entre sí, da lugar a preguntas urgentes para la sociedad. Nuestra capacidad para responder a estas preguntas se ve limitada por la escasez de información básica sobre el alcance y la influencia de los virus de las plantas en los ecosistemas naturales y la influencia recíproca de los ecosistemas naturales de la dinámica y evolución de los virus de plantas. Estudios en los ecosistemas terrestres han encontrado cada vez más pruebas de infecciones por virus en un amplio rango de plantas silvestres hospederas, aun las influencias ecológicas y evolutivas de estos virus siguen siendo en gran parte inexplorado. Para hacer frente a esta falta de conocimiento crítico, el campo de la ecología del virus planta está resurgiendo de sus raíces históricas como una frontera científica en expansión que busca examinar las funciones ecológicas de los virus asociadas a las plantas y sus vectores en los ecosistemas naturales y

agroecosistemas; y la influencia recíproca de las propiedades de los ecosistemas en la distribución y evolución de los virus de plantas (Roossinck *et al.*, 2010). Hay aproximadamente 22 familias de virus de plantas en las que al menos un miembro es fitopatógeno. Dentro de estas familias, las más abundantes son la familia Geminiviridae (Roossinck 2012) (Figura 2). Para acelerar la reintegración de virología vegetal y ecología, en 2007 por la U. Melcher, C. Malmstrom fue fundada la Red internacional de Ecología de Virus de Plantas (PVEN), con una financiación inicial de la Fundación Nacional de Ciencias de EE.UU. Estos estudios ecológicos no pueden separarse de las investigaciones genéticas, dada la prevalencia de la variación genética para la resistencia y virulencia y la necesidad de un enfoque de ecología evolutiva para entender fenómenos como cambios de huésped y mayor agresividad en los diferentes aislados.

A nivel comunitario la organización de las enfermedades pueden conducir a disminuciones en la diversidad vegetal. La investigación sobre los agentes patógenos generalistas es particularmente importante, recientes trabajos analizan tanto las consecuencias ecológicas de los patógenos comunes (por ejemplo, la propagación de patógenos, competencia aparente) y el papel de las plantas relaciones filogenéticas en rangos de hospedantes. Los estudios de retroalimentación entre los microbios del suelo (incluyendo patógenos) y especies vegetales ha sido significativo, en parte porque ofrece nuevas maneras de explicar la coexistencia de múltiples especies en las comunidades vegetales. La investigación a nivel comunitario, a su vez, suele tener vínculos con estudios a nivel de ecosistemas. Trabajos recientes sugieren no sólo que los cambios de temperatura, gases de invernadero y los nutrientes pueden alterar los niveles de enfermedad sino también la planta de enfermedades y sus efectos pueden alterar las propiedades del ecosistema. Los estudios sobre enfermedades de las plantas son, pues, un componente importante de la investigación mundial sobre las enfermedades virales (Alexander *et al.*, 2010). La comprensión de la diversidad de virus y la influencia es mucho más limitada en los ecosistemas naturales que en los agroecosistemas, debido a la separación de las ciencias básicas y aplicadas en el siglo 20. Las plantas silvestres se consideraron en la virología como

reservorios de infección para los cultivos, no como el tema principal de estudio (Cooper y Jones, 2006, Elena, 2011), mientras que las disciplinas ecológicas examinan las comunidades naturales rara vez se consideran los virus de las plantas (Harper, 1990). Por otra parte, muchos investigadores en todas las disciplinas asumieron que los virus infectan vegetación natural sin consecuencias, en parte sobre la base de la opinión de que los virus en la naturaleza por lo general coevolucionan con los hospederos a un estado de menor virulencia y agresividad.



**Figura 2.** Distribución de virus de las plantas por familia. Los números indican las especies de virus de las plantas en cada familia reconocida por el Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus.

Los números indican las especies de virus de las plantas en cada familia reconocida por el Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus. Los



nombres de familia con un asterisco incluyen especies que infectan a otro huésped no vegetal.

## **2.4 La Familia Geminiviridae**

La familia *Geminiviridae* es una de las dos familias de virus de las plantas con genomas de DNA circulares singulares (Hull, 2002). Los miembros de la familia *Geminiviridae* poseen un genoma circular de DNA monocatenario (ssDNA). Sus genomas se encuentran dentro de partículas icosaédricas geminadas. La familia *Geminiviridae* está formada por nueve géneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus*, *Begomovirus*, *Becurtovirus*, *Turncurtovirus*, *Eragrovirus*, *Capulavirus* y *Grablovirus* (Van Regenmortel *et al.*, 2000, Varsani *et al.*, 2014, ICTV, 2013, Varsani *et al.*, 2017). Las enfermedades de los geminivirus se caracterizan por diferentes síntomas como las hojas rizadas, rugosidad, mosaicos, retraso en el crecimiento de las plantas, clorosis y una gran disminución en la producción vegetal (Vega y Rivera-Bustamante, 2001). Estos síntomas difieren según el huésped, la etapa de cultivo; Virus y/o géneros y condiciones ambientales (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2000). Se debe considerar la posible propagación de los geminivirus y su vector de insectos a nuevas ubicaciones e infección de nuevos hospedadores de plantas (Schumann y D'Arcy, 2010; Zuñiga-Vega y Ramírez, 2002; Melendrez-Bojorquez *et al.*, 2016). Los geminivirus han sido responsables por un gran número de enfermedades virales en los trópicos, especialmente en cultivos de frijol y tomate (Van regenmontel *et al.*, 2000; Roosinck, 2011). Los geminivirus se han convertido en los patógenos más importantes de las plantas en las zonas tropicales y subtropicales, ya que son la causa de diferentes enfermedades que perjudican la producción de cultivos económicamente importantes.

### **2.4.1 Género *Becurtovirus***

Este género se ha agregado recientemente a la familia, incluyendo dos especies reconocidas por la ICTV y su especie Beet curly top iran virus tipo es el

(BCTIV). Los becurtovirus poseen genomas de monopartita de aproximadamente 2,8 kb (ICTV, 2013).

#### **2.4.2 Género *Turncurtovirus***

En este género sólo hay una especie, el Turnip curly top virus. Tiene un genoma de monopartita de aproximadamente 2,9 kb (ICTV, 2013).

#### **2.4.3 Género *Eragrovirus***

En este género sólo existe una especie, Eragrostis curvula streak virus. Tiene un genoma monopartita de aproximadamente 2,7 kb (ICTV, 2013).

#### **2.4.4 Género *Mastrevirus***

En este género se incluyen 29 especies reconocidas y su especie tipo es el Maize streak virus (MSV). Estos virus son transmitidos por saltahojas de forma circular, no propagatoria y tienen genomas monopartita (ssDNA) de aproximadamente 2,6 kb (ICTV, 2013; Hull, 2002).

#### **2.4.5 Género *Curtovirus***

Incluye tres especies reconocidas por la ICTV, la especie tipo es el Beet curly top virus (BCTV) (ICTV, 2013), que tiene gran importancia económica e infecta la remolacha azucarera. Su genoma consiste en una molécula circular ssDNA de aproximadamente 2,6 a 2,8 kb. Son transmitidas por saltahojas de forma no circulante y propagativa e infectan plantas dicotiledóneas (Agrios, 2005).

#### **2.4.5 Género *Topocovirus***

La única especie de este género es el Tomato pseudo-curly top virus TPCTV y tiene un genoma de monopartita e infecta las plantas dicotiledóneas, este género se transmite principalmente por especies de la familia *Membracidae* como el insecto *Micrutalis malleifera* (Hull, 2002; ICTV, 2013).

#### **2.4.6 Género *Capulavirus***

La especie tipo es el *Euphorbia caputmedusae* latent virus e incluye tres especies más, el Virus de la hoja de la alfalfa, el Virus de la hoja rizada y el Virus latente de *Plantago lanceolata*.

#### **2.4.7 Género *Grablovirus***

La única especie de este género es el Grapevine red blotch virus. Y solo se ha encontrado infectando uvas.

#### **2.4.8 Género *Begomovirus***

Es el único género reportado en México, es el más diversificado y distribuido por todo el mundo. Infecta plantas dicotiledóneas, son transmitidos por mosquita blanca y presenta como miembro tipo al Bean golden mosaic virus (BGMV), al cual le deben su nombre (Goodman, 1984). La mayoría tiene un genoma dividido en dos componentes bipartitas denominadas comúnmente DNA-A y DNA-B. Se ha mencionado que cada componente se encapsula independientemente en la partícula viral, de tal forma que se requieren las dos partículas para causar la infección (Goodman *et al.*, 1980). De todos los begomovirus reportados solamente TYLCV tiene un genoma monopartita, excepto para el Tomato yellow leaf curl virus Thailand (TYLCV-Th) que tiene un genoma bipartita (Rochester *et al.*, 1994).

## **2.5 Género *Begomovirus*: organización genómica y su distribución en plantas cultivadas y no cultivadas**

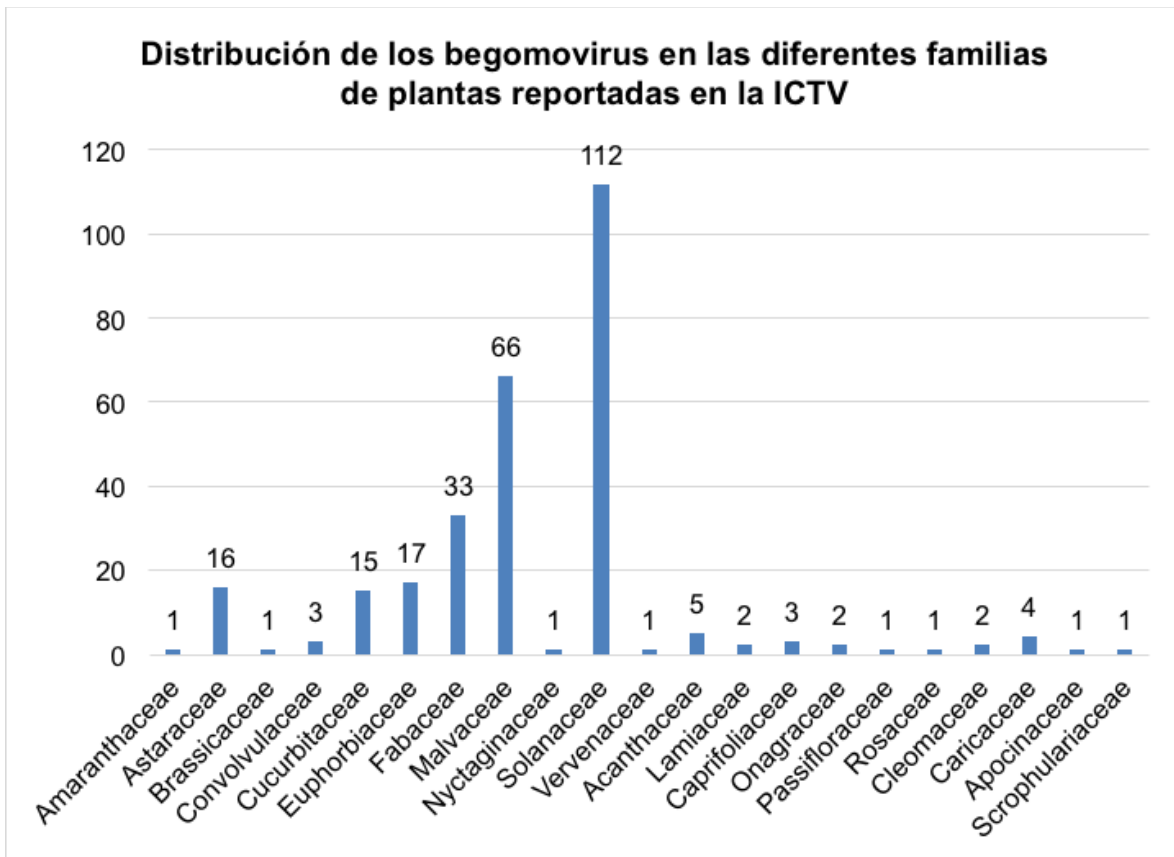
La mayoría de los begomovirus reportados en América o también denominados del nuevo mundo poseen un genoma bipartita, el cual se compone por dos moléculas de DNA denominadas DNA-A y DNA-B con un tamaño de 2.5 a 2.8 Kb los cuales se transcriben bidireccionalmente. En el DNA-A se identifican cinco marcos de lectura abierta, uno en el sentido del virión denominado AV1 (proteína de la capsida) y cuatro en la cadena complementaria denominados AC1 (proteína de replicación), AC2 (proteína de transcripción), AC3 (proteína potenciadora de replicación) y AC4 (desconocido). En el DNA-B se han identificado dos marcos de lectura abierta, ambos en el sentido del virión denominados BV1 (proteína de transporte nuclear) y BC1 (proteína de movimiento). El componente A contiene toda la información necesaria para la replicación y encapsulación del virus, mientras que el componente B codifica para proteínas involucradas en el movimiento viral célula-célula y a larga distancia.

Los begomovirus que carecen del DNA-B se les conocen como monopartitas y son comunes en el viejo mundo. Son pocos los begomovirus monopartitas reportados que han demostrado ser causantes de síntomas típicos de la enfermedad silvestre con sólo el DNA-A, como ejemplo está el Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate (TYLCV) y Virus del enrollamiento de la hoja del tomate (TYCV).

## **2.6 Distribución de especies de *Begomovirus* en diferentes familias de plantas**

El género begomovirus representa el 88,76% de las especies reportadas de toda la familia *Geminiviridae*, siendo el género con mayor diversidad. Los virus de este género han sido reportados en diferentes familias de plantas. Estos virus se han encontrado por primera vez en 21 familias diferentes de plantas (Figura 3), siendo la familia *Solanaceae* con 112 especies de begomovirus reportadas como las más estudiadas. Seguido sólo por *Malvaceae*, *Fabaceae*, *Euphorbiaceae*,

*Asteraceae* y *Cucurbitaceae* con al menos 15 especies begomovirus en cada una de las familias.



**Figura 3.** Distribución de los begomovirus en las diferentes familias de plantas reportadas en la ICTV. El número de cada barra representa la cantidad de especies de begomovirus de acuerdo a la última actualización de la ICTV.

## 2.7 Begomovirus en plantas no cultivadas

El continente Americano ofrece diversos ecosistemas donde los factores que impulsan la emergencia de virus (Anderson *et al*, 2004). En el norte del continente se han realizado trabajos acerca de la ecología de virus. En la reserva ecológica de los pastos altos, al noroeste de Oklahoma, se detectó la presencia de un nuevo timovirus en la planta silvestre *Asclepias viridis*, que resultó ser frecuente y abundante entre las poblaciones de plantas y podía infectar especies limitadas. Se determinó, mediante secuenciación, que este virus estaba estrechamente relacionado al Virus del mosaico amarillo de la *Kennedia*. Se monitoreó la población *Asclepias viridis* durante 5 años determinando un alto

porcentaje de plantas representativa de la reserva ecológica y regiones aledañas; sin embargo, en plantas del centro y sureste de Oklahoma no se detectó dicho virus (Min *et al.*, 2011). En Florida se han realizado estudios sobre la ecología de virus transmitidos por mosca blanca, determinándose a las plantas silvestres como nichos ecológicos de estos insectos y por ende, como reservorios de los virus. En el 2005 se detectó al Virus del amarillamiento de la vena del calabacín en calabacín y sandía, observándose severos daños al momento de la cosecha. Recientemente se detectó al Virus del arrugamiento de la hoja de las cucurbitáceas y al Virus del desorden de la deformación amarilla de las cucurbitáceas en cultivos de sandía (Adkins *et al.*, 2011).

En Brasil, *Bemisia tabaci* y begomovirus nativos coexistieron durante mucho tiempo sin afectar seriamente los cultivos. Esto cambió en 1970 con la intensificación e incremento en la producción de soya, la superficie sembrada aumentó de 1 millón a 13 millones de hectáreas en 1983. La soya es hospedante natural de *B. tabaci* por lo que el incremento en el área de siembra causó un marcado incremento en su población. Esto dio lugar a epidemias devastadoras del virus mosaico dorado del frijol en el cultivo de frijol común (*Phaseolus vulgaris*), que fue introducido desde Centroamérica mucho antes. Así, el factor crítico identificado para la emergencia fue la intensificación y extensificación agrícola de un huésped introducido que incrementó las poblaciones de vectores. Lo peor estaba aún por venir, cuando en 1990 llegó el biotipo B de *B. tabaci*, la cual tiene un mayor rango de huéspedes causó pérdidas sin precedentes en los cultivos (Morales y Anderson, 2001).

Las plantas silvestres pueden ser una fuente de inóculo primaria de begomovirus hacia los cultivos de importancia económica (Assunção *et al.*, 2006). El Virus del mosaico dorado de la *Rhynchosia minima* (RhGMV) se describió por primera vez en Honduras en 1999 infectando *Rhynchosia minima* (Potter *et al.*, 2000). *Rhynchosia minima* es una maleza muy común en Sinaloa y otras regiones del mundo. El RhGMV se transmite a frijol causando mosaicos, enanismo y distorsión de la hoja (Roye *et al.*, 1997). En México, el RhGMV fue reportado por primera vez en Chiapas infectando tabaco, recientemente fue reportado infectando

soya en el norte de Sinaloa (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2002, Méndez-Lozano *et al.*, 2006). Así mismo en el 2009 Hernández-Zepeda *et al.*, caracterizaron al Virus del mosaico amarillo de la *Rhynchosia minima* de Yucatán en plantas de *Rhynchosia minima* con síntomas visibles asociados a begomovirus; además analizaron plantas de *Desmodium Scorpiurus* en donde detectaron a este virus a través de patrones de restricción.

En India, se caracterizó un nuevo begomovirus infectado la planta silvestre *Rhynchosia minima*. Los análisis moleculares mostraron homologías del 84% para el componente A y para el componente B del 77%; por lo que se le consideró una nueva especie de begomovirus y el nombre que se propuso para este begomovirus es Virus del mosaico amarillo de la *Rhynchosia* de la India. (Jyothsna *et al.*, 2011). El género *Sida* es un grupo de plantas no cultivadas que están distribuidas tanto en el viejo como en el nuevo mundo. Varios begomovirus han sido caracterizados de diferentes especies de *Sida* en el nuevo mundo (Frischmuth *et al.*, 1997). En Costa Rica un begomovirus bipartita conocido como virus del mosaico dorado de la sida Costa Rica (*Sida* golden mosaic Costa Rica virus, SiGMCRV) fue aislado y caracterizado de *Sida rhombifolia*. (Hofer *et al.*, 1997). En Honduras dos begomovirus bipartitas conocidos como virus del mosaico dorado de la sida de Honduras (*Sida* golden Honduras mosaic virus, SiGMHV) y virus de la vena amarilla de la sida (*Sida* yellow vein virus, SiYVV) fueron aislados y caracterizados de *Sida rhombifolia* (Frischmuth *et al.*, 1997). En Brasil, dos componentes A (DNA-A) han sido secuenciados y caracterizados de *Sida* sp. (Fauquet *et al.*, 2003).

Recientemente en Sinaloa se identificó y se secuenció a un nuevo begomovirus infectando *Sida rhombifolia* llamado Virus del mosaico de la sida de Sinaloa (*Sida* Mosaic Sinaloa Virus, SiMSV) (Perea-Araujo, 2006). Y en el ciclo agrícola 2010-2011 se detectó al Virus del mosaico de la sida de Sinaloa infectando cultivos de importancia agrícola (Domínguez-Duran, 2011). En el 2011 en Brasil se caracterizó molecular y biológicamente un nuevo begomovirus infectando plantas nativas *Euphorbia heterophylla*, las cuales mostraban mosaicos amarillos brillosos. La secuencia del componente A comparte un 87.3% de



identidad con el Virus del mosaico de la euphorbia de Peru por lo cual fue clasificado como perteneciente a una nueva especie de begomovirus, tentativamente llamados Virus del mosaico amarillo de la Euphorbia. (Fernandes, *et al.*, 2011). América latina y el Caribe han sido los más afectados por el complejo planta-patógeno-planta silvestre transportado por su insecto vector, la mosquita blanca. La mayoría de los begomovirus reportados en plantas silvestres se han encontrado en la familia *Malvaceaea*.

En el 2009 Andre P. Graham *et al.*, reportaron dos componentes distintos de DNA-A y un componente del DNA-B, estos fueron amplificados, clonados y secuenciados de plantas de *Malvastrum americanum* en Jamaica denominado Malvastrum yellow mosaic Helshire virus (MaYMHV), el otro DNA-A y DNA-B representan una especie de virus nuevo cuyo nombre tentativo fue Malvastrum yellow mosaic Jamaica virus (MaYMJV). El DNA-A apartir de MaYMJV y MaYMHV están más estrechamente relacionados entre sí y el grupo filogenéticamente con begomovirus que infecte a las plantas silvestres pertenecientes a la familia *malvaceae* en Cuba y Florida. El componente de DNA-B de MaYMJV es muy similar a la de Sida mosaic virus (SiGMV) y Sida golden mosaic Cosate Rica virus (SiGMCRV). En el 2010 se comprobó la presencia de begomovirus en *Sida rhombifolia* y *Sida micrantha* detectando Sida yellow mosaic virus (SiYMV) y Sida micrantha mosaic virus (SimMV), que fueron asociados en los cultivos de tomate por ser reservorios naturales (Castillo-Urquiza, 2010). En este mismo año en cuba presentaron la secuencia completa del genoma de dos cepas de begomovirus bipartitas Sida golden mosaic Florida virus (SiGMFV) infectando *Malvastrum coromandelianum* demostrando en el análisis filogenético que SiGMFV DNA-A se encuentra en un grupo que incluye begomovirus infectando malezas malvaceus en el Caribe (Fiolla-Olivé, 2010).

Las plantas no cultivadas son importantes como fuentes de inóculo de begomovirus. Ellas producen nuevos virus y cepas, actuando como "recipientes de mezcla" para la recombinación y la variedad entre los begomovirus (Azhar *et al.*, 2010, Mubin *et al.*, 2010b). El resultado de la interacción entre begomovirus y

plantas huéspedes también depende de la capacidad del virus para contrarrestar la defensa de la planta (Moissiard y Voinnet, 2004, Vanitharani *et al.*, 2004).

## **2.8 Importancia de las Plantas no cultivadas como fuente de infección primaria de virus**

Las plantas no cultivadas son la vegetación que no está asociada al agroecosistema. Estas actúan como reservorios de muchas especies de begomovirus, sin embargo, no está claramente definido cuál es su importancia significativa en su contribución a la masiva diversidad e incidencia observada en años recientes. En esta situación, los virus se mantienen persistentes en el ecosistema y son consecuentemente transmitidos de plantas enfermas a plantas sanas (Fernández *et al.*, 2007). Las plantas no cultivadas desempeñan un rol importante como fuente de inóculo primario, en la propagación y difusión de los virus que afectan a las plantas cultivadas, ellas pueden cumplir tres roles, no excluyentes, en la epidemiología de estas enfermedades: servir como reservorio de los virus, como reservorio de los vectores, o de ambos a la vez. Para que una especie de planta no cultivada sea importante como fuente de infección primaria de un virus, debe constituir una proporción relevante de la flora silvestre de dicha área y estar abundantemente infectada por el virus (Cho *et al.*, 1987 b). Las plantas no cultivadas que presentan crecimiento todo el año pueden actuar como portadoras de virus y focos de infección entre estaciones de cultivo, permitiendo la sobrevivencia de éstos en ausencia de cultivos susceptibles en el campo. Posteriormente pueden actuar como fuentes de inóculo primario para virus cuando comienzan a establecerse (Roye *et al.*, 1997).

Desde principios del siglo XX, se ha acumulado una extensa bibliografía referente a este tema, lo que revela la gran importancia como fuente primaria de propagación de virus en los países desarrollados. Las plantas no cultivadas que se encuentran junto a las plantas cultivadas y algunas de ellas son importantes reservorios para begomovirus, estos pueden emerger como patógenos de plantas cultivadas y las epidemias asociadas a ellos han causado considerables pérdidas en diferentes cultivos de importancia económica en tanto regiones tropicales y

subtropicales, como en algunas regiones templadas (Anderson, 1997; Marshall *et al.*, 2003). Muchas de las plantas no cultivadas han sido relacionadas como hospedantes de este género de virus fitopatógenos en distintos países y debido a los estudios realizados se encuentran fuertemente relacionados a la familias *Malvaceae*, *Euphorbiaceae* y *Fabaceae* (Morales y Anderson, 2001) . Por lo anterior y los estudios realizados se ha demostrado que los begomovirus hospedados en plantas no cultivadas pueden ser transmitidos a distintos cultivos por su insecto vector, permitiendo la perduración de la infección entre las estaciones de cultivo y así asegurando la sobrevivencia de éstos en ausencia de cultivos susceptibles en el campo.

## **2.9 Plantas no cultivadas en México**

Dentro de las familias de plantas no cultivadas con más especies reportadas en CONABIO en México podemos mencionar la familia *Asteraceae* con 238 especies reportadas, familia *Fabaceae* con 74 especies de plantas reportadas y *Poaceae* con 134 especies de plantas (CONABIO 2014). En Sinaloa se estima la presencia de cerca de 3,000 especies de plantas vasculares, contenidas en cerca de 1,000 géneros y alrededor de 200 familias (Vega Aviña, 1997), de las cuales se sabe que muchas de estas familias son hospederas de virus fitopatógenos que pueden estar cumpliendo un rol epidemiológico importante en esos cultivos en los cultivos de hortalizas.

### **III. Justificación**

En los ecosistemas naturales, la diversidad de especies de plantas no cultivadas es muy diversa amplia y se ha reportado que muchas de estas especies vegetales actúan como reservorios naturales de muchas especies de begomovirus. En cambio, en los agroecosistemas la diversidad de plantas es baja, ya que únicamente son cultivadas entre cinco y seis familias diferentes de plantas, las cuales son severamente afectadas por begomovirus que son descritos en la literatura recurrentemente. Los begomovirus causan enfermedades como el Virus del mosaico dorado en Chile, el Virus de la vena amarilla del Chile, el Virus de la hoja amarilla y acucharada del tomate, el Virus del tomate chino de la Paz, el Virus de la hoja rizada de las cucurbitáceas y el Virus del mosaico dorado del frijol, las cuales impactan severamente en la productividad en los cultivos de Chile, tomate, pepinos, calabazas, tomatillo y frijol, lo cual genera pérdidas millonarias y baja tasa de empleo en los campos agrícolas.

Nuestra capacidad para responder a estos escenarios se ve limitada por la escasez de información básica sobre el alcance y la influencia de los virus de las plantas no cultivadas. En el noroeste de México, los problemas son desafiantes ya que existe una enorme cantidad de plantas no cultivadas, las cuales son hospederas naturales de begomovirus; donde es inevitable que los cultivos entren en contacto directo con las plantas no cultivadas infectadas por este tipo de virus, incrementando la posibilidad de ocasionar enfermedades emergentes que afectan directamente la producción hortícola, ocasionando enormes pérdidas económicas. Por lo tanto es de gran importancia la caracterización genómica de begomovirus en plantas de los ecosistemas naturales y agroecosistemas para tener una mejor comprensión de la ecología de virus de plantas y así determinar su capacidad de generar una nueva enfermedad.

#### **IV. Hipótesis**

La diversidad genética de begomovirus existente en ecosistemas naturales y agroecosistemas del noroeste de México, es un riesgo potencial en la inducción de enfermedades emergentes de en los cultivos hortícolas.

## **V. Objetivos**

### **5.1 Objetivo general**

- Caracterizar el genoma de begomovirus en ecosistemas naturales y agroecosistemas con riesgo potencial de transmisión a cultivos hortícolas en el noroeste de México.

### **5.2 Objetivos específicos**

- Analizar molecularmente las plantas colectadas en los ecosistemas naturales y agroecosistemas como reservorios del género *Begomovirus* en el estado de Sinaloa.
- Determinar la diversidad e infectividad de los begomovirus aislados de las principales familias de plantas colectadas en ecosistemas naturales en el estado de Sinaloa.
- Caracterizar molecular y biológicamente un begomovirus seleccionado en relación a su capacidad de generar una enfermedad emergente en una especie vegetal de importancia hortícola en el noroeste de México.

## Capítulo 2

### **Análisis molecular de plantas colectadas en ecosistemas naturales y agroecosistemas como reservorios potenciales Begomovirus en el estado de Sinaloa**

Manuscrito a ser sometido a la Revista Mexicana de Fitopatología (Mexican Journal of Phytopathology)

#### **Resumen**

Los virus del género begomovirus causan enfermedades como la *Vena amarilla del chile* y *Enrollamiento de la hoja amarilla en tomate*, por lo que representan un daño potencial en cultivos de importancia comercial. Sin embargo, poca atención se ha dedicado a estos virus en sus hospederos en los ecosistemas naturales. Para contribuir en la comprensión de la ecología de este tipo de virus en plantas no cultivadas, donde su biodiversidad puede ser un punto de emergencia de enfermedades donde los ecosistemas naturales se limitan con los agroecosistemas, realizamos colectas de plantas no cultivadas en ecosistemas naturales y agroecosistemas. Las plantas colectadas fueron analizadas mediante técnicas moleculares para la detección de begomovirus, encontrando su presencia en 97 muestras de 161 colectadas, las cuales pertenecen a 23 diferentes familias de plantas identificadas. Los resultados sugieren la presencia de begomovirus en las principales familias de plantas no cultivadas en el estado de Sinaloa, además, se identificó una especie de begomovirus introducido que tiene la capacidad de infectar prácticamente todas las familias de plantas no cultivadas tanto en los ecosistemas naturales y los agroecosistemas. Estos resultados son relevantes para identificar epidemias de virus fitopatógenos emergentes y plantear enfoques necesarios para lograr un control eficaz de las epidemias, además de mejorar la comprensión de lo que existe en nuestros ecosistemas naturales y poder predecir los futuros escenarios.

## Introducción

A nivel mundial la producción hortícola se ve afectada por diferentes bacterias, hongos y virus fitopatógenos Hull, 2002. Los Geminivirus constituyen una de las familias de virus de plantas más grandes (*Geminiviridae*) y toma su nombre de su partícula geminada. Sus genomas consisten en uno (monopartita) o dos (bipartita) moléculas de DNA circular de cadena sencilla (ssDNA). La familia *Geminiviridae* está representada por nueve géneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus*, *Begomovirus*, *Becurtovirus*, *Turncurtovirus*, *Eragrovirus*, *Capulavirus* y *Grablovirus* Varsani et al. 2014; 2017. Los geminivirus han sido responsables por un gran número de enfermedades virales en zonas tropicales y subtropicales, ya que son la causa de diferentes enfermedades que perjudican la producción de cultivos económicamente importantes como frijol y tomate. Van regenmontel et al. 2000; Roosinck, 2011.

El género *Begomovirus* es el más amplio de la familia *Geminiviridae* con mas de 320 especies actualmente reconocidas por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus ICTV (2016) (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>). Las enfermedades emergentes ocasionadas por begomovirus pueden ser infecciones simples o mixtas donde dos o más begomovirus se encuentran infectando una sola planta. Una enfermedad viral emergente según La Organización Mundial de la Salud (OMS) se define como "un virus que ha aparecido por primera vez en una población, o que puede haber existido anteriormente, pero que está aumentando rápidamente en su incidencia o alcance geográfico". Frecuentemente los virus emergentes presentan una incidencia aumentada en cierto nicho debido a cambios en el ambiente, el vector, el huésped o en el genoma viral Rojas y Gilbertson, 2008. Desde 1978 en los campos agrícolas de México se han identificado enfermedades ocasionadas por begomovirus; sin embargo, el primer reporte en el estado de Sinaloa fue hasta 1984 en plantas de tomate que mostraban una sintomatología de hojas enchinadas. por lo cual la enfermedad fue llamada como Virus del Tomate Chino. Desde entonces los esfuerzos para comprender estas enfermedades se han centrado en los cultivos hortícolas, tomando como actores secundarios a las



plantas no cultivadas de los ecosistemas naturales. Estas plantas actúan como reservorios de muchas especies de begomovirus; sin embargo, no se ha definido claramente su importancia en su contribución a la incidencia observada en años recientes. En esta situación, los virus se mantienen persistentes en el ecosistema y son transmitidos de plantas enfermas a plantas sanas Fernández et al. 2007.

El continente Americano ofrece diversos ecosistemas donde los factores impulsan la emergencia de virus, donde América latina y el Caribe han sido los más afectados por el complejo planta-patógeno-planta silvestre transportado por su insecto vector, la mosquita blanca (*B. tabaci*) Anderson et al. 2004. La mayoría de los begomovirus reportados en plantas silvestres se han encontrado en la familia *Malvaceae*, aunque existen muchos otros reportes de este tipo de virus infectando diferentes familias como lo son: *Fabaceae*, *Euphorbiaceae*, *Amaranthaceae*, *Astereaceae*, *Cucurbitaceae*, ICTV, 2016. Las plantas no cultivadas son importantes como fuentes de inóculo de begomovirus ya que en ellas se generan nuevas especies de virus, debido a que actúan como "recipientes de mezcla" para su recombinación y diversificación Azhar et al. 2012; Mubin et al. 2010. El éxito de la infección de los begomovirus depende de su capacidad para contrarrestar la defensa de la planta Moissiard, 2004; Voinnet, 2003; Vanitharani et al. 2004. Para que una planta no cultivada sea fuente importante de infección primaria de un virus, debe constituir una proporción relevante de la flora silvestre de dicha área y estar abundantemente infectada por el virus Cho et al. 1987b. Estas plantas que presentan crecimiento todo el año pueden actuar como portadoras de virus y son focos de infección entre las estaciones de los cultivos, permitiendo la sobrevivencia de éstos en su ausencia en el campo. Posteriormente pueden actuar como fuentes de inóculo primario para el establecimiento de los virus Roye et al. 1997.

Actualmente, existen más de 2800 especies de virus reconocidos en el mundo por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, ICTV (2013). Los estudios en los ecosistemas naturales han encontrado cada vez más pruebas de infecciones virales en un amplio rango de plantas no cultivadas, aunque las

influencias ecológicas y evolutivas de estos virus siguen siendo en gran parte inexploradas. Para hacer frente a esta falta de conocimiento crítico, el campo de la ecología del virus-planta está resurgiendo de sus raíces históricas como una frontera científica en expansión que busca examinar las funciones ecológicas de los virus asociadas a las plantas y sus vectores en los ecosistemas naturales y en los agroecosistemas Roossinck et al. 2010. Estos estudios ecológicos no pueden separarse de las investigaciones genéticas, dada la prevalencia de la variación genética para la resistencia y virulencia, así como la necesidad de comprender diferentes fenómenos como lo son los cambios de huésped, mayor virulencia y agresividad en los diferentes aislados. Uno de los aspectos más interesantes es que cinco de las doce familias de cultivos de importancia económica proporcionan aproximadamente el 75% del suministro mundial de alimentos.

El presente estudio analiza la presencia de begomovirus en las plantas no cultivadas de los ecosistemas naturales y agroecosistemas del estado de Sinaloa, y determina el riesgo potencial en la inducción de enfermedades emergentes en cultivos hortícolas de alta importancia comercial, además de proveer información sobre la ocurrencia de infecciones naturales en las plantas no cultivadas. De esta manera se generó conocimiento sobre los nichos ecológicos que ha creado el begomovirus introducido a las plantas nativas y a los agroecosistemas del estado de Sinaloa. La hipótesis a evaluar fue que existe una alta diversidad genética de begomovirus en los ecosistemas naturales y agroecosistemas del estado de Sinaloa. Los resultados obtenidos soportan la hipótesis planteada.

## **Materiales y métodos**

### **Material vegetal**

Se colectaron secciones foliares de las plantas no cultivadas utilizadas en este trabajo se colectaron en diferentes ecosistemas del norte y sur de Sinaloa, así como en la reserva ecológica de la Uba que se ubica en el municipio de Guasave, en el estado de Sinaloa (Lat 25.4846/ Long. -108.4675).. La colecta del material vegetal se llevó a cabo empleando aleatorización en una dirección

elegida; este caso se refiere al muestreo en poblaciones más o menos grandes de una especie dada.

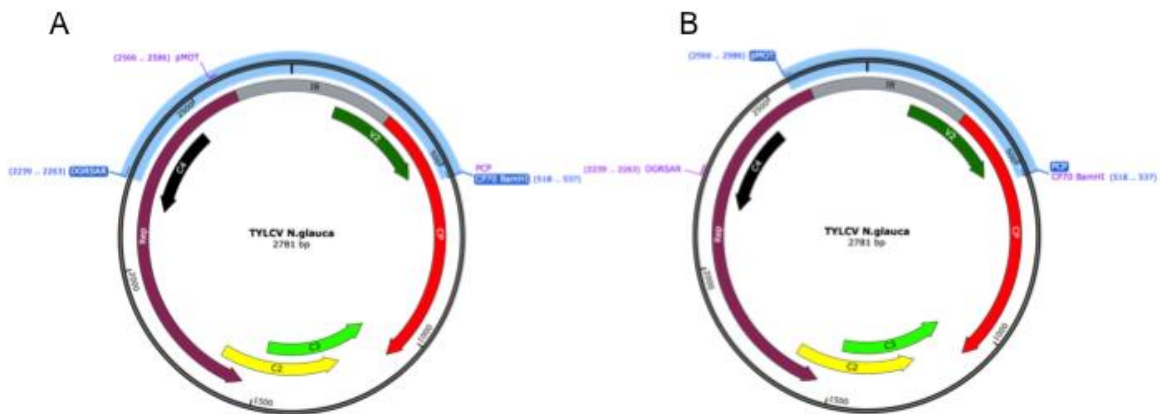
Así mismo, se colectaron 3 especímenes por muestra, en donde 2 fueron prensadas para su conservación e identificación taxonómica y generación de un respaldo herborizado con el apoyo de la Universidad Autónoma de Sinaloa (área de Agronomía), y el tercer espécimen fue empleado para los diferentes análisis moleculares.

### **Extracción de DNA total**

La extracción de DNA total se realizó con CTAB (bromuro de cetil-trimetilamonio) siguiendo un protocolo previamente reportado Zhang et al. 1998. Brevemente, para cada muestra se utilizó aproximadamente 0.3 g de tejido joven, el cual se maceró en un tubo con 200 µl de buffer CTAB al 3% (1.4 mM EDTA, 100 mM Tris-HCL, pH 8.0, 0.2% β-mercaptoetanol), precalentado a 60°C, posteriormente, se adicionaron 600 µl del mismo buffer. Se incubó la muestra a 60°C por 60 minutos, agitándose por inversión. Se agregaron 600 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó por inversión varias veces. Las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. Después se agregaron 1.5 µl de enzima RNAsa (20u/µl) y se incubaron por 30 minutos a 37°C, posteriormente se agregaron 600 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitaron por inversión varias veces. La muestras e centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se precipitó el DNA con 600 µl de isopropanol (-20°C). Se centrifugaron las muestras por 10 minutos a 13,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó con 1ml de etanol al 70 % y se centrifugó durante 4 minutos a 13,000 rpm. Finalmente se dejó secar la pastilla que contenía el DNA y se resuspendió en 50 a 100 µl de agua destilada estéril. La integridad del DNA total se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

### Detección de begomovirus mediante PCR anidado.

La detección de begomovirus se realizó por PCR anidado, usando los oligonucleótidos degenerados Rep DGRSAR (GAGTCTAGATGCTGACCTCCTCTAGCWGATCTGCCGTC) y CP70-BamHI (CACGGATCCGATTGRACCTTACANGGNCCTTCACAACC). que amplifican un fragmento de 950 a 1015 pares de bases. En la segunda reacción se utilizó el par de oligonucleótidos PMot (GAGTCTAGAGGATANGTRAGGAAATARTTT) y PCP (CGCGAATTCGACTGGACCTTACATTGGNC), Ascencio et al. 1999, que amplifican un fragmento de 550 a 750 pb de la región que incluye la parte N-Terminal de la proteína Rep, la región intergénica y la región N-Terminal de la CP.



**Figura 4.-** Mapa del genoma de begomovirus monopartita TYLCV. A). Fragmento de 1015 pb amplificado por los primers DGRSAR/CP70BamHI en primer PCR punto final. B). Fragmento de 750 pb amplificado por los primers pMOT/PCP en PCR anidado.

### Caracterización de los begomovirus por patrón de restricción (PCR-RFLP).

Para determinar si existía variabilidad genética en los begomovirus detectados e identificar posibles infecciones mixtas, los productos de PCR amplificados en la segunda reacción con los primers Mot/CP (650 pb) se analizaron por RFLP con las enzimas MspI y HhaI Argüello et al. 1994. La digestión enzimática se realizó en un volumen total de 15  $\mu$ L utilizando 6  $\mu$ L del producto de PCR, 1X del buffer de reacción y 0.5 unidades de la enzima (MspI o HhaI). La reacción se incubó por dos horas a 37°C y se visualizó en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Además se empleó el sistema QIAxcel, el cual reemplaza el análisis tradicional por un sistema automatizado de

alta resolución. Se analizaron los fragmentos de DNA digeridos en corridas de 12 muestras durante 3 minutos. El análisis y documentación de los datos se realizó con el software QIAxcel ScreenGel (QIAGEN group, versión 1.0.x).

## **Resultados**

### **Colecta de plantas silvestres en el estado de Sinaloa**

Para determinar las familia de plantas no cultivadas de los ecosistemas naturales y agroecosistemas del estado de Sinaloa que pudieran fungir como reservorios potenciales de begomovirus, se llevaron a cabo colectas de plantas con síntomas de enfermedad en seis diferentes puntos, que comprenden tres diferentes municipios con diferentes ecosistemas del estado de Sinaloa (Tabla 1) Incluir en esta tabla los diferentes municipios y las coordenadas de los 6 diferentes puntos de colecta). . Estos municipios cuentan con diferentes tipos de clima, que van desde cálido semidesértico hasta cálido subhúmedo. Además dentro de estos puntos se incluyó la reserva natural de La uba, ubicada en el municipio de Guasave, la cual se encuentra asentada en el corazón agrícola de la región. En total se colectaron 23 familias de plantas no cultivadas, y se identificaron 61 especies diferentes (tabla 2). La identificación de algunas muestras no fue posible por falta de material. En la siguiente tabla se incluyen todos los puntos de muestreo realizados, así como la sintomatología presentada en algunas de las muestras y el resultado en la detección molecular.

**Tabla 2.** Familias y especies de plantas colectadas en las diferentes localidades del estado de Sinaloa.

Familia	Especies	Localidad <sup>+</sup>	Síntomas	Muestras positiva <sup>s</sup>	Detección molecular	
					Primer PCR <sup>cd</sup>	PCR anidado <sup>cd</sup>
<b>I. Acanthaceae</b>						
	1. <i>Acalypha plistachiastra</i>	L.U.	NS	1/1	+ <sup>c</sup>	+ <sup>c</sup>
<b>II. Amaranthaceae</b>						
	2. <i>Amaranthus palmeria</i>	Conc., L.U., Bat., S.L.	NS	2/4	--	+ <sup>cd</sup>
<b>III. Apocynaceae</b>						
	3. <i>Stemmadenia palmeri</i>	S.L.	NS	0/1	--	--
<b>III. Asclepiadiaceae</b>						
	4. <i>Sarcostema spp.</i>	Conc.	NS	0/1	--	--
<b>IV. Asteraceae</b>						
	5. <i>Parthenium hysterophorus</i>	Moc., L.U., 300.	NS	4/12	+ <sup>cd</sup>	+ <sup>cd</sup>
	6. <i>Xanthium strumarium</i>	L.U.	YL, M	1/1	--	+ <sup>d</sup>
	7. <i>Sonchus oleraceus</i>	L.U., S.L.	NS, YL, NS	1/3	--	+ <sup>c</sup>
	8. <i>Helianthus annuus</i>	L.U.	NS	0/1	--	--
	9. <i>Porophyllum punctatu</i>	L.U.	NS	1/1	--	+ <sup>c</sup>
	10. <i>Franseria ambrosioides</i>	S.L.	NS	0/1	--	--
	11. <i>Artemisia ludoviciana</i>	S.L.	NS	0/1	--	--
<b>V. Bibnoniaceae</b>						
	12. <i>Amphiphium paniculatum</i>	Moc.	NS	1/1	+ <sup>c</sup>	+ <sup>c</sup>
<b>VI. Caesalpinaceae</b>						
	13. <i>Caesalpinia platyloba</i>	S.L.	NS	1/1	+ <sup>d</sup>	+ <sup>d</sup>
<b>VII. Capparaceae</b>						
	14. <i>Polanisia dodecandra</i>	Conc., S.L.	NS	1/2	+ <sup>c</sup>	+ <sup>c</sup>
<b>VIII. Convolvulaceae</b>						
	15. <i>Ipomoea spp.</i>	Conc., Bat.	NS	3/3	+ <sup>c</sup>	+ <sup>cd</sup>
<b>IX. Cucurbitaceae</b>						
	16. <i>Momordica charantia</i>	Moc., L.U.	NS	2/3	+ <sup>c</sup>	+ <sup>d</sup>
	17. <i>Cucumis</i>	L.U.	NS	1/1	--	+ <sup>c</sup>

	<i>dispsacues</i>					
	18. <i>Citrullus lanatus</i>	S.L.	YL	0/1	--	--
	19. <i>Cucumis anguria</i>	Bat.	NS	0/1	--	--
<b>X. Euphorbiaceae</b>						
	20. <i>Euphorbia heterophylla</i>	Moc.	NS	0/1	--	--
	21. <i>Acalypha plistachia</i>	Moc., Conc.	NS	0/2	--	--
	22. <i>Manihot spp.</i>	Moc.	NS	1/1	--	+ <sup>d</sup>
	23. <i>Croton spp.</i>	Moc.	NS	0/1	--	--
	24. <i>Ricinus communis</i>	L.U., S.L., 300	NS	1/3	--	+ <sup>d</sup>
<b>XI. Fabaceae</b>						
	25. <i>Senna biflora</i>	Moc., Conc., S.L.	NS	0/3	--	--
	26. <i>Senna uniflora</i>	Moc.	NS	0/1	--	--
	27. <i>Sesbania herbaceae</i>	Conc.	NS	0/1	--	--
	28. <i>Lonchocarpus lanceolatus</i>	L.U.	NS	0/1	--	--
	29. <i>Rynchosia minima</i>	Bat., 300	YL	5/5	+ <sup>c</sup>	+ <sup>d</sup>
	30. <i>Phaseolus vulgaris</i>	300	YL, M, VC, LD	1/1	--	+ <sup>cd</sup>
<b>XII. Malpighiaceae</b>						
	31. <i>Mascagnia macroptera</i>	S.L.	NS	1/1	--	+ <sup>d</sup>
<b>XIII. Malvaceae</b>						
	32. <i>Abutilon trisulcatum</i>	Moc., L.U. 300	NS, YL	3/6	+ <sup>cd</sup>	+ <sup>cd</sup>
	33. <i>Sidastrum lodiigenis</i>	Moc.	NS, YL	1/3	+ <sup>c</sup>	--
	34. <i>Anoda pentaschita</i>	Conc.	NS	1/1	--	+ <sup>d</sup>
	35. <i>Abutilon palmeri</i>	L.U., Bat, S.L.	NS	5/7	+ <sup>c d</sup>	+ <sup>c d</sup>
	36. <i>Herissantia crispa</i>	L.U.	YL	1/1	--	+ <sup>c</sup>
	37. <i>Sida rhombifolia</i>	300	NS	4/4	--	+ <sup>cd</sup>
	38. <i>Sida acuta</i>	300	NS	0/2	--	--
	39. <i>kosteletzkya depressa</i>	Bat	M, LD, Mo	2/2	+ <sup>c</sup>	+ <sup>c</sup>
<b>XIV. Nyctaginaceae</b>						
	40. <i>Boerhaaviai spp.</i>	Moc.	NS	1/1	--	+ <sup>c</sup>
<b>XV. Pedaliaceae</b>						
	41. <i>Matynia annua</i>	Conc.	NS	1/1	--	+ <sup>d</sup>
<b>XVI. Portulacaceae</b>						
	42. <i>Potulaca deraceae</i>	Bat.	NS	3/3	+ <sup>d</sup>	--
<b>XVII. Rhamnaceae</b>						



	43. <i>Karwinskia humboldtiana</i>	S.L.	NS	1/1	+ <sup>d</sup>	--
<b>XVIII. Rubiaceae</b>						
	44. <i>Borreria leavis</i>	Conc.	NS	0/1	--	--
<b>XIX. Solanaceae</b>						
	45. <i>Solanum tridynamun</i>	Moc., S.L.	NS	3/4	+ <sup>c</sup>	--
	46. <i>Solanum madreense</i>	Moc.	NS	0/1	--	--
	47. <i>Datura discolor</i>	Moc.	NS	1/1	--	+ <sup>c</sup>
	48. <i>Physalis acutiflora</i>	Moc.	NS	1/1	--	+ <sup>c</sup>
	49. <i>Physalis angulata</i>	Moc.	NS	0/1	--	--
	50. <i>Solanum nigrenses</i>	Conc., L.U.	NS	2/2	+ <sup>c</sup>	+ <sup>cd</sup>
	51. <i>Datura reburra</i>	L.U.	NS	1/1	--	+ <sup>c</sup>
	52. <i>Nicotiana glauca</i>	L.U., Bat.	NS,YL	2/2	+ <sup>c</sup>	4+ <sup>d</sup>
	53. <i>Solanum americanum</i> Mill	L.U.	NS	1/1	--	+ <sup>d</sup>
	54. <i>Solanum trydinamum</i> Dunal	S.L.	NS	2/2	+ <sup>c</sup>	+ <sup>c</sup>
	55. <i>Nicotiana trigonophylla</i>	S.L.	NS	1/1	+ <sup>d</sup>	+ <sup>d</sup>
	56. <i>Datura inoxia</i>	S.L.	NS	1/1	+ <sup>d</sup>	+ <sup>c</sup>
	57. <i>Datura stramonium</i>	Bat., 300.	NS	4/4	--	+ <sup>cd</sup>
<b>XX. Sterculiaceae</b>						
	58. <i>Melochia pyramidata</i>	Conc.	NS	0/1	--	--
	59. <i>Waltheria americana</i>	Conc.	NS	1/1	--	+ <sup>cd</sup>
<b>XXI. Vitaceae</b>						
	60. <i>Vitaceae spp.</i>	Moc.	NS	1/1	--	+ <sup>d</sup>
<b>XXII. Verbenaceae</b>						
	61. <i>Verbenaceae spp.</i>	L.U.	NS	1/2	--	+ <sup>c</sup>
<b>Unidentified</b>	62. --	Conc., L.U., Bat., S.L.	NS,YL,YL	7/11	+ <sup>cd</sup>	+ <sup>d</sup>

Moc: Mocerito, Conc: Concordia, L.U.: Guasave, La Uba, Bat.: Guasave, Batamote, S.L.: Sinaloa de Leyva, 300: Guasave, Calle 300.

<sup>a</sup>NS: Asintomática, YL: Hojas amarillas, M: Mosaicos, VC: Clorosis intervenal, LD: Deformación de la hoja, Mo: Moteado, CS: Puntos cloróticos

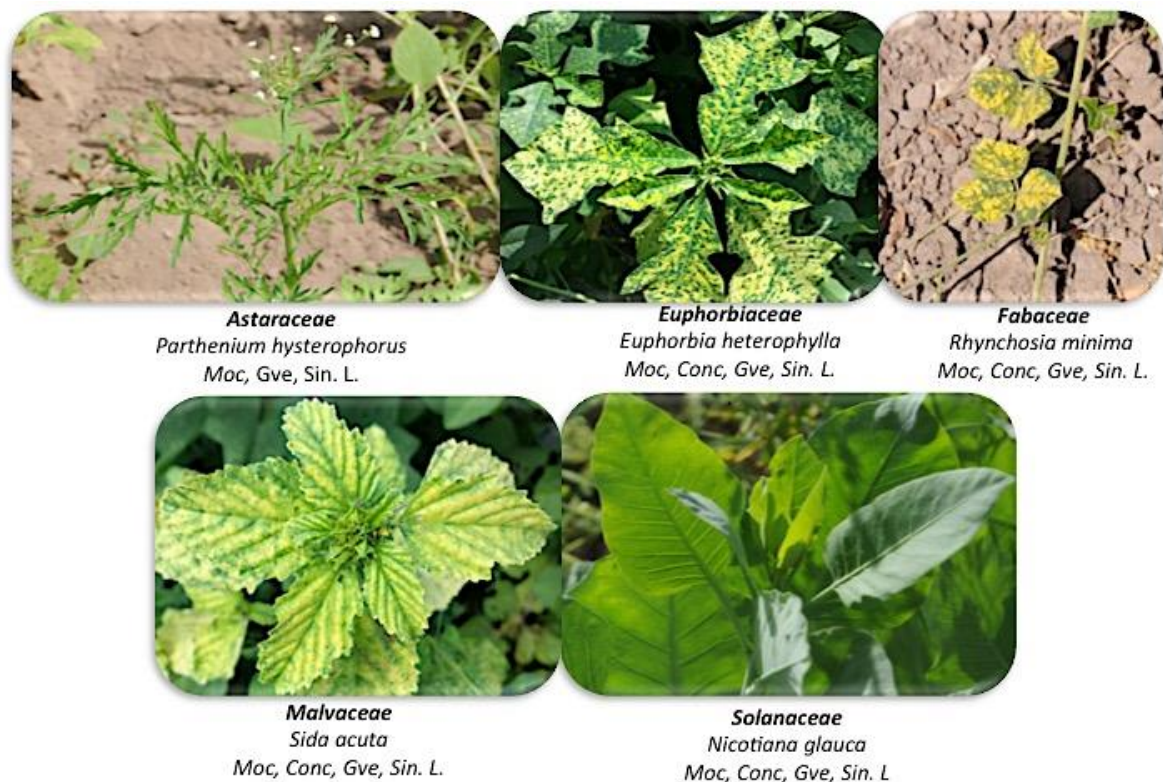
<sup>b</sup>Planta positiva/Planta colectada.

<sup>c</sup> 1100/750 pares de bases.

<sup>d</sup> 950/650 pares de bases.

--: No detectado

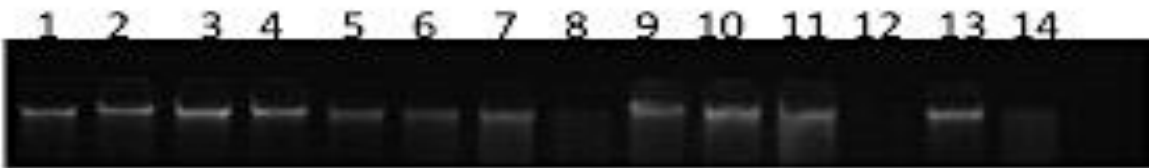
Analizando las muestras colectadas por cada localidad, se tomaron en cuenta 5 familias predominantes, ya que se encuentran en la mayoría de los puntos de colecta y resultaron positivas para las pruebas de presencia de begomovirus. Estas familias concuerdan con lo reportado por Vega et. al., 2001, donde reportan la flora de Sinaloa, sobresaliendo por su mayoría de género y especies las familias *Asteraceae* con 88 géneros y 239 especies, *Fabaceae* con 47 géneros y 172 especies, *Euphorbiaceae* con 21 géneros y 101 especies, *Malvaceae* con 18 géneros y 39 especies, *Cucurbitaceae* con 15 géneros y 22 especies y *Solanaceae* con 11 géneros y 47 especies. En el presente trabajo se encontraron con mayor predominancia estas mismas familias, ubicándolas en la mayor parte de los puntos muestreados (figura 4).



**Figura 5.** Imágenes representativas de ejemplares colectados pertenecientes a familias de plantas no cultivadas predominantes en los diferentes puntos de muestro.

### **Extracción de DNA en las diferentes familias de plantas silvestres**

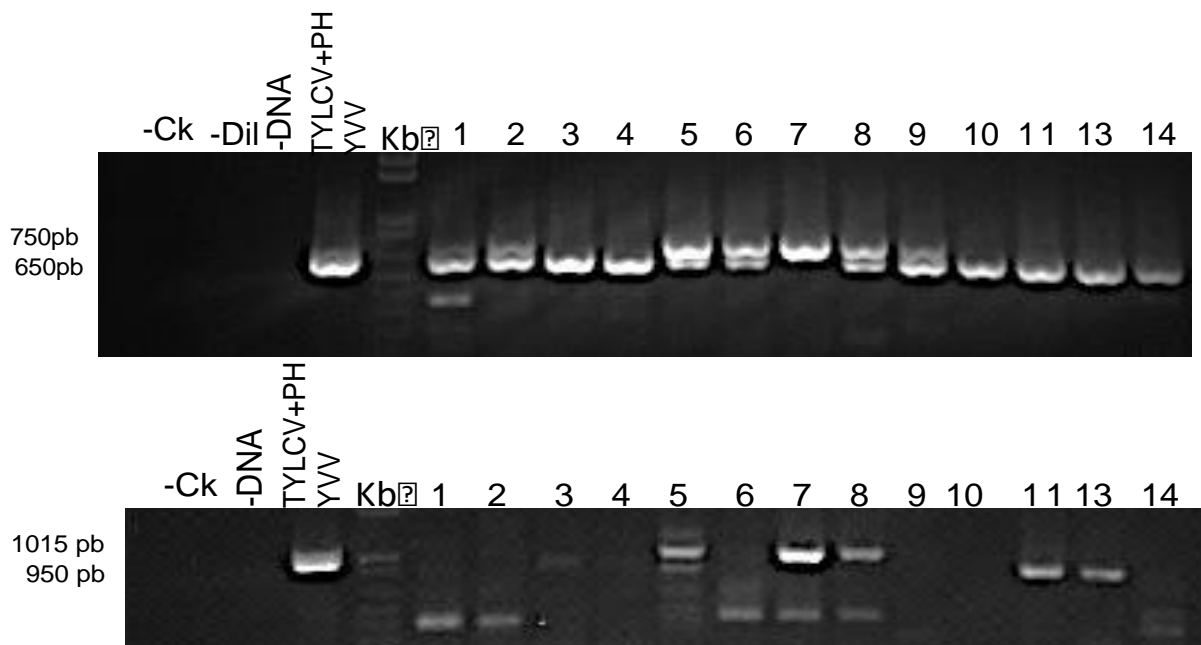
Se llevaron a cabo extracciones de DNA total con las dos metodologías propuestas. Al realizar las extracciones de tejido fresco con el equipo automatizado BioSprint 96 los resultados no son favorables, ya que en la mayoría de las muestras, la concentración y calidad de DNA total no son buenas en comparación con los obtenidos con el método tradicional del CTAB modificado. Al liofilizar tejido de las muestras colectadas, la calidad de extracción mejoró notablemente con ambas metodologías. Cabe señalar que no todas las plantas silvestres tienen la misma consistencia en su tejido, por lo que en algunas de ellas únicamente fuimos capaces de obtener DNA a través de la extracción por CTAB. En el análisis de electroforesis, se observó que en la mayoría de las extracciones de las diferentes muestras el DNA total fue de buena calidad y concentración. Aun así se llevaron a cabo los análisis moleculares (Figura 6).



**Figura 6.** Electroforesis del DNA total extraído de las diferentes familias de plantas no cultivadas. 1.-*Astereceae*, 2-3.- *Euphorbiaceae*, 4-8.- *Fabaceae*, 9-13.- *Malvaceae*, 14.- *Solanaceae*.

### **Detección de begomovirus mediante PCR y PCR anidado en las diferentes familias de plantas silvestres**

Una vez obtenido el DNA total del tejido foliar de plantas no cultivadas, se realizó la detección mediante PCR, encontrándose que en algunas de las familias analizadas se logró amplificar los fragmentos esperado de 950 a 1015pb que corresponde para un begomovirus bipartitas y monopartitas correspondientemente (Figura 6).

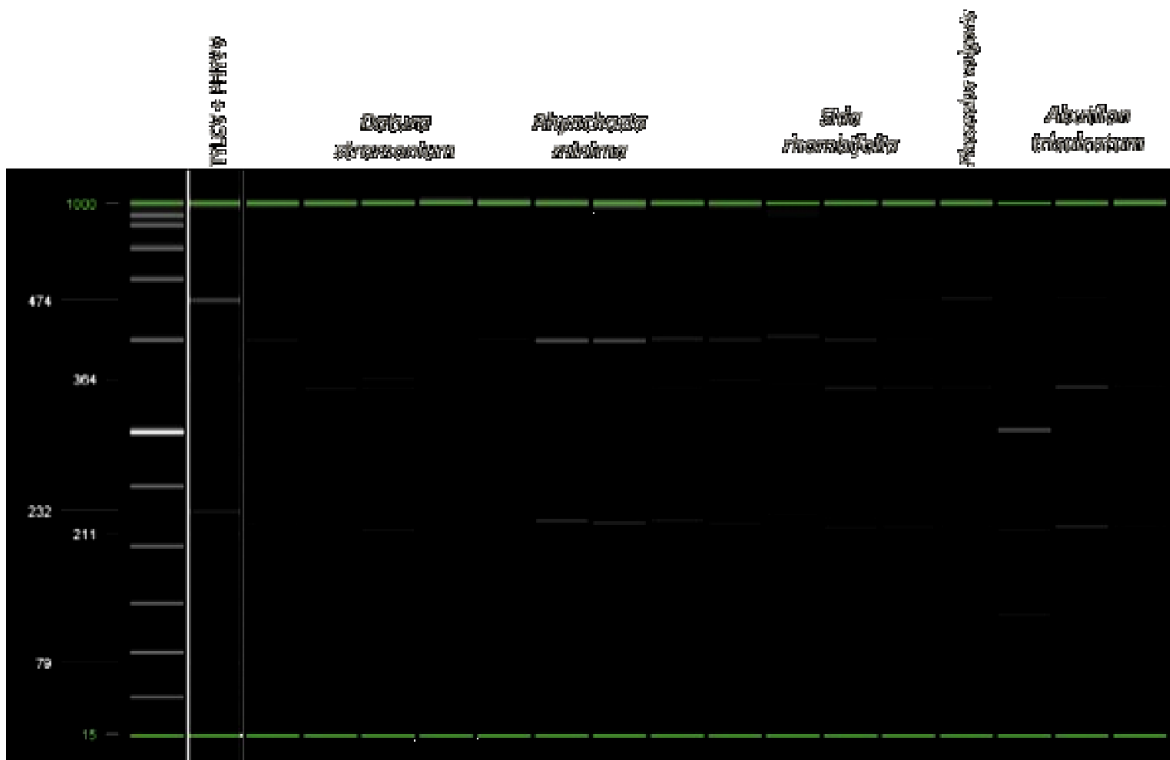


**Figura 7.** Detección de begomovirus mediante PCR y PCR anidado en las diferentes familias de plantas no cultivadas. +.- TYLCV+PHYVV.-1.- *Parthenium hysterophorus*. 2-4.- *Euphorbia heterophylla*, 5.- *Rhynchosia precatorea*, 6-7.- *Rhynchosia minima*, 8.- *Senna biflora*, 9.- *Abutilon trisulcatum*, 10-11.- *Sida acuta*, 13.- *Herisantia crisspa*, 14.- *Physalis arcutiflora*.

El resultado obtenido del primer PCR fue positivo para la detección de begomovirus en las diferentes familias como era esperado. Las muestras 5, 7 y 8 pertenecientes a la familia de las *Fabaceae* y las muestras numero 3, 11 y 13 que forma parte de las *Malvaceaes*. La amplificación de fue 950 pb, el fragmento asociado a begomovirus bipartitas. Para obtener una mayor afinidad y sensibilidad en la detección, se realizó un PCR anidado a las mismas muestra (Figura 6). Al realizar el PCR anidado, todas las muestras analizadas fueron positivas para la presencia de begomovirus. Las muestras 1, 2, 5, 6, 7, 8 y 9 amplificaron fragmentos 750 pb, el cual corresponde a la detección de begomovirus monopartita, específicamente de TYLCV. Las muestras 3, 4, 10, 11, 13 y 14 fragmentos de 650 pb asociados a begomovirus bipartitas. que se asocian tanto a begomovirus bipartitas como monopartitas. Además, 1, 2, 5, 6, 8 y 9, se detecto la presencia de ambos begomovirus, ya que se detectaron ambos fragmentos.

## Identificación preliminar de begomovirus en las diferentes familias de plantas silvestres por PCR-RFLP's.

Una vez detectada la presencia de begomovirus en las plantas silvestres, para confirmar su identidad, los fragmentos amplificados se sometieron a un análisis de restricción (PCR-RFLP's). Estudios previos muestran que la restricción del fragmento amplificado por PCR (N-terminal CP-Rep y región intergénica del DNA A) con las enzimas de restricción *MspI* y *HhaI* permite diferenciar rápidamente entre linajes de begomovirus de manera eficaz; además, permite determinar la presencia de más de un virus en una misma muestra (Monreal-Vargas y Argüello-Astorga, 2005). Con base en lo anterior, los fragmentos amplificados de 8 de las muestras analizadas se sometieron a la restricción con las enzimas *MspI*. En el análisis con la enzima *MspI* se observan diferentes patrones de restricción, por que se difiere que existe una gran diversidad genética de los begomovirus que se hospedan en las plantas silvestres (Figura 7).



**Figura 8.** Identificación preliminar de begomovirus detectados en las diferentes familias de plantas no cultivadas mediante por PCR-RFLP+.- TYLCV+PHYVV.-1-3.-*Datura stramonium*, 4-8.-*Rhynchosia minima*, 9-12.-*Sida rhombifolia*, 13.-*Phaseolus vulgaris*, 14-16.- *Abutilon trisulcatum*.

## Discusión

Las plantas no cultivadas suelen presentarse en forma de "manchones". En muchos casos existen pocas áreas con elevada densidad y muchas otras con niveles poblaciones bajos o nulos. Esta distribución suele contribuir la variabilidad asociada a problemas de drenaje, topografía, tipo de suelo o microclima. Es la distribución en "manchones" la que hace muy dificultosa la obtención de estimaciones más o menos confiables. Resulta imposible determinar con precisión los niveles de abundancia de plantas silvestres en un área específica: la selección de puntos de muestreo en toda su extensión permitiría tener una idea relativamente precisa de qué es lo que se encuentra presente, pero el método debe ser práctico y cuando se realiza monitoreo debe haber una solución de compromiso y un plan que permita optimizar los objetivos de precisión con los de tiempo y costo. Generalmente, se toman 5 muestras. El punto de muestreo debe seleccionarse al azar. El registro puede ser el de densidad (número de individuos en un marco de 1 mt x 1 mt por ejemplo) o bien puede usarse una escala de abundancia visual de 0 a 10. Del mismo modo, sólo puede registrarse la ausencia o presencia de una determinada especie en un área circundante al observador.

Como se ha dicho anteriormente, en la mayoría de los casos, las plantas no cultivadas exhiben altos niveles de agregación en el área. Al aumentar la experiencia del observador, se conocerá de antemano la ubicación de los "manchones" y consecuentemente, el esfuerzo podrá direccionarse mejor. Si se desea ser más específico, las áreas pueden ser "marcadas" o georeferenciadas. Este estudio proporciona pruebas que apoyan nuestra hipótesis. Encontramos presencia de begomovirus en muchas especies vegetales nativas, los causan síntomas sistémicos leves o asintomáticos, y se detectaron virus introducidos en la vegetación natural en sitios distribuidos ampliamente en zonas agroecológicas. Los begomovirus introducidos invaden las comunidades de plantas nativas no perturbadas. La ecología de los virus de las plantas en otros ha sido reconocido como relevante para comprender y predecir la epidemias de virus en los cultivos Duffus et al, 1971. Los begomovirus fueron detectados satisfactoriamente usando primers degenerados en 97 de las 161 muestras colectadas (Tabla1). Las

muestras negativas pueden tener explicaciones, la presencia de polifenoles en el DNA de la muestra podría inducir al resultado negativo del PCR. A pesar de que las muestras fueron eluidas para reducir el efecto de los posibles inhibidores. Además, usando nuestros protocolos, contamos con la capacidad en detectar begomovirus en plantas conocidas en contener altas cantidades de inhibidores Jose *et al.*, 2000.

Algunas de las muestras colectadas de los diferentes ecosistemas eran asintomáticas y algunas otras presentaban la sintomatología asociada a begomovirus, los cuales son: amarillamientos, hojas enchinadas y acucharadas. En general estos son síntomas ocasionados por virus pero también pueden ser causados por otros patógenos, insectos e insuficiencia de nutrientes, los cuales son indetectables en las reacciones de PCR al utilizar primers específicos para begomovirus Maruthi *et al.*, (2006). La ausencia de sintomatología, podría ser asociada a un bajo título viral ocasionado por las modificaciones en la capacidad de replicación y la capacidad de silenciamiento debido a las defensas de la plantas, Moriones y Castillo, (2000). Los begomovirus detectados en las plantas no cultivadas, actualmente se encuentran infectando chile, tomate, calabaza Green *et al.*, (2001), Maruthi *et al.*, (2005), Bull *et al.*, (2004).

Nuestros resultados sugieren que, cuando los begomovirus se propagan en poblaciones de especies de plantas nativas, tienen el potencial de causar pérdidas considerables en los agroecosistemas. Esto se debe a posibles eventos de recombinaciones genéticas, eventos sinérgicos o antagónicos. Así, las infecciones mixtas de begomovirus en plantas nativas creciendo en la interface entre los ecosistemas naturales y agroecosistemas es probable que se magnifiquen las infecciones en las plantas heterogéneas. Es sorprendente la severidad en los síntomas causados por begomovirus introducidos en las plantas nativas aunque esto no sugiere que los begomovirus autóctonos sean inofensivos para las plantas no cultivadas. Esto indica que tienen el potencial de causar mayores daños cuando hacen brincos de especies de plantas cuando se ve afectada la flora nativa. La necesidad de encontrar caminos efectivos para restringir la aparición de enfermedades emergentes en esta interface, y suprimir la rápida transmisión de

epidemias de nuevos aislados es urgente. Para poder lograr esto, adquirir el conocimiento sobre los factores que conllevan a este tipo de eventos es esencial ya que dicho conocimiento nos permitirá tener un manejo integral de las enfermedades causadas por begomovirus.

## **Conclusiones**

A pesar que colectamos en diferentes ecosistemas naturales y agroecosistemas y diferentes poblaciones de plantas no cultivadas, detectamos begomovirus en todos los puntos de colecta y no existe diferencia dependiendo del tipo de ecosistema en las plantas colectadas que son hospederas naturales de begomovirus. Tanto begomovirus bipartitas y monopartitas fueron detectados en las familias predominantes en el estado de Sinaloa. Un dato sobresaliente es que TYLCV, un begomovirus introducido a los ecosistemas de México, haciendo énfasis en nuestro estado, revela que ha hecho su nicho ecológico en prácticamente todas las zonas climáticas y mayoría de especies nativas de los ecosistemas naturales y agroecosistemas. Esto indica que a pesar de las diferentes especies de plantas colectadas, aparentemente no influye en la diferenciación de los hospederos naturales de los begomovirus.

Otro dato importante, es el posible salto de especies, donde se verían envueltas nuevos huéspedes que son genéticamente distantes de sus hospederos naturales. En este caso, la geografía original del huésped no corresponde con el área geográfica original del patógeno, por ellos las plantas no cultivadas que crecen junto a los agroecosistemas, representan una fuente importante de nuevos begomovirus, que pueden ser causante de enfermedades emergentes al introducirse a los agroecosistemas, debido a la falta de coevolución de las nuevas combinaciones de virus-huésped, donde el huésped recién infectado carecerá de resistencia a los nuevos virus que enfrentara. Sin embargo es necesario realizar estudios más profundos para comprender la ecología de los begomovirus en plantas no cultivadas.



## Literatura citada

- Anderson, P.K., Cunningham, A.A., Patel, N.G., Morales, F.J., Epstein, P.R., Daszak, P. 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol. Evol.* 19:535–544.
- Ascencio-Ibáñez, J. R., Díaz-Plaza, Méndez-Lozano, J., Monsalve-Fonnegra Z., Arguello-Astorga, G., Rivera-Bustamante, R. F. 1999. First Report of Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus in Yucatán, México. *Plant Disease.* 83:1178.
- Ascencio-Ibáñez, 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, México. *Plant Disease* 86:692.
- Azhar M.T., Akhtar S., Mansoor S. Cotton leaf curl Multan betasatellites strains cloned from *Gossypium barbadense* further supports selection due to host resistance. *Virus Genes.* 2012;45:402–405.
- Cho JJ, Mitchell WC, Mau RFL, Sakimura BP, 1987b. Epidemiology of tomato spotted wilt virus disease on crisphead lettuce in Hawaii. *Plant Disease*, 71, 505 – 8.
- Duffus, J. 1971. Role of weeds in the incidence of virus diseases. *Annu.*
- Fernandes, R. F, Albuquerque, C. L, Oliveira, L. C, Cruz, R. R, Rocha, B. W, Pereira, G. T, Naito, B. F, Dias, M. N, Nagata, T, Faria, C. J, Zerbini, M. F, Aragao, L. J y Nagata-Inoue, K. A. 2011. Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), infecting *Euphorbia heterophylla* plants. *Archives of Virology* 156:2063–2069.
- Hull, R. 2002. *Matthews' Plant Virology*. 4ta edición. Academic Press. 1001p.
- J. Jose, R. Usha, *Plant Mol. Biol. Rep.* 18, 349–355 (2000)
- M. Mubin, M.S. Shahid, M.N. Tahir, R.w: Briddon y S. Mansoor. 2010. Characterization of begomovirus components from a weed suggest that begomovirus may associate with multiple distinct DNA satellites. *V. genes* 40:452-457
- M.N. Maruthi, A.R. Rekha, S.H. Mirza, S.N. Alam y J. Colvin 2006. PCR-Based detection and partial genome sequence indicate high genetic diversity in Bangladeshi begomoviruses and their withefly vector, *Bemisia tabaco*. *V. Genes* 34:373-385.

- M.N. Maruthi, S.N. Alam, K.A. Kader, A.R. Rekha, A. Cork, J. Colvin, *Phytopathology* 95, 1472–1481 (2005)
- M.R. Rojas, R.L. Gilbertson. 2008. Emerging plant viruses: a diversity of mechanisms and opportunities. M.J. Roossinck (Ed.), *Plant Virus Evolution*, Springer, pp. 27-51
- Marilyn, J. Roossinck. 2011. The big unknow: plant virus biodiversity. *Current Opinion in Virology*. 63:67
- Moissiard G, Voinnet O (2004) Viral suppression of RNA silencing in plants. *Mol Plant Pathol* 5:71–82
- Moriones, E., and J. Navas-Castillo. 2000. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Res.* 71:123-134.
- R. B. Wickner. 2000. *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press. 1162p.
- *Rev. Phytopathol.* 9:319-340.
- Roossinck M. J. (2010). Lifestyles of plant viruses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365, 1899–1905. 10.1098/rstb.2010.0057
- Roye, M. E., McLaughlin, W. A., Nakhla, M. R., Maxwell, D. P. 1997. Genetic diversity among geminiviruses associated with three weed species, *Sida* spp., *Macroptilium lathyroides*, and *Wissadula amplissima*, in Jamaica. *Plant Disease* 81:1251–7.
- S.E. Bull, W.S. Tsai, R.W. Briddon, P.G. Markham, J. Stanley, S.K. Green, *Arch. Virol.* 149, 1193–1200 (2004)
- S.K. Green, W.S. Tsai, S.L. Shih, L.L. Black, A. Rezajan, M.H. Rashid, M.M.N. Roff, Y.Y. Myint, L.T.A. Hong, *Plant Dis.* 85, 1286 (2001)
- Van Regenmortel, M. H. V., 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
- Vanitharani, R., Chellappan, P., Pita, J.S. and Fauquet, C.M. (2004) Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 78, 9487–9498.
- Varsani, A., Castillo, J.N., Moriones, E., Zepeda. H.C., Idris, A., Brown, J.K., Zerbini, F.M. and Martin, D.P. 2014. Establishment of three new genera in

the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. Arch. Virol.

- Voinnet, O., S. Rivas, P. Mestre, and D. C. Baulcombe. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33:949-956
- Zhang, Y. P., Uyemoto, J. K., Kirkpatrick, B. C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay, *Journal of Virology Methods* 71:45-50.

## Capítulo 3

### **Molecular and biological characterization of *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV): An Eastern hemisphere begomovirus introduced in the Western hemisphere**

Artículo aceptado y publicado en línea el 21 de septiembre 2017 en Crop Protection 103 (2018) 51-55

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2017.09.006>

## **Molecular and biological characterization of *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV): An Eastern hemisphere begomovirus introduced in the Western hemisphere**

Gustavo Domínguez-Durán<sup>a</sup>, Edgar A. Rodríguez-Negrete<sup>b</sup>, Juan José Morales-Aguilar<sup>a</sup>, Erika Camacho-Beltrán<sup>a</sup>, Jesús L. Romero-Romero<sup>a</sup>, Maria A. Rivera-Acosta<sup>a</sup>, Norma E. Leyva-López<sup>a</sup>, Analilia Arroyo-Becerra<sup>c</sup> and Jesús Méndez-Lozano<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Instituto Politécnico Nacional. CIIDIR-Unidad Sinaloa. Departamento de Biotecnología Agrícola.*

<sup>b</sup>*CONACyT. Instituto Politécnico Nacional. CIIDIR-Unidad Sinaloa. Departamento de Biotecnología Agrícola.*

<sup>c</sup>*Instituto Politécnico Nacional. CIBA Tlaxcala.*

Phone: 52(687)8729625

Fax: 52(687)8729626

email: jmendezl@ipn.mx

### **ABSTRACT**

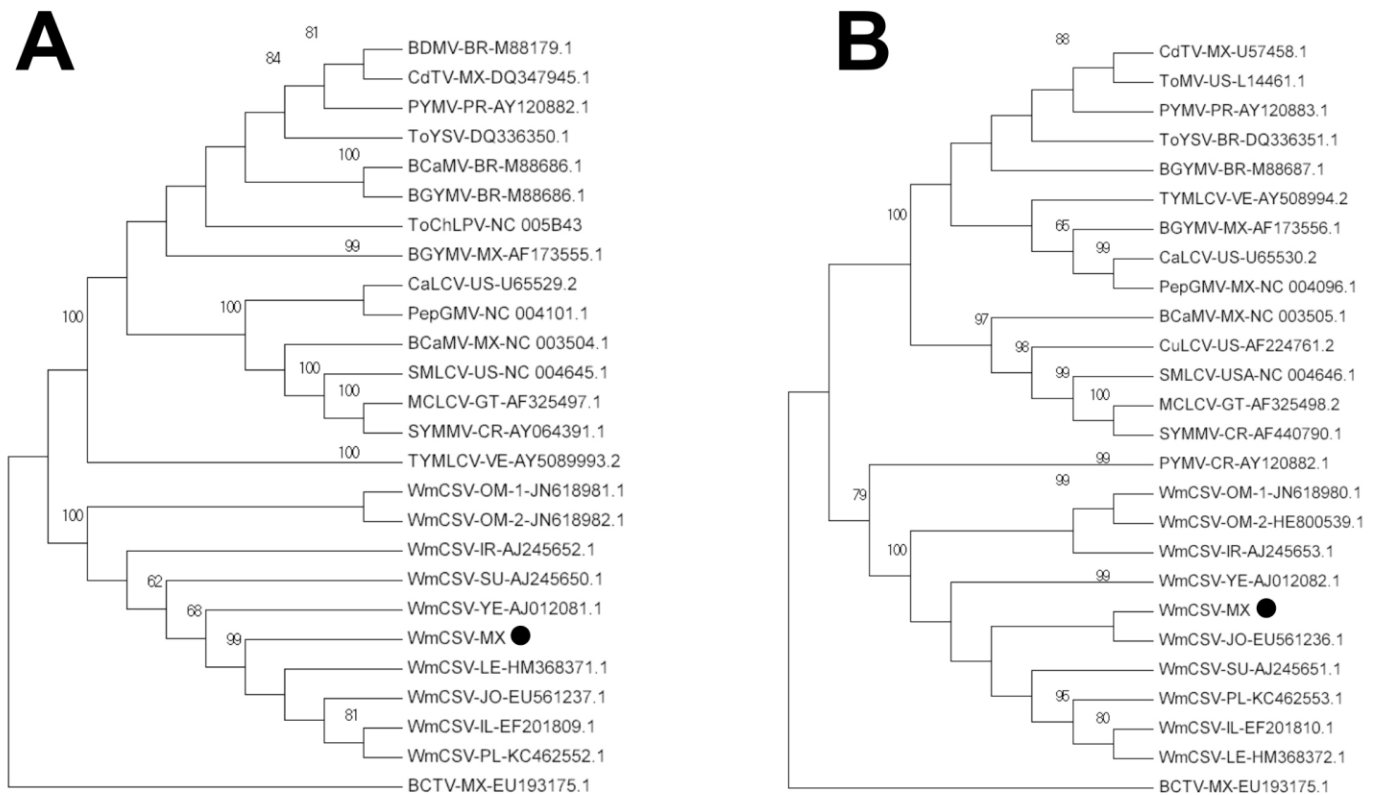
*Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) is a bipartite begomovirus that causes severe diseases to cucurbits, particularly watermelon, across Eastern Mediterranean countries. Watermelon plants showing begomovirus-associated symptoms and virus vector whitefly infestation were collected from a cultivated area in Sonora, Mexico. Using rolling circle amplification (RCA) and sequencing, the full-length genome of an isolate of WmCSV was obtained. Agrobacterium-mediated virus inoculation to *Solanaceae* (*Nicotiana benthamiana* and tomato) and *Cucurbitaceae* (Squash, melon and watermelon) plants, fulfilled Koch's postulation confirming the disease-associated agent. To the best of our knowledge, this is the first report of WmCSV associated to cucurbits diseases in the Western Hemisphere.

*Keywords: Begomovirus, Old World (OW) virus, WmCSV, cucurbits*

Geminivirus (family *Geminiviridae*) are small circular single-stranded (ss) DNA viruses packed into icosahedral twined-shaped particles, which cause severe diseases in major crop plants worldwide. On the basis of genome organization, the host range and type of insect vector, the family is divided into seven genera which are namely, *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Eragovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus*, and *Turncurtovirus* (Brown et al., 2015). The majority of geminivirus, as been the most important economically, belong to genus *Begomovirus* that are transmitted by polyphagous insect vector *Bemisia tabaci* to dicotyledonous host. The genomes of begomovirus that are native to the New World (NW) usually are bipartite, consisting of two components that are designated DNA-A and DNA-B. In contrast, most of the known Old World (OW) begomoviruses have monopartite genomes consisting of single DNA molecule homologous to the DNA-A component of bipartite begomovirus. The DNA-A component encodes viral functions required for viral DNA-A replication, transcription and vector-assisted transmission, whereas DNA-B component encodes proteins required for cell-to-cell and long distance viral particles movement in host plants (Rojas et al., 2005). Begomovirus have spread rapidly among cucurbit crops throughout the world, and such spread were caused by NW viruses in the Western Hemisphere [i.e. *Squash leaf curl virus* (SLCV), *Cucurbit leaf curl virus* (CuLCV), *Melon chlorotic leaf curl virus* (MCLCuV)] and OW viruses in the Eastern Hemisphere [i.e. *Squash leaf curl China virus* (SLCCNV), *Loofa yellow mosaic virus* (LYMV), *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) (Ali-Shtayeh et al., 2014; Idris et al., 2008). WmCSV is a OW bipartite begomovirus that was first identified in Yemen and later reported in Sudan, Iran, Israel, Jordan, Oman and Palestine (Abudy et al., 2010; Al-Musa et al., 2011; Ali-Shtayeh et al., 2014; Bedford et al., 1994; Khan et al., 2012; Kheyr-Pour et al., 2000). The virus infects nearly all cultivated cucurbits and it brings severe damage to watermelon and melon plants (Abudy et al., 2010).

In the summer of 2012, watermelon plants exhibiting typical geminivirus symptomatology (leaf curling, yellowing and stunting), and insect vector (*B. tabaci*)

infestation were collected from a watermelon cultivated field in Mexico Northeastern State, Sonora. The total DNA was extracted from four symptomatic plants using a CTAB-based method (Doyle and Doyle, 1987), and then putative full-length begomovirus genome components were enriched by rolling circle amplification (RCA) with  $\Phi$ -29 DNA polymerase (TempliPhi, Ge Healthcare) as described previously (Inoue-Nagata et al., 2004). The resulting concatamers were digested with three different enzymes (*SacI*, *XbaI* and *Bam*HI). *Bam*HI restriction yielded three fragments of ca. 2.7, 1.7 and 1.0 kb, putatively corresponding to a full-length monomeric component (ca. 2.7 kbp fragment) and a split component (ca. 1.7 and 1.0 kbp fragments). The three fragments were cloned into *Bam*HI-digested pBluescript SK- vector (Stratagene), transformed in *E. coli* DH5 $\alpha$  and two independent clones of each fragment from sample #Wm4-MX were fully sequenced using the primer walking strategy. The assembly and comparison of the sequences were obtained using the SeqMan and MegAlign programs [DNASTAR Inc., Madison, WI, USA], and it showed the presence of two putative viral full-length genomes of 2752bp and 2759bp corresponding to DNA-A and B respectively. Phylogenetic analysis based on the alignment of the complete nucleotide sequences of both components with selected begomoviruses sequences available in the GenBank database (Table 1) denote high nucleotide sequence identity with other WmCSV isolates (DNA-A 97.99-99.48% and DNA-B 95.64-99.06%) indicating that it is an isolate of a single species, and based on present species demarcation criteria (Brown et al., 2015) the proposed name of the isolate is WmCSV-[MX-Sinaloa-2012] (DNA-A and B were deposited in GenBank under accession IDs: KY124280, KY124281, respectively), hereafter WmCSV-[MX]. Additionally, phylogenetic trees based on multiple sequence alignment of the complete DNA-A and DNA-B sequences showed that WmCSV A-[MX] segregate most closely with sequences of WmCSV isolates from Iran, Jordan, Lebanon and Palestine, whereas WmCSV B-[MX] segregate closely with sequence from Jordan (Figure 1).

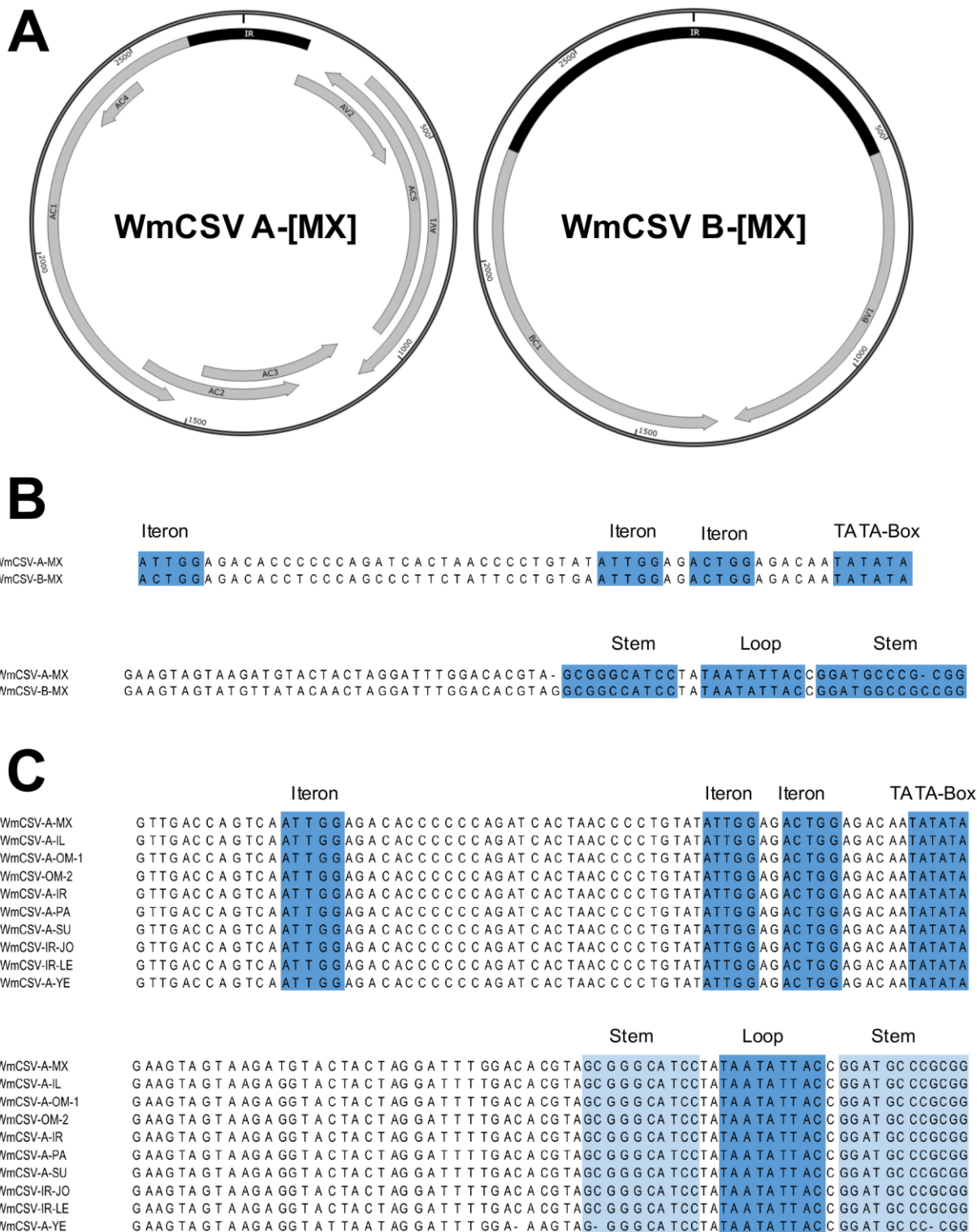


**Figure 1.** Phylogenetic trees based on multiple sequence alignment of the complete DNA-A (A) and DNA-B (B) components of selected begomovirus belonging to SLCV- new world clade with WmCSV-[MX]. Trees were constructed by Maximum Likelihood method with 1,000 bootstrap replicates using MEGA 7. The viruses sequences used for alignment were as follows: *Bean calico mosaic virus* (BCaMV), *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV), *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), *Cabbage leaf curl virus* (CaLCV), *Chino del tomate virus* (CdTV), *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), *Potato yellow mosaic virus* (PYMV), *Tomato chino La Paz virus* (ToChLPV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), *Tomato yellow margin leaf curl virus* (TYMLCV), *Squash mild leaf curl virus* (SMLCV), *Squash yellow mild mottle virus* (SYMMV), *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV). The countries codes are: BR: Brazil, CR: Costa Rica, GT: Guatemala, IL: Israel, IR: Iran, JO: Jordan, LE: Lebanon, MX: Mexico, OM: Oman, PL: Palestine, PR: Puerto Rico, SU: Sudan, US: United States of America, VE: Venezuela, YE: Yemen. Virus sequences accession numbers are shown in the figure following virus acronyms. As outgroup, *Beet curly top virus* sequence (BCTV) was used.

The detailed analysis of the WmCSV DNA-A sequence showed that it encompasses seven open reading frames (ORFs) which are positionally conserved with those of other begomoviruses; two in the virion sense (AV1 and AV2) and five in complementary sense (AC1 to AC5), whereas DNA-B component encodes the virion-sense and complementary-sense BV1 and BC1 genes respectively (Figure 2 A). A



predicted stem-loop structure, containing the sequence TAATATTAC within the loop, was identified in both viral components. This structure marks the origin of geminiviral DNA replication (Stanley, 1995). An alignment of the common region (CR) of WmCSV-[MX] DNA-A and DNA-B upstream of the hairpin structure, showing the sequence of the predicted stem-loop structure, the TATA box of the Rep promoter and the predicted iterons (the sequences recognized by the Rep protein to initiate viral replication) (Arguello-Astorga et al., 1994) (Figure 2 B). The CR of DNA-A and DNA-B (130 and 132 bp in length for A and B component, respectively) shares high sequence identity (85.4%), suggesting that the two DNA components are cognate. The alignment of CRs of DNA-A of WmCSV-[MX] and other related isolates showed that Mexican isolate shares 100% homology in this region compared to the other CRs analyzed (Figure 2 C).



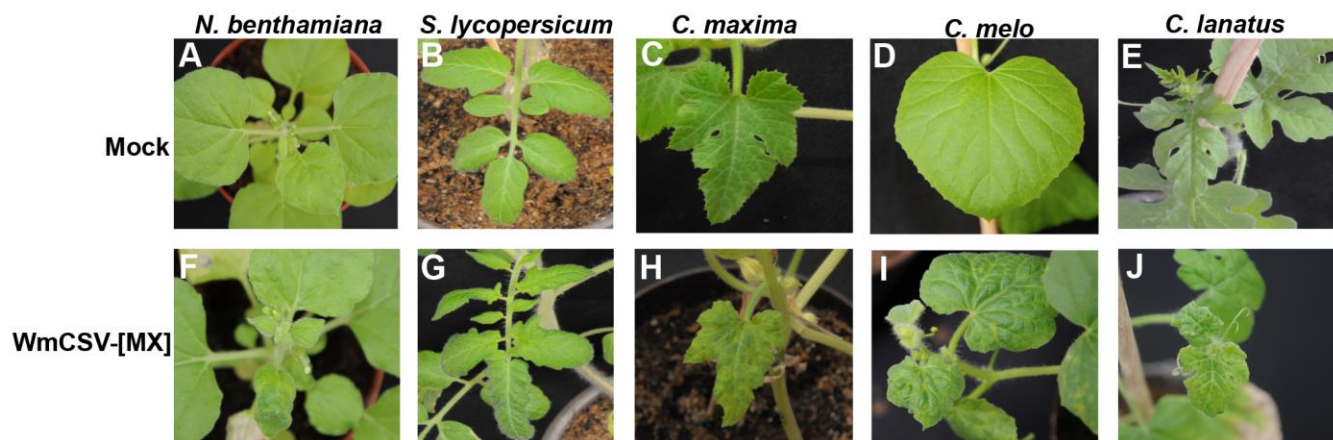
**Figure 2.** Genome organization of WmCSV-[MX] DNA-A and B (A). Alignment of WmCSV-[MX] DNA-A and B common regions (B). Alignment of DNA-A common region of WmCSV-[MX] and other WmCSV isolates. Regulatory elements of viral transcription (TATA-Box) and replication (Iterons, and stem-loop) are highlighted in blue.

Geminivirus virion sense genes are highly conserved; AV2 (97.44-99.15% of amino acid identity to other WmCSV isolates) is a pathogenic determinant and Viral Silencing Suppressor (VSS). The coat protein (CP; encoded by AV1) (96.46-100% identity) is involved in virus genome packing and insect vector transmission. Rep (encoded by AC1) (95.67-98.72% identity) gene product is a multifunctional protein involved in viral replication, modulation of host cellular cycle and transcriptional auto regulator. The replication enhancer protein (REn; encoded by AC3) (95.27-100% identity), although not essential for virus replication enhances viral DNA accumulation and symptom development in infected plants. The AC2 gene (98.16-100% identity), which overlaps AC3 encodes the transcriptional activator protein (TrAP) involved in the activation of late viral genes, pathogenicity factor, and VSS. AC4 (95.7-100% identity) is a highly conserved small protein contained entirely within the Rep sequence but in a different reading frame. It is involved in virus movement, and acts as VSS (Fondong, 2013). The AC5 ORF (96.0-96.81% identity) is not conserved between all begomoviruses and may be or not required for infectivity. Recently, AC5 protein has been described as a pathogenic factor and VSS (Li et al., 2015). All bipartite begomoviruses DNA-B components encode BV1 (the nuclear shuttle protein) (95.1-99.6% identity) in the virion-sense and BC1 (movement protein) (95.31-99.01% identity) in the complementary-sense. These proteins are involved in cell-to-cell and intracellular movement of the virus in plants(Fondong, 2013).

In order to evaluate the infectivity of WmCSV-[MX], viral infectious clones were obtained according the protocol previously described (Wu et al., 2008). The RCA-derived product from sample #Wm4-MX was partially digested with two units of *Bam*HI within 20 minutes, and the digestion product corresponding to viral dimer tandem was excised and purified from 1% agarose gel. Viral dimers were cloned into *Bam*HI-digested pGreen 0029 binary vector, transformed in *E. coli*, and dimeric constructs were corroborated by *Pvu*I or *Pst*I digestion for A and B DNA respectively. Agrobacterium strains harboring viral infectious clone were obtained by electrotransformation of GV3101 *A. tumefaciens* strain. Viral agroinoculation assays were performed according to the methodology previously described (Cañizares et al., 2015). The host range of WmCSV-[MX] was investigated by agroinoculating

*Solanaceae* (*Nicotiana benthamiana*, and tomato, *Solanum lycopersicum*) and *Cucurbitaceae* (Squash, *Cucurbita maxima*, watermelon, *Citrus lanatus*, and melon, *Cucumis melo*) plants at the 4-5 leaf stage with a viral infectious clone. As a control, plants of different species were inoculated with *A. tumefaciens* strain harboring pGreen empty vector. Inoculated plants were kept in the greenhouse and viral infection was evaluated by symptoms appearance at 21 days post inoculation (dpi) and corroborated by viral PCR detection using WmCSV-[MX] specific primers (Wmq-F 5'-GAGGCGATTGTCTGTGATGGTGAT-3' and Wmq-R 5'-CTTTTAGTCGGCCTCTCCCTTCC-3') designed on DNA-A with PrimerSelect [DNASTAR Inc., Madison, WI, USA]. Inoculated plants belonging to *Solanaceae* family, *N. benthamiana* displayed symptoms including moderate leaf curling and stunting 21dpi (Fig 3 F) and were PCR positives for viral infection (10/10 plants); whereas 7/9 plants of *S. lycopersicum* presented leaf curling at 21dpi (Fig 3 G) and were PCR positives for virus detection. Previous reports showed that four different isolates of WmCSV (from Yemen, Sudan, Iran, and Jordan) were unable to infect tomato plants (evaluated by symptomatology and PCR detection) (Ali-Shtayeh et al., 2014; Bedford et al., 1994; Kheyr-Pour et al., 2000). Interestingly, WmCSV-[MX] which is closely related to the Jordanian isolate was able to efficiently infect the tomato. This result could be explained due to differences in susceptibility of the tomato line used in our study compared with lines used in previous reports.

On the other hand, plant species belonging to *Cucurbitaceae* family exhibited severe symptomatology including leaf deformation, chlorotic mottling, and stunting at 21dpi and were PCR positives for virus detection (10/10 *C. maxima*, 10/10 plants *C. melo*, 11/11 plants *C. lanatus*) (Fig 3 H, I and J respectively).



**Figure 3.** Infectivity assay using WmCSV-[MX] agroinfectious clone. *N. benthamiana*, *S. lycopersicum*, *C. maxima*, *C. Melo* and *C. lanatus* plants were inoculated with *A. tumefaciens* strains harboring pGreen empty vector (A-E) or viral infectious clone (F-J). All images obtained at 21 dpi.

The obtained results fulfilled the Koch's postulation confirming the disease-associated agent. To the best of our knowledge, this is the first report of WmCSV associated to cucurbits diseases in the Western Hemisphere. The frequent movement of seed and vegetative plant material across national borders is known to contribute to the spread of plant diseases (Jones, 2009). The Middle East region has extensive trade/travel links with the rest of the world, and consequently, chance of the virus spreading is high. WmCSV associated disease has progressed to alarming levels in many eastern Mediterranean countries, infecting in single or mixed infection with NW virus SLCV in a synergistic manner (Sufrin-Ringwald and Lapidot, 2011). To date, SCLV is the only case of an NW virus establishing in the OW, whereas *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) would be the only example of the opposite (Lefeuvre et al., 2010). Therefore, the recent introduction of WmCSV to NW would cause similar disease emergence in Central and North America regions where SLCV is endemic. Besides SLCV, there exist other begomovirus belonging to squash clade endemic of NW with potential to cause new diseases in combination with WmCSV. For instance, reassortants between *Cucurbit leaf curl virus* (CuLCV) and SLCV are viable and cause disease in pumpkin

(Brown et al., 2002). *Melon chlorotic virus* (MCLCuV) and its closest relatives, including *Bean calico mosaic virus* (BCaMV), *Cucurbit leaf crumple virus* (CuLCrV) and SLCV are able to form pseudorecombinants and have distinct but overlapping host ranges including species within the *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, and *Solanaceae* families (Idris et al., 2008). Investigations in progress are focused on predicting the emergence of new diseases caused for WmCSV in single infections or forming complex with other begomoviruses that are endemic from Mexico.

### **Acknowledgments:**

We thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Mexico) grant PDCPN 2013, No. 214950 and Instituto Politécnico Nacional (SIP 20164812) for financial support of this research. GDD, JJMA and MARA were supported by fellowship from CONACyT, Mexico and BEIFI program of IPN.

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

### **References**

- Abudy, A., Sufrin-Ringwald, T., Dayan-Glick, C., Guenoune-Gelbart, D., Livneh, O., Zaccai, M., Lapidot, M., 2010. Watermelon chlorotic stunt and Squash leaf curl begomoviruses—New threats to cucurbit crops in the Middle East. *Isr. J. Plant Sci.* 58, 33–42. doi:10.1560/IJPS.58.1.33
- Al-Musa, A., Anfoka, G., Al-Abdulat, A., Misbeh, S., Haj Ahmed, F., Otri, I., 2011. Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV): A serious disease threatening watermelon production in Jordan. *Virus Genes* 43, 79–89. doi:10.1007/s11262-011-0594-8
- Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M., Mallah, O.B., Abu-Zeitoun, S.Y., 2014. Molecular characterization of watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV) from palestine. *Viruses* 6, 2444–2462. doi:10.3390/v6062444
- Arguello-Astorga, G.R., Guevara-Gonzalez, R.G., Herrera-Estrella, L.R., Rivera-Bustamante, R.F., 1994. Geminivirus Replication Origins Have a Group-Specific Organization of Iterative Elements: A model for Replication. *Virology* 203, 90–100. doi:10.1006/viro.1994.1458
- Bedford, I.D., Briddon, R.W., Jones, P., Alkaff, N., Markham, P.G., 1994. Differentiation of three whitefly transmitted geminiviruses from the Republic of Yemen. *Eur. J. Plant Pathol.* 100, 243–257.
- Brown, J.K., Idris, A.M., Alteri, C., Stenger, D.C., 2002. Emergence of a New Cucurbit-Infecting Begomovirus Species Capable of Forming Viable Reassortants with Related

- Viruses in the *Squash leaf curl virus* Cluster. *Phytopathology* 92, 734–742. doi:10.1094/PHYTO.2002.92.7.734
- Brown, J.K., Zerbini, F.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J.C.F., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R.W., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Malathi, V.G., Martin, D.P., Rivera-Bustamante, R., Ueda, S., Varsani, A., 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch. Virol.* 160, 1593–1619. doi:10.1007/s00705-015-2398-y
- Cañizares, M.C., Rosas-Díaz, T., Rodríguez-Negrete, E., Hogenhout, S.A., Bedford, I.D., Bejarano, E.R., Navas-Castillo, J., Moriones, E., 2015. *Arabidopsis thaliana*, an experimental host for tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses by agroinoculation and whitefly transmission. *Plant Pathol.* 64, 265–271. doi:10.1111/ppa.12270
- Doyle, Doyle, J., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19.
- Fondong, V.N., 2013. Geminivirus protein structure and function. *Mol. Plant Pathol.* 14, 635–649. doi:10.1111/mpp.12032
- Idris, a M., Mills-Lujan, K., Martin, K., Brown, J.K., 2008. Melon chlorotic leaf curl virus: characterization and differential reassortment with closest relatives reveal adaptive virulence in the squash leaf curl virus clade and host shifting by the host-restricted bean calico mosaic virus. *J. Virol.* 82, 1959–1967. doi:10.1128/JVI.01992-07
- Inoue-Nagata, A.K., Albuquerque, L.C., Rocha, W.B., Nagata, T., 2004. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage  $\phi$ 29 DNA polymerase. *J. Virol. Methods* 116, 209–211. doi:10.1016/j.jviromet.2003.11.015
- Jones, R.A.C., 2009. Plant virus emergence and evolution: Origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control. *Virus Res.* 141, 113–130. doi:10.1016/j.virusres.2008.07.028
- Khan, A.J., Akhtar, S., Briddon, R.W., Ammara, U., Al-Matrooshi, A.M., Mansoor, S., 2012. Complete nucleotide sequence of watermelon chlorotic stunt virus originating from Oman. *Viruses* 4, 1169–1181. doi:10.3390/v4071169
- Kheyr-Pour, a, Bananej, K., Dafalla, G. a, Caciagli, P., Noris, E., Ahoonmanesh, a, Lecoq, H., Gronenborn, B., 2000. Watermelon chlorotic stunt virus from the Sudan and Iran: Sequence Comparisons and Identification of a Whitefly-Transmission Determinant. *Phytopathology* 90, 629–35. doi:10.1094/PHYTO.2000.90.6.629
- Lefeuvre, P., Martin, D.P., Harkins, G., Lemey, P., Gray, A.J.A., Meredith, S., Lakay, F., Monjane, A., Lett, J.M., Varsani, A., Heydarnejad, J., 2010. The spread of tomato yellow leaf curl virus from the middle east to the world. *PLoS Pathog.* 6. doi:10.1371/journal.ppat.1001164
- Li, F., Xu, X., Huang, C., Gu, Z., Cao, L., Hu, T., Ding, M., Li, Z., Zhou, X., 2015. The AC5 protein encoded by Mungbean yellow mosaic India virus is a pathogenicity determinant that suppresses RNA silencing-based antiviral defenses. *New Phytol.* 208, 555–569. doi:10.1111/nph.13473
- Rojas, M.R., Hagen, C., Lucas, W.J., Gilbertson, R.L., 2005. Exploiting Chinks in the Plant's Armor: Evolution and Emergence of Geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 361–394. doi:10.1146/annurev.phyto.43.040204.135939
- 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. doi:10.1016/S0042-6822(95)80093-X

Sufrin-Ringwald, T., Lapidot, M., 2011. Characterization of a synergistic interaction between two cucurbit-infecting begomoviruses: Squash leaf curl virus and Watermelon chlorotic stunt virus. *Phytopathology* 101, 281–289. doi:10.1094/PHYTO-06-10-0159

Wu, C.Y., Lai, Y.C., Lin, N.S., Hsu, Y.H., Tsai, H.T., Liao, J.Y., Hu, C.C., 2008. A simplified method of constructing infectious clones of begomovirus employing limited restriction enzyme digestion of products of rolling circle amplification. *J. Virol. Methods* 147, 355–359. doi:10.1016/j.jviromet.2007.10.002



**Table 1** Percentage nucleotide and amino acid sequence identities (%) between WmCSV-[MX] and other begomovirus belonging to squash clade

	D N A- A	D N A- B	IR -A	A C 1	A C 2	A C 3	A C 4	A C 5	A V 1	A V 2	B C 1	B V 1
	nn	aa	aa	nn	aa	nn	aa	nn	aa	nn	aa	nn
W mC SV- A- IR	<b>99.4</b> <b>80</b>	96.7 6	99.6 2	99.0 5	99.8 3	99.7 5	99.9 2	99.8 7	99.8 1	99.7 0	99.3 2	99.6 5
W mC SV- A- IL	98.4 40	98.5 7	99.6 8	<b>99.3</b> <b>8</b>	99.0 7	99.9 9	99.2 0	99.9 5	99.8 4	99.8 8	99.8 3	99.6 1
W mC SV- A- JO	99.4 00	98.5 7	<b>99.0</b> <b>6</b>	99.0 7	99.0 7	99.8 9	99.2 5	99.9 4	99.8 4	99.8 1	99.8 4	<b>99.0</b> <b>6</b>
W mC SV- A- LE	99.2 20	98.7 5	99.6 2	99.4 5	<b>99.8</b> <b>2</b>	<b>99.7</b> <b>0</b>	<b>99.0</b> <b>0</b>	<b>99.0</b> <b>0</b>	<b>99.0</b> <b>0</b>	99.6 8	99.8 1	99.7 9
W mC SV- A- OM -1	97.9 90	95.8 4	95.6 4	99.6 6	99.7 2	99.5 7	99.8 2	99.8 6	99.9 3	99.8 4	99.6 4	99.5 8
W mC SV- A- OM -2	98.0 40	95.8 4	95.7 1	99.8 6	99.7 2	99.5 7	99.8 6	99.8 8	99.9 3	99.8 4	99.6 4	99.5 8
W mC SV- A- PA	99.3 10	<b>98.9</b> <b>3</b>	97.2 3	99.0 7	99.8 7	99.7 5	99.8 8	<b>99.0</b> <b>0</b>	99.4 4	99.8 4	<b>99.6</b> <b>6</b>	99.7 6
W mC SV- A- SU	98.3 90	97.4 9	99.5 9	99.4 9	99.2 4	99.1 1	99.8 5	99.8 6	<b>99.0</b> <b>0</b>	<b>99.0</b> <b>0</b>	99.8 5	99.7 4
W mC SV- A- YE	98.1 30	96.7 6	99.4 8	99.4 9	99.7 3	99.6 5	<b>99.0</b> <b>0</b>	<b>99.0</b> <b>0</b>	99.4 4	99.5 9	99.6 0	99.7 7

The numbers in bold refers to highest percentages of sequence identities. Acronyms an

## Capítulo 4

### Resultados adicionales

**Evidences of seed transmission of a member of genus *Begomovirus* (*Sida mosaic Sinaloa virus*) isolated from the non-cultivated plant *Sida acuta***

Manuscrito en preparación para ser sometido a revista JCR o en el padrón de CONACYT

**Evidences of seed transmission of a member of genus *Begomovirus* (*Sida mosaic Sinaloa virus*) isolated from the non-cultivated plant *Sida acuta***

Domínguez-Durán G., Romero-Romero J.L., Camacho-Beltrán E., Rivera-Acosta, Magallanes-Tapia M.A., Leyva-López N.E. and Méndez Lozano J.

Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Sinaloa, Departamento de Biotecnología Agrícola. Blvd. Juan de Dios Bátiz Patedes 250, Guasave, Sinaloa 81101, Mexico.

*Corresponding author:*

Jesús Méndez Lozano

Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Sinaloa. Departamento de Biotecnología Agrícola. Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Col. San Joaquín. Guasave, Sinaloa, México C.P. 81101. Tel: +52 (687) 872965

E-mail address: jmendezl@ipn.mxjmendez@ipn.mx

**ABSTRACT**

In this study, seed transmission was determined of *Sida mosaic Sinaloa virus* (SiMSinV) in *Sida acuta* and *Sida rhombifolia*. The genus *Sida* is a group of non-cultivated plants worldwide and number of begomovirus has been isolated from *Sida* plants, indicating the presence of different viral species distributed along Central America, Brazil, the Caribbean and Mexico. In 2010 seeds from symptomatic *S. acuta* and *S. rhombifolia* plants were collected in Guasave Valley from Sinaloa state. A total of 466 seeds were growing *in vitro* conditions and *Sida* seedlings were analyzed 60 dpg for the presence of *Begomvirues*. The PCR detection indicates that 35 samples of *S. acuta* amplify for the expected amplicon for bipartite begomoviruses. In addition, the complete genome (DNA A and B) was

obtained either by Rolling Circle Amplification (RCA) or by specific primers for DNA A and B of SiMSinV. The sequence analysis of both DNA genome components indicated 98% identity to SiMSinV a bipartite begomovirus previously reported in *S. rhombifolia*. Seed-borne viruses has been observed in about 100 species; however, now days no report exhibiting begomoviruses seed transmission have been described. This is the first report of a SiMSinV member of family *Geminivirade* (genus: *Begomovirus*) with the ability of seed transmission in *Sida acuta* plants.

## INTRODUCTION

The genus *Sida* is a group of wild plants that are distributed both the old and the new world (Frischmuth et al., 1997). Most agriculturally important geminiviruses belong to the genus *Begomovirus* and are estimated to be responsible for billions of dollars worth of lost production, especially in tropical areas (Fauquet et al., 2008 and Varma et al., 2003). A number of begomovirus sequences have been isolated from *Sida* plants, indicating the presence of diferent viral species distributed along Central America, Brazil and the Caribbean region (M.E. Roye; et. al., 1997; T. Frischmut; et. al., 1997; P. Höfer; et. al., 1997; J. Jovel; et. al., 2004 and recently identified a new *Begomovirus*-infected plants of *Sida* spp. in the state of Yucatan, Mexico (C. Hernandez, A. M. Idris, G. Carnevali, J.K. Brown, O. A. Moreno, 2007). The epidemiology of begomoviruses is incomplete without the study of wild plants, as crop-infecting begomoviruses may have arisen from endemic wild plant-infecting ones (Andrade et al., 2006), and there are wild plant-infecting begomoviruses that can infect crops (Al-Aqeel 2003). It has been suggested that *Sida* spp. should strongly influence the evolution of geminiviruses since these weeds are perennial, ubiquitous and host members of at least 26 begomovirus species (Andrade et. al., 2006 and Fauquet et al., 2008). In Mexico there are few studies on virus identification and plants belonging to the *Malvaceae* family, *Sida acuta* species should be noted that one of the most widely distributed wild plant. About 100 species of seed-borne viruses are known. The seed can carry the virus in the seed coat or embryo. The presence of virus in the integument is of seminal infection rudiment of the mother plant. This phenomenon can easily occur, having

vascular connections between seminal rudiment and the parent plant. However, few viruses can survive desiccation of the seed head matures. An exception is the snuff mosaic virus (TMV). Approximately 20% of plant viruses are transmitted from generation to generation in the seed (Matthews, 1991; Mink, 1993), and yet very little is known about the mechanism(s) involved. Seed transmission is achieved either by direct invasion of the embryo via the ovule or by indirect invasion of the embryo, mediated by infected gametes (Wang, et al., 1994). Any begomovirus is transmitted by seed. Preliminary analysis conducted in our laboratory indicated that mature seeds of symptomatic *Sida acuta* plants collected in different places in Guasave, Sinaloa, Mexico were infected by begomovirus. With the aim to corroborate the seed transmission of begomovirus in *Sida acuta* plants we characterized at the molecular level the begomovirus infecting *Sida acuta* seeds. This result would be the first evidence of seed transmission of begomovirus.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Seed samples**

In 2010 and 2014 field sample of *Sida acuta* plants with mature seeds showing symptoms of severe yellow mosaic in the leaves were collected in Guasave, Sinaloa, Mexico.

### **Germination of *Sida acuta* seed *in vitro***

To determine the ability of SiMSV transmitted through seed, plant seeds of *Sida acuta* with symptoms associated to geminivirus were put in magentas containing MS medium. The data show that of 466 sanitized seeds (chlorine treatment and hydration) and placed *in vitro* germination for seeds germinated only 35 with a 7.5% germination (Table 1). According to Juan Calderon in 2000 a plant *Sida* spp. in the field produces 7 692 seeds of which 8.2% is feasible under natural conditions, therefore our results in the percentage of germination agree with this author.

The germination of the seeds took about 2 months for the daily monitoring carried out plants germinated successfully observed light mosaics. It should be noted that these symptoms are not comparable with the symptomatology observed in field.

**Table 1. Treatments used for seed germination *in vitro* of *Sida acuta*.**

Treatmens	15 minuetes	30 minuetes	60 minutes	
	Chloride	Chloride	Chloride	
1	100/12			
2	40/0			
3	96/2			
4	50/5	50/1	50/5	
Modified chloride	12 hours	18 hours	24 hours	36 hours
	Hidratation /37°C	Hidratation /37°C	Hidratation /37°C	Hidratation 37°C
5	20/0	20/2	20/6	20/2
Total germinated seeds				35/466

### DNA extraction

Total nucleic acids were extracted from *Sida acuta* seeds were macerated using BioSprint 96 automated equipment of Qiagen following instructions of the manufacturer. DNA products were visualized in agarose gels (0.8%) stained with Gel Red under UV light.

### **Detection of Begomovirus in tomato samples by nested PCR**

To detection of begomovirus were analyzed by nested PCR. The nested PCR procedure, used (RepMot: 5'GAGTCTAGAGGATANGTRAGGAAATARTTTGGC3'/CPMot: 5'CGCGAATTCGACTGGACCTTACATTGGNCCTCAC3') primers (J. T. Ascencio-Ibañez, 2002) amplify a fragment from 650 pb (for New World begomoviruses) to 750 bp (Old World begomoviruses). The nested PCR was performed in 25 µL reaction volumes containing 1 µL PCR product, 0.5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Life Technologies, USA), 1 µl of 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl of 10 mM dNTPs, 1 µl of 10 pM of each forward and reverse primers and 2.5µl of 10X reaction buffer. The amplifications were performed using an automated thermocycler model ICycler (Bio-rad, USA). The nested PCR condition consisted of initial denaturing at 95°C for 4 min followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 2 min followed by 1 cycle at 72°C for 5 min. The nested PCR products were analyzed by electrophoresis in a 0.8% agarose gel and visualized by staining with ethidium bromide and UV illumination. To determine whether genetic variation in begomoviruses detected in wild plants, fragments amplified by nested PCR were used for PCR-RFLP analysis with *MspI* enzyme.

### **Amplification of Complete Genome by Rolling Circle Amplification (RCA) and PCR**

The complete genome of begomovirus was obtained according either by RCA method (GE)and PCR. For RCA amplification 1 µl of total DNA is denature with 9 µl of sample buffer at 95°C fro 3 min. Add 10 µl of Templphi Premix and incubate at 30°C for 18 h.after incubation sample is heat inactivated at 65°C for 10 min and cool on ice. At this step DNA amplification is ready to a digestion with restriction enzyme to linearize the full DNA genome of desire begomovirus. To molecularly characterize of SiMSinV by PCR, specific primers were used to amplify its complete components (DNA-A and DNA-B). These primers are designed on a unique restriction site for the enzyme *Bam*HI (SiMSV-A Forward

5CACGGATCCCACCTTTAATTTGAAC`3 and the first SiMSV-A Reverse 5CACGGATCCCATCAATCGTGCT`3) and the component B is used on a *Xba*I restriction site (SiMSV-B Forward 5CGCTCTAGACGAGATGACGG`3 and SiMSV-B Reverse 5' CGCTCTAGAGATGGTTGAACGC3). Using these primers sets the expected fragment of approximately 2600 bp for later cloning into the pGEM-T EASY vector was amplified.

### **Cloning of PCR products and sequencing of DNA**

To cloning nested PCR fragments amplified with the degenerate primers RepMot-CPMot (Ascencio-Ibañez *et. al.*, 2002), two representative samples from each county were selected and purified with column kit (INVITROGEN) and ligated onto the pGEM-T easy Vector (Promega, Madison, WI). The ligation mixture was used to transform *Escherichia coli* JM109 (Promega). Plasmid DNA from cultures of recombinant colonies was purified using QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN GmbH). Cloned viral DNA fragments were sequenced using an ABI PRISM 377 sequencer using the Dye cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). The sequences of TYLCV isolate from Sinaloa were deposited in GenBank with the accession number FJ012358.

### **Sequence and phylogenetic analysis**

The nucleotide sequence data were edited using the EditSeq program of the sequence analysis software suite Lasergene (DNASTAR Inc.). BLAST was used to compare our sequences against DNA sequences available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Begomovirus sequences used for comparisons and phylogenetic analysis were available in the GenBank database (Table 1). The phylogenetic relations were determined by DNASTAR.



### **Analysis of genetic variability**

Genetic comparison was with program of software MEGA 5. The recombination analysis was performed by using the RDP3 program with the detection methods as described: Bootscan, Geneconv, Maximum Chi Square, Chimaera, Sister Scanning, 3SEQ, Reticulate compatibility matrix, VisRD y Topal DSS.

## RESULTS

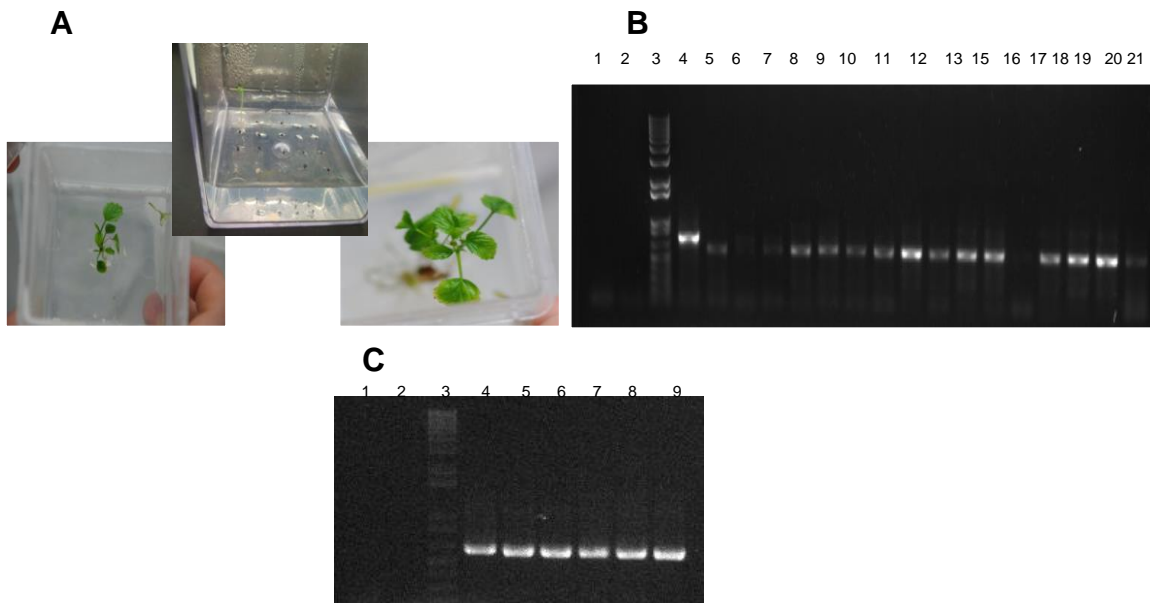
### Detection of begomovirus in seed of *Sida acuta* by nested PCR

The presence of begomovirus was preliminarily diagnosed by nested PCR using degenerate primers starting from a concentration of 100 ng of total DNA from *Sida acuta* plants and seeds. In 2010 seeds from *Sida acuta* were grow *in vitro* conditions, for this analysis 466 seeds were put to germinate in magentas with MS medium, only 35 plants were germinated and analyzed to detect the presence of begomovirus (figure 2A), in 2014 total of 43 seed were analyzed, 25 by pools of 5 seed and 18 individuals seeds by nested PCR detection, in both cases we found that in the *Sida acuta* plants and seeds analyzed was achieved amplify the expected 650 bp fragment which corresponds for a bipartite begomoviruses (figure 2B and C). It is noteworthy that for the genus Begomovirus there are no reports about its ability to spread through seed; however, there are different kinds of virus with this ability, such as Alfalfa mosaic virus (Xu and Nie, 2006), Tobacco mosaic virus (Cerkauskas, 2004) and bean mottle virus (Loren et al., 2002).

## FIGURES



Figure 1. Plants and seed of *Sida acuta* collected in Guasave Valley. A) Symptoms observed in field plants *Sida acuta* showing severe yellow mosaic. B) *Sida acuta* seed collected from infected plants.

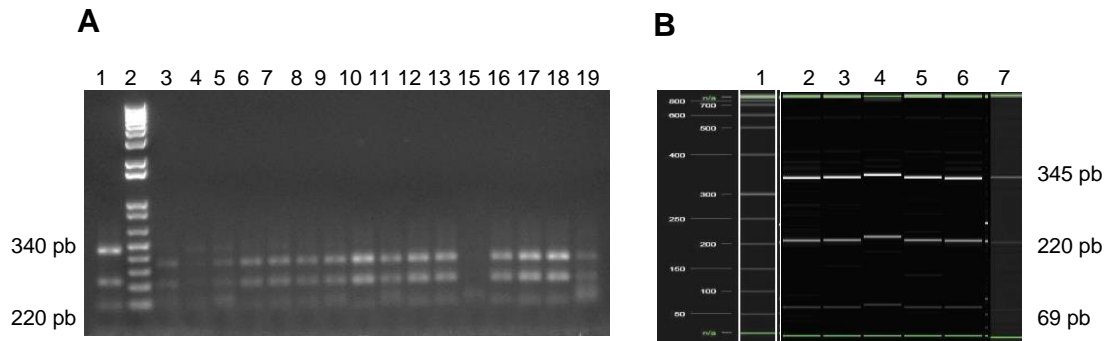


**Figure 2.** A). *Sida acuta* plants germinated *in vitro* conditions. B). Detection of begomovirus in *Sida acuta* plants *in vitro* by nested PCR. Lane 1 and 2, Negative controls,

Lane 3, Size marker, Lane 4, Positive control (TYLCV), Lane 5 to 20, *Sida acuta in vitro* plants and Lane 21, *Sida acuta* wild plant. C). Detection of begomovirus in *Sida acuta* seed by nested PCR. Lane 1 and 2, Negative controls, Lane 3, Size marker, Lane 4, Positive control (SiMSinV), Lane 5 to 9, *Sida acuta* seeds.

### **Preliminary identification of begomovirus in *Sida acuta in vitro* plants and seeds by PCR-RFLP's.**

Determined the presence of begomovirus in plants of *Sida acuta* plants germinated *in vitro* and seeds to confirm their identity, the amplified fragments to restriction analysis (PCR-RFLP 's ) were subjected . Previous studies show that the restriction of the PCR-amplified fragment (N -terminal CP -Rep and intergenic region of DNA A) with the restriction enzymes *MspI* restriction allows quickly differentiate between begomovirus lineages effectively; also allows the presence of more than one virus in a single sample (Monreal-Vargas and Argüello-Astorga, 2005). Based on the above, the amplified fragments of the 17 samples of *Sida acuta* germinated *in vitro* and the 25 seeds were subjected to restriction enzymes *MspI*. In the analysis with the enzyme *MspI* a pattern of two bands of approximately 340 and 220 bp for the electrophoretic analysis by agarose gel (Figure 3 A, lanes 3-18) was observed. For the 25 seeds capillary electrophoresis was performance with the Quiaxcel equipment by Quiagen (Figure 3 B), this technique allows us to obtain a higher resolution in the patterns obtained with *MspI* enzyme. The patterns obtained in these analyzes are similar to those previously reported for SiMSV to be digested with the same enzymes (Ruelas- Ayala, 2008). It is noteworthy that while the restriction of the amplified DNA from a plant of *Sida acuta* control field as a source was performed as previously described , obtaining the same restriction pattern (Figure 3 A lane 19). The results indicate that the fragments amplified *in vitro* germinated *Sida* plants and seed from a wild plant is associated with previously reported SiMSinV.



**Figure 3.** A). Preliminary identification of begomovirus by PCR-RFLP's in *Sida acuta in vitro* plants. Lane 1, positive control (TYLCV), Lane 2, molecular Size marker, Lane 3-18 *in vitro Sida acuta* plants, Lane 19 wild *Sida acuta* plant. B). Preliminary identification of begomovirus by PCR-RFLP's in *Sida acuta* seeds. Lane 1, Size marker, Lane 2, positive control (SiMSinV), Lane 3 to 6 *Sida acuta* seeds (pools of 5), Lane 7 wild *Sida acuta* plant.

## DISCUSSION

Most agriculturally important geminiviruses belong to the genus Begomovirus and are estimated to be responsible for billions of dollars worth of lost production, especially in tropical areas (Fauquet et al., 2008 and Varma et al., 2003). The epidemiology of begomoviruses is incomplete without the study of wild plants, as crop-infecting begomoviruses may have arisen from endemic wild plant-infecting ones (Andrade et al., 2006), and there are wild plant-infecting begomoviruses that can infect crops (Al-Aqeel 2003). It has been suggested that *Sida* spp. should strongly influence the evolution of geminiviruses since these weeds are perennial, ubiquitous and host members of at least 26 begomovirus species (Andrade et. al., 2006 and Fauquet et al., 2008). Despite this barrier, they continue to cause disease in epidemic proportion. It is necessary to address key issues like survival of virus in alternative hosts and its importance as inoculum source. With this perspective, we initiated study of the seed transmission of SiMSinV infecting its natural host *Sida acuta*. We describe here the identification and characterization of a begomovirus that can be transmitted by seed in its natural host in Mexico. To our knowledge, this is the first record of a begomovirus been transmitted by seed. It appears that wild plants are likely storehouse for mobilization and recombination due to multiple infections of begomoviruses, *Sida*

*acuta* are widely distributed in tropical and subtropical regions where other begomoviral diseases are major problems. Characterization of viruses from an array of the diseased plants is necessary to understand and manage crop diseases. *Sida* spp. may provide an environment for mixed infection and recombination. *Sida* infecting begomoviruses may be participating in the evolution of agriculturally relevant begomoviruses in Mexico (Stewart et. al., 2013).

## REFERENCES

- Ascencio-Ibáñez, J. R., Díaz-Plaza, Méndez-Lozano, J., Monsalve-Fonnegra Z., Arguello-Astorga, G., Rivera-Bustamante, R. F. 1999. First Report of *Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus* in Yucatán, México. *Plant Disease*. 83:1178.
- Cerkauskas, R. 2004. Whitefly-transmitted geminiviruses. *Pepper Diseases*. AVRDC- The World Vegetable Center. Fact Sheet. [www.avrdc.org](http://www.avrdc.org).
- Fauquet, C.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M. and Zhou, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch Virol* 153:783–821.
- 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.
- Hofer, P., Engel, M., Jeske, H., Frischmuth, T. 1997. Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed *Sida rhombifolia* in Costa Rica. *Journal of General Virology* 78: 1785-1790.
- Jovel, J., Reski, G., Rothenstein, D., Ringel, M., Frischmuth, T., and Jeske, H. 2004. *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of begomovirus different from Abutilon mosaic virus. *Arch. Virol.* 149: 829-841.
- Loren, J. G., Said, A. G., Thomas, E. H., John, H. H. 2002. Bean pod mottle virus.
- Mink, G.I. 1993. Pollen- and seed-transmitted viruses and viroids. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31, 375-402.
- Roye, M. E., McLaughlin, W. A., Nakhla, M. R., Maxwell, D. P. 1997. Genetic diversity among geminiviruses associated with three weed species, *Sida* spp., *Macroptilium lathyroides*, and *Wissadula amplissima*, in Jamaica. *Plant Disease* 81, 1251–7.
- Varma A, Malathi VG (2003) Emerging geminivirus problems: a serious threat to crop production. *Annals Appl Biol* 142:145–164.

- Xu, H., J. Nie. 2006. Identification, characterization and molecular detection of Alfalfa mosaic virus in potato. *Phytopathology* 96: 1237-1242.
- Stewart, C., Kon, T., Rojas M., Graham, A., Martin, D., Gilberson R. And Roye M. 2013. The molecular characterisation of a Sida-infecting begomovirus from Jamaica. *Archives of virology*. 2014. 159:375-378.
- Matthews, R.E.F. 1991. *Plant Virology*, Third Edition San Diego, CA: Academic Press, Inc.
- Wang, D. and Maule J. A. 1994. A model for seed transmission of a plant virus: Genetic and structural analyses of pea embryo invasion by pea seed-borne mosaic virus. *The plant cell*. Vol 6, 777-787.
- Aqeel, H.A., 2003. Characterisation of two begomoviruses isolated from *Sida santaremensis* Monteiro and *S. acuta* Burm f. MSc. Thesis, University of Florida. [http://etd.fcla.edu/UF/UFE0002838/alaqeel\\_h.pdf](http://etd.fcla.edu/UF/UFE0002838/alaqeel_h.pdf). Accessed 24 Mar 2010.



## Resultados adicionales:

### 4.2 Molecular characterization of naturally coinfection of *Rhynchosia golden mosaic Sinaloa virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* in noncultivated *Rhynchosia minima* plants

Manuscrito en preparación

**Molecular characterization of naturally coinfection of *Rhynchosia golden mosaic Sinaloa virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* in noncultivated *Rhynchosia minima* plants.**

#### Abstract

**Background:** *Rhynchosia minima* is a common noncultivated plant found all over Sinaloa, in cultivated and non-cultivated areas. It also had been reported to be a natural host of diferents begomovirus. One of this begomovirus is *Rhynchosia golden mosaic Sinaloa virus* (RhGMSinV), that produce characteristic symptom of yellow and/or golden mosaic on leaves. An introduced monopartite begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) had been found infecting noncultivated plants in the same áreas where *R. minima* is usual to be found. The obejctive of this study is to determinate the complete nucleotide sequence and genome organization and the phlogenetic relationship of RhGMSinV *R.minima* and TYLCV found in a natural coinfection.

**Findings:** To determine the presense of begomovirus infecting *R.minima* plants, PCR and nested PCR reactions were performed with degenerated primers and to amplify the full-lemght genome of RhGMSinV *R.minima* RCA reactions were carry out. The completes genomes of RhGMSinV and a partial sequence of *Tomato yellow leaf curl virus* was molecularly charactized, analyzed phylogenetically. Pairwise indicated that TYLCV isolate we detected in *R.minima* plants its the same virus that its infecting and devastating the crops fields of Sinaloa.

**Conclusion:** *R.minima* is a perennial, invasive noncultivated plant that is widely distributed throughout Sinaloa and increased cultivated areas, may result in crops been infected by RhMSinV *R.minima* in coinfection of an aggressive monopartite begomovirus leading in economical lost.

**Keywords:** *Rhynchosia minima* ,Begomovirus, *Rhynchosia golden mosaic Sinaloa virus*, *Tomato yellow leaf curl virus*, Rolling Circle Amplification.

## Background

The genus Begomovirus (family Geminiviridae) consists of whitefly-transmitted single-stranded DNA viruses that infect dicotyledonous plants. The begomovirus genome may be bipartite or monopartite [1]. The DNA components of bipartite begomoviruses, such as Bean golden yellow mosaic virus- [Guatemala:1987], are designated DNA-A and DNA-B. The DNA-A encodes genes that are necessary for viral replication [2] and whitefly transmission [3]. Genes encoded by the DNA-B component allows for virus movement within the plant [4]. The DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses have little sequence homology except for the common region (CR) of 160–200 nucleotides that is highly conserved between the two components. Within the CR are sequence elements that are essential for replication [5] and transcription of viral genes [6].

Begomoviruses are known to cause disease outbreaks and epidemics of crop plants, including cassava, tomato, cotton, cabbage, and legumes worldwide [7, 8]. Some begomovirus species consist of members that infect only wild plants in nature, for example members of the species Sida golden mosaic Honduras virus and Sida golden mosaic Costa Rica virus infect only Sida spp. [9, 10], while the begomovirus species Tomato yellow leaf curl virus, Calopogonium golden mosaic virus, Macroptilium yellow mosaic Florida virus, and Macroptilium mosaic Puerto Rico virus have members that naturally infect both wild and cultivated plants [11–12]. *Rhynchosia minima* (Family: Fabaceae) was identified as one of the species that is commonly observed with symptoms resembling those caused by other begomoviruses [13]. Rhynchosia mosaic disease was reported previously in the Western Hemisphere, where *R. minima* plants showing golden mosaic symptoms have been associated with different begomoviruses such as Rhynchosia mosaic virus Puerto Rico (AF442117) [14], Rhynchosia golden mosaic virus Honduras (AF239671) [15], and Rhynchosia mosaic Sinaloa virus (DQ406672). Recently, Rhynchosia mosaic disease was reported in the Eastern Hemisphere, where *R. minima* plants were associated with a novel bipartite begomovirus (Rhynchosia yellow mosaic virus) [16]. But also, not only the noncultivated plants are being infected by Rhynchosia mosaic disease, in Ecuador, a natural recombinant of

RhGMYuV was detected in tomato samples in a coinfection with the unique monopartite begomovirus from the new world, Tomato leaf deformation virus [17]. *R.minima* is a perennial, invasive noncultivated plant that is widely distributed throughout Sinaloa and increased cultivated areas, may result in crops been infected by RhMSinV *R.minima* in coinfection of an aggressive monopartite begomovirus leading in economical lost. The completes genomes of RhGMSinV and a partial sequence of TYLCV was molecularly charactized, analyzed phylogenetically. Pairwise indicated that TYLCV isolate we detected in *R.minima* plants its the same virus that its infecting and devastating the crops fields of Sinaloa.

## Methods

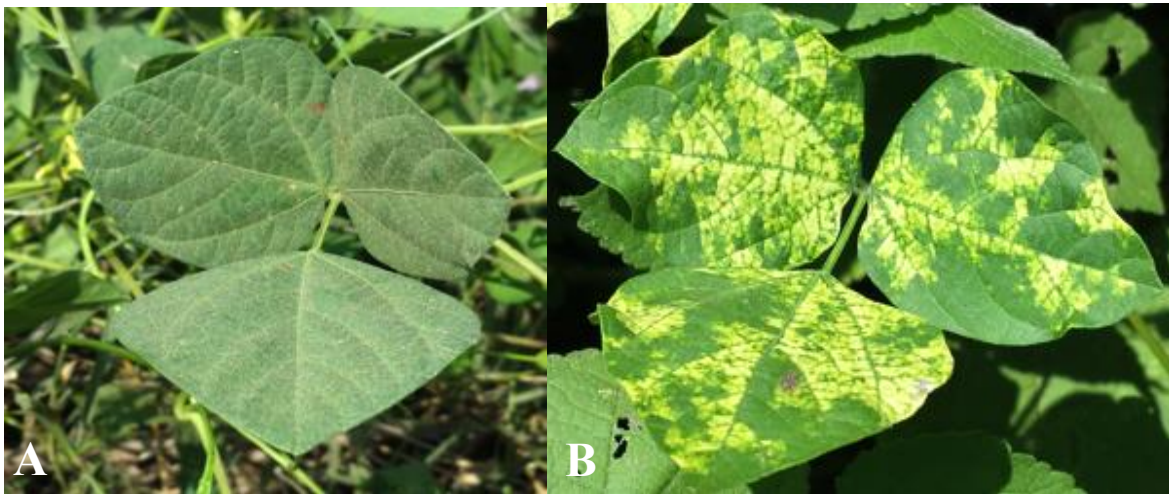
Seven *Rhynchosia minima* (figure 1) were collected from 150 noncultivated plant specimens that exhibited foliar symptoms suggestive of begomovirus infection, chlorosis, chlorotic spots, yellow or golden mosaic, yellow/green mottle, curling, and distortion. Samples were collected during 2012–2015. Total DNA was performed by the procedure of cetyl trimethyl ammonium chloride at 3%, (CTAB) [18]. PCR was performed to detect begomovirus in noncultivated plants using the degenerated primers Rep-DGRSAR and CP70-BamHI [10] and P-MOT/CP70 for a nested PCR. Total DNA of positive samples were used to amplify begomoviral genomic components using phi29 DNA polymerase (TempliPhi, GE Healthcare) [19] following manufacturer's instructions. To release the monomeric fragments, the amplified viral DNA was digested with BamHI from both components. The linearized DNA-A and DNA-B components were size selected (2.6 kb) and recovered from 0.8% agarose gels using a Qiaex II Gel Extraction Kit (QIAGEN). The linearized fragments were ligated into the pGreen0029 and pBlueScript SK-vector that had been digested either with BamHI. The ligation mix was used to transform *Escherichia coli* DH5 a following standard procedures [20] Bacterial colonies bearing recombinant plasmids carrying apparent monomeric full length viral inserts were selected for sequencing. The clones DNA-A and DNA-B components of RhYSinV were sequenced at the DNA sequencing facility (Cinvestav- Irapuato). The resultant DNA sequence fragments were aligned and

edited using EditSeq and SeqMan software (DNASTar Inc., Madison, WI, USA) to construct a complete DNA-A and DNA-B component, each of approximately 2.6 kb in size. To establish the identity of each sequence, pairwise percentage nucleotide identity (distance) was calculated using ClustalV, also available in the DNASTAR package.

## Results and discussion

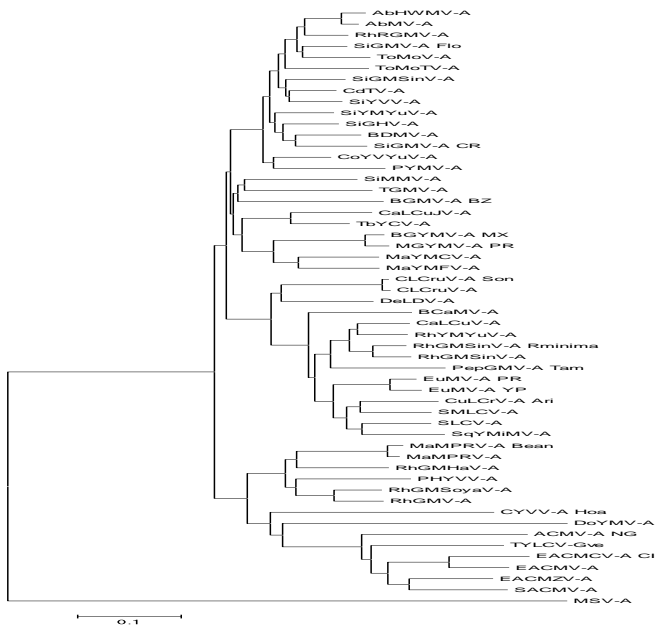
Three DNA-A and DNA-B components of RhGMSinV *R.minima* were fully sequenced and shown to be >99% identical, indicating that they are isolates of the same virus species. The BLASTn search confirmed that RhGMSinV *R.minima* is most closely related to other western hemisphere begomovirus. The DNA-A component of RhGMSinV *R.minima* shared its highest nucleotide sequence identity (93%) with one begomovirus from Mexico, RhMGSinV, indicating that it belongs to a new strain of that species, based on the new criteria established [21]. The DNA-A component of RhGMSinV *R.minima* was organized similar to other Western Hemisphere bipartite begomoviruses as it has five open reading frames (ORF): the AV1 (CP) on the virion sense strand and AC1 (Rep), AC2 (TraP), AC3 (REn) and AC4, on the complementary sense strand. The full-length DNA-B clones were sequenced completely and were 99% similar, suggesting that they are isolates of the same begomovirus. The complete DNA-B of RhGMSinV *R.minima* is most closely to RhGMSinV with a sequence identity of 87%. Two genes *BC1* and *BV1* are present on the viral and complementary strands, respectively, of the DNA-B component (figure 2). The 5' termini of the viral and complementary sense genes on the DNA-A and DNA-B of RhGMSinV *R.minima* are separated by an IR. Within this IR, a CR of 297 nucleotides of RhGMSinV *R.minima* was most identical, 90%, to the CR of RhGMSinV. Present in the CR of RhGMSinV *R.minima* are characteristic features of geminivirus CRs such as the origin of replication within a putative stem loop structure, the TATA box transcriptional element and multiple copies of an iterated sequence, predicted to be the Rep-binding site (rbs). In RhGMSinV *R.minima*, this putative iterated sequence, TGGAG is a perfect tandem repeated located 7 and 10 nucleotides upstream of the TATA box. The inverted

complementary sequence (CTCCA) is repeated twice, and is located between the nucleotide coordinates 99 and 22 upstream of the TATA box. Multiple alignments of the DNA-A and DNA-B components, in addition to that of the CR, were used to reconstruct phylogenetic trees for each genome component and the CR. The DNA-A and DNA-B of WGMSTV-[JM:Alb:05] show a congruent ancestry in that they were most related to viruses of the clade containing RhGMSinV. *R. minima* is a perennial, invasive plant that is widely distributed throughout Sinaloa and increased cultivation of bean and tomato, especially in new areas, may result in members of the RhGMSinV *R.minima* infecting in these crops. It would be a good idea if the backyard gardening initiative was complemented with substantial public education and outreach to increase the awareness and impact of whitefly transmitted begomoviruses as pathogens of food crops. Knowledge of noncultivated and the importance of rouging these wild plants, particularly those showing yellow mosaic, as a component of the integrated pest management plan is important in this particular example because RhGMSinV *R.minima* could be adapted to crops.

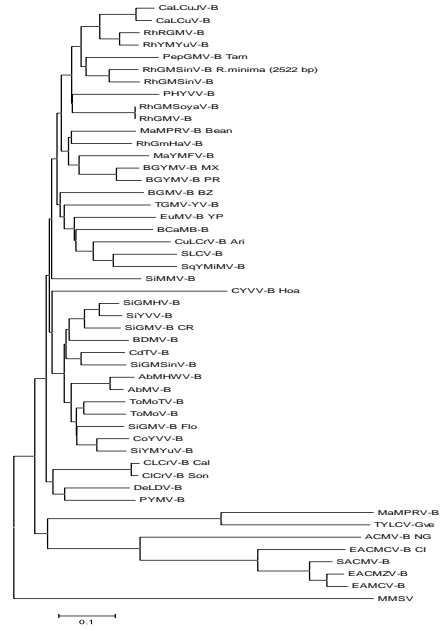


**Figure 1.** (A) Asymptomatic *Rhynchosia minima* plant; (B) Characteristic symptomatology associated to RhGMSinV in *Rhynchosia minima* plants.

A



B



**Figure 2.** Cladograms showing relatedness of the genomic DNA-A and DNA-B components of RhGMSinV *R.minima* to other begomoviruses. (A) DNA-A and (B) DNA-B, were reconstructed using MUSCLE available in MegAlign (DNAStar Inc). Bootstrap values are placed at the nodes.

## References

1. C.M. Fauquet, J. Stanley, *Ann. Appl. Biol.* 142, 165–189 (2003)
2. E.B. Fontes, V.A. Luckow, L. Hanley-Bowdoin, *Plant Cell* 4, 597–608 (1992)
3. P. Höfer, I.D. Bedford, P.G. Markham, H. Jeske, T. Frischmuth, *Virology* 236, 288–295 (1997)
4. A.A. Sanderfoot, S.G. Lazarowitz, *Plant Cell* 7, 1185–1194 (1995)
5. G.R. Argüello Astorga, R.G. Guevara-González, L.R. Herrera-Estrella, R.F. Rivera-Bustamante, *Virology* 203, 90–100 (1994)
6. P. Eagle, L. Hanley-Bowdoin, *J. Virol.* 71, 6947–6955 (1997)
7. F.J. Morales, P.K. Anderson, *Arch. Virol.* 146, 415–441 (2001)
8. A. Varma, V.G. Malathi, *Ann. Appl. Biol.* 142, 145–164 (2003)
9. T. Frischmuth, M. Engel, S. Lauster, H. Jeske, *J. Gen. Virol.* 78, 2675–2682 (1997)
10. P. Höfer, M. Engel, H. Jeske, T. Frischmuth, *J. Gen. Virol.* 78, 1785–1790 (1997)
11. M. Diaz, D.P. Maxwell, J.P. Karkashian, P. Ramirez, *Plant Dis.* 86, 188 (2002)
12. R. Salati, K. Nahkla, M.R. Rojas, J. Jaquez, D.P. Maxwell, R.L. Gilbertson, *Phytopathology* 92, 487–496 (2002)
13. A.M. Idris, E. Hiebert, J. Bird, J.K. Brown, *Phytopathology* 93, 774–783 (2003)
14. Hernández-Zepeda C, Brown JK, Moreno-Valenzuela OA, Argüello-Astorga GR, Idris AM, Carnevali G, Rivera-Bustamante RF: Characterization of Rhynchosia yellow mosaic Yucatan virus, a new recombinant begomovirus associated with two fabaceous weeds in Yucatan, Mexico. *Arch Virol* 2010, 155:1571-1579.
15. Potter JL, Roca de Doyle MM, Nakhla MK, Maxwell DP: First report and characterization of Rhynchosia golden mosaic virus in Honduras. *Plant Dis* 2000, 84:1045
16. Ilyas M, Qazi J, Mansoor S, Briddon RW: Molecular characterisation and infectivity of a “Legumovirus” (genus Begomovirus: family Geminiviridae)

infecting the leguminous weed *Rhynchosia minima* in Pakistan. *Virus Res* 2009, 145:279–284

17. Paz-Carrasco LC, Castillo-Urquiza GP, Lima ATM, Xavier CAD, Vivas-Vivas LM, Mizubuti ESG, Murillo-Zerbini F: Begomovirus diversity in tomato crops and weeds in Ecuador and the detection of a recombinant of rhynchosia golden mosaic Yucatan Virus. *Arch Virol* 2014, 159:2127-2132.
18. Wyatt SD, Brown JK: Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 1996, 86:1288–1293.
19. Ascencio-Ibáñez, JR, Díaz-Plaza, Méndez-Lozano J, Monsalve-Fonnegra Z, Arguello-Astorga, GR, Rivera-Bustamante, RF: First Report of Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus in Yucatán, México. *Plant Disease* 1999. 83:1178.
20. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
21. Eagle PA, Hanley-Bowdoin L: cis element that contribute to Geminivirus transcriptional regulation and the efficiency of DNA replication. *J Virol* 1997, 71:6947–6955.



## VI. Conclusiones generales

El mundo esta en un periodo acelerado de cambio climático acompañado por la rápida expansión de las actividades humanas. Estos cambios tienen impactos sobre las plantas, vectores y virus ocasionando mayores inestabilidades en los fitosistemas virus-plantas. Los cambios climaticos en espacio y tiempo ocurren por la fructuación de la temperatura, lluvias y patrones de vientos lo cual podría ocasionar alteraciones regionales sobre las plantas no cultivadas, su distribución y mayor abundancia. Además, en regiones donde el clima es muy cálido, se generan condiciones ideales para el optimo crecimiento y desarrollo de las plantas no cultivadas.

Esto tiene mayor implicación en nuestra capacidad para desarrollar controles efectivos sobre las epidemias virales que disminuyen la producciión de alimentos a nivel mundial; lo que genera una era emocionante en la cual podemos investigar la epidemiologia de virus en las plantas no cultivadas en diferentes regiones del estado de Sinaloa, y las implicaciones del desarrollo de tratamientos efectivos para el control de enfermedades y a su vez su biodiversidad, especialmente cuando nuevos esecenarios se presentan al entrar en contacto la flora silvestre con los agroecosistemas donde las condiciones cambian rapidamente y el control de enfermedades viralres resulta menos efectivo o complamente inefectivo. Un componente crucial de este tipo de investigaciones envuelve la revelación que la biodiversidad de virus presentes en las plantas no cultivadas, los cuales pueden tener la capacidad de infectar a las plantas presentes en los agroecosistemas. El factor mas crítico en la evolución de una enfermedad emergente es la expansión y adaptación en los huéspedes naturales. La rápida expansión en las activades humadas incluyen la implentación de prácticas agrícolas más intensas, extensas y diversas, mayor dispersión de los monocultivos, una enorme pérdida de diversidad genética, incremento en la fragmentación en la flora nativa, aplicación desmesurada de agroquímicos, irrigaciones y cultivos protegidos. Todos estos factores propician la aparición de enfermedades emergentes ocasionadas por begomovirus.

Esto, genera información no solo sobre el potencial de inducir nuevas enfermedades, sino sobre la posible evolución de los begomovirus al entrar en contacto con nuevos huéspedes y la respuesta a los rápidos cambios ambientales. Es por ello, que tenemos la creciente necesidad de estudiar a los begomovirus en los ecosistemas naturales en áreas ricas en biodiversidad de flora nativa donde la información generada facilitaran el desarrollo de estrategias efectivas en el control de las enfermedades. Dichos estudios ayudaran a identificar las posibles amenazas que poseen los virus nativos al cruzar la barrera e infectar nuevos huéspedes, lo que subsecuentemente podrían ser distribuidos mundialmente a través de la rápida expansión del comercio de plantas y sus productos.

## **VII. Perspectivas**

A partir de los estudios y discusiones presentados en esta Tesis Doctoral, las perspectivas de trabajos futuros se orientan directamente al estudio de begomovirus en las plantas no cultivadas.

En un primer plano estaría el trabajo destinado a la caracterización de begomovirus en las familias *Asteracea* y *Euphorbeacea*, ya que la primera de ellas, del 100% de las muestras colectadas ninguna presentaba sintomatología relacionada a begomovirus y al analizarse mediante técnicas moleculares para la detección de los mismos, casi siempre resultaba positiva, por lo que considero necesario un analisis mas profundo sobre caracterización de begomovirus en esta

familia. Por otra parte, la segunda familia, al observarse en campo, regularmente las plantas no cultivadas pertenecientes a esta especie, los síntomas observados en campo son severos, por lo que se puede hipotetizar que el begomovirus tipo es agresivo y podría ser agente causal de una enfermedad emergente bajo las condiciones óptimas en diferentes cultivos agrícolas.

Otro punto que sería interesante completar, sería el estudio de la interacción de los virus RhGMV aislados de *R. minima* de diferentes zonas geográficas del estado de Sinaloa, ya que conocemos la agresividad de ambos aislados y si sería plausible el empleo de una cepa no agresiva como vector de inducción de antagonismo hacia otras especies de virus.

Finalmente, creo que es interés mundial dar respuesta a la mayor pregunta relacionada a la capacidad de transmisión por semilla de los begomovirus, donde tenemos las evidencias positivas de eventos de este tipo de transmisión en una de las especies de begomovirus nativos del estado de Sinaloa. Sería necesario un estudio destinado 100% a la búsqueda de diferentes especies con este tipo de capacidad en las diferentes al menos las principales familias del estado de Sinaloa, a la cual me atrevería a llamar *Begomovirus seed transmission hunter*.

## VIII. Referencias bibliográficas adicionales

- Anderson, M., K. Richardson, S. Harbison and B. Morris. 1998. Nucleotide sequence of the Geminivirus Chloris striate mosaic virus. *Virology*, 164: 443-449.
- Anderson, P.K., Cunningham, A.A., Patel, N.G., Morales, F.J., Epstein, P.R., Daszak, P. 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol. Evol.* 19:535–544.
- Anderson, P.K., Cunningham, A.A., Patel, N.G., Morales, F.J., Epstein, P.R., Daszak, P. 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol. Evol.* 19:535–544.

- André P. Graham, Darren P. Martin, Marcia E. Roye 2009. Molecular characterization and phylogeny of two begomovirus infecting malvastrum americanum in Jamaica in *Virus Genes* 40: 256-266.
- Ascencio-Ibáñez, J. R., Díaz-Plaza, Méndez-Lozano, J., Monsalve-Fonnegra Z., Arguello-Astorga, G., Rivera-Bustamante, R. F. 1999. First Report of Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus in Yucatán, México. *Plant Disease*. 83:1178.
- Ascencio-Ibáñez, 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, México. *Plant Disease* 86:692.
- Assunção, I. P. 2006. Diversidade genética de begomovirus que infectan plantas invasoras na região nordeste. *Planta Daninha*, v. 24, n. 2, p. 239-244.
- Bedford, I. D, Kelly, A. Banks, G. K. Briddon, R.W. Cenis, J. L. y Markham, P.G. 1997. *Solanum nigrum*: an indigenous weed reservoir for a tomato yellow leaf curl geminivirus in southern Spain. *European Journal of Plant Pathology* 104: 221–222, 1998.
- Briddon, R. W., Bull, S. E., Amin, I., Idris, A. M., Mansoor, S., Bedford, I. D., Dhawan, P., Rishi, N., Siwatch, S. S., Abdel-Salam, A. M., Brown, J. K., Zafar, Y., Markham, P. G. 2003. Diversity of DNA- $\beta$ , a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology* 312: 106–121.
- Briddon, R.W., Pinner, M.S., Stanley, J. and Markham, P.G.1990. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*, 177, 85–94.
- Burdon JJ, Chilvers GA: Host density as a factor in plant disease ecology. *Annu Rev Phytopathol* 1982, 20:143-166. [L]  
[SEP]
- Chiba, M., Reed, J.C., Prokhnevsky, A.I., Chapman, E.J., Mawassi, M., Koonin, E.V., Carrington, J.C. and Dolja, V.V. 2006. Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. *Virology*, 346, 7–14.
- Cho JJ, Mitchell WC, Mau RFL, Sakimura BP, 1987b. Epidemiology of tomato spotted wilt virus disease on crisphead lettuce in Hawaii. *Plant Disease*, 71, 505 – 8.
- Cooper, B., Schmitz, I., Rao, A.L., Beachy, R.N. and Dodds, J.A. 1996. Cell-to-cell transport of movement-defective cucumber mosaic and tobacco mosaic viruses in transgenic plants expressing heterologous movement protein genes. *Virology*, 216, 208–213.
- Cooper, I., Jones, R.A.C., 2006. Wild plants and viruses: under-investigated ecosystems. *Virus Research*. 67:1–47.

- Dasgupta, R., Garcia, B.H., 2nd, and Goodman, R.M. 2001. Systemic spread of an RNA insect virus in plants expressing plant viral movement protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 4910–4915.
- Dobson, A. and Foufopoulos, J. 2001. Emerging infectious pathogens of wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B* 356:1001–1012
- Elvira Fiollo-Olivé, Yamila Martínez-Zubiaur, Enrique Moriones, Jesús Navas-Castillo. 2010. Complete nucleotide sequence of Sida golden mosaic Florida virus and phylogenetic relationships with other begomoviruses infecting malvaceous weeds in the caribbean. *Arch Virol*.
- Faria, J. C., Zerbini, F.M. 2000. Família Geminiviridae - taxonomia, replicação e movimento. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 8:25-65.
- Fauquet, C. M., Bisaro, D. M., Briddon, R. W., Brown, J. K., Harrison, B. D., Rybicki, E. P., Stenger, D. C., Stanley, J. 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology* 148: 405-421.
- Fernandes, R. F, Albuquerque, C. L, Oliveira, L. C, Cruz, R. R, Rocha, B. W, Pereira, G. T, Naito, B. F, Dias, M. N, Nagata, T, Faria, C. J, Zerbini, M. F, Aragao, L. J y Nagata-Inoue, K. A. 2011. Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), infecting Euphorbia heterophylla plants. *Archives of Virology* 156:2063–2069.
- 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.
- Froissart, R., Michalakos, Y. and Blanc, S. 2002. Helper-component transcomplementation in the vector transmission of plant viruses. *Phytopathology*, 92, 576–579.
- Garrett, K.A., Dendy, S.P., Frank, E.E., Rouse, M.N., Travers, S.E., 2006. Climate change effects on plant disease: genomes to ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*. 44:489–509.
- Hacker, D.L. and Fowler, B.C. 2000. Complementation of the host range restriction of southern cowpea mosaic virus in bean by southern vean mosaic virus. *Virology*, 266, 140–149.
- Haible, D., Kober, S., Jeske, H. 2006. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of Virological Methods* 135:9–16
- Hofer, P., Engel, M., Jeske, H., Frischmuth, T. 1997. Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed Sida rhombifolia in Costa Rica. *Journal of General Virology* 78:1785-1790.

- Huppert, E., Szilassy, D., Salanki, K., Diveki, Z. and Balazs, E. 2002. Heterologous movement protein strongly modifies the infection phenotype of cucumber mosaic virus. *J. Virol.* 76, 3554–3557.
- J.L. Harper., J. Burdon, S.R. Leather (Eds.). 1990. Pests, pathogens and plant communities: an introduction *JPests, Pathogens and Plant Communities*, Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 3–14
- Jeger, M.J., Seal, S.E., Van den Bosch, F., 2006. Evolutionary epidemiology of plant virus disease. *Adv. Virus Research.* 67:163–203.
- Jeger, M.J., Seal, S.E., Van den Bosch, F., 2006. Evolutionary epidemiology of plant virus disease. *Adv. Virus Res.* 67, 163–203.
- Jones, R. 2009. Plant virus emergence and evolution: Origins, new encounters scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control. *Virus Research.* 141:113-130.
- Jovel, J., Reski, G., Rothenstein, D., Ringel, M., Frischmuth, T., Jeske, H. 2004. Sida micrantha mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from Abutilon mosaic virus. *Archives of virology.* 149(4): 829-841.
- Jupin, I., F. De Kouchkovsky, Jouanneau, F., Gronenborn, B. 1994. Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): Involvement of the protein encoded by ORF C4. *Virology*, 204: 82-90.
- Jyothsna, P. Rawat, R y Malathi, V. G. 2011. Molecular characterization of a new begomovirus infecting a leguminous weed *Rhynchosia minima* in India. *Virus Genes* 42:407–414.
- Kuhn, C.W. and Dawson, W. 1973. Multiplication and pathogenesis of cowpea chlorotic mottle virus and southern bean mosaic virus in single and double infections in cowpea. *Phytopathology*, 63, 1380–1385.
- Malmstrom, C.M., Hughes, C.C., Newton, L.A., Stoner, C.L., 2005a. Virus infection in remnant native bunchgrasses from invaded California grasslands. *New Phytology.* 168: 217–230.
- Malmstrom, C.M., Hughes, C.C., Newton, L.A., Stoner, C.L., 2005a. Virus infection in remnant native bunchgrasses from invaded California grasslands. *New Phytology.* 168: 217–230.
- Malmstrom, C.M., McCullough, A.J., Johnson, H.A., Newton, L.A., Borer, E.T., 2005b. Invasive annual grasses indirectly increase virus incidence in California native perennial bunchgrasses. *Oecologia* 145:153–164.
- Malmstrom, C.M., McCullough, A.J., Johnson, H.A., Newton, L.A., Borer, E.T., 2005b. Invasive annual grasses indirectly increase virus incidence in California native perennial bunchgrasses. *Oecologia* 145:153–164.
- Mansour A, Al-Musa A. 2006. Tomato yellow leaf curl virus: host range and virus-vector relationships. *Plant Pathol* 41: 122–125

- Marcia E. Roye, Wayne A. McLaughlin 1997. Genetic Diversity Among Geminivirus Associated with the weeds species *Sida* spp., *Macroptilium lathyroides*, and *Wissadula amplissima* for Jamaica. *Plant Dis* 81: 1251-1258
- Marshall, E.J.P, Brown, V. K., Boatman, N. D., Lutman, P.J W., Squire, G.R and Ward, L.K. 2003. The role of weeds in supporting biological diversity within crop fields. *Weed research*, 77-89.
- Mayo, M., Ryabov, E., Fraser, G. and Taliansky, M. 2000. Mechanical transmission of Potato leafroll virus. *J. Gen. Virol.* 81, 2791–2795.
- Méndez-Lozano J, Quintero-Zamora E, Barbossa-Jasso MP, Leyva-Lopez NE, 2006. A begomovirus associated with leaf curling and chlorosis of soybean in Sinaloa, Mexico is related to Pepper golden mosaic virus *Plant Disease* 90:109.
- Morales, F.J., Anderson, P.K., 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*. 146: 415–441.
- Morales, F.J., Jones, P.G., 2004. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research*. 100:57–65.
- Nagata Inoue Alice K, Lima Mirtes F, Gilbertson L Robert. 2016. A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Hortic. Bras.* Vol 34. No1.
- Potter, J. L., Nakhla, M. K., Mejía, L., Maxwell, D. P. 2000. PCR and DNA hybridization methods for specific detection of bean-infecting begomoviruses in the Americas and Caribbean. *Plant Disease*. 87:1205-1212.
- Roger A.C.Jones. 2009. Plant virus emergence and evolution: Origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control. *Virus research* 141, 113-130
- Rojas, M. R. 2001. Detection and Characterisation of Whitefly- Transmitted Geminiviruses by the Use of Polymerase Chain Reaction. Madison, Wisconsin, USA: University of Wisconsin-Madison, MSc Thesis.
- Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russell, D. R., Maxwell, D. P. 2005. Use of degenerate primers in polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77, 340–7.
- Roye, M. E., McLaughlin, W. A., Nakhla, M. R., Maxwell, D. P. 1997. Genetic diversity among geminiviruses associated with three weed species, *Sida* spp., *Macroptilium lathyroides*, and *Wissadula amplissima*, in Jamaica. *Plant Disease* 81:1251–7.
- Ryabov, E.V., Robinson, D.J. and Taliansky, M. 2001b. Umbravirus encoded proteins both stabilize heterologous viral RNA and mediate its systemic movement in some plant species. *Virology*, 288, 391–400.

- S.F. Elena, C. Caranta, M.A. Aranda, M. Tepfer, J.J. López-Moya (Eds.), 2011. Evolutionary constraints on emergence of plant RNA viruses Recent Advances in Plant Virology, Caister Academic Press, Norfolk, UK. pp. 283–300
- Sambrook, J., Fritsh, E. F., Maniatis, T. 1999. Molecular Cloning. A laboratory manual. 2nd Ed. Journal.
- Sastry, K.S., 2013. Seed-transmitted plant virus diseases. Springer, Berlin, p 327.
- Saunders, K., Bedford, I. D., Briddon, R. W., Markham, P. G., Wong, S. M., Stanley, J. 2000. A unique virus complex causes *Ageratum* yellow vein disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6890–6895.
- Sherwood RT: Viruses of white clover in pastures of Pennsylvania, New York, and Vermont. Plant Dis 1997, 81:817- 820.
- Stukenbrock EH, McDonald BA: The origins of plant pathogens in agroecosystems. Annu Rev Phytopathol 2008, 46:75-100. [L] [SEP]
- Thresh, J.M., 2006a. Plant virus epidemiology: the concept of host genetic vulnerability. Virus Research. 67:89–125.
- Valkonen, J.P.T. 1992. Accumulation of potato virus Y is enhanced in *Solanum brevidens* also infected with tobacco mosaic virus or potato spindle tuber viroid. Ann. Appl. Biol. 121, 321–327.
- Varsani, A., Castillo, J.N., Moriones, E., Zepeda. H.C., Idris, A., Brown, J.K., Zerbini, F.M. and Martin, D.P. 2014. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. Arch. Virol.
- Vega Aviña, R. 2000. Catálogo y base de datos preliminar de la flora de Sinaloa. Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Agronomía. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. L057. México, D.F.
- Yelina, N.E., Savenkov, E.I., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y. and Valkonen, J.P.T. 2002. Long-distance movement, virulence, and RNA silencing suppression controlled by a single protein in hordei- and potyviruses: complementary functions between virus families. J. Virol. 76, 12 981–12 991.
- Zhang, Y. P., Uyemoto, J. K., Kirkpatrick, B. C.1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay, Journal of Virology Methods 71:45-50.