

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Detección de *Begomovirus* en los cultivos de sandía (*Citrullus lanatus*) y melón (*Cucumis melo*) en Costa Rica, durante el 2003 al 2005

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología para optar al grado de *Magister Scientiae*
En Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular

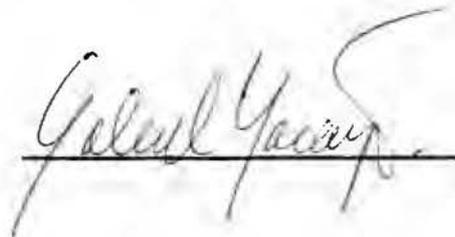
José Aníbal Mora Villalobos

Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio" Costa Rica

2006

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de *Magister Scientiae* en Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular.

Dr. Gabriel Macaya Trejos
Representante del Decano del SEP



Dra. Pilar Ramírez Fonseca
Directora de la Tesis



Dra. Floribeth Mora Umaña
Asesora



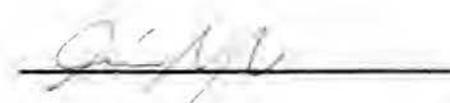
Dr. James Karkashian Córdoba
Asesor



Dr. Federico Albertazzi
Representante del Director del Programa
de Posgrado en Biología con énfasis en
Genética y Biología Molecular



José Anibal Mora Villalobos
Candidato



ÍNDICE

Hoja de aprobación.....	ii
Índice.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	iv
Lista de tablas.....	vi
Lista de figuras.....	vii
Introducción.....	1
Materiales y Métodos.....	3
Colecta de material vegetal.....	3
Extracción de ácidos nucleicos totales.....	5
Hibridación por “dot blot”.....	5
Sonda general	5
Sondas específicas	5
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	6
Hibridación por “Southern blot”.....	6
PCR-RFLP.....	7
Clonación parcial y secuenciación.....	7
Comparación de secuencias y análisis filogenéticos.....	8
Resultados.....	10
Detección de <i>Begomovirus</i>	10
Identificación de <i>Begomovirus</i> que infectan sandía y OP.....	12
Secuenciación de los clones.....	13
Análisis de secuencias.....	15
Discusión.....	17
Detección de <i>Begomovirus</i>	17
Identificación de <i>Begomovirus</i> que infectan sandía y OP.....	20
WmLCuV es una nueva especie de <i>Begomovirus</i> del grupo del SLCV.....	21
Referencias.....	25

RESUMEN

Los *Begomovirus* son patógenos importantes de cultivos tropicales y subtropicales del hemisferio oeste. En Latinoamérica la mayoría de áreas productoras de sandía (*Citrullus lanatus* L.) y melón (*Cucumis melo* L.) son afectadas por *Begomovirus*. En la región se han reportado cuatro *Begomovirus* que infectan sandía y seis en melón. Debido a lo anterior, se diseñó esta investigación en la cual se utilizaron cuatro métodos de diagnóstico: hibridación de ADN por “dot blot” con dos sondas generales, PCR con iniciadores generales y “Southern blot”. Se reportó la presencia de dos *Begomovirus* en sandía: el SYMMoV y el virus del enrollamiento de la hoja de sandía (“watermelon leaf curl virus” - WmLCuV), este último es un nuevo reporte de virus. No se detectó ningún *Begomovirus* en las muestras de melón analizadas. Además se diagnosticaron *Begomovirus* en las plantas silvestres asociadas a estos cultivos.

ABSTRACT

Begomovirus are important pathogens of tropical and subtropical crops in the Western Hemisphere. In Latin America most of the watermelon (*Citrullus lanatus* L.) and melon (*Cucumis melo* L.) producing areas are affected by *Begomovirus*. In the region, there are four *Begomovirus* reported to infect watermelon and six in melon. In this investigation, four diagnostic methods were used: DNA dot blot hybridization with two general probes, PCR with general primers and Southern blot. Two *Begomovirus* were detected in watermelon: SYMMoV and the watermelon leaf curl virus (WmLCuV), the

latter is a new report of a virus. No *Begomovirus* was detected in the melon samples analyzed. In addition, *Begomovirus* was diagnosed in the wild plants associated with these crops.

LISTA DE TABLAS

Cuadro 1. Detección de *Begomovirus* utilizando una sonda general, entre el total de muestras analizadas por especie y por años de cosecha.

Cuadro 2. Detección de *Begomovirus* en sandía, melón y otras plantas colectadas en la región Pacífico Norte y Pacífico Central de Costa Rica durante los años 2003–2006 mediante los cuatro sistemas de diagnóstico.

Cuadro 3. Detección de secuencias de *Begomovirus* al utilizar algunas sondas específicas entre, el total de muestras analizadas.

Cuadro 4. Comparación del porcentaje de la identidad nucleotídica del componente A del virus del enrollamiento de la hoja de sandía - WmLCuV con otros *Begomovirus* relacionados.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Mapa de Costa Rica. Se resaltan en gris las regiones Pacífico Norte (1) y Pacífico Central (2).

Fig. 2. Análisis filogenético que indica la relación entre la secuencia nucleotídica de ADN-A del WmLCuV y otros *Begomovirus*. Se utilizó método de máxima parsimonia (MEGA) con 1 000 “bootstraps”. El número en cada rama indica el porcentaje de “bootstrap”, se eliminaron los valores menores a 50. Las ramas horizontales y verticales son arbitrarias.

Fig. 3. Análisis filogenético que indica la relación entre la secuencia nucleotídica del gen *cp* (A) y *rep* (B) del WmLCuV y otros *Begomovirus*. El árbol fue hecho por el método de máxima parsimonia (MEGA) con 1 000 “bootstraps”. Las ramas horizontales y verticales son arbitrarias. El número en cada rama indica el porcentaje de “bootstrap”, se eliminaron los valores menores a 50.

Fig. 4. Análisis por PCR-RFLP de cinco muestras de sandía positivas para el WmLCuV. Se amplificó la porción superior del ADN-A con los iniciadores generales pACv1978 y pAVc715 y se digirió con diferentes enzimas de restricción. Se presenta el mapa de restricción del segmento amplificado (A) y los resultados de las digestiones con *EcoR* I (B), *EcoR* V (C) y *BamH* I (D), evaluados en geles de agarosa al 1% en solución TAE.

**Detección de *Begomovirus* en los cultivos de sandía (*Citrullus lanatus*) y melón
(*Cucumis melo*) en Costa Rica, durante el 2003 al 2005**

J.A. MORA, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, San Jose 2060. E-mail anibalmora@hotmail.com; **M.R. ROJAS**, Department of Plant Pathology, University of California, Davis 95616. E-mail mrojas@ucdavis.edu; **F. MORA-UMAÑA**, Convenio Universidad de Costa Rica-Ministerio de Agricultura y Ganadería. E-mail fmora@proteconet.go.cr; **J. KARKASHIAN**, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, San José 2060. E-mail jamesk@biologia.ucr.ac.cr; **P. RAMÍREZ**, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, San José 2060. E-mail pramirez@biologia.ucr.ac.cr.

La mayoría de áreas productoras de sandía (*Citrullus lanatus* L.) y melón (*Cucumis melo* L.) en Latinoamérica han sido afectadas por *Begomovirus* (Familia *Geminiviridae*, género *Begomovirus*) desde inicios de los años 90. Lo anterior ha generado consecuencias devastadoras para la economía de este sector agroindustrial. Los *Begomovirus* son patógenos importantes de cultivos tropicales y subtropicales del hemisferio oeste (Morales y Anderson 2001). Esta epidemia parece estar asociada a factores tales como la aparición de vectores más eficientes, nuevas variantes virales, cambios en los sistemas de cultivos y a la introducción de variedades susceptibles a los campos (Varma y Malathi 2003).

Los *Begomovirus* son transmitidos por las moscas blancas (*Bemisia tabaci* Genn.). Los *Begomovirus* endémicos de América tienen genoma bipartito. El componente A (ADN-A) y el componente B (ADN-B) son de aproximadamente 2.6kb cada uno y comparten una

región común (RC) de ~200nt la cual es idéntica entre los componentes de la misma especie. El ADN-A contiene cinco genes o marcos de lectura abiertos (ORF) que se encargan de la replicación y la encapsidación viral. El ADN-B contiene dos genes los cuales codifican para proteínas relacionadas con el movimiento viral (Hanley-Bowdoin *et al.* 1999, Fauquet y Stanley 2003, Gutierrez 2003).

El grupo de los *Begomovirus* tiene gran diversidad entre los virus de plantas. Esta posiblemente se generó por eventos de mutación, recombinación, rearrreglos y adquisición de nuevos genes. Las mutaciones puntuales y las pequeñas inserciones o deleciones tradicionalmente se han considerado como una fuente importante de diversidad de virus (Domingo y Holland 1994). Sin embargo, Padidam *et al.* (1999) señalan que entre los virus ADN, la recombinación interespecífica funge un papel importante en el aumento de la diversidad de secuencias. Estos eventos pueden haber originado a algunos *Begomovirus* que infectan sandía y melón.

En Latinoamérica se han reportado varios *Begomovirus* que infectan melón y sandía. En melón se han identificado seis: el virus del enrollamiento de la hoja de cucúrbitas ("*cucurbit leaf curl virus*" – CuLCuV) (Brown *et al.* 2002) y el virus del arrugamiento de la hoja de cucúrbitas ("*cucurbit leaf crumple virus*" – CuLCrV) (Guzmán *et al.* 2000) los cuales que se encuentran en el suroeste de los Estados Unidos y en norte de México; entre tanto el virus del enrollamiento clorótico de la hoja del melón ("*melon chlorotic leaf curl virus*" – MCLCuV) se ha reportado en el estado de Zacapa, Guatemala (Brown *et al.* 2001); el virus del mosaico clorótico del melón ("*melon chlorotic mosaic virus*" – MCMV) detectado en el 2002 en el estado de Lara, Venezuela (Ramírez *et al.* 2004); y el virus del enrollamiento de la hoja del ayote ("*squash leaf curl virus*" – SLCV) que se encuentra

diseminado desde el suroeste de Estados Unidos hasta Nicaragua (Brown *et al.* 1995). El cultivo de sandía puede ser infectado por cuatro *Begomovirus*: CuLCuV, CuLCrV, SLCV y por el virus del moteado leve amarillo del ayote (“*squash yellow mild mottle virus*” – SYMMoV).

En Costa Rica el SYMMoV se ha diagnosticado en sandía y ayote, y no está restringido a la familia de las cucurbitáceas, ya que se ha encontrado en papaya (Caricaceae: *Carica papaya*) (Karkashian 2002) y en frijol común (Fabaceae: *Phaseolus vulgaris*) (Ramos-Reynoso 2004). El SYMMoV es considerado un virus con ámbito amplio de hospederos dentro del género *Begomovirus*.

En la región se han diagnosticado algunos *Begomovirus* que afectan cultivos de importancia económica. Debido a lo anterior, se diseñó esta investigación en la cual se reportó la presencia de dos *Begomovirus* en sandía: el SYMMoV y el virus del enrollamiento de la hoja de sandía (“*watermelon leaf curl virus*” - WmLCuV), este último es un nuevo reporte de virus. No se detectó ningún *Begomovirus* en las muestras de melón analizadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de material vegetal. Se colectaron muestras foliares de sandía y melón con síntomas típicos de virus (mosaicos, moteados, enanismos, encrespamiento, corrugamiento y/o enrollamientos) y otros cultivos o plantas silvestres asociados a éstos, los cuales se denominan en adelante: “otras plantas” (OP). Las muestras se trajeron de 15 sitios geográficos distribuidos en dos regiones: Pacífico Norte y Pacífico Central de Costa Rica

(Fig. 1). El muestreo se realizó durante la época seca correspondiente a la cosecha de los años 2004 y 2005. En la cosecha del 2006 solamente se colectó tejido vegetal de sandía. Las muestras foliares se preservaron en sílica gel antes de su análisis en el laboratorio.

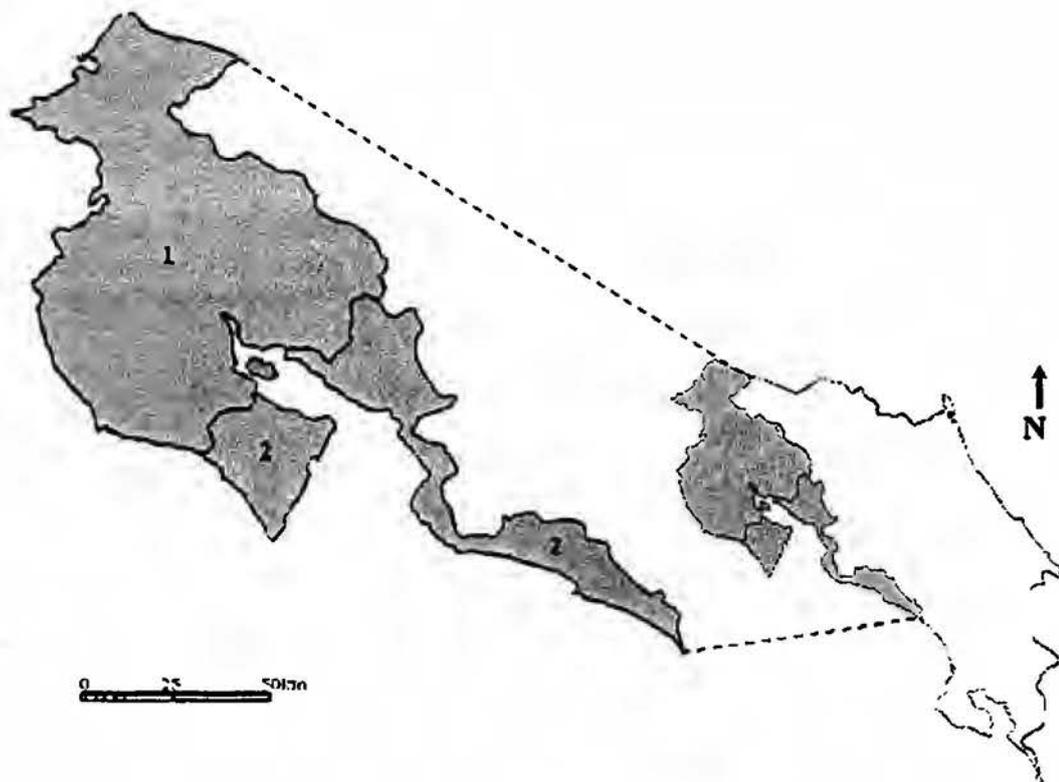


Fig. 1. Mapa de Costa Rica. Se resaltan en gris las regiones Pacífico Norte (1) y Pacífico Central (2).

Para el diagnóstico de *Begomovirus* se utilizó la técnica de hibridación por “dot blot” con dos sondas generales. Además las muestras se analizaron por medio de PCR con iniciadores generales. Los productos de PCR se visualizaron por medio de tinción convencional con bromuro de etidio e hibridación por “southern blot”. Los virus se identificaron individualmente con hibridaciones por “dot blot” con seis sondas específicas.

Extracción de ácidos nucleicos totales. Los ácidos nucleicos totales de las muestras fueron extraídos siguiendo una modificación del método Dellaporta (Rojas *et al.* 1993).

Hibridación por “dot blot”. Se colocaron tres microlitros de ADN total desnaturalizado en membranas de nylon tipo A (Pall Corporation, Glen Cove, NY). Las muestras se fijaron con una fuente de luz UV calibrada a 50mJ y la señal se detectó con autoradiografías.

El ADN de la sonda sin marcar se utilizó como control positivo, además de dos controles negativos, el primero de agua y el segundo de ADN extraído de una planta sana.

Sonda general. Se utilizaron dos sondas generales: en el primer sistema se utilizó el extremo tres prima del gen *cp* correspondiente al virus del mosaico amarillo dorado del frijol (“*Bean golden yellow mosaic virus*” BGYMV-[GT]), el cual se amplificó con los iniciadores específicos PBGGTv647 y PBGGTc1048 (Potter *et al.* 2003). El amplicón se marcó e hibridó a baja astringencia (55°C) de acuerdo a las especificaciones del proveedor del sistema de marcaje y detección de genes: “Gene Imagen Alkphos Direct Labeling and Detection System” (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ), este sistema se denominó “dot blot^{CP}”. En el segundo sistema se utilizó una mezcla de clones completos del ADN-A de los virus TYLCV, BGYMV, CuLCrV, PHYVVA y ToMoV, en este caso el sistema se llamó: “dot blot^{MCA}” (mezcla de componentes A). Esta sonda se marcó con [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP por “nick-translation” (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). La hibridación se llevó a cabo a baja astringencia (37°C) de acuerdo a Gilbertson *et al.* (1991) (Cuadro 1 y 2).

Sondas específicas. Las muestras de sandía y OP se analizaron a alta astringencia (42°C) con seis sondas específicas (Gilbertson *et al.* 1991). La primera sonda corresponde a un clon de la región hipervariable del SYMMoV (SYMMoV^{hip}). Otras se hicieron marcando los

clones WmLCuV^{sup}, WmLCuV^{inf} y 05-2599^{hip} obtenidos en este estudio (se detallan posteriormente). Finalmente se marcaron los clones completos del ADN-A y ADN-B TLCrV (TLCrV^A y TLCrV^B, respectivamente), debido que durante la investigación se detectó secuencia con alta identidad nucleotídica al TLCrV en las muestras analizadas (Cuadro 3).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las muestras de sandía y OP se analizaron por PCR con los iniciadores generales PAV1v494 y PAV1c1048 (Wyatt y Brown 1996). Únicamente 40 muestras de melón seleccionadas al azar fueron analizadas (Cuadro 2).

El ADN viral se amplificó utilizando la metodología descrita por Rojas *et al.* (1993). En reacciones de PCR de 25µL con: MgCl₂ (2.5mM), solución de reacción (1X), dNTP's (200µM), cada iniciador (0.2µM), ADN polimerasa (2.5u) (Fermentas, Hanover, MD) y 5µL de ácidos nucleicos de las muestras. Se utilizaron reacciones sin ADN y reacciones con ADN de plantas sanas como controles negativos, los controles positivos fueron clones con secuencias complementarias a los iniciadores. Se utilizaron geles de agarosa al 1% en solución de TAE, teñidos con bromuro de etidio para visualizar los productos de PCR.

Hibridación por “Southern blot”. Se utilizaron geles de agarosa al 0.9% en solución TBE para fraccionar los productos del PCR amplificados con los iniciadores generales PAV1v494 y PAV1c1048. Los geles se transfirieron a membranas de nylon tipo A (Pall Corporation, Glen Cove, NY) y se hibridaron con la sonda general MCA marcada con [α^{32} P]-dCTP por “nick-translation” (Salati *et al.* 2002).

Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción de productos de PCR (PCR-RFLP). Cinco muestras positivas para WmLCuV seleccionadas al azar, se amplificaron con los iniciadores generales PAL1v1978 y PARc715 (Rojas *et al.* 1993). El producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción *Bam*H I, *Eco*R I y *Eco*R V. Las digestiones se visualizaron en geles de agarosa al 1% en solución TAE y se tiñeron con bromuro de etidio. Los patrones de digestión se compararon con los esperados para los virus WmLCuV, SYMMoV y TLCrV (Fig. 4a).

Clonación parcial y secuenciación. Se amplificó la porción superior del ADN-A con los iniciadores generales PAL1v1978 y PARc715 (Rojas *et al.* 1993), de las cinco muestras analizadas por PCR-RFLP. El producto de PCR de la muestra 05-2599 se clonó en el vector pTZ57R/T utilizando el sistema InsT/Aclone (Fermentas, Hanover, MD). El fragmento se secuenció con el sistema "BigDye Terminator v3.1" (Applied Biosystems, Foster City, CA) y el ABI Prism 377 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Considerando la información de secuencia generada se diseñó un par de iniciadores específicos (PWLCc1978 5'GATTCTCGAACCGGGAAGAC3' y PWLCv715 5'GGCAAGATATGGATGGATGAA3') para amplificar el segmento inferior del ADN-A del virus encontrado, este segmento se clonó y secuenció. A su vez, se utilizó el mismo procedimiento para la región hipervariable, que se amplificó con los iniciadores generales PCRc2 y PBLv2039) (Rojas *et al.* 1993). Los tres clones se denominaron WmLCuV^{sup}, WmLCuV^{inf} y 05-2599^{hip}, respectivamente. Para secuenciar la RC del ADN-B se diseñó el iniciador específico PWLCvRC (5'TGCTGGACTCTAAAACGC3').

Comparación de secuencias y análisis filogenéticos. Se utilizó el programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994), para alinear las secuencias parciales y completas del ADN-A de la muestra 05-2599 con secuencias de otros *Begomovirus* obtenidas de la base de datos GenBank. Los análisis de parsimonia se llevaron a cabo con el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 3.1 (Kumar *et al.* 2004). La robustez de las ramas internas de los árboles se estimó por medio de análisis de “bootstrap” con 1 000 réplicas. Los análisis filogenéticos se corroboraron comparándolos con métodos de distancia, vecino más cercano y UPGMA utilizando el programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.* 2004). Las secuencias recombinantes se detectaron con el programa Recombinant Detection Program (RDP2) versión 2.0 (Martin *et al.* 2005b), con los parámetros preestablecidos por el programa, una probabilidad igual a 0.05 y un tamaño de ventana igual a 40.

Números de accesoión en el GenBank de las secuencias utilizadas: X15983, virus del mosaico del *Abutilon* (“*Abutilon mosaic virus*” – AbMV); U51137, virus del mosaico del *Abutilon*-Hawai (“*Abutilon mosaic virus*-Hawai” – AbMV-[HW]); AF110189, virus del mosaico calico del frijol (“*bean calico mosaic virus*” – BCaMV); M88179, virus del mosaico enano del frijol (“*bean dwarf Bmosaic virus*” – BDMV); M88686, virus del mosaico dorado del frijol-Brasil (“*bean golden mosaic virus*-Brazil” – BGMV-[BZ]); M91604, virus del mosaico dorado amarillo del frijol-Guatemala (“*bean golden yellow mosaic virus*-Guatemala” – BGYMV-[GT]); M10070, virus del mosaico dorado amarillo del frijol-Puerto Rico (“*bean golden yellow mosaic virus*-Puerto Rico” – BGYMV-[PR]); U65529, virus del enrollamiento de la hoja de la col (“*cabbage leaf curl virus*” – CaLCuV); AF224760, virus del enrollamiento de la hoja de cucúrbitas (“*cucurbit leaf curl virus*” – CuLCuV); AF325497, virus del enrollamiento de la hoja clorótica del melón (“*melon*

chlorotic leaf curl virus” – MCLCuV); U57457, virus del mosaico dorado del chile-Tamaulipas (“*pepper golden mosaic virus-Tamaulipas*” – PepGMV-TAM); X70418, virus de la vena amarilla en Huasteco del chile (“*pepper Huasteco yellow vein virus*” – PHYVV); D00940, virus del mosaico amarillo de la papa-Venezuela (“*potato yellow mosaic virus-Venezuela*” – PYMV-[VE]); AF039031, virus del mosaico amarillo de la papa-Trinidad y Tobago (“*potato yellow mosaic virus-Trinidad y Tobago*” – PYMV-[TT]); AF408199, virus del mosaico dorado de la *Rhynchosia* (“*Rhynchosia golden mosaic virus*” – RhGMV); AF049336, virus del mosaico dorado de la *Sida* (“*Sida golden mosaic virus*” – SiGMV); X99550, virus del mosaico dorado de la *Sida* de Costa Rica (“*Sida golden mosaic Costa Rica virus*” – SiGMCRV); M38183, virus del enrollamiento de la hoja del ayote (“*squash leaf curl virus-E*” – SLCV-E); AF421552, virus del enrollamiento leve de la hoja del ayote (“*squash mild leaf curl virus-Imperial Valley*” – SMLCV-[IV]); AY064391, virus del moteado leve amarillo del ayote (“*squash yellow mild mottle virus*” – SYMMoV); NC 001507, virus del mosaico dorado del tomate (“*tomato golden mosaic virus*” – TGMV); AF608286, virus del enrollamiento de la hoja del tomate de Sinaloa-Nicaragua (“*tomato leaf curl Sinaloa virus-Nicaragua*” – ToLCSinV-[Nic]); NC 003830, virus del corrugamiento de la hoja del tomate (“*tomato leaf crumple virus*” – TLCrV); AY029750, virus rugoso severo del tomate (“*tomato severe rugose virus*” – ToSRV); NC_004642, virus del corrugamiento severo de la hoja del tomate (“*tomato severe leaf curl virus*” – ToSLCV); AJ245650, virus del enanismo clorótico de la sandía-Sudan (“*watermelon chlorotic stunt virus-Sudan*” – WmCSV-SD).

RESULTADOS

Detección de *Begomovirus*. Se colectaron 426 muestras vegetales durante el período de noviembre 2003 – julio 2005, de las cuales 241 fueron de melón, 142 sandías y 43 de OP. Del total de muestras el 33% fueron positivas para *Begomovirus* (Cuadro 1).

Se diagnosticó infección causada por *Begomovirus* en 119 muestras de sandía durante los tres años del estudio, cuando se utilizó la sonda general MCA. Estas muestras pertenecen a las dos regiones estudiadas y los resultados se repiten durante los tres años de muestreo. No se detectó infección causada por *Begomovirus* en el cultivo de melón durante el primer y segundo año del estudio en ninguna de las regiones muestreadas, por lo que no se colectaron muestras vegetales de este cultivo durante el último año. En las plantas (OP) *Carica papaya*, *Nicandra physalodes*, *Sida* sp., *Malva* sp. y *Euphorbia* sp. se diagnosticó la presencia de *Begomovirus* durante el 2004 y 2005. También se reportaron *Begomovirus* en algunas especies vegetales no identificadas durante las mismas temporadas de evaluación (Cuadro 1).

Los cuatro métodos de diagnóstico, fueron sensibles para la detección de *Begomovirus* en tejido vegetal, y no se observaron falsos negativos ni positivos con los controles utilizados. La hibridación por “dot blot” con la sonda general MCA fue la que presentó mayor amplitud de detección (Cuadro 2).

Al comparar los sistemas de hibridación por “dot blot” CP y MCA se evidenció que cuando se utilizó la sonda general MCA, la presencia de *Begomovirus* fue del 83% en las muestras de sandía. Por su parte la sonda CP detectó virus en el 8% de las muestras de

sandía. Una situación similar se observó con las OP, donde la sonda MCA mostró mayor **sensibilidad** (Cuadro 2).

Cuadro 1. Detección de *Begomovirus* utilizando una sonda general^a, entre el total de muestras analizadas por especie y por años de cosecha.

Especie	Cosecha			Total
	2004	2005	2006	
<i>Cucumis melo</i>	0 / 144	0 / 97	...	0 / 241
<i>Citrullus lanatus</i>	26 / 33	20 / 29	73 / 80	119/142
Otras plantas				
<i>Cucumis sativus</i>	0 / 3	0 / 4	...	0 / 7
<i>Cucurbita foetidissima</i>	...	0 / 2	...	0 / 2
<i>Capsicum annum</i>	...	0 / 4	...	0 / 4
<i>Nicandra physalodes</i>	1 / 1	1 / 1
<i>Sida sp.</i>	2 / 2	1 / 1	...	3 / 3
<i>Malva sp.</i>	2 / 2	3 / 3	...	5 / 5
<i>Gossypium herbaceum</i>	...	0 / 2	...	0 / 2
<i>Euphorbia sp.</i>	2 / 3	2 / 2	...	4 / 5
<i>Carica papaya</i>	...	2 / 2	...	2 / 2
No identificadas	5 / 7	4 / 5	...	9 / 12
Total General	38 / 195	32 / 151	73 / 80	143 / 426

^a = Las muestras positivas se determinaron por medio de "dot blot" con la sonda MCA.

Se detectaron *Begomovirus* en el 66% de las muestras de sandía y el 51% de las OP, cuando se utilizó la técnica de PCR con iniciadores generales. Al analizar los productos de PCR por hibridación por “Southern blot” con la sonda MCA, no se registraron cambios en el número de muestras positivas de sandía con respecto a la técnica de PCR. En el caso particular de las OP, se obtuvo mayor sensibilidad con la hibridación por “Southern blot”. Con ninguno de los cuatro métodos de diagnóstico se detectó la presencia de *Begomovirus* en las muestras de melón (Cuadro 2)

Cuadro 2. Detección de *Begomovirus* en sandía, melón y “otras plantas” colectadas en la región Pacífico Norte y Pacífico Central de Costa Rica durante los años 2003–2006 mediante los cuatro sistemas de diagnóstico ^a.

Muestra	Dot Blot ^{MCA}	Dot Blot ^{CP}	PCR ^{494–1048}	
			Electroforesis	Southern Blot ^{MCA}
Sandía	119 / 142	11 / 142	94 / 142	94 / 142
Melón	0 / 241	0 / 241	0 / 40	0 / 40
Otras plantas	24 / 43	13 / 43	15 / 43	17 / 43

^a. Los resultados se muestran como número de plantas detectadas positivas sobre total de muestras analizadas. CP: Sonda general CP marcada con el sistema Alkphos Direct. MCA: Sonda general MCA marcada por nick-translation. 494–1048: iniciadores generales PAV1v494 y PAV1c1048.

Identificación de *Begomovirus* que infectan sandía y OP. Del total de muestras diagnosticadas positivas para *Begomovirus*, se identificó el virus presente en el 26% de las muestras (Cuadro 3).

Se determinó la presencia del SYMMoV en cinco muestras de sandía. Once muestras fueron consistentemente positivas con las sondas específicas TLCrV^A, WmLCuV^{sup} y WmLCuV^{inf} y en tres muestras se detectó señal con la sonda 05-2599^{hip}. Al analizar el grupo de OP no se determinó la presencia de SYMMoV, 18 muestras fueron positivas con la sonda TLCrV^A, en nueve de estas se obtuvo señal con la sonda TLCrV^B y en siete con las sondas WmLCuV^{sup} y WmLCuV^{inf} (Cuadro 3).

Secuenciación de los clones. Las secuencias de los clones WmLCuV^{sup} y WmLCuV^{inf} traslapan en 43nt con un 100% de identidad. A partir de estas se ensambló la secuencia completa del ADN-A del WmLCuV, el cual tiene una longitud de 2 662nt y presenta los cinco genes u encuadres de lectura reportados para los *Begomovirus* del hemisferio oeste: *cp*, *rep*, *trap*, *ren* y *ac4*. La RC posee los seis elementos *cis* involucrados con la regulación de la replicación y de la transcripción: motivo-CA, sitio de unión a REP, caja-TATA, motivo-AG, caja-G y la secuencia de asa de nueve nucleótidos (Orozco *et al.* 1998 y Hanley-Bowdoin *et al.* 1999).

El WmLCuV tiene mayor identidad con el SYMMoV (83%) y con el MCLCuV (80%) (Cuadro 4). La RC del ADN-A tiene menos del 84% de identidad nucleotídica comparada con otras RC de virus conocidos.

La secuencia del clon 05-2599^{hip} tiene una identidad baja al compararlo con otros virus reportados en GenBank. La mayor identidad la presenta con el SYMMoV (57%). La RC del ADN-B posee los seis elementos *cis* descritos anteriormente. La identidad entre las dos RC secuenciadas es del 82%.

Cuadro 3. Detección de secuencias de *Begomovirus* al utilizar algunas sondas específicas entre, el total de muestras analizadas.

Especie	SYMMoV ^{hip}	TLCrV ^A	TLCrV ^B	WmLCuV ^{sup}	WmLCuV ^{inf}	05-2599 ^{hip}
<i>Citrullus lanatus</i> –(sandía)	5 / 142	11 / 142	0 / 142	11 / 142	11 / 142	3 / 142
Otras plantas						
<i>Cucumis sativus</i> –(pepino)	0 / 7	0 / 7	0 / 7	0 / 7	0 / 7	0 / 7
<i>Cucurbita foetidissima</i>	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2
<i>Capsicum annuum</i> –(chile)	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Nicandra physalodes</i>	0 / 1	1 / 1	1 / 1	1 / 1	1 / 1	0 / 1
<i>Sida sp.</i>	0 / 3	2 / 3	2 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
<i>Malva sp.</i>	0 / 5	4 / 5	4 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
<i>Gossypium herbaceum</i> –(algodón)	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2
<i>Euphorbia sp.</i>	0 / 5	4 / 5	0 / 5	4 / 5	4 / 5	0 / 5
<i>Carica papaya</i> –(papaya)	0 / 2	2 / 2	0 / 2	2 / 2	2 / 2	0 / 2
Especies no identificadas	0 / 12	5 / 12	2 / 12	0 / 12	0 / 12	1 / 12
Total General	5 / 185	29 / 185	9 / 185	18 / 185	18 / 185	4 / 185

Cuadro 4. Comparación del porcentaje de la identidad nucleotídica del componente A del virus del enrollamiento de la hoja de sandía - WmLCuV con otros *Begomovirus* relacionados.

Virus	Identidad nucleotídica (%) con el WmLCuV					
	ADN-A	<i>cp</i>	<i>ren</i>	<i>trap</i>	<i>Rep</i>	<i>ac4</i>
SYMMoV	83	94	98	98	68	54
MCLCV	80	87	94	95	68	53
SLCV-E	76	87	91	88	63	55
SMLCV-[IV]	74	85	84	84	63	54
TLCrV	76	78	77	76	82	94

Análisis de secuencias. La comparación gen por gen del WmLCuV muestra que *cp*, *ren* y *trap* tienen una alta identidad con el SYMMoV (94, 98 y 98% respectivamente). Por otra parte *rep* y *ac4* presentan mayor identidad con el TLCrV (81 y 92%) (Cuadro 4).

Los análisis de máxima parsimonia hechos con la secuencia completa del ADN-A muestran que WmLCuV se ubica en la base del grupo del SLCV (Figura 2). Sin embargo, al utilizar los genes *cp*, *trap* y *ren*, el WmLCuV se ubica junto con SYMMoV; y con la secuencia de *rep* y *ac4* el WmLCuV se ubica dentro del grupo del AbMV (Figura 3).

Existe una alta probabilidad de que el SYMMoV se haya recombinado con el TLCrV en la región correspondiente al gen *rep*, dando origen al WmLCuV (RDP, $P = 2.04 \times 10^{-44}$). El primer punto de recombinación se identificó en una región de 15nt (entre los 1 894 – 1 909nt del WmLCuV), que corresponde a los nucleótidos 746 – 753 del gen *rep*. El segundo punto de recombinación posiblemente se encuentra dentro de la RC de los virus

envueltos. Estos resultados se comprobaron por medio de PCR-RFLP con el segmento recombinante del virus (Figura 4).

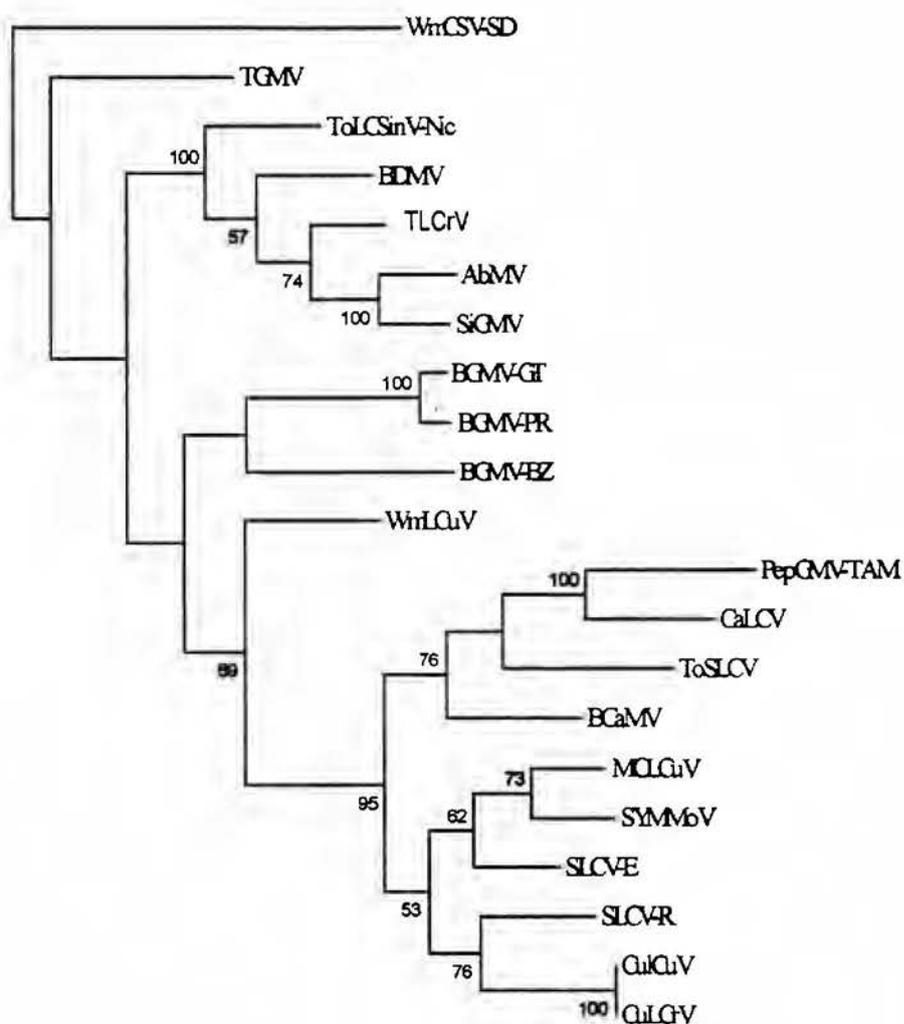


Fig. 2. Análisis filogenético que indica la relación entre la secuencia nucleotídica de ADN-A del WmLCuV y otros *Begomovirus*. Se utilizó método de máxima parsimonia (MEGA) con 1 000 “bootstraps”. El número en cada rama indica el porcentaje de “bootstrap”, se eliminaron los valores menores a 50. Las ramas horizontales y verticales son arbitrarias.

DISCUSIÓN

Detección de *Begomovirus*: Se diagnosticó la presencia de *Begomovirus* en el cultivo de sandía, pero no en el melón, entre las muestras colectadas en las regiones Pacífico Norte y Pacífico Central de Costa Rica. Es importante señalar que algunas de las otras plantas evaluadas muestran infecciones virales, al encontrarse en asociación con ambos cultivos.

El 83% de las muestras de sandía analizadas mostraron infección causada por *Begomovirus*. En Costa Rica la sandía se siembra durante todo el año, lo que indudablemente favorece la permanencia de inóculo viral tanto en el cultivo como en hospederos alternos (Salati *et al.* 2002). Lo anterior contribuye a que durante la mayor parte del año se encuentre en el campo tejido vegetal disponible como fuente de alimento para *Bemisia tabaci*, lo que contribuye a que se incrementen las poblaciones del vector de estos virus, y por ende la diseminación de los virus que este transmite (Rojas *et al.* 2005).

Con frecuencia se reporta la presencia de *Begomovirus* en plantas silvestres (Salati *et al.* 2002, Ala-Poikela *et al.* 2005). En este estudio las OP muestreadas presentaron los síntomas típicos de las infecciones virales (mosaicos amarillos o dorados). Desde el punto de vista epidemiológico las OP desempeñan un papel muy importante al convertirse en hospederos alternos virus y por ende en reservorios, para que este sobreviva en el tiempo.

No se detectó la presencia de *Begomovirus* en las muestras de melón evaluadas, a pesar de que algunas de las OP presentes en estos campos sí presentaron infección. Lo anterior indica que tanto virus como vector estuvieron presente en las dos regiones en las diferentes épocas de evaluación.

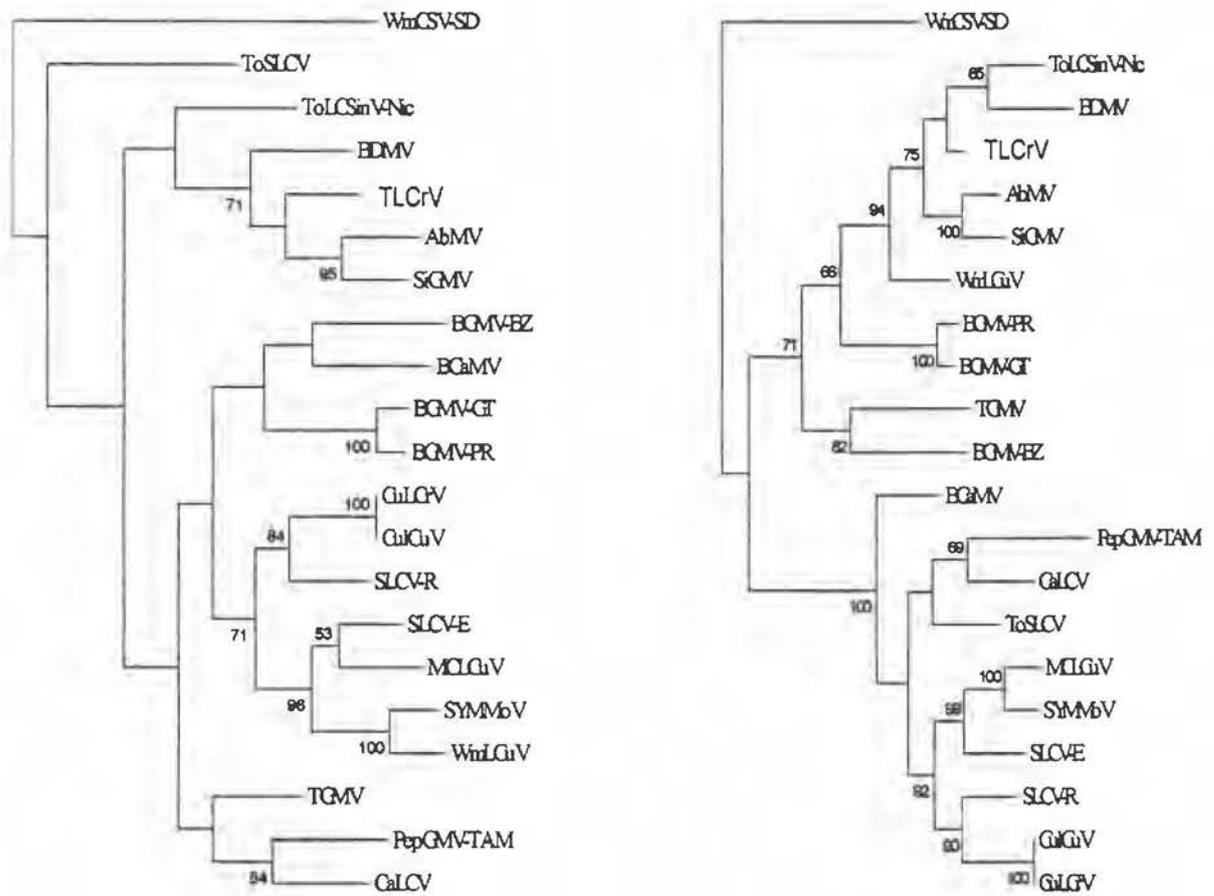


Fig. 3. Análisis filogenético que indica la relación entre la secuencia nucleotídica del gen *cp* (A) y *rep* (B) del *WmLCuV* y otros *Begomovirus*. El árbol fue hecho por el método de máxima parsimonia (MEGA) con 1 000 “bootstraps”. Las ramas horizontales y verticales son arbitrarias. El número en cada rama indica el porcentaje de “bootstrap”, se eliminaron los valores menores a 50.

Las plantas de melón evaluadas mostraban algún tipo de sintomatología relacionada con virus. Considerando los datos obtenidos se puede inferir que estos pueden ser causados por otros virus o factores de índole abiótico (Hull 2002)

Condiciones como la presencia de mosca blanca, baja precipitación, baja humedad relativa y altas temperaturas, favorecen el desarrollo de poblaciones del insecto *Bemisia tabaci* y por ende de la dispersión del virus. Estas condiciones predominan en los estados de Zacapa en Guatemala y Lara en Venezuela en donde se han reportado severas infecciones con *Begomovirus* en plantaciones de melón (Brown *et al.*, 2001, Ramírez *et al.*, 2004). Condiciones similares se presentan en las dos regiones evaluadas en Costa Rica. Surge la interrogante: ¿Por qué no se detectan *Begomovirus* en melón en Costa Rica? Pueden existir dos causas: (i) sí hay *Begomovirus* que infectan melón. No obstante, el grado de sensibilidad de las técnicas utilizadas no detectan los niveles virales presentes en los tejidos, debido a las bajas concentraciones presentes. Factores propios de las interacciones entre plantas y/o virus pueden afectar la concentración viral en los tejidos vegetales. En Guatemala se han diagnosticado infecciones mixtas causadas por *Crinivirus* y *Begomovirus* transmitidos por moscas blancas en el cultivo del melón, En Costa Rica no se han reportado infecciones causadas por *Crinivirus* en este cultivo, pero sí se ha diagnosticado la presencia de *Potyvirus* y del virus del mosaico en pepino ("*Cucumber mosaic virus*" - CMV) en plantaciones de melón. Lo anterior sugiere que la interacción entre virus en una misma planta puede afectar las concentraciones de ambos virus (Hull 2002). (ii) No hay *Begomovirus* que infectan melón en Costa Rica. El SYMMoV y el MCLCV presentan un 90% de identidad nucleotídica. El segundo se ha reportado como agente causal de importantes infecciones virales en plantaciones comerciales de melón en Guatemala. El SYMMoV se ha encontrado en cultivos de sandía, ayote (*Cucurbita moschata*), papaya (Karkashian *et al.* 2002) y frijol (Ramos-Reinoso 2004) en Costa Rica, pero no se ha diagnosticado en melón. Debido en parte a esta diferencia entre hospederos se propone que el SYMMoV y el MCLCV se

consideren dos especies de virus diferentes y no una sola, tal como lo proponen Fauquet y Stanley (2005).

Identificación de los *Begomovirus* presentes en sandía y otras plantas: En el cuadro 3 se observa que cinco muestras de sandía son positivas para SYMMoV, lo cual corrobora los datos obtenidos por Karkashian *et al* (2002). En 11 muestras se detectó la presencia del WmLCuV, el cual se caracterizó por primera vez en esta investigación. En las mismas 11 muestras se detectó secuencia complementaria al TLCrV-A; sin embargo, al no detectar el ADN-B se puede afirmar la presencia del virus TLCrV en sandía. La evidencia de secuencia indica que la sonda TLCrV^A hibrida con una región del WmLCuV-A, además todas las muestras positivas para TLCrV^A lo fueron con las sondas WmLCuV^{sup} y WmLCuV^{inf}, lo cual evidencia que la sonda TLCrV^A hibrida con el WmLCuV.

Se detectó SYMMoV y WmLCuV en muestras de sandía; ambos virus con baja incidencia (3 y 7% del total de muestras analizadas, respectivamente). Lo anterior se puede deber a que durante esa época existiera poco inóculo viral en la zona o que estos virus presenten alguna limitante que impida infectar de forma eficiente las plantas de sandía (Hull 2002). Con las sondas específicas utilizadas no se identificó el virus presente en el 90% de las muestras que mostraron ser positivas para *Begomovirus*. Es posible que existan otros *Begomovirus* que infecten sandía en el Pacífico Norte y Pacífico Central de Costa Rica y que aún no se hayan caracterizado.

Cuando se analizaron las OP con las sondas específicas, se diagnosticó la presencia del TLCrV en *Sida* sp. y *Malva* sp., y otras dos OP no identificadas, lo cual constituye el primer reporte del TLCrV en Costa Rica. Este virus fue descrito y caracterizado en el norte

de México y sur de EE.UU., en donde se ha diagnosticado en tomate, chile y *Malva parviflora* (Paplomatas *et al.* 1994, Brown *et al.* 2000). La diseminación del TLcRV podría ser un ejemplo de movimiento de virus a larga distancia producida por actividad humana, ya que este no se había reportado para la región mesoamericana. En Costa Rica se han reportado el virus del moteado amarillo del tomate (“tomato yellow mosaic virus” - ToYMoV, Nakhla *et al.* 2005), el virus del chile de Texas (“Texas pepper virus” - TPV, Lotrakul *et al.* 2000) y el virus de la vena amarilla del chile de Huasteco (“pepper Husteco yellow vein virus” - PHYVV (M. Rojas datos no publicados) *Begomovirus* infectando tomate. El TLcRV constituye el cuarto virus perteneciente a este género, que infecta este cultivo de importancia agronómica en nuestro país.

Con respecto a las OP, dos muestras de papaya (*Carica papaya*) y cuatro de *Euphorbia* sp. se diagnosticaron con el WmLCuV. Los resultados anteriores indica que estas plantas son hospederos alternos del virus, constituyéndose en reservorios de inóculo viral (Salati *et al.* 2002).

En el caso específico de *Nicandra physalodes* se diagnosticó la presencia de los virus TLcRV y WmLCuV de forma simultánea en una sola muestra. Lo anterior es indicativo de que en esta se presenta una infección mixta con dos *Begomovirus*. Padidam *et al.* (1999) señala que las infecciones mixtas son importantes en la evolución de los virus, ya que proveen una condición para la recombinación, la cual puede contribuir a la aparición de variantes más severas o nuevas especies virales. No obstante, las infecciones mixtas han sido poco estudiadas en Centroamérica (Rojas *et al.* 2005).

WmLCuV es una nueva especie de *Begomovirus* del grupo del SLCV. La secuencia del WmLCuV comparte menos del 83% de identidad nucleotídica del ADN-A con otros *Begomovirus* descritos. Este valor se encuentra por debajo del umbral establecido por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (90%) para distinguir especies de *Begomovirus*, por ello el virus del enrollamiento de la hoja de sandía (“watermelon leaf curl virus” - WmLCuV) debe ser considerado como una nueva especie nueva de virus..

Al comparar las secuencias de la RC del ADN-A y ADN-B de la muestra 05-2599 se determinó que presentaban una identidad nucleotídica del 82%, por lo que se deduce que la secuencia del ADN-B no pertenece al WmLCuV, lo cual es indicativo que la muestra en mención presenta una infección mixta causada por al menos dos virus.

El ADN-B del WmLCuV no se detectó en la muestra 05-2599, se puede deber a dos causas: (i) se secuenció la RC de un virus diferente al WmLCuV, lo cual podría ser posible dado que la muestra 05-2599 presenta una infección mixta. (ii) El WmLCuV podría ser un virus pseudorecombinante y no presentar ADN-B. En este caso las funciones del ADN-B son suministradas por otro virus. Se ha demostrado que virus diferentes con baja identidad en la RC (hasta un 60%) pueden formar pseudorecombinantes (Pita *et al.* 2001).

El grupo filogenético de *Begomovirus* del SLCV está conformado por virus que infectan cucurbitáceas como SLCV-E, SMLCV-[IV], SYMMoV, MCLCV, CuLCuV, CuLCrV y algunos que infectan otros cultivos como: BCaMV, CaLCV y PepGMV. El análisis filogenético del ADN-A del WmLCuV, indica que este se encuentra en una posición basal del grupo, lo cual es de esperarse ya que el virus presenta un segmento recombinante. Al analizar los genes *cp*, *trap* y *ren*, el WmLCuV se ubica en una rama cercana al SYMMoV. Sin embargo, con los genes *rep* y *ac4*, muestra mayor afinidad con

otros virus pertenecientes al grupo del AbMV, lo cual es de esperarse ya que en esta región es donde se presenta el segmento recombinante. Al realizarse los análisis filogenéticos concernientes a este virus, se observó que el mismo ocupa una posición diferente al utilizar distintos genes del ADN-A, lo anterior sugiere que se originó por medio de un evento de recombinación (Padidam *et al.* 1999, Martin *et al* 2005b).

Es de importancia señalar que el WmLCuV se diagnosticó en sandía y en dos hospederos alternos que no pertenecen a la familia *Cucurbitaceae* (*Euphorbiaceae* y *Caricaceae*). Este virus al igual que el SYMMoV, presenta mayor ámbito de hospederos, que otros pertenecientes al mismo grupo y que infectan únicamente cucurbitáceas (SLCV-E, SMLCV-[IV], MCLCV, CuLCuV y CuLCrV).

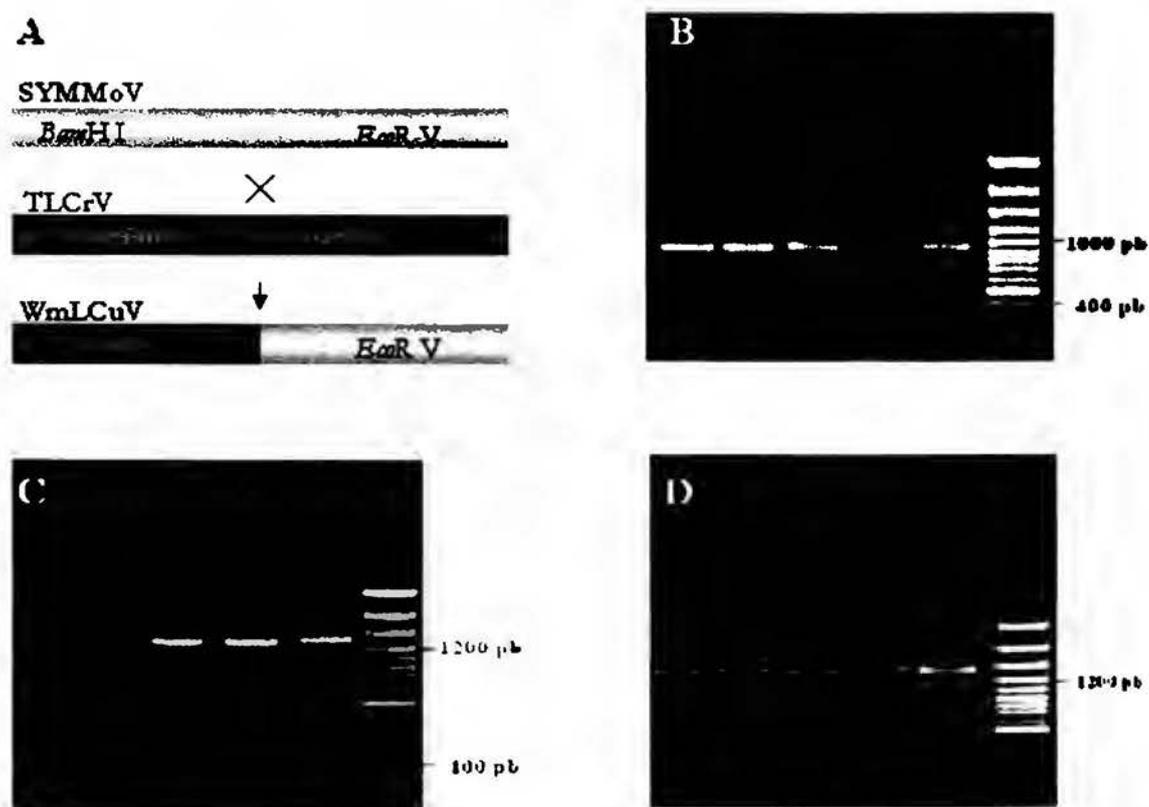


Fig. 4. Análisis por PCR-RFLP de cinco muestras de sandía positivas para el WmLCuV. Se amplificó la porción superior del ADN-A con los iniciadores generales pACv1978 y pAVc715 y se digirió con diferentes enzimas de restricción. Se presenta el mapa de restricción del segmento amplificado (A) y los resultados de las digestiones con *EcoR* I (B), *EcoR* V (C) y *Bam*HI (D), evaluados en geles de agarosa al 1% en solución TAE.

REFERENCIAS

- Ala-Poikela, M., E. Svensson, A. Rojas, T. Horko, L. Paulin, J.P.T. Volkonen & A. Kvarnheden. 2005. Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. *Plant Pathology* 54: 448–459.
- Brown, J.K., D. Froehlich & R. Rosell. 1995. The sweet potato or silver leaf whitefly: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annual Review of Entomology* 40: 511–534.
- Brown J.K., K.M. Ostrow, A.M. Idris & D.C. Stenger. 2000. Chino del tomate virus: relationships to other begomoviruses and the identification of A component variants that affect symptom expression. *Phytopathology* 90: 546–552
- Brown, J.K., A.M. Idris, D. Rogan, M.H. Hussein & M. Palmieri. 2001. Melon chlorotic leaf curl virus, a new *Begomovirus* associated with *Bemisia tabaci* infestations in Guatemala. *Plant Disease* 85: 1027.
- Brown, J.K., A.M. Idris, C. Alteri & D.C. Stenger. 2002. Emergence of a new cucurbit-infecting begomovirus species capable of forming viable reassortants with related virus un the squash leaf curl virus cluster. *Phytopathology* 92: 734–742.
- Domingo, D. & J.J. Holland. 1994. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. *In* *The Evolutionary Biology of Viruses*. Morse, S.S. (ed.). Raven Press, New York.
- Fauquet, C.M. & J. Stanley. 2003. Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems. *Annals of Applied Biology* 142: 165–189.
- Fauquet, C.M. & J. Stanley. 2005. Revising the way we conceive and name virus below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Archives of Virology* 150: 2151–2179.
- Gilbertson. R.L., S.H. Hidayat, R.T. Martinez & D.P. Maxwell. 1991. Differentiation of bean –infecting geminivirus by nucleic acid hybridization probes and aspects of bean golden mosaic in Brazil. *Plant Disease* 75: 336–342.
- Gutierrez, C. 2003. Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiology Molecular Plant Pathology* 60: 219–230.
- Guzman, P., M.R. Sudarshana, Y –S Seo, M.R. Rojas, E. Natwick, T. Turin, K Mayberry & R.L. Gilbertson. 2000. A new bipartite geminivirus (Begomovirus) causing leaf curl and crumpling in cucurbits in the Imperial Valley of California. *Plant Disease* 92: 488.
- Hanley–Bowdoin, L., S.B. Sattlage, B.M. Orozco, S. Nagar & D. Robertson. 1999. Geminivirus: models for plant replication, transcription and cell cycle regulation. *Critical Review in Plant Science* 181: 71–106.

- Hull, R. 2002. *Matthews' Plant Virology* (4th Edn). Academic press. Nueva York. 1001p.
- Karkashian, J.P., D.P. Maxwell & P. Ramírez. 2002. Squash yellow mottle geminivirus: a new cucurbit-infecting geminivirus from Costa Rica. *Phytopathology* 92: S125.
- Kumar, S., K. Tamura & M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150–163.
- Lotrakul, P., Valverde, R. A., De La Torre, R., Sim, J. & Gómez, A. 2000. Occurrence of a strain of Texas pepper virus in Tbasco and Habanero pepper in Costa Rica. *Plant Disease* 84:168-172.
- Martin, D.P., E. van der Walt, D. Posada & E. P. Rybicki. 2005a. The evolutionary value of recombination is constrained by genome modularity. *PloS Genetics* 1: 475–479.
- Martin, D.P., C. Williamson & D. Posada. 2005b. RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignment. *Bioinformatics* 21: 260–262.
- Morales, F. & P. Anderson. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology* 146: 415–441.
- Nakhla, M. K., Sorensen, A., Mejía, L., Ramírez, P., Karkashian, J. P. & Maxwell, D. P. 2005. Molecular characterization of tomato-infecting begomoviruses in Central America and development of DNA-based detection methods. *Acta Horticulturae* 695: 277-288.
- Orozco, B.M., H.J. Gladfelter, S.B. Settlege, P.A. Eagle, R.N. Gentry & L. Hanley – Bowdoin. 1998. Multiple *cis* elements contribute to geminivirus origin function. *Virology* 242: 346–356.
- Padidam, M., S. Sawyer & C. Fauquet. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265: 218–225.
- Paplomatas, E.J., V.P. Patel, Y.M. Hou, A.O. Noueiry & R.L. Gilbertson. 1994. Molecular characterization of a new sap –transmissible bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. *Phytopathology* 84: 1215 –1224.
- Pita, J.S., V.N. Fondong, A. Sangaré, G.W. Otim–Nape, S Ogwal & C.M. Fauquet. 2001. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinants keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease un Uganda. *Journal of General Virology* 82: 655–665.
- Potter, J.L., M.K. Nakhla, L. Mejía & D.P. Maxwell. 2003. PCR and DNA hybridization methods for specific detection of bean –infecting begomovirus un the Americas and Caribbean. *Plant Disease* 87: 1205 –1212.

- Ramírez, P., M. Chicas, J. Salas, D. Maxwell & J. Karkashian. 2004. Identificación de un nuevo begomovirus en melón (*Cucumis melo* L.) en Lara, Venezuela. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 72: 22–30.
- Ramos –Reynoso, E.D. 2004. Identificación de geminivirus que infectan frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en Nicaragua. Tesis de M.Sc. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Rojas, A., A. Kvarnaden, D. Marcenaro & J.P.T. Valkkonen. 2005. Sequence characterization of tomato leaf curl Sinaloa virus and tomato severe leaf curl: phylogeny of new world begomoviruses and detection of recombination. *Archives of Virology* 150: 1281–1299.
- Rojas, M., R. Gilbertson, D. Russel & D. Maxwell. 1993. Use of degenerate initiators in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77: 340–347.
- Salati, R., K.N. Medhat, M.R. Rojas, P. Guzman, J. Jaquez, D.P. Maxwell & R.L Gilbertson. 2002. Tomato yellow leaf curl virus in the Dominican Republic: characterization of a fan-infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir host. *Phytopathology* 92: 487–496.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins & T.J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.
- Varma, A. & V.G. Malathi. 2003. Emerging geminivirus problems: a serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology* 142: 145–164.
- Wyatt, S. & J. Brown. 1996. Detection of subgroup III geminiviruses isolates in leaf extracts by degenerate initiators and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86: 1288–1293.