

Geminivirus Transmitidos por Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*) en Tomate, en el Valle Agrícola de Culiacán, Sinaloa

Geminivirus Transmitted by White Fly (*Bemisia tabaci*) in Tomato, in the Agricultural Valley of Culiacan, Sinaloa

Ofelia Yadira Lugo Melchor, Roberto Guzmán Uriarte, Raymundo Saúl García Estrada y Josefina León Félix, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad Culiacán, Apdo. Postal 32-A, Culiacán, Sin., CP 80129, México. Correspondencia: ljosefina@ciad.mx

(Recibido: Abril 05, 2011 Aceptado: Mayo 21, 2011)

Lugo MOY, Guzmán UR, García ERS y León FJ. 2011. Geminivirus transmitidos por mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en tomate del Valle Agrícola de Culiacán, Sinaloa. Revista Mexicana de Fitopatología 29:109-118.

Resumen. Sinaloa es uno de los principales productores de tomate en México, sin embargo, su producción se ha visto afectada por enfermedades relacionadas con la presencia de geminivirus transmitidos por mosca blanca, ocasionando fuertes pérdidas económicas. En el presente trabajo, se identificaron y caracterizaron los geminivirus presentes en plantas de tomate, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada y posterior análisis de secuenciación. De 507 muestras de plantas analizadas, 197 presentaron síntomas y 310 no los mostraron; se encontraron un total de 134 muestras positivas, que corresponden a 99 (73.8%) que presentaron síntomas y 35 (26.2%) que no los presentaron. De las 134 muestras positivas detectadas por PCR anidada, 64.2% presentó el virus TYLCV, 22.4% SLCV, 6.7% correspondieron a variantes de otros virus (STLCV AV1, PHYVV, CuLCrV segmento A y B) y 3.7% no se identificó el tipo de geminivirus. La PCR anidada permitió detectar los geminivirus transmitidos por mosca presentes en plantas de tomate, tanto con síntomas como sin ellos, y su posterior secuenciación permitió determinar los diferentes tipos de geminivirus presentes, así como nuevas variantes de geminivirus y virus que no habían sido reportados previamente en tomate.

Palabras clave adicionales: *Solanum lycopersicum*, diagnóstico molecular, reacción en cadena de la polimerasa.

Los Geminivirus representan un factor limitante en la producción mundial de varios cultivos incluyendo maíz, yuca, frijol, calabaza, cucurbitáceas y tomate, producidos en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (Bisaro, 1996). La amplia distribución mundial del cultivo de tomate, así como la fácil adaptación y la rápida reproducción de *Bemisia tabaci* (mosca blanca), ha ocasionado pérdidas devastadoras en esta hortaliza (Morales y Anderson, 2001). En Estados Unidos, la estimación de las pérdidas causadas por geminivirus en tomate alcanzan a alrededor del 20% de

Abstract. Sinaloa is one of the main tomato producer states in Mexico; however, its tomato production has been seriously affected by diseases related to the presence of geminivirus transmitted by whitefly, causing great economic losses for the state. In this study, geminivirus present in tomato plants were identified and characterized by nested polymerase chain reaction (PCR) and later sequencing analysis. A total of 507 plants were analyzed, from which, 197 plants showed symptoms of the presence of geminivirus and 310 plants did not show any symptoms of the presence of geminivirus. After analysis, 134 samples were found positive, 99 (73.8%) corresponding to plants that presented symptoms, and 35 (26.1%) without symptoms. From the 134 positives samples detected by nested PCR, 64.2% belonged to TYLCV, 22.4% to SLCV, 6.7% were variants of other viruses (STLCV AV1, PHYVV, CuLCrV segment A and B) and 3.7% contained geminivirus whose type was not identified. The nested PCR allowed detection of geminivirus transmitted by whitefly in tomato plants with, and without symptoms. Posterior sequencing analysis allowed to determine the different types of virus, as well as, new variants of geminivirus which has not been previously detected in tomato plants.

Additional keywords: *Solanum lycopersicum*, molecular

The Geminivirus are a limiting factor in the production of several crops worldwide, including corn, cassava, beans, pumpkin, squash and tomatoes produced in tropical and subtropical areas of the world (Bisaro, 1996). The worldwide distribution of tomato, as well as the easy adaptation and fast reproduction of *Bemisia tabaci* (whitefly), have easy customization and rapid distribution, has caused devastating losses in such crop (Morales and Anderson, 2001). The estimated losses caused by geminivirus in the United States reach about 20% of production, but in the Dominican Republic, Cuba, Mexico, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Venezuela and Brazil, damage is even greater, ranging from 30 to 100% yield loss, in addition to the cost derived from its control (Czosnek, 2007).

la producción, pero en República Dominicana, Cuba, México, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Venezuela y Brasil, los daños son mayores, oscilando entre 30 y 100% de pérdidas en el rendimiento, además de los costos de control de la mosca blanca (Czosnek, 2007).

La distribución global de geminivirus está directamente relacionada con el vector polífago, *Bemisia tabaci*, se estima que esta especie de mosca blanca es capaz de tomar alrededor de 500 plantas como hospedero alrededor del mundo (Morales y Anderson, 2001) y se ha encontrado con una invasividad de hasta 200 km de radio (Deying *et al.*, 2006).

En México, a los geminivirus se les ha asociado con numerosas enfermedades en cultivos de importancia económica como frijol (*Phaseolus vulgaris*), tomate (*Solanum lycopersicum*), chile (*Capsicum annuum*), calabaza (*Cucurbita* spp.), entre otros, y son transmitidos a través de la mosca blanca. Los daños por virus se pueden incrementar rápidamente en los cultivos cuando no se cuenta con un diagnóstico certero, oportuno y confiable, razón por la cual los productores en muchos casos no manejan de manera adecuada las estrategias de control para estas enfermedades.

Los Geminivirus constituyen la familia más grande, diversa y económicamente importante de los virus de ADN de plantas (Rojas *et al.*, 2005). La familia *Geminiviridae* se clasifica en cuatro géneros definidos con base en el vector que los transmite, al hospedero que infecta, y a su estructura genómica (*Mastresvirus*, *Curtovirus*, *Topocovirus* y *Begomovirus*) (Fauquet *et al.*, 2003). Dentro del grupo más ampliamente diversificado y distribuido se encuentran los *Begomovirus*, los cuales infectan principalmente plantas dicotiledóneas y son transmitidos por la mosca blanca. El genoma de los *Begomovirus* es generalmente bipartita a excepción del *Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate* (TYLCV) (Lazarowitz, 1992). Los componentes genómicos son denominados como ADN-A y ADN-B con tamaño molecular que oscila entre 2.7 y 3.0 kb, respectivamente (Yadava *et al.*, 2010). Ambos componentes están organizados en unidades de transcripción divergentes separados por una región intergénica (RI), la cual contiene el origen de la replicación del virus y dos promotores que dirigen la transcripción genética en direcciones opuestas, con excepción de una secuencia de la RI de aproximadamente 200 pb, que se encuentra en ambos ADN virales y es denominada como región común (RC) (Hanley *et al.*, 2000). Los dos componentes son completamente diferentes, el ADN-A contiene toda la información que se requiere para la replicación y formación de la cápside del virus, mientras que el componente B, codifica para las proteínas involucradas en el movimiento viral de célula a célula, en el rango de hospederos y en el desarrollo de los síntomas en la planta (Hou *et al.*, 1998). Las técnicas moleculares basadas en amplificar regiones conservadas de los componentes genómicos A y B de los geminivirus, ha permitido diseñar nuevos oligonucleótidos que son utilizados como método de diagnóstico como es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permiten la detección cualitativa y semicuantitativa de bajas

The geminivirus global distribution is directly related to the polyphagous vector *Bemisia tabaci*. It is estimated that this whitefly species is capable to take about 500 plants as host around the world (Morales and Anderson, 2001), having been found within an invasiveness as large as a 200 km radius (Deying *et al.*, 2006).

Geminiviruses in Mexico have been associated to numerous diseases in economically important crops, such as beans (*Phaseolus vulgaris*), tomato (*Solanum lycopersicum*), pepper (*Capsicum annuum*), and squash (*Cucurbita* spp.), among others, and they are transmitted by whiteflies. Damage by virus can rapidly increase in the crops when there is not an accurate, timely and reliable diagnosis, which is why producers often do not adequately handle the control strategies for this sort of diseases.

The Geminiviruses represent the largest, most diverse and economically important family of plant DNA virus (Rojas *et al.*, 2005). The *Geminiviridae* family is classified into four genera, which are defined based on the transmitting vector, on the host it infects, and its genomic structure (*Mastresvirus*, *Curtovirus*, *Topocovirus* and *Begomovirus*) (Fauquet *et al.*, 2003). The *Begomoviruses* are included within the most diversified and distributed group; these primarily infect dicotyledonous plants, and they are transmitted by whitefly. The *Begomovirus* genome is generally bipartite, except for the *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Lazarowitz, 1992). The genomic components are referred to as DNA-A and DNA-B, with a molecular size ranging between 2.7 and 3.0 kb, respectively (Yadava *et al.*, 2010). Both components are organized into divergent transcription units separated by an intergenic region (IR), which contains the origin of the virus replication and two promoters that direct gene transcription in opposite directions, with the exception of an IR sequence of approximately 200 bp found in both viral DNA, denominated as common region (CR) (Hanley *et al.*, 2000). The two components are completely different; all the information required for replication and formation of the capsid virus is contained by the DNA-A, while the B component encodes for the proteins involved in the viral movement from cell to cell, in the host range and in symptoms development in the plant (Hou *et al.*, 1998). Molecular techniques based on conserved regions to amplify A and B genomic components of the geminivirus have allowed to design new oligonucleotides primers that are utilized as a diagnostic tool, such as the polymerase chain reaction (PCR) for both qualitative and semi-quantitative detection of low geminivirus concentrations, even when crude extracts of plant material are used; thus, such method has allowed an earlier detection of this type of viruses, as well as the identification of its new variants. This will help to plan new studies to improve molecular diagnostics.

Therefore, the objective of the study was to identify and characterize the presence of whitefly-transmitted geminiviruses on tomato crops in the Valley of Culiacan, Sinaloa, during the 2006-2007 agricultural season, by means of the nested PCR technique, as well as by sequencing the amplified DNA fragments.

semicuantitativa de bajas concentraciones de geminivirus, aún cuando se utilicen extractos crudos de material vegetal, por lo que el método ha permitido la detección más oportuna de este tipo de virus, así como la identificación de sus nuevas variantes. Lo que permite encaminar nuevos trabajos para mejorar el diagnóstico molecular.

Por ello, el objetivo del trabajo fue identificar y caracterizar la presencia de geminivirus transmitidos por mosca blanca, en cultivos de tomate del Valle de Culiacán, Sinaloa, durante el ciclo agrícola 2006-2007, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidada y la secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de plantas de tomate. La toma de muestra de las plantas de tomate se llevó a cabo por barrido total de dos campos agrícolas, ubicados en el Valle de Culiacán. El campo agrícola #1 se encuentra localizado bajo las coordenadas 24°46'16.42''-107°31'23.49'', el campo agrícola #2 se encuentra localizado bajo las coordenadas 24°46'07.09''-107°34'17.05'', cada campo se encuentra seccionado en tablas de aproximadamente 300 m de largo y 90 m de ancho, dichas tablas fueron seccionadas en cuadros de tal manera que se pudiese observar la forma en que la mosca blanca infecta a cada campo agrícola. La toma de muestra se realizó en los meses de octubre de 2006 a abril de 2007, con una frecuencia quincenal de tal forma que se alcanzara a cubrir en su totalidad cada campo, con un total de 507 muestras analizadas, de las cuales 301 correspondieron al campo agrícola #1 y 206 muestras para el campo agrícola #2. La toma de muestra se realizó durante la floración hasta la etapa de producción del cultivo de tomate y consistió en recolectar aproximadamente 10 g de la parte superior de las hojas más jóvenes de la planta con sintomatología y dos muestras más de 10 g cada una, de plantas aparentemente sanas y vecinas a las plantas con síntomas de virus. Las muestras fueron recolectadas en bolsas de plástico estériles y transportadas a temperatura ambiente al Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Alimentos (LMAA) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Coordinación Culiacán.

Extracción de ADN genómico de plantas. Se empleó la metodología utilizada por Green y Thompson (1999), con modificaciones para la obtención de mejores resultados. Se trituraron 0.5 g de tejido vegetal en un mortero, se agregó nitrógeno líquido para facilitar la ruptura de la célula y la molienda, una vez que se obtuvo un polvo fino se añadieron 3 mL de buffer de extracción de bromuro de cetil trimetil amonio, CTAB (Tris 100 mM, pH 8; NaCl 1.4 M; EDTA 50 mM, pH 8; CTAB 2.5%; PVP 1%; 2-mercaptoetanol 0.2%), se homogenizó y se tomó 1 mL del homogenizado, se incubó a 65°C durante 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 16,000 x g por 5 min. Se tomaron 700 µL del sobrenadante en un tubo Eppendorf y se agregó un volumen igual de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) (SIGMA), se centrifugó a 16,000 x g por 10 min y se repitió de nuevo. El sobrenadante obtenido fue colocado en un tubo Eppendorf estéril, se agregaron 3.5 µL de ARNasa (Promega) y se

MATERIALS AND METHODS

Tomato plants sampling. The sampling of tomato was carried out by the total scanning of two agricultural fields, located in the Valley of Culiacan. The agricultural field #1 is located under the 24°46'16.42''-107°31'23.49'' coordinates; the agricultural field #2 is located under the 24°46'07.09''-107°34'17.05'' coordinates; every farm field is sectioned approximately into tables of 300 m long and 90 m wide. The tables were sectioned into squares so that it could be observed how every field becomes infected by the whitefly. The sampling was conducted from October, 2006 to April, 2007 every two weeks, looking forward to cover each agricultural field in full, with a total of 507 samples analyzed, out of which 301 corresponded to the field #1, having the 206 samples left corresponding to the field #2. The sampling was performed from flowering, to the production stage of the tomato crop, consisting in collecting approximately 10 g from the top of each of the youngest leaves, from the plants with virus symptoms; plus two more samples, 10 g each, from apparently healthy plants and neighboring plants with virus symptoms, as well. Samples were collected in sterile plastic bags and transported at room temperature to the Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Alimentos (LMAA) from the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Coordinación Culiacan.

Extraction of genomic DNA from plants. The methodology used by Green and Thompson (1999) with modifications for better results, was utilized. A total of 0.5 g plant tissue was ground in a mortar; liquid nitrogen was added to facilitate cell disruption and grinding. Once turned into fine powder, 3 mL of extraction buffer cetyl trimethyl ammonium bromide were added, CTAB (Tris 100 mM, pH 8; NaCl 1.4 M; EDTA 50 mM, pH 8; CTAB 2.5%; PVP 1%; 2-mercaptoethanol 0.2%); it was homogenized afterwards taking 1 mL of the homogenate, and incubated at 65°C for 30 min. After the incubation period, it was centrifuged at 16,000 x g for 5 min. A total of 700 µL of supernatant were taken in an Eppendorf tube and added an equal volume of chloroform isoamyl alcohol (24:1) (SIGMA,); centrifuged at 16,000 x g for 10 min and repeated again. The supernatant was placed in a sterile Eppendorf tube, had 3.5 µL of ARNasa (Promega) added to it and incubated it at 37°C for 30 min. The DNA was precipitated after the incubation time with 0.8 volumes of isopropanol (Faga-Lab), incubated in ice for 5 min and centrifuged at 16,000 x g for 10 min. The supernatant was carefully eliminated to avoid the miscarriage of the DNA pill; once the pill was obtained, it was washed with 450 µL of ethanol at 70% (SIGMA), centrifuged for 2 min and the remaining ethanol was removed; allowed a period no longer than 15 min to dry it out and had it re-suspended in 40 µL of nanopure sterile water injectable grade (Laboratorios Pisa); finally, it was stored at 20°C for future analysis.

Amplification of viral DNA by nested PCR. The geminivirus detection was performed by means of nested PCR with the detection system GoTaq PCR Core Systems 1 (Promega, Corp. Madison WI, USA). The first amplification round consisted in using 2 µL of viral DNA, placing them in

incubó a 37°C por 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se precipitó el ADN con 0.8 volúmenes de isopropanol (Faga-Lab), se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó a 16,000 x g por 10 min. Se eliminó el sobrenadante con cuidado para evitar traerse la pastilla de ADN, una vez que se obtuvo la pastilla se lavó con 450 µL de etanol al 70% (SIGMA), se centrifugó por 2 min y se eliminó el etanol remanente, se dejó secar un tiempo no mayor de 15 min y se resuspendió el ADN en 40 µL de agua nanopura estéril grado inyectable (Laboratorios PISA), por último, se almacenó a -20°C para posteriores análisis.

Amplificación de ADN viral por PCR anidada. La detección de geminivirus se realizó mediante PCR anidada, con el sistema de detección GoTaq PCR Core Systems 1 (Promega, Corp. Madison WI, USA). La primera ronda de amplificación consistió en usar 2 µL de ADN viral, colocándolos en una mezcla de PCR (MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0.4 mM, buffer GoTaq ADN polimerasa 1X, GoTaq ADN polimerasa 1 U, oligonucleótidos sentido y antisentido 0.4 µM y el resto de agua) a un volumen final de 25 L. El genoma viral fue amplificado por PCR mediante los oligonucleótidos *PAL1v1978* (5'-GCATCTGCAGGC C C ACATYGTCTTYCCNGT-3') y *PAR1c715* (5'-GATTTCTGCAGTTDATRTTYTCRTCCATCCA-3') que amplifican una región conservada del componente A de los virus, amplificando una parte del gen *Rep*, toda la región intergénica y una porción del gen *CP*, además, permite la amplificación de dos grandes regiones genómicas, que juntas cubren la totalidad del genoma A de los *Begomovirus* (Rojas, 1994). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador de gradiente (Mastercycler, Eppendorf), bajo las siguientes condiciones: 94°C 2 min, 35 ciclos (94°C 1 min, 55°C 1 min y 72°C 1 min) y un paso final a 72°C por 10 min. Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, se consideró positiva cuando se observó una banda de 1400 pb (Figura 1A). La segunda ronda de amplificación consistió en utilizar 2 µL de producto de PCR de la primera ronda, colocándolos en una mezcla de PCR (MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0.4 mM, buffer Taq ADN polimerasa 1X, GoTaq ADN polimerasa 1 U, oligonucleótidos sentido y antisentido 0.4 µM y el resto de agua) a un volumen final de 25 L. Se utilizaron como oligonucleótidos a *RepMot* (5'-GAGTCTAGAGGATANGTRAGGAAATARTTCTTGGC-3') y *CpMot* (5'-CGCGAATTCGACTGGACCTTACATGGNCCTTCAC-3'), los cuales fueron diseñados para amplificar regiones conservadas de los genes *Rep* y *CP* con una amplificación directa sobre la región intergénica, la cual varía de 600 pb para los *Begomovirus* de América y 750 pb (Figura 1B) para los *Begomovirus* de Europa (De la Torre *et al.*, 2003) y sus condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C 2 min, 35 ciclos (94°C 1 min, 65°C 1 min y 72°C 1 min) y un paso final de 72°C por 10 min. Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en gels de agarosa al 1% y se consideraron positivas cuando se obtuvo un fragmento de 600 ó 750 pb.

Identificación de TYLCV y SLCV por PCR. Una vez detectados los geminivirus, se llevó a cabo la identificación de TYLCV y SLCV (*Virus del enrollamiento*

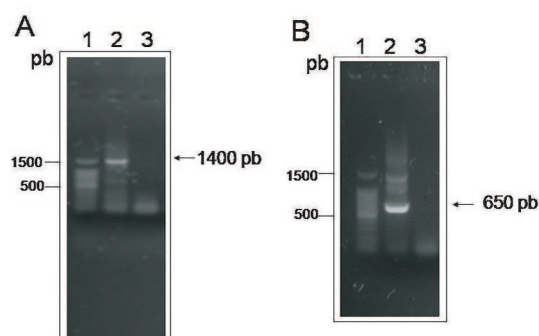


Figura 1. Análisis electroforético de los productos de PCR para la detección de geminivirus. A. PCR con los oligonucleótidos *PAL1v1978* y *PAR1c715*. La flecha indica el producto de PCR amplificado de 1400 pb. Carril 1, marcadores de tamaño molecular; carril 2, muestra analizada; carril 3, control negativo. B. PCR anidada con los oligonucleótidos *RepMot* y *CpMot*. La flecha indica el producto de PCR amplificado de 650 pb. Carril 1, marcadores de tamaño molecular; carril 2, muestra analizada; carril 3, control negativo.

Figure 1. Electrophoretic analysis of products PCR for geminivirus detection. A. PCR with the *PAL1v1978* and *PAR1c715* oligonucleotides. The 1400 bp amplified PCR product is indicated by the arrow. Lane 1, markers of molecular size; lane 2, sample analyzed; lane 3, negative control. B. Nested PCR with the *RepMot* and *CpMot* oligonucleotides. The 650 bp amplified PCR products is indicated by the arrow; lane 1, markers of molecular size; lane 2, analyzed sample; lane 3, negative control.

a PCR mixture (MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0.4 mM, buffer GoTaq ADN polymerase 1X, GoTaq DNA polymerase 1 U, sense and antisense oligonucleotides 0.4 µM and the rest in water) at a final volume of 25 L. The viral genome was amplified by PCR throughout the *PAL1v1978* (5'-GCATCTGCAGGC C C C ACATYGTCTTYCCNGT-3') and *PAR1c715* (5'-GATTTCTGCAGTTDATRTTYTCRTCCATCCA-3') oligonucleotides, which amplifies a conserved region of the A viral component, amplifying a portion of the *Rep* gene, the entire intergenic region and a portion of the *CP* gene; moreover, it allowed the amplification of two genomic regions, which together covered the *Begomovirus* genome A, in full (Rojas, 1994). The amplification was performed in a gradient thermal cycler (Master cycler, Eppendorf), under the following conditions: 94°C 2 min, 35 cycles (94°C 1 min, 55°C 1 min and 72°C 1 min), and a final step at 72°C for 10 min. The amplification products were analyzed by means of agarose gel electrophoresis at 1%; it was considered positive when there was a band of 1400 bp (Figure 1A). The second round of amplification consisted of using 2 µL of the PCR product of the first round, placing them in a PCR mixture (MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0.4 mM, buffer Taq ADN polymerase 1X, GoTaq ADN polymerase 1 U, sense and antisense oligonucleotides 0.4 µM and the rest in water) at a final volume of 25 L. The *RepMot* (5'-GAGTCTAGAGGATANGTRAGGAAATARTTCTTGGC-3') and *CpMot* (5'-CGCGAATTCGACTGGACCTTACATGGNCCTTCAC-3')

de la hoja de calabaza) con el sistema de detección GoTaq PCR Core Systems 1 (Promega, Corp. Madison WI, USA). La ronda de amplificación para TYLCV consistió en utilizar 2 µL de ADN viral, colocándolos en una mezcla de PCR (MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0.4 mM, buffer GoTaq ADN polimerasa 1X, GoTaq ADN polimerasa 1 U, oligonucleótidos sentido y antisentido 0.4 µM y el resto de agua) a un volumen final de 25 L. El juego de oligonucleótidos utilizados fue *Rep-DGSAR* (5'-GAGTCTAGATGCTGACCTCCTCTAGCWGATCTGCCGTC-3') y *YMAC-Rev* (5'-GAGTCTAGAGGRTTAGARGCATGHTACATGCCAT-3'), que amplifican la mitad superior de TYLCV y sus condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C 2 min, 35 ciclos (94°C 1 min, 65°C 1 min y 72°C 1 min) y un paso final de 72°C por 10 min. Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% y se consideraron positivas cuando se obtuvo un fragmento de 1560 pb. En el caso de la amplificación para SLCV se utilizaron las mismas cantidades de la mezcla maestra y las mismas condiciones utilizadas para la identificación de TYLCV, variando solo en el tipo de oligonucleótidos que se utilizaron, *REP-SL2150-for* (5'-TGG AATTCTKGACGCGRTTG GYGTCCTTTGGC-3') y *YMAC-Rev* (5'-GAGTCTAGAGGRTTAGARGCATGHGTACATGCCAT-3') la cual amplifica la mitad superior del genoma de SLCV observándose un fragmento de 1400pb (Argüello *et al.*, 2004).

Análisis de secuencias de ADN. Las muestras positivas para geminivirus restantes que no resultaron positivas para TYLCV ni para SLCV se secuenciaron en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El fragmento que se secuenció fue aquel que amplificaba regiones conservadas de los genes Rep y CP con tamaños de 600 pb para los *Begomovirus* de América y 750 pb para los *Begomovirus* de Europa (De la Torre *et al.*, 2003). Las 12 secuencias obtenidas se compararon en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando el programa BLAST. Las secuencias obtenidas se compararon con las referidas por el programa BLAST y para obtener el porcentaje de identidad se utilizó el programa MEGA4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de geminivirus por PCR anidada. Se analizaron 507 muestras de plantas de tomate para geminivirus, colectadas de dos diferentes campos agrícolas localizados en el Valle de Culiacán, Sinaloa. De ellas 197 presentaron la sintomatología característica de daños relacionados con la presencia de virus y 310 estaban ausentes de síntomas visuales (Cuadro 1). Del total de las muestras analizadas, 134 resultaron positivas, el 73.9% de las muestras positivas presentaban la sintomatología característica para TYLCV, mientras que el 26.1% de las muestras positivas carecían de síntomas (Cuadro 2). Morilla *et al.* (2005) reportan que no existe una correlación entre la presencia del virus y el desarrollo del síntoma, pero que puede existir una relación entre la concentración viral en los

Cuadro 1. Muestras de plantas de tomate analizadas para la presencia de geminivirus de dos campos agrícolas de Valle de Culiacán, Sinaloa.

Table 1. Samples of tomato plants analyzed for geminivirus presence from two agricultural fields from the Valley of Culiacan, Sinaloa.

Campo agrícola	Número de muestras	Con síntomas	Sin síntomas
#1	301	140	161
#2	206	571	149
Total	507	197	310

CCTTCAC-3') were used as oligonucleotides, which were designed to amplify both *Rep* and *CP* gene conserved regions, with a direct amplification of the intergenic region, which ranged from 600 bp for the *Begomovirus* from America and 750 bp (Figure 1B) for the *Begomovirus* from Europe (De la Torre *et al.*, 2003); its amplification conditions were as follows: 94°C 2 min, 35 cycles (94°C 1 min, 65°C 1 min and 72°C 1 min) and a final step of 72°C for 10 min. The amplification products were analyzed by agarose gel electrophoresis at 1% and they were considered positive when a fragment ranging from 600 to 750 bp, was obtained.

Identification of TYLCV and SLCV by PCR. The proper identification of TYLCV (*Tomato yellow leaf curling virus*) and SLCV (*Squash leaf curling virus*) was carried out once the geminiviruses had been detected by means of the detection system GoTaq PCR Core Systems 1 (Promega, Corp. Madison, WI, USA). The amplification round for TYLCV consisted on using 2 µL of viral DNA, placing them in a PCR mixture (MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0.4 mM, buffer GoTaq ADN polymerase 1X, GoTaq DNA polymerase 1 U, sense and antisense oligonucleotides 0.4 µM and the rest in water) at a final volume of 25 L. The set of oligonucleotides used was *Rep-DGSAR* (5'-GAGTCTAGATGCTGACCTCCTTAGCWGATCTGCCGTC-3') and *YMAC-Rev* (5'-GAGTCTAGAGGRTTAGARGCATGHGTACATGCCAT-3'), which amplify the upper half of TYLCV; its amplification conditions were as follows: 94°C 2 min, 35 cycles (94°C 1 min, 65°C 1 min and 72°C 1 min) and a final step of 72°C for 10 min. The amplification products were analyzed by agarose gel electrophoresis, and 2% were considered positive when a fragment reached 1560 bp. The same amount of master mix and the same conditions used for TYLCV identification were used for the SLCV

Cuadro 2. Porcentaje de muestras de plantas de tomate positivas y negativas para geminivirus con y sin sintomatología.

Table 2. Positive and negative tomato plant sampling percentage for geminivirus with and without symptoms.

Resultado	Total	Con síntomas (%)	Sin síntomas (%)
Positivas	134	99 (73.9)	35 (26.1)
Negativas	373	98 (26.2)	275 (73.8)

tejidos de la planta con la ausencia de síntomas en el caso de plantas de chiles. Esto indica que esta técnica tiene la sensibilidad suficiente para detectar los virus antes de que presenten la sintomatología.

El 26.3% de las plantas con síntomas resultaron negativas (Cuadro 2), lo que sugiere que estas plantas pudieran presentar alguna fitotoxicidad ocasionada por mosca blanca ya que se caracteriza por causar este tipo de daño o bien por potenciar la dispersión de los geminivirus propiciando la aparición de infecciones mixtas (Bedford *et al.*, 1994; Polson y Anderson, 1997; Jones, 2003). Otra de las causas que pudieran haberse presentado es que las plantas con síntomas pero negativos, se encontraban infectadas con virus que causan síntomas parecidos a los geminivirus transmitidos por *B. tabaci* pero que no pertenecen a este grupo, como lo son: *Carlavirus*, *Luteovirus*, *Nepovirus*, *Potyvirus*, *Closterovirus*, por lo que es recomendable hacer el diagnóstico de laboratorio para determinar con exactitud el tipo de virus que ocasiona el daño a las plantas (Dardón *et al.*, 1994).

Identificación de TYLCV y SLCV. De las muestras positivas para geminivirus, se identificó la presencia de dos distintas especies de geminivirus pertenecientes al género *Begomovirus*, el *Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate* (TYLCV, por sus siglas en inglés) y el *Virus del enrollamiento de la hoja de calabaza* (SLCV). Se encontró que el 64.2% de las muestras positivas pertenecían al virus TYLCV, el 22.4% pertenecían al virus SLCV y el 6.7% presentaron coinfección con ambos virus (Cuadro 3). Este tipo de infecciones mixtas son comunes en regiones tropicales y subtropicales, además la coinfección entre dos virus en algunos casos es un prerrequisito para que la recombinación pueda ocurrir. Tales infecciones han sido reportadas frecuentemente en cultivos como el tomate en diferentes regiones (Torres *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 1999; Accotto *et al.*, 2003; Méndez *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2003; Xie y Zhou, 2003; Jovel *et al.*, 2004; Chowda *et al.*, 2005).

El TYLCV es una amenaza a nivel mundial para el tomate y otros cultivos agrícolas (Khan *et al.*, 2007). Recientemente el TYLCV fue reportado en el estado de Sinaloa ocasionando pérdidas importantes en tomate durante la temporada otoño-invierno 2006-2007 (Gámez *et al.*, 2006). Mientras el SLCV se ha encontrado distribuido principalmente en EUA (Arizona, Texas y California) y ha

Cuadro 3. Porcentaje de muestras de plantas de tomate positivas infectadas con TYLCV, SLCV y otros geminivirus.

Table 3. Percentage of tomato plant samplings positively infected with TYLCV, SLCV and other geminivirus.

Geminivirus (%) ^x	Número de muestras (%) con ^y		
	TYLCV	SLCV	Otros virus
134 (26.4)	86 (64.2)	30 (22.4)	9 (6.7)

^x507 muestras de plantas de tomate analizadas para la detección de geminivirus.

^y134 muestras de plantas de tomate positivas para geminivirus.

amplification case, differing only in the type of oligonucleotides used, *REP-SL2150-for* (5'-T G G A A T T C T K G A C G C G R T T G G Y G T C T T T G G C -3') and *YMAC-Rev* (5'-G A G T C T A G A G G R T T A G A R G C A T G H G T A C A T G C C A T -3'), which amplifies half of the upper SLCV genome, having a fragment observed at 1400 pb (Argüello *et al.*, 2004).

Analysis of DNA sequence. The remaining geminiviruses samples that had not been positive for neither TYLCV nor SLCV were sequenced at the Laboratorio de Biología Molecular Del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The sequenced fragment was the one fragment that had the conserved regions of both the *Rep* and *CP* genes amplified, with sizes of 600 bp for the *Begomovirus* from America and 750 bp for the *Begomovirus* from Europe (De la Torre *et al.*, 2003). The 12 obtained sequences were compared in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database, by means of the BLAST program. The sequences obtained were compared with those referred by the BLAST, aiming to get the identity percentage used in the MEGA4 program.

RESULTS AND DISCUSSION

Geminivirus detection by nested PCR. A total of 507 tomato plant samples were analyzed for geminivirus, collected from two different agricultural fields located in the Valley of Culiacan, Sinaloa. The characteristic symptoms of damage related to the presence of the virus were shown by 197 samples; 310 had no visual symptoms (Table 1). A total of 134 were positive out of the total analyzed samples; the 73.9 % of the positive samples presented the TYLCV characteristic symptoms, whereas 26.1% of the positive samples had no symptoms at all (Table 2). It has been reported by Morilla *et al.* (2005) that there is no relation between the virus and symptom development, but there may be a relation between the titer or and the viral concentration in the plant tissues with a lack of symptoms in the case of pepper plants. It is indicated by this technique that it is sensitive enough to detect the virus before symptoms are expressed.

The 26.3 % of plants with symptoms resulted negative (Table 2), suggesting thus that such plants could present some phytotoxicity caused by whitefly, since it is characterized for causing this sort of damage or by enhancing the geminivirus dispersion, encouraging the occurrence of mixed infections (Bedford *et al.*, 1994; Polson and Anderson, 1997; Jones, 2003). Another possible cause is that may have been revealed is that plants with negative symptoms of infection were infected indeed, but by viruses causing similar symptoms to those caused by geminivirus transmitted by *B. tabaci*, but which do not belong to this group, such as *Carlavirus*, *Luteovirus*, *Nepovirus*, *Potyvirus*, *Closterovirus*. Consequently, it is advisable to perform a laboratory diagnosis, looking forward to determine exactly the type of virus causing damage to plants (Dardón *et al.* 1994).

Identification of TYLCV and SLV. The presence of two different geminivirus species corresponding to the

sido reportado en otros países como Guatemala, Honduras, México (Sinaloa y Sonora), Nicaragua y Panamá, infectando distintos hospederos naturales como sandía, melón, azafrán y diferentes especies de calabaza (Schuster, 2004). Sin embargo, no existen reportes que describan el hallazgo en plantas de tomate, por lo que el presente trabajo constituye el primer reporte de este virus infectando un nuevo hospedero; el hallazgo coincide con el hecho de que en la misma región agrícola se siembra también calabaza.

Análisis de secuencias de ADN y su relación con otros geminivirus. Doce de las muestras que amplificaron para geminivirus, pero no amplificaron para TYLCV ni para SLCV, fueron secuenciadas y comparadas con otras secuencias de geminivirus reportadas en el GenBank del NCBI, mediante BLASTn para identificar a qué tipo de geminivirus corresponden. Las secuencias denominadas GEM#CIADCLN fueron las obtenidas de este trabajo. Las secuencias GEM301CIADCLN, GEM78CIADCLN y GEM298CIADCLN mostraron una similitud del 100% con el *Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate* (TYLCV Guasave y TYLCV Sinaloa), este grupo de secuencias presentan un 99% de similitud con GEM71CIADCLN y con el segmento A del *Virus de la hoja enrollada de las cucurbitáceas* (*Curcubit leaf curl virus*, CuLCrV). Las secuencias GEM13CIADCLN, GEM12CIADCLN, GEM35CIADCLN, GEM23CIADCLN y GEM15CIADCLN presentan una similitud del 99.9% con el *Virus chino del tomate de Sinaloa* (*Chino del tomate virus isolate Sinaloa*, CdTV) y del 99.1% con el grupo de secuencias GEM301CIADCLN, GEM78CIADCLN y GEM298CIADCLN. Las secuencias GEM34CIADCLN y GEM48CIADCLN presentan una similitud del 99.9% con la del *Virus de la vena amarilla del chile huasteco de Sinaloa* (*Pepper huasteco yellow vein virus*, PHYVV). La secuencia GEM22CIADCLN presenta una similitud del 99.7% con el *Virus de la hoja enrollada de la calabaza* (*Squash leaf curl virus*, SLCV) y del 97.4% comparado con los otros grupos de secuencias (Figura 2). El análisis de secuencias muestra una relación cercana con algunos *Begomovirus* que han sido reportados anteriormente en plantas de tomate, entre ellos, TYLCV y CdTV, dichos virus han sido reportados recientemente por coinfectar no solamente plantas de tomate sino también plantas de chile (Cárdenas *et al.*, 2010). Por lo que es importante continuar con el monitoreo de estos virus ya que pueden infectar uno o varios cultivos y ocasionar pérdidas en éstos.

CONCLUSIONES

Mediante la técnica de PCR anidada se detectó la presencia de geminivirus en muestras de plantas de tomate con o sin síntomas en los campos agrícolas del Valle de Culiacán, durante el ciclo agrícola 2006-2007. Los geminivirus identificados corresponden al *Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate* (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) y *Virus del enrollamiento de la hoja de calabaza* (*Squash leaf curl virus*, SLCV).

El SLCV, no se ha reportado en plantas de tomate. Mediante PCR anidada y posterior secuenciación se

Begomovirus genus, the TYLCV and SLCV, were identified from the positive samples for geminivirus. It was showed that 64.2% of the positive samples were TYLCV; 22.4% SLCV and 6.7% were co-infected with both viruses (Table 3). Such type of mixed infections is rather common in tropical and subtropical regions; in addition, the co-infection between two viruses is a pre-requisite, in some cases, for recombination to take place. These infections have been frequently reported in crops, such as tomato, in different regions (Torres *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 1999; Accotto *et al.*, 2003; Méndez *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2003; Xie and Zhou, 2003; Jovel *et al.*, 2004; Chowda *et al.*, 2005).

The TYLCV is a global threat for tomato and other crops (Khan *et al.*, 2007). Such virus has been recently reported in the state of Sinaloa, causing important losses for tomato during the autumn-winter 2006-2007 season (Gómez *et al.*, 2006), while the SLCV has been found distributed mainly in the USA (Arizona, Texas and California), and it has been reported in other countries such as Guatemala, Honduras, Mexico (Sinaloa and Sonora), Nicaragua and Panama, infecting different natural host, such as watermelon, cantaloupe, saffron and different squash species (Schuster, 2004). Nevertheless, there are no reports describing the findings in tomato plants, which is why the present study represents the first report of this virus having a new infected host. This particular finding is consistent with the fact that in the same agricultural region squash is also sown.

Analysis of DNA sequence and how it is related to other geminiviruses. Twelve of the geminivirus amplified samples, but not amplified for neither TYLCV nor SLCV, were sequenced and compared to other geminivirus sequences reported at the NCBI GenBank through BLAST, looking forward to identify what type of geminivirus they belong to. The sequences denominated GEM#CIADCLN were obtained from the study hereby. The GEM301CIADCLN, GEM78CIADCLN and GEM298CIADCLN sequences showed a 100% similarity with the TYLCV Guasave and TYLCV Sinaloa; a 99% similarity with GEM71CIADCLN and with the A segment of the *Curcubit leaf curl virus*, CuLCrV was revealed by this sequence group. A 99% similarity with the *Chino de tomate virus isolate Sinaloa*, CdTV and a 99.1% similarity with the GEM301CIADCLN, GEM78CIADCLN and GEM298CIADCLN sequence group was shown by the GEM13CIADCLN, GEM12CIADCLN, GEM35CIADCLN, GEM23CIADCLN and GEM15CIADCLN sequences. A 99.9% similarity with the *Pepper huasteco yellow vein virus*, PHYVV was shown by the GEM34CIADCLN and GEM48CIADCLN sequences. A 99.7% similarity with the *Squash leaf curl virus*, SLCV and with a 97.3% similarity if compared with the other sequence groups was revealed by the GEM22CIADCLN sequence (Figure 2). A close relationship to some *Begomovirus* that have been previously reported in tomato plants, being TYLCV and CdTV among them, is shown by the analysis of the sequences; these viruses have been recently reported for co-infecting not only tomato plants,

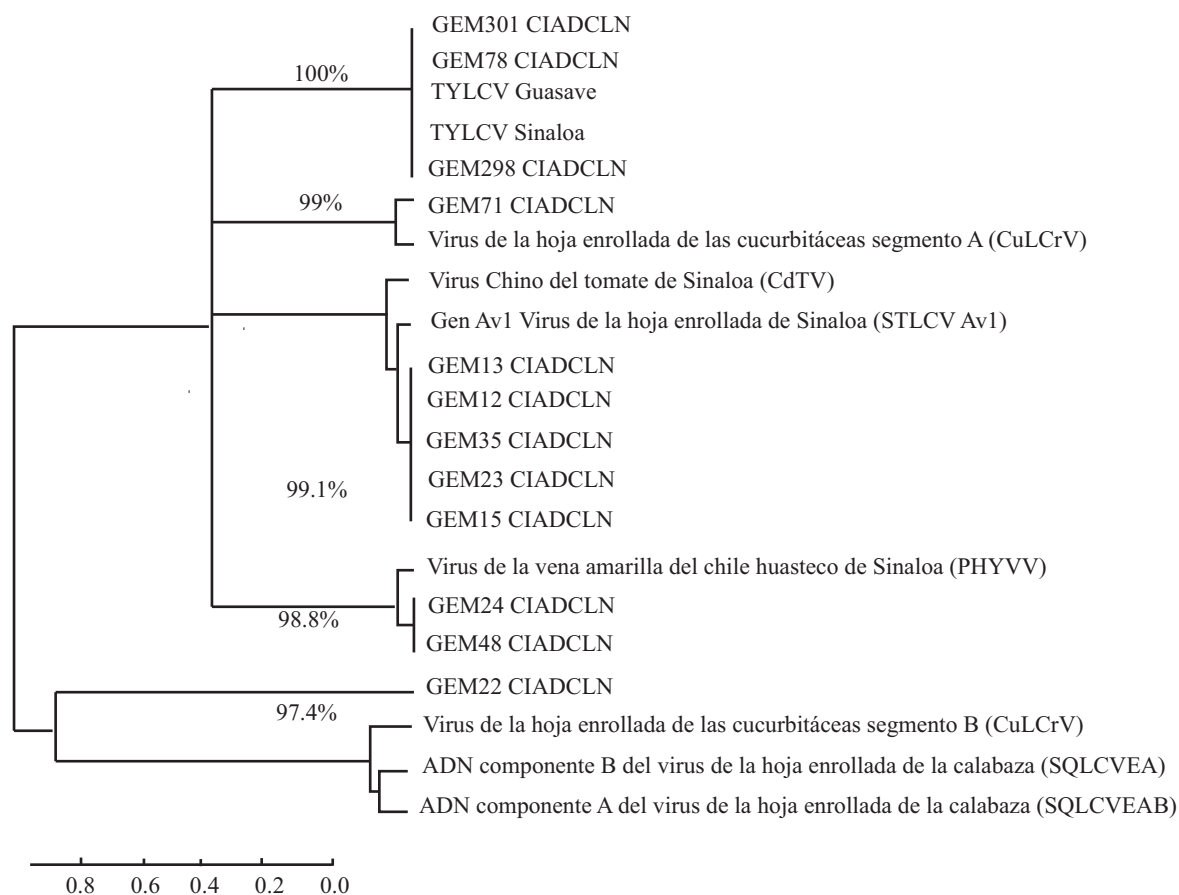


Figura 2. Análisis de las secuencias de los fragmentos de ADN de geminivirus amplificados por PCR anidada. Porcentajes de homología entre las secuencias, utilizando el programa MEGA 4.

Figure 2. Analysis of the geminivirus DNA fragments sequence amplified by nested PCR. Homology percentages among sequences using the MEGA 4 program.

identificaron los virus TYLCV Guasave, TYLCV Sinaloa, CuLCrV segmento A, y variantes de los virus STLCV AV1, PHYVV y CuLCrV segmento B. La presencia de más de un virus infectando a las plantas de tomate, complica la identificación basado solo en síntomas visuales, por lo que es de gran importancia contar con metodologías como la PCR para dar diagnósticos precisos, que permitan tomar las acciones pertinentes a cada problema.

Agradecimientos. Los autores agradecen al Dr. Gerardo Argüello Astorga por el apoyo metodológico para la detección de geminivirus, al Dr. Osvaldo López Cuevas y a la Q.F.B. Célida Martínez Rodríguez por su asistencia técnica.

LITERATURA CITADA

- Accotto GP, Bragaloni M, Luison D, Davino S and Davino M. 2003. First report of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in Italy. *Plant Pathology* 52:799.
- Argüello AG, López OL, Kong LJ, Orozco BM, Settlege SB and Hanley BL. 2004. A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. *Journal of Virology*

but also pepper plants (Cárdenas *et al.*, 2010). Therefore, it is important to continue monitoring these viruses, since they may infect one or more crops causing some relevant losses.

CONCLUSIONS

The Geminivirus were detected by the nested PCR technique in tomato plant samples with or without symptoms, in the fields from the Valley of Culiacan during the 2006-2007 crop season. The identified geminivirus corresponded and the *Squash leaf curl virus*.

The SLVC has not been reported in tomato plants. The TYLCV Guasave, TYLCV Sinaloa, CuLCrV segment A, and variants STLCV AV1, PHYVV and CuLCrV virus, segment B were identified by means of the nested PCR technique and its subsequent sequencing. The presence of more than one virus infecting tomato plants complicates the identification based only in visual symptoms, which is why it is so important to have methodologies such as the PCR in order to reach accurate diagnoses that shall allow the appropriate actions to be taken for each problem.

Acknowledgements. The authors thank PhD.

- 78:4817-4826.
- Bedford I, Briddon R, Brown JK, Rosell RC and Markham PG. 1994. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *The Annals of Applied Biology* 125:311-325.
- Bisaro DM. 1996. *Geminivirus* DNA replication. Pp:833-854. *DNA Replication in Eucaryotic Cells*. Vol. 31. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA. 1058p.
- Cárdenas CCY, Argüello AG, Poghosyan A, Hernández GJ, Lebsky V, Holguin PJ, Medina HD and Vega PS. 2010. First report of *Tomato yellow leaf curl virus* co-infecting pepper with *Tomato chino La Paz virus* in Baja California Sur, Mexico. *Plant Disease* 94:1266-1266
- Chowda RRV, Colvin J, Muniyappa V and Seal S. 2005. Diversity and distribution of begomoviruses infecting tomato in India. *Archives of Virology* 150:845-867
- Czosnek H. 2007. Interactions of *Tomato yellow leaf curl virus* with its whitefly vector. Pp:157-170. In: Czosnek H. (ed.). *Tomato yellow leaf curl virus* Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance. Vol. VIII. Springer. Dordrecht, The Netherlands. 448p.
- Dardón D, Calderón F, Salguero V, Lastra R y Brown J. 1994. Identificación de virus en el tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) en cinco departamentos de Guatemala. *Agronomía Mesoamericana* 5:109-117.
- De La Torre AR, Monsalvo RAC, Rivera BRF and Méndez LJ. 2003. First report of a geminivirus inducing yellow mottle in okra (*Abelmoschus esculentus*) in Mexico. *Plant Disease* 87:202-202.
- Deying M, Gorman K, Devine G, Luo W and Denholm I. 2006. The biotype and insecticide-resistance status of whiteflies, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), invading cropping systems in Xinjiang Uygur Autonomous Region, Northwestern China. *Crop Protection* 26:612-617.
- Fauquet CM, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC and 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.
- Gámez JC, Álvarez RP, Ruelas ARD, Leyva LNE and Méndez LJ. 2006. Presence of *Tomato yellow leaf curl virus* infecting tomato in Sinaloa, Mexico. *Phytopathology* 96:38.
- Green MJ and Thompson DA. 1999. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. *Plant Diseases* 83:482-485.
- Hanley BL, Settlege S, Oroaco BM, Nagar S and Robertson D. 2000. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 18:71-106.
- Hou Y, Paplomatas EJ and Gilbertson RL. 1998. Host adaptation and replication properties of two bipartite *Geminiviruses* and their pseudorecombinants. *The American Phytopathological Society* 11:208-217.
- Jones DR. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology* 109:195-219.
- Jovel J, Reski G, Rothenstein D, Ringel M, Frischmuth T and Jeske H. 2004. Sida micrantha mosaic is associated with a complex infection of *begomoviruses* different from *Abutilon mosaic virus*. *Archives of Virology* 149:829-841.
- Khan AA, Khan MS, Raj SK and Naqvi QA. 2007. Molecular identification of a *Begomovirus* causing yellow vein disease on *Calendula officinalis* in India. *EPPO Bulletin* 37:420-426.
- Lazarowitz SG. 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Plant Diseases* 11:327-349.
- Mendez LJ, Torres PI, Fauquet CM and Rivera BRF. 2003. Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper husateco virus* and *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* 93:270-277.
- Morales FJ and Anderson PK. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology* 146:415-441.
- Morilla G, Janssen D, Garcia AS, Moriones E, Cuadrado IM and Bejarano ER. 2005. Pepper (*Capsicum annuum*) is a dead-end host for *Tomato yellow leaf curl virus*. *Phytopathology* 95:1089-97.
- Polson JE and Anderson PK. 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminivirus in tomato in the Western hemisphere. *Plant Diseases* 81:1358-1369.
- Ribeiro SG, Ambrozevicus LP and Avila AC. 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* 148:281-95
- Rojas M. 1994. First report of *Tomato yellow leaf curl virus* associated with beans, *Phaseolus vulgaris*, in Cuba. *Plant Diseases* 77:340
- Rojas MR, Hagen C, Lucas WJ and Gilbertson RL. 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology* 43:361-394.
- Sanchez CS, Navas CJ, Camero R, Soria C, Díaz JA and Moriones E. 1999. Displacement of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. *Phytopathology* 89:1038-1043.
- Schuster D. 2004. Squash as a trap crop to project tomato from whitefly-vectored *Tomato yellow leaf curl virus*. *International Journal of Pest Management* 50:281-284.
- Torres PI, Garzon TJA, Brown JK, Becerra FA and Rivera BR. 1996. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology* 86:1186-1192.
- Xie Y and Zhou XP. 2003. Molecular characterization of *Squash leaf curl Yunnan virus*, a new begomovirus and evidence for recombination. *Archives of Virology* 148:2047-2054.

Yudava P. Suyal G and MukherjeeKS. 2010. *Begomovirus*

DNA replication and pathogenicity. *Current Science*
98:360-368.