

Diagnóstico molecular de geminivirus en plantaciones comerciales de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y malezas asociadas al cultivo, en la provincia Santa Elena.

Ma. Alejandra Ibarra^(1,2), Lisbeth Espinoza^(1,3), Ana Ma. Campuzano.⁽¹⁾ & Esther L. Peralta⁽¹⁾
Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador⁽¹⁾
Facultad Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceanográficas y Recursos Naturales⁽²⁾
Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)
Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral
Apartado 09-01-5863. Guayaquil-Ecuador
maibarra@espol.edu.ec^(1,2), ldespino@espol.edu.ec^(1,3)

Resumen

La familia Geminiviridae está actualmente constituida por cuatro géneros, siendo los Begomovirus los de mayor propagación, en parte debido a las características de su principal vector, la mosca blanca (*Bemisia tabaci*). Esta familia causa daños y pérdidas en cultivos como frijol, tomate, melón, tabaco, calabaza, pimiento, entre otros, donde se estiman pérdidas de entre 40 y 100% de la producción. Para este trabajo se recolectaron 89 muestras de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) y 10 malezas con síntomas de: amarillamiento, clorosis, arrugamiento, deformación y enrollamiento de las hojas. Se realizó la extracción de ADN total y mediante el uso de cebadores degenerados (AVcore y ACcore) y PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) se realizó la amplificación del gen de la cápside proteica (CP). Se obtuvieron amplicones del tamaño esperado (600 pb) en el 34% de las muestras de tomate sintomáticas y de malezas, los cuales fueron clonados y secuenciados, obteniendo una homología del 99% con ToLDeV del Perú. Los resultados expuestos constituyen los primeros en demostrar la presencia de geminivirus en Ecuador, afectando los cultivos de tomate y malezas acompañantes.

Palabras Claves: Geminiviridae, *Solanum lycopersicum*, malezas, *Bemisia tabaci*.

Abstract

The family Geminiviridae is currently classified into four genera, the genus Begomovirus is the most spread due to the transmission mediated by whiteflies (*Bemisia tabaci*). This family causes important damages and yield losses to crops (beans, tomatoes, melons, tobacco, squash, peppers, etc.) in tropical and subtropical regions; those losses are estimated in a range between 40 and 100% of yields. For this investigation, 89 samples of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) and 10 samples of weeds showing geminivirus-related symptoms were collected. The most representative symptoms observed were: yellowing, chlorosis, warping and upward curling of leaflet margins. Total DNA and the most conserved region (AVI gen or CP) were extracted by PCR using degenerate primers. Amplicons of approximately 600bp were obtained in 34% of the evaluated samples, amplicones were cloned and sequenced, obtaining a 99% homology in comparison to ToLDeV from Peru. The present results are the first record of the presence of geminivirus in commercial crops and associated weeds in Ecuador.

Keywords: Geminiviridae, *Solanum lycopersicum*, Weed, *Bemisia tabaci*.

1. Introducción

La familia Geminiviridae está constituida por cuatro géneros: Begomovirus, Curtovirus, Mastrevirus y Topocuvirus [1, 2]. Estos virus presentan un genoma de ADN circular de simple cadena distribuido en uno o dos componentes, los cuales pueden medir entre 2,7kb y 3kb [3, 4]. Esta familia viral ha causado problemas en cultivos de importancia en más de 20 países de América y zonas tropicales y subtropicales del resto del mundo [2].

Los Begomovirus constituyen el género más estudiado debido a los daños que han ocasionado en cultivos comerciales desde el año 1986 [5,6], convirtiéndose en un problema emergente por su gran capacidad de mutación y recombinación genética [1,3]. La presencia de altas poblaciones de mosca blanca (*Bemisia tabaci*), su vector, permite la rápida dispersión y recombinación de estos virus [7], estos cuenta con un amplio rango de hospederos, gran capacidad de proliferación y resistencia a varios tipos de insecticidas [8,9].

Los geminivirus en general pueden llegar a ocasionar pérdidas que varían entre el 40 y el 100% de la producción [8], afectando al menos 17 cultivos de interés comercial, entre los que se encuentran: frijol, tomate, algodón, soya, melón, tabaco, calabaza, pimiento entre otros; además pueden afectar especies de malezas tales como *Amaranthus dubius* (Bledo), *Rhynchosia minima* (Bejuco culebra), *Solanum nigrum* (Hierba mora), varias especies del género *Malachra* (Malva prieta, Malva mulata), por citar algunas [3, 10].

En el Ecuador no existen resultados que demuestren la presencia de esta familia viral. Sin embargo, Valarezo y Arias [11, 12, 13] han reportado la presencia de la mosca blanca (*B. tabaci*) en la zona costera de las provincias de Manabí, Santa Elena, Guayas, Los Ríos y parte de la sierra ecuatoriana.

Valarezo y recientemente Espinoza [12, 14] han planteado la necesidad de continuar las investigaciones sobre la presencia del complejo mosca blanca-Begomovirus, debido al registro de pérdidas agrícolas entre 40 y 60% en Santa Elena y su posible relación con las poblaciones de *B. tabaci* y la ocurrencia de síntomas severos en cucurbitáceas y solanáceas.

Los síntomas en campo asociados con la infección de geminivirus pueden expresarse como: mosaico amarillo brillante, enrollamientos, reducción del área foliar, enanismo, epinastia, maduración prematura de los frutos, moteado clorótico y clorosis foliar interna o de los márgenes [15, 16]; sin embargo, estos síntomas también pueden ser producidos por otras especies virales siendo una limitante para su diagnóstico directo, por lo que lo más recomendable es utilizar procedimientos más específicos y sensibles para un diagnóstico efectivo, tales como PCR, ACR (Amplificación por círculo rodante) o HAN (Hibridación de ácidos nucleicos) [17].

La presencia del vector principal (*B. tabaci*) junto a la de síntomas relacionados con geminivirus, en especial del género *Begomovirus* en los cultivos, hace considerar la posibilidad de la presencia de algunas de sus especies en la provincia de Santa Elena por lo que el objetivo principal de este estudio fue diagnosticar la presencia de geminivirus en los cultivos de tomate de esta provincia.

2. Materiales y Métodos.

2.1. Muestreos.

Se realizaron muestreos dirigidos a plantaciones de tomate (*S. lycopersicum*) y de malezas en la

provincia de Santa Elena, este estudio fue realizado durante la época seca de junio, julio y agosto en las haciendas ubicadas en las localidades Azúcar, y San Rafael, Luz Victoria y Chanduy.

Para los muestreos se consideraron recolectar síntomas como: mosaico amarillo brillante, enrollamiento total de la hoja, encrespamiento de los folíolos, entrenudos cortos, moteado clorótico, clorosis foliar o marginal, enrollamiento de la hoja, deformaciones foliares como abultamientos, ampollas, reducción del área foliar, enanismo, abscisión floral, reducción del tamaño de los frutos, entre otros. Además en todas las plantaciones muestreadas se observó la presencia de mosca blanca, sin embargo este factor no fue parte del estudio.

2.2. Extracción de ADN y PCR

Para la extracción de ácidos nucleicos total se aplicó el protocolo interno del CIBE basado en la metodología de Dellaporta [18] y Aljanaba [19].

La concentración y calidad del ADN obtenido se evaluó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% con una solución tamponada, TAE 1X y por espectrofotometría, empleando el Nanodrop Thermo; se cuantificó la presencia de ADN a una absorbancia entre 220-750 nm.

Se realizó la amplificación mediante PCR, con el empleo de iniciadores degenerados diseñados por Brown (AVcore: GCCHATRTAYAGRA AGCCMAGRAT, ACcore: GGRTTDDGARGCA TGHGTACANGCC) [20]. Las condiciones de amplificación incluyeron 30 ciclos de: un proceso de desnaturalización a 95°C por un minuto, alineación de cebadores a 58°C por un minuto y una elongación, a 72°C por un minuto; seguido de una extensión final 20 minutos a 72°C.

2.3. Análisis de datos

Para el análisis de la relación de dependencia o independencia entre la presencia de los síntomas encontrados en campo y la presencia del virus en los tejidos vegetales, se empleó técnicas estadísticas inferenciales como: tablas de contingencias (Ji-cuadrado, X²) y análisis de correspondencia para los cuales se usó el software estadístico InfoStat [21].

2.4. Clonación, Secuenciación y Alineación

El criterio de selección de las muestras para la clonación se basó en la calidad y concentración del producto de PCR obtenido. Para el desarrollo del protocolo de clonación se empleó el kit pGEM®-T

and pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega), siguiendo la metodología de ligación y transformación recomendada por el fabricante.

Las muestras que presentaron el inserto del tamaño esperado fueron enviadas al Instituto de Genómica de Arizona (AGI) de la Universidad de Arizona para su secuenciación mediante el Applied Biosystem 3730XL DNA Analyzer.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas individualmente en Basic Blast-NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) y fueron alineadas y comparadas con 19 secuencias de diferentes begomovirus que han sido reportadas en América y cuyo principal hospedero es *S. lycopersicum* (Tabla 1), se empleó el programa informático Bioedit [22] usando “Clustal W Multiple alignment” y transformando los ácidos nucleicos a aminoácidos.

Las distancias genéticas fueron determinadas a partir de la secuencia de aminoácidos con el software Mega 5.05, en Construct/test-Neighbor Joining tree (Método del vecino más próximo) [23].

Tabla 1. Geminivirus de América más reconocidos

Accesiones	Virus	Acrónimo	País
FJ538207	Tomato yellow spot virus	ToYSV	Argentina
GQ387369	Tomato yellow vein streak virus	ToYVSV	Argentina
AY090557	Tomato chlorotic mottle virus	ToCMoV	Brasil
AF132852	Tomato golden mottle virus	TGMoV	Brasil
HQ606467	Tomato severe rugose virus	ToRMV	Brasil
EU518935	Tomato yellow mosaic virus	TYMV	Colombia
NC_003867	Tomato mosaic Havana virus	ToMHV	Cuba
AF012300	Tomato mottle Taino virus	ToMoTV	Cuba
FJ174698	Tomato yellow distortion leaf virus	ToYLDV	Cuba
AJ223505	Tomato yellow leaf curl virus	TYLCV	Cuba
L14460	Tomato mottle virus	ToMoV	Florida
HM459852	Tomato chino La Paz virus	ToChLPV	México
HM459851	Tomato yellow leaf curl virus	TYLCV	México
EF501978	Tomato golden mottle virus	TGMoV	México
DQ347946	Tomato severe leaf curl virus	ToSLCV	México
AJ842171	Tomato severe leaf curl virus	ToSLCV	Nicaragua
AF110515	Sinaloa tomato leaf curl virus	STLCV	Panamá
GQ334472	Tomato leaf deformation virus	ToLDeV	Perú
NC_015122	Tomato mottle leaf curl Zulia virus	ToMLCV	Venezuela

3. Resultados

3.1. Muestreo y síntomas

Se logró recolectar un total de 13 muestras de malezas pertenecientes a los géneros *Luffa* sp., e *Ipomoea* sp., de acuerdo a lo descrito en la guía de campo para la identificación de malezas [24], y 76 muestras de tomate (*S. lycopersicum*) de la variedad Dominic.

Los síntomas comunes encontrados en campo fueron: S1=Moteado clorótico, S2=Clorosis foliar, S3=Mosaico amarillo, S4=Deformación, S5=Enrollamiento de la hoja en forma de cuchara S6= Ampollas en el haz de la hoja, tal como se describe en las tablas 2 y 3; además fueron observadas altas

poblaciones de mosca blanca en los cultivos de interés y en malezas (figura 1).

Tabla 1. Descripción de síntomas en tomate

Hacienda	Número de Muestras	Síntomas					
		S1	S2	S3	S4	S5	S6
Azúcar	26	1	0	0	0	0	0
	22	0	1	0	0	0	0
Luz Victoria	16	0	1	0	0	1	0
Chanduy	1	1	0	0	0	0	0
	7	0	0	1	0	0	0
	2	0	1	1	0	0	0
	2	0	0	1	1	0	0
Total	76						

S1=Moteado clorótico, S2=Clorosis foliar, S3=Mosaico amarillo, S4=Deformación, S5= Enrollamiento de la hoja en forma de cuchara S6= Ampollas en el haz de la hoja, 1= Presencia del síntoma, 0= Ausencia del síntoma.

Tabla 2. Descripción de síntomas en malezas

Hacienda	Número de Muestras	Síntomas					
		S1	S2	S3	S4	S5	S6
Azúcar	3	1	0	0	1	0	1
	5	0	1	0	0	0	0
Luz Victoria	3	1	0	0	0	1	0
Chanduy	2	0	0	1	1	0	0
Total	13						

S1=Moteado clorótico, S2=Clorosis foliar, S3=Mosaico amarillo, S4=Deformación, S5= Enrollamiento de la hoja en forma de cuchara S6= Ampollas en el haz de la hoja, 1= Presencia del síntoma, 0= Ausencia del síntoma.



Figura 1. Presencia mosca blanca y síntomas como arrugamiento, deformación en maleza y enrollamiento de la hoja de tomate, en forma de cuchara, encontrados en campo.

3.2. Extracción de ADN y PCR

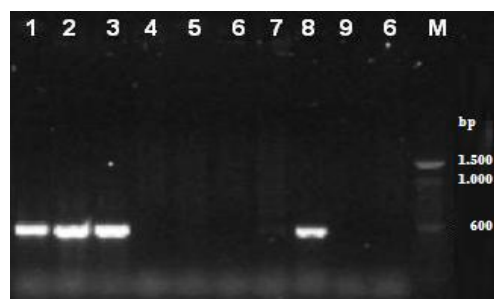


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se observa los fragmentos de 600nt amplificados con los iniciadores AVcore y ACcore. Carriles: M=marcador 100bp, del 1 al 7 muestras de tomate, 8= control positivo y 9= blanco del PCR.

Del total de muestras colectadas en campo 79 presentaron un ADN apto para las pruebas de PCR: 69 de *S. lycopersicum* y 10 de malezas. Se diagnosticó la presencia de geminivirus en 22 de las muestras de tomate y 5 de malezas (figura 2 y tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de muestras infectadas por geminivirus

Localidad	Hacienda	Infectadas		
		Tomate	Maleza	Total
Azúcar	Azúcar	8.86%	2.53%	11.39%
San Rafael	Luz Victoria	13.92%	2.53%	16.45%
San Rafael	Chanduy	5.06%	1.27%	6.33%
Total		27.84%	6.33%	34.17%

3.3. Análisis de datos.

La tabla cruzada (Tabla 4) demuestra que existe cierta dependencia entre los síntomas identificados en las plantaciones de tomate S2-S5 (Clorosis foliar en los márgenes y enrollamiento de la hoja) y S3-S4 (Mosaico amarillo y deformaciones) con la infección por geminivirus, ($\chi^2=23.86$, $p<0.05$); mientras que el análisis realizado para las malezas (Tabla 5), indicó que no existe relación de dependencia entre las dos variables ($\chi^2=2.33$, $p>0.05$).

Tabla 4. Tabla de contingencia entre síntomas e infección en tomate

Infectados	S1	S2	S2-S3	S2-S5	S3	S3-S4	Total
No	19	18	1	3	5	0	46
Si	4	3	0	11	2	2	22
Total	23	21	1	14	7	2	68
Chi 2	23.86						
P	0.0002						

S1=Moteado clorótico, S2=Clorosis foliar, S3=Mosaico amarillo, S4=Deformación, S5= Enrollamiento de la hoja en forma de cuchara S6= Ampollas en el haz de la hoja.

Mediante análisis de correspondencia se determinó que la presencia de síntomas como enrollamiento de la hoja y clorosis es el más fuerte indicio de la posible presencia de geminivirus en tomate. Mientras que en las muestras de maleza, aunque no presentó síntomas de dependientes para la infección de geminivirus, cabe recalcar que el número de muestras evaluadas es muy bajo como para llegar a esta conclusión.

Tabla 5. Tabla de contingencia entre síntomas e infección en malezas

Infectados	S1-S4	S1-S5	S2	S3-S4	Total
No	0	1	3	1	5
Si	1	2	1	1	5
Total	1	3	4	2	10
Chi 2 =	2.33				
P =	0.51				

S1=Moteado clorótico, S2=Clorosis foliar, S3=Mosaico amarillo, S4=Deformación, S5= Enrollamiento de la hoja en forma de cuchara S6= Ampollas en el haz de la hoja.

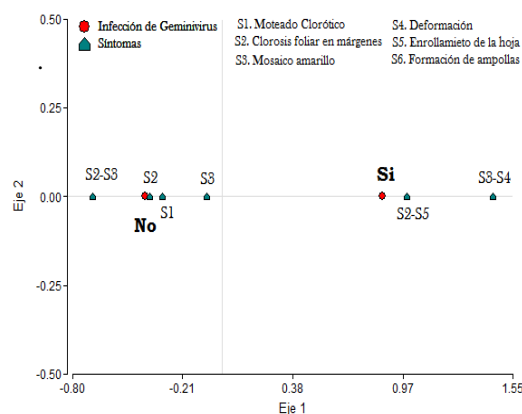


Figura 3. Análisis de correspondencia entre los síntomas y la infección por geminivirus para las muestras de tomate. S1=Moteado clorótico, S2=Clorosis foliar, S3=Mosaico amarillo, S4=Deformación, S5= Enrollamiento de la hoja en forma de cuchara S6= Ampollas en el haz de la hoja.

3.4 Clonación y secuenciación

Un total de tres muestras cumplieron con los criterios de selección y fueron clonadas y secuenciadas satisfactoriamente. Se realizó el alineamiento en NCBI-Basic Blast, y se determinó una homología del 99% con el Virus de la deformación de la hoja del tomate (ToLDeV), una especie perteneciente al género *Begomovirus* recientemente identificada en el Perú [25], almacenada en la base de datos GenBank (No. de accesión GQ334472).

3.5 Análisis y comparación de secuencias.

Se realizaron varios tipos de alineaciones entre los begomovirus más destacados en América que afectan al tomate (Tabla 1). A pesar que en este trabajo solo se secuenció una región de 500 nucleótidos de CP, es importante recalcar que dentro del género *Begomovirus*, el gen AV1, es una de las regiones mejor conservadas [26] y más adecuada para realizar estudios filogenéticos [3].

El análisis de secuencias se obtuvo con la alineación de 168 aminoácidos de la región central de la CP mediante la aplicación de “Construct/test-Neighbor Joining tree” [23].

La figura 4 describe las distancias genéticas y la relación que existe entre la muestra ToLDeV descrita por primera vez en este estudio en el Ecuador con las demás especies, formándose seis ramas entre nodos e internodos de importancia, siendo la especie más cercana filogenéticamente a la secuencia TLDeV de Perú ubicándose en el mismo nodo con 98%, seguido por ToYVSV-Ar con 76% en su internodo.

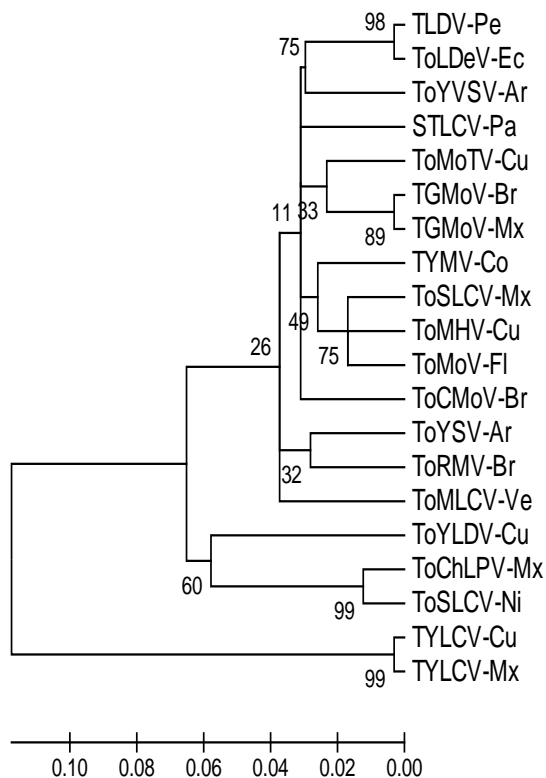


Figura 4. Árbol filogenético, que muestra la relación entre 20 Begomovirus que infectan únicamente a los cultivos de *S. lycopersicum*, empleando el alineamiento de secuencias 186 de aminoácidos de la región central de la cápside proteica.

Los internodos que aun se consideran cercanos estarían conformado por las especies ToCMoV-Br SLCV-Pa, ToMoTV-Cu, TGMoV-Br, TGMoV-Mx, TYMV-Co, ToSLCV-Mx, ToMHV-Cu, ToMoV-Fl. Mientras que los internodo más distante está conformado por ToYSV-Ar, ToRMV-Br, ToMLCV-Ve; seguido del ToYDV-Cu, ToChLPV-Mx, ToSLCV-Ni y finalmente los individuos que se encuentran totalmente separados no solo de ToLDeV-Ec sino de todos los demás es TYLCV, tanto de México como Cuba.

Las distancias observadas entre las diferentes especies de begomovirus, están siendo consideradas en la actualidad por varios investigadores como parte de un complejo proceso de evolución y adaptación, teniendo como motor la capacidad de recombinación de este tipo de virus, lo que les permite acceder a un mayor número de hospederos y a una variedad de síntomas diferentes.

Haciendo un análisis desde el punto de vista de familia, esta es una de las más complejas al momento de realizar o plantear técnicas de control, ya que su diversidad y capacidad de recombinación quiebran rápidamente la resistencia de algunas variedades comerciales de tomate.

4. Conclusión

Con este estudio se demostró por primera vez la presencia de geminivirus en los cultivos de tomate (*S. lycopersicum*) y malezas en Ecuador.

Los síntomas con mayor asociación a la presencia comprobada de geminivirus fueron enrollamiento de las hojas, en la localidad de Luz Victoria, y clorosis foliar en Chanduy. Otros síntomas encontrados en las localidades como moteado clorótico, clorosis foliar y ampollas de el haz de las hojas mostraron ser independientes para la infección de geminivirus.

El begomovirus identificado en los cultivos ecuatorianos correspondió a ToLDeV con una homología del 99% con el ToLDeV determinado recientemente en Perú.

5. Agradecimientos

Agradecimientos especiales al CICYT y sus directivos por apoyar en el financiamiento de este proyecto de investigación, al CIBE (Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador), por haber ofrecido sus instalaciones de laboratorios e invernadero, además por haber provisto los materiales y los equipos necesarios.

6. Referencias

- [1]. Bian, X.Y., Thomas, M. R., Rasheed, M. S., Saeed, M., Hanson, P., DeBarro, P. J. & Rezaian, M. A. 2007. A recessive allele (*tgr-1*) conditioning tomato resistance to geminivirus infection is associated with impaired viral movement. *Phytopathology* 97:930-937.
- [2]. Yang, C., Cui, G., Zhang, J., Weng, X., Xie, L. & Wu, Z. 2008. Molecular characterization of a distinct *Begomovirus* species isolated from *Emilia Sonchifolia*. *Journal of Plant Pathology* 90 (3), 475-478
- [3]. Zúñiga, C. & Ramírez, P. 2002. Los Geminivirus, patógenos de importancia mundial. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecológica* (Costa Rica) No. 64. P 25 – 33.
- [4]. Xiong, Q., Fan, S., Wu, J. & Zhou, X. 2007. Ageratum yellow vein China virus is a distinct *Begomovirus* species associated with a DNA β molecule. *Phytopathology* 97:405-411.
- [5]. Idris, A. & Brown, J. 1998. Sinaloa tomato leaf curl geminivirus: Biological and molecular evidence for a new subgroup III virus. *Phytopathology* 88:648-657.

- [6]. Martínez, Y., Quiñones, M., Fonseca, D. & Miranda, E. 2003. Prospección nacional de *Begomovirus* presentes en el cultivo del tomate en Cuba. *Revista Protección Vegetal*. 18(3). P 168-175
- [7]. Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B., Carvalho, M.G. & Zerbini, F.M. Brasil. 2002. Genetic diversity of *Begomovirus* infecting tomato and associated weeds in southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 27: 372-377
- [8]. Holguín, R., Vázquez, R. & Mejía, H. México. 2004. Geminivirus en tomate (*Lycopersicon esculentum*) y rango de hospedante en Baja California Sur, México. *Resista Mexicana de Fitopatología*. 22 (001)
- [9]. Martínez, Y., Quiñones, M., Palenzuela, I. & Muñoz, Y. Cuba. 2006. Diversidad de *Begomovirus* presentes en Cuba. *Revista Protección Vegetal*. 21(3). P 149-154.
- [10]. Sampedro, J., González, M., Pérez, N. & Pérez E. 2002. Malezas hospedantes de geminivirus en campos de frijol en Cuba. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* (Costa Rica) No. 66 p. 36-38.
- [11]. Valarezo, O. 1994. Diagnóstico preliminar sobre moscas blancas en el Ecuador. *Revista Colegio de Ingenieros Agrónomos de Manabí* (Ecuador): P. 15.
- [12]. Valarezo, O., Cañarte, E., Navarrete, B., Guerrero, J. & Arias, M. 2008. Diagnóstico de la "mosca blanca" en Ecuador. *Revista la Granja*. P 13-15, 18.
- [13]. Arias, M. 1995. Monitoreo de moscas en soya. *Revista INIAP* (Ecuador) 6: 13.
- [14]. Espinoza, L. Campusano, A. M., Ibarra, A., Álvarez, R., Paredes, J. & Peralta, E. L. 2011. Diagnóstico e identificación de nuevas especies virales en cultivos de tomate y melón en Ecuador. *Fitopatología Colombiana*. Vol 35:1 (Suplemento especial) Pg 62-63
- [15]. Faría, A; Nava, A. Venezuela. 2007. Detección por PCR de *Begomovirus* en el cultivo de tomate en las áreas productoras de tomate en los andes venezolanos. *Revista de la Facultad de Agronomía Luz* (Maracaibo-Venezuela). 26: 179-195
- [16]. Cervantes, L., Zavaleta, E. & Rojas, R. México. 2009. Detección de geminivirus asociados a la alstroemeria (*alstroemeria* l.) En villa Guerrero, estado de México I. *Revista Averiencia* 34:12.
- [17]. Czosnek, H. 2002. Characterization and management of tomato and pepper geminiviruses. Submitted to the Office Agriculture & Food Security U.S. Agency for International Development. P 3- 6.
- [18]. Dellaporta, S. Word, J. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reports*. N°1, 1983, pp. 19 – 21.
- [19]. Aljanabi, S., Wood, J., Hicks, J. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-4693.
- [20]. Brown, J.K., Idris, A.M., Torre-Jerez., Banks, G.K. & Wyatt, S.D. 2001 the core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provicional identification and classification of *Begomovirus*s. *Archives of Virology* 146:1581-1598.
- [21]. Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada M., Casanoves, F., Di Rienzo, J.A. & Robledo, C.W. (2008). *Infostat. Manual del Usuario*, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina
- [22]. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- [23]. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- [24]. Muñoz, R. & Pitty A. 1995 Guía fotográfica para la identificación de malezas, Parte I. Zamorano, Honduras: Escuela agrícola Panamericana. 77-80.
- [25]. Márquez B., Aragón, L., Fiallo, E., Navas, & J. Moriones, E. 2011. Tomato leaf deformation virus, a novel *Begomovirus* associated with a severe disease of tomato in Peru. *Eur J Plant Pathol*. 129:1-7
- [26]. Padidam, M., Beachy, R.N. & Fauquet, C. 1995. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology* 76: 249-263