

## Una nueva cepa del *Virus del Chino del Tomate* aislado de plantas de soya (*Glycine max* L.) en México\*

### A new strain of *Chino del Tomate Virus* isolated from soybean plants (*Glycine max* L.) in Mexico

Jorge Armando Mauricio-Castillo<sup>1,2,§</sup>, Gerardo Rafael Argüello-Astorga<sup>1</sup>, Bernardo Bañuelos-Hernández<sup>1</sup>, Salvador Ambríz-Granados<sup>1</sup>, Rodolfo Velásquez-Valle<sup>3</sup> y Jesús Méndez-Lozano<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, S. L. P. 78216, México. (grarguel@ipicyt.edu.mx; berbanher@gmail.com; sambriz@ipicyt.edu.mx). <sup>2</sup>Unidad Académica de Agronomía-Universidad Autónoma de Zacatecas, A. P. 336, 98000. Zacatecas, Zacatecas. México. <sup>3</sup>Campo Experimental Zacatecas-INIFAP, Calera de V. R., Zacatecas, C. P. 98500, México. (fitovalle58@yahoo.com.mx). <sup>4</sup>CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa. P. O. Box 280, Guasave, Sinaloa 81101, México. (jmendezl@ipn.mx). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: jamaca1209@hotmail.com.

#### Resumen

Mediante el uso de técnicas moleculares como la PCR y los RFLPS se logró aislar e identificar a partir de plantas de soya con síntomas de virosis las secuencias completas del componente A de dos begomovirus en el estado de Sinaloa, México. Ambos genomas fueron analizados mediante la comparación de sus secuencias nucleotídicas con las disponibles en la base de datos del NCBI. El primer aislado correspondió a *Rhynchosia golden mosaic virus* (*RhGMV*), mientras que el segundo corresponde a la especie Chino del tomate virus (*CdTV*) el cual mostró 92.3% de identidad global con sus parientes más cercanos, *CdTV*-[8] y *CdTV*-[RK]. Los extractos de plantas de soya sintomáticas fueron analizados mediante PCR utilizando un par de iniciadores universales que permitieron amplificar y confirmar la presencia del componente B de *CdTV*, por lo que se propone al segundo aislado identificado en este trabajo como una nueva cepa de *CdTV* denominada "Chino del tomate virus-Soybean" (Mexico: Sinaloa: 2005). La presencia de esta nueva cepa de *CdTV* aislada de soya es importante ya que hasta la fecha la infección del virus había sido restringida en forma natural a plantas de la familia *Solanaceae*.

**Palabras clave:** geminivirus, infección mixta, soya, RFLP, *CdTV*.

#### Abstract

Molecular techniques such as PCR and RFLP allowed the isolation and identification of complete A component sequences of two begomoviruses from soybean plants with virus symptoms in the state of Sinaloa, Mexico. Both genomes were analyzed by comparison of their nucleotide sequences with those available in the NCBI database. The first isolate corresponded to *Rhynchosia golden mosaic virus* (*RhGMV*), while the second corresponded to the Chino del tomate virus (*CdTV*) which showed a 92.3% overall identity with its closest relatives, *CdTV*-[8] and *CdTV*-[RK]. Plant extracts of symptomatic soybean were analyzed by PCR using a pair of universal primers that allowed to amplify and confirm the presence of the *CdTV* B component, therefore the second isolate identified in this work is proposed as a new *CdTV* strain called "Chino del tomate virus - Soybean" (Mexico: Sinaloa: 2005). The presence of this new *CdTV* strain isolated from soybean is important because to date virus infection was naturally restricted to plants of the *Solanaceae* family.

**Keywords:** geminivirus, mixed infection, soybean, RFLP, *CdTV*.

\* Recibido: marzo de 2014  
Aceptado: abril de 2014

## Introducción

Los geminivirus son un grupo diversificado y ampliamente distribuido de fitopatógenos que producen grandes pérdidas económicas alrededor del mundo. Su genoma esta constituido por una o dos moléculas de ADN circular de cadena sencilla con un tamaño de 2.5 a 3 Kb (Lazarowitz, 1992). Son transmitidos por insectos del orden Homóptera (mosquitas blancas y chicharritas) a una gran variedad de plantas mono y dicotiledóneas, produciendo síntomas como mosaicos, moteados, rayados, deformaciones foliares, enanismo, amarillamientos y clorosis constituyéndose como uno de los grupos de fitopatógenos más importantes desde el punto de vista económico debido a su alta incidencia, distribución y severidad de síntomas.

Actualmente el ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) reconoce cuatro géneros (Mastrevirus, Topocuvirus, Curtovirus y Begomovirus) pertenecientes a la familia *Geminiviridae* (Fauquet *et al.*, 2008) siendo los begomovirus el grupo más diversificado y de más amplia distribución a nivel global, son transmitidos por la mosquita blanca (*Bemisia tabaci* Genn.), su genoma puede ser mono o bipartita e infectan plantas dicotiledóneas. Los componentes A y B de los begomovirus bipartitas comparten una región común cuya longitud va de 160 a 230 pares de bases (pb) que contiene los elementos en Cis necesarios para la replicación viral (Arguello *et al.*, 1994). El componente A produce las proteínas involucradas en la replicación y encapsidación del genoma viral (Gutiérrez *et al.*, 2004) mientras que el componente B codifica dos proteínas encargadas del movimiento del virus a través de la planta (Gafni y Epel, 2002).

A inicio de los años 70 se publicó el primer reporte sobre la presencia de una nueva enfermedad que producía enchinamientos en las plantas de jitomate cultivadas en el estado de Sinaloa, México (González y Cervantes, 1973). La enfermedad se asoció con la presencia de elevadas poblaciones de mosquita blanca y fue hasta 1984 que se logró aislar y caracterizar al virus del chino del tomate (Brown y Hine, 1984), un begomovirus considerado como agente causal de dicha enfermedad. Actualmente se cree que el *CdTV* está restringido a los miembros de la familia *Solanaceae* entre los que destacan los cultivos de jitomate y chile presentes en los estados de Chiapas, Morelos, Sinaloa y Tamaulipas mostrando una tendencia a dispersarse debido a su amplio rango de hospederos (Brown y Nelson, 1988; Torres-Pacheco *et al.*, 1996).

## Introduction

Geminiviruses are a diverse and widely distributed group of plant pathogens that cause great economic losses worldwide. Their genome consists of one or two molecules of single-stranded circular DNA with a size of 2.5 to 3 Kb (Lazarowitz, 1992). They are transmitted by insects of the Homoptera order (whiteflies and leafhoppers) to a variety of mono and dicotyledonous plants, producing symptoms such as mosaics, speckled, striped, leaf deformation, dwarfing, yellowing and chlorosis becoming one of the most important groups of plant pathogens from an economic point of view because of its high incidence, distribution and severity of symptoms.

Currently the ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) recognizes four genera (Mastrevirus, Topocuvirus, Curtovirus and Begomovirus) belonging to the *Geminiviridae* family (Fauquet *et al.*, 2008), begomoviruses are the most diversified group with highest worldwide distribution, transmitted by the whitefly (*Bemisia tabaci* Genn.), their genome can be mono or bipartite and infect dicotyledonous plants. The A and B components of the bipartite begomoviruses share a common region ranging from 160 to 230 base pairs (bp), containing the *cis* elements required for viral replication (Arguello *et al.*, 1994). The A component produces the proteins involved in replication and encapsidation of the viral genome (Gutiérrez *et al.*, 2004) while the B component encodes two proteins promoting virus movement through the plant (Gafni and Epel, 2002).

At the beginning of the 70s the first report was published on the presence of a new disease causing crinkle in tomato plants grown in the state of Sinaloa, Mexico (González and Cervantes, 1973). The disease was associated with the presence of large whiteflies populations and it was not until 1984 that it was possible to isolate and characterize the Chino del tomate virus (Brown and Hine, 1984), a begomovirus considered as the causative agent of the disease. Currently *CdTV* is believed to be restricted to members of the *Solanaceae* family mainly in tomato and chili crops present in the states of Chiapas, Morelos, Sinaloa and Tamaulipas showing a tendency to spread due to its wide host range (Brown and Nelson, 1988; Torres-Pacheco *et al.*, 1996).

En el presente escrito se reporta una nueva cepa de *CdTV* aislada en plantas de soya (*Glycine max* L.) en el estado de Sinaloa, México y cuyas diferencias a nivel de genoma con respecto a las demás cepas de *CdTV* reportadas en solanáceas podría favorecer su presencia en cultivos de soya.

**Recolecta de muestras.** Se recolectaron 12 muestras de plantas de soya en parcelas comerciales ubicadas en el municipio de Guasave, Sinaloa, México que mostraban síntomas probablemente causados por virus (enanismo, hojas enrolladas y amarillas).

**Extracción de ADN.** Se adoptó un protocolo de extracción de ADN genómico para todas las muestras de tejido vegetal analizadas. Este se basó en una modificación del método de Della Porta (1983) que utiliza nitrógeno líquido y el buffer de extracción "A" compuesto por Tris 100 mM - pH 8, NaCl 50 mM - pH 8, EDTA 50 mM - pH 8 y agua destilada.

**Amplificación de ADN begomoviral presente en los extractos de soya.** En algunas ocasiones la carga viral contenida en los extractos de ADN procedentes de plantas con posibles síntomas de virosis es reducida por lo que se implementó el uso del kit Templi phi (GE Healthcare) para incrementar la concentración de ADN viral mediante una reacción isotérmica catalizada por la ADN polimerasa del bacteriófago  $\phi 29$  la cual es capaz de producir microgramos de ADN circular de cadena sencilla a partir de picogramos.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Las amplificaciones de ADN viral se realizaron utilizando los iniciadores universales para begomovirus: pRep-DGR (Méndez *et al.*, 2006), prCP70-Mot, prRepQGR-rev (De la Torre *et al.*, 2006) y prC889 (Brown *et al.*, 2001). Los productos de PCR comprenden la totalidad del componente A. La reacción de PCR se realizó utilizando como control positivo los genomas A del *Pepper huastec yellow vein virus* (*PHYVV*) y del *Pepper golden mosaic virus* (*PepGMV*) clonados en el vector pGEM-T easy (Promega, Madison, WI).

Posteriormente se confirmó la presencia del componente B de *CdTV-soybean* utilizando los iniciadores universales: BC1-80rev (AGAYGARTATCARYTDTTCNCATGA) y BV1-310for (AGGDACNGTNAAGRTYGARCGTGT) diseñados durante este trabajo y que son complementarios a secuencias del componente B de begomovirus tanto del nuevo como del viejo mundo. Para todos los juegos de oligonucleótidos, la composición de la mezcla de reacción para PCR (50  $\mu$ L volumen total) fue la misma y consistió en

In this paper a new *CdTV* strain isolated from soybean plants (*Glycine max* L.) is reported in the state of Sinaloa, Mexico and whose genome differences with respect to other strains reported in *Solanaceae* could favor its presence in soybean crops.

**Collection of samples.** 12 samples of soybean plants were harvested in commercial plots located in the Guasave municipality, Sinaloa, Mexico showing virus-like symptoms (dwarfism, rolled and yellow leaves).

**DNA extraction.** A genomic DNA extraction protocol was adopted for all plant tissue samples analyzed. This was based on a modification of the Della Porta's method (1983) using liquid nitrogen and extraction buffer "A" consisting of 100 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8 and distilled water.

**Amplification of begomovirus DNA present in soybean extracts.** In some instances the viral load contained in DNA extracts from plants with possible virus symptoms is reduced thus the Templi phi kit (GE Healthcare) was used to increase the viral DNA concentration by an isothermal reaction catalyzed by the  $\phi 29$  bacteriophage DNA polymerase capable of producing micrograms of single stranded circular DNA from picograms.

**Polymerase chain reaction (PCR).** Viral DNA amplifications were carried out using the universal primers for begomoviruses: pRep-DGR (Méndez *et al.*, 2006), PrCP70-Mot, prRepQGR-rev (De la Torre *et al.*, 2006) and prC889 (Brown *et al.*, 2001). The PCR products comprise the complete A component. The PCR reaction was performed using as positive control the A genomes of *Pepper huastec yellow vein virus* (*PHYVV*) and *Pepper golden mosaic virus* (*PepGMV*) cloned into the pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI).

Subsequently the presence of the *CdTV-soybean* B component was confirmed using the universal primers: BC1-80rev (AGAYGARTATCARYTDTTCNCATGA) and BV1-310for (AGGDACNGTN AAGRTYGARCGTGT) designed in this work, which are complementary to sequences of the begomovirus B component from both the new and the old World. For all oligonucleotides sets, the composition of the PCR reaction mixture (50  $\mu$ L total volume) was the same and consisted of the following: 1X Taq DNA polymerase buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 1  $\mu$ M oligonucleotides, 2.5 U Taq DNA polymerase,

lo siguiente: Buffer Taq DNA polimerasa 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 0.2 mM de cada dNTPs, oligonucleótidos 1 µM, Taq DNA polimerasa 2.5 U, DNA 1 µg. Las condiciones para la amplificación del ADN viral fueron: desnaturalización inicial a 94 °C/2min, y 35 ciclos conformados por 94 °C/1min, 55 °C/1min, 72 °C/1min, con una extensión final de 72 °C/5 min. Los productos amplificados fueron analizados por movilidad electroforética en geles de agarosa al 1%.

**Caracterización de los fragmentos amplificados y clonas obtenidas por patrón de restricción (RFLP).** Se seleccionaron clonas positivas para cada combinación de oligonucleótidos utilizada y fueron analizadas mediante la técnica de RFLP con el objetivo de identificar bandas polimórficas que indicarían si se trata de una infección sencilla o mixta. Se utilizaron las enzimas de restricción *MspI* y *HhaI* en combinación con *EcoRI* (New England BioLabs<sup>TM</sup>). Los productos digeridos se analizaron por movilidad electroforética en geles de agarosa al 2%.

### Clonación y secuenciación

Los productos de PCR obtenidos de las muestras de campo se clonaron directamente en el plásmido pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI), según las indicaciones del proveedor. La transformación de célula calcio competente de *Escherichia coli* Top-10 se realizó por el método de choque térmico. Las clonas virales obtenidas fueron secuenciadas en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) en San Luis Potosí, México. El análisis *in silico* de las secuencias nucleotídicas obtenidas fue realizado mediante comparaciones con las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI, utilizando el programa BLASTN y el análisis de filogenia fue realizado mediante el método Clustal V de MegAlign (DNASTAR software, Lasergene, London).

### Identificación de begomovirus por PCR

Los extractos de ADN total obtenidos a partir de plantas de soya analizados por PCR utilizando los iniciadores universales para begomovirus, prRepDGR, prCP70, prRepDGR-rev y prC889 permitieron amplificar a partir de cinco de los doce extractos de soya dos fragmentos de ADN viral traslapados de 1.8 y 1.4 Kb que representan la totalidad del componente A de los begomovirus como se ha reportado con anterioridad (Méndez *et al.*, 2006).

1 µg DNA. The conditions for viral DNA amplification were: initial denaturation at 94 °C/2min, and 35 cycles of 94 °C/1min, 55 °C/1min, 72 °C/1min, with a final extension of 72 °C/5 min. The amplified products were analyzed by electrophoretic mobility in 1% agarose gels.

**Characterization of amplified fragments and clones by restriction pattern (RFLP).** Positive clones were selected for each oligonucleotide combination used and were analyzed by RFLP to identify polymorphic bands that indicate whether it is a single or mixed infection. The *MspI* and *HhaI* restriction enzymes were used in combination with *EcoRI* (New England BioLabs<sup>TM</sup>). The digested products were analyzed by electrophoretic mobility in 2% agarose gels.

### Cloning and sequencing

PCR products obtained from field samples were directly cloned into the pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI) plasmid, as indicated by the supplier. Transformation of *Escherichia coli* Top-10 calcium competent cells was performed by the heat shock method. Viral clones obtained were sequenced at the National Laboratory of Agricultural, Medical and Environmental Biotechnology (LANBAMA) in San Luis Potosí, Mexico. The *in silico* analysis of the nucleotide sequences obtained was performed by comparison with available sequences in the NCBI database, using the BLASTN software and phylogeny analysis was performed using the Clustal V method of MegAlign (DNASTAR software, Lasergene, London).

### Begomovirus identification by PCR

Total DNA extracts obtained from soybean plants analyzed by PCR using universal primers for begomovirus, prRepDGR, prCP70, prRepDGR-rev and prC889 allowed the amplification from five of the twelve soybean extracts of two overlapping fragments of viral DNA of 1.8 and 1.4 Kb representing the complete begomovirus A component as has been reported previously (Méndez *et al.*, 2006).

### PCR amplification of the begomovirus B component

PCR confirmation of the B component corresponding to each A component identified, was obtained in an efficient manner by using the combination of universal primers

### Amplificación por PCR del componente B de begomovirus

La confirmación por PCR del componente B correspondiente a cada uno de los componentes A identificados, se obtuvo de una forma eficiente empleando la combinación de iniciadores universales BC1-80rev and BV1-310for. Ésta combinación de oligonucleótidos universales son complementarios a secuencias conservadas localizadas en los componentes B de begomovirus presentes en el viejo y nuevo mundo. La longitud de los fragmentos de ADN B viral amplificados fue de 1 300 pb.

### Análisis por RFLP

Las clonas obtenidas pertenecientes al componente A y B de begomovirus fueron digeridas con la enzima de restricción *EcoRI* para confirmar que contenían los fragmentos de ADN viral. Para el componente A el primer grupo de clonas positivas liberaron un fragmento de 1.8 Kb amplificado con la combinación de iniciadores prCP70 y prRepDGRrev mientras que el segundo grupo de clonas libero un fragmento de 1.4 Kb correspondiente al ADN viral que incluye la región intergénica de los begomovirus el cual fue amplificado con la combinación de iniciadores universales prRepDGR y prC889, mientras que para las clonas obtenidas a partir de los oligonucleótidos BC1-80rev y BV1-310for se confirmó la presencia de un fragmento de 1 300 pb.

Se seleccionaron ocho clonas positivas para cada combinación de oligonucleótidos utilizada y fueron analizadas mediante la técnica de RFLP. La presencia de dos patrones de restricción diferentes en las clonas obtenidas a partir de los componentes A y B sometidas al análisis por RFLP indicaron que se trataba de una infección mixta en la que participaban dos begomovirus diferentes (Figura 1). El resultado obtenido de la selección de clonas concuerda con el aumento en el reporte de infecciones mixtas causadas por begomovirus en México, cuyo ejemplo más claro es el de las infecciones mixtas causadas por *PHYVV* y *PepGMV*, los cuales producen serios daños a los cultivos de chile cuando se encuentran infectando juntos una misma planta (Rentería *et al.*, 2011).

La alta incidencia de infecciones mixtas causadas por begomovirus en malezas y cultivos de interés económico puede influir en la aparición de nuevas cepas y variantes con cambios a nivel de nucleótidos en genes clave que pudieran producir la aparición de nuevos síntomas, cada vez más severos e inclusive ampliar su rango de huéspedes naturales (Brown *et al.*, 2000). La importancia del análisis de secuencias mediante la técnica de RFLP radica en que nos informa sobre

BC1-80rev and BV1-310for. This combination of universal primers is complementary to conserved sequences located at begomovirus B components present in the old and new World. The length of the amplified viral B DNA fragments was 1 300 bp.

### RFLP analysis

The clones obtained belonging to the begomovirus A and B components were digested with the *EcoRI* restriction enzyme to confirm that they contained the viral DNA fragments. For the A component the first set of positive clones released a 1.8 Kb fragment amplified with the primer combination prCP70 and prRepDGRrev while the second group of clones released a 1.4 kb fragment corresponding to the viral DNA including the begomovirus intergenic region which was amplified with the universal primer combination prRepDGR and prC889 while for clones obtained from the BC1-80rev and BV1-310for oligonucleotides the presence of a 1 300 bp fragment was confirmed.

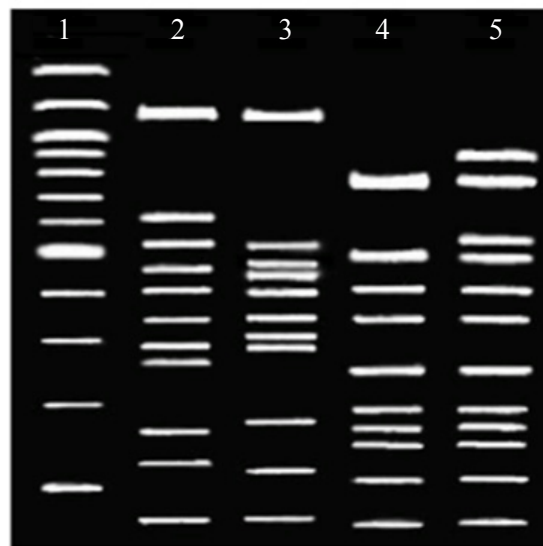
Eight positive clones were selected for each oligonucleotide combination used and were analyzed by RFLP. The presence of two different restriction patterns in the clones obtained from the A and B components subjected to RFLP analysis indicated that it was a mixed infection involving two different begomoviruses (Figure 1). Results from clones selection is consistent with the increase in reports of mixed infections by begomoviruses in Mexico, the clearest example is the mixed infections caused by *PHYVV* and *PepGMV*, which produce serious damage to chili crops when they co-infect the same plant (Rentería *et al.*, 2011).

The high incidence of mixed infections caused by begomoviruses in weeds and crops of economic interest may influence the emergence of new strains and variants with changes at the nucleotide level in key genes that could produce the appearance of new symptoms, more severe and even extend their natural host range (Brown *et al.*, 2000). Sequence analysis by RFLP is important since it reports the presence of two or more begomovirus genomes infecting the same plant showing that mixed infections are very common in nature (Bañuelos *et al.*, 2012) and allows the identification of small nucleotide differences even among viruses of the same species by the presence of one or more polymorphic bands provided that digestions are performed with enzymes allowing

la presencia de dos o más genomas begomovirales infectando la misma planta con lo cual se observa que las infecciones mixtas son muy comunes en la naturaleza (Bañuelos *et al.*, 2012) y además nos permite identificar pequeñas diferencias a nivel de nucleótidos aun entre virus pertenecientes a la misma especie mediante la presencia de una o más bandas polimórficas siempre y cuando las digestiones se realicen con enzimas que nos permitan liberar el fragmento de ADN clonado en combinación con otra enzima de restricción que reconozca sitios de corte constituidos por un máximo de cinco nucleótidos y así favorecer la aparición de más polimorfismos.

cloned DNA fragment release in combination with another restriction enzyme recognizing cleavage sites of a maximum of five nucleotides, thus revealing more polymorphisms.

The digestion products were subjected to electrophoresis in 2% agarose gel. Lane 1 shows the molecular weight marker (100 bp DNA ladder). The plasmid containing the *CdTV-soybean* amplicon corresponds to lines 2 and 4 and that corresponding to *RhGMV* is represented in lines 3 and 5.



**Figura 1. Patrones de restricción obtenidos por RFLP a partir de dos clones distintos cuyos insertos tienen una longitud de 1.4 Kb del componente A de los dos begomovirus obtenidos a partir de extractos de plantas de soja utilizando la combinación de oligonucleótidos prRepDGR/prC889. Los plásmidos recombinantes fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoRI* en combinación con las enzimas *HinfI* (líneas 2 y 3) o *MspI* (líneas 4 y 5). Los productos de la digestión se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%. Línea 1 muestra marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder). El plásmido que contiene el amplicón del *CdTV-soybean* corresponde a las líneas 2 and 4 y el correspondiente al *RhGMV* esta representado en las líneas 3 y 5.**

**Figure 1. Restriction patterns obtained by RFLP from two different clones carrying 1.4 Kb inserts of the A component of the two begomoviruses obtained from soybean plant extracts using the prRepDGR/prC889 oligonucleotide combination. The recombinant plasmids were digested with the *EcoRI* restriction enzyme in combination with the *HinfI* enzyme (lines 2 and 3) or *MspI* (lanes 4 and 5).**

### Análisis de secuencia y organización genómica

Las secuencias obtenidas fueron editadas mediante el programa edit seq (DNASTar MegAlign software) y se armó el genoma completo de un primer begomovirus cuyo componente A (número de acceso NC010294) tiene una longitud de 2 604 pb mientras que la longitud de su componente B (número de acceso NC010293) es de 2 551 pb. El componente A del primer aislado de plantas de soja fue comparado con las secuencias presentes en la base de datos del NCBI y las que mostraron una mayor similitud a nivel

### Sequence analysis and genomic organization

The sequences obtained were edited using the program edit seq (DNASTar MegAlign software) and the complete genome of a first begomovirus was assembled whose A component (accession number NC010294) is 2604 bp long while the length of the B component (Accession number NC010293) is 2551 bp. The A component of the first isolate from soybean plants was compared to the sequences in the NCBI database and those showing greater similarity at the nucleotide level were analyzed using the Clustal V

de nucleótidos se analizaron con el algoritmo Clustal V de MegAlign y se obtuvo una alta identidad a nivel de secuencia nucleotídica (99%) con el componente A de *Rhynchosia golden mosaic virus*, su pariente más cercano. Para el segundo begomovirus se logró obtener un componente A (número de acceso DQ347945) completo cuya secuencia de 2 609 pb resultó ser 92.3% similar al componente A del *CdTV-[8]* y *CdTV[RK]*, sus parientes más cercanos (Cuadro 1). Además, se logró la caracterización parcial (1 300 pb) del componente B (número de acceso EU339940) del segundo begomovirus aislado durante este trabajo.

algorithm of MegAlign and high identity was obtained at nucleotide sequence level (99%) with the A component of the *Rhynchosia golden mosaic virus*, its close relative. For the second begomovirus a complete A component was obtained (accession number DQ347945) whose 2609 bp sequence was found to be 92.3 % similar to the *CdTV-[8]* and *CdTV [RK]* A component, its closest relatives (Table 1). Furthermore, the partial characterization (1300 bp) of the B component (access number EU339940) of the second begomovirus isolated during this work was achieved.

**Cuadro 1. Comparación global (%) entre los componentes A completos de los begomovirus pertenecientes a la especie *CdTV* y su similitud a nivel de secuencia con el componente A de *CdTV-soybean*.**

**Table 1. Overall comparison (%) between the complete A components of begomoviruses of the *CdTV* species and their sequence similarity with the *CdTV-soybean* A component.**

Virus	Aislados de Solanaceas				Aislado de leguminosa
	<i>CdTV-[H6]</i>	<i>CdTV-[H8]</i>	<i>CdTV-[RK]</i>	<i>CdTV[IC]</i>	<i>CdTV-Soybean</i>
<i>CdTV-[IC]</i>	97.1	97.2	97.2	-----	92.2
<i>CdTV-Soybean</i>	92.2	92.3	92.3	92.2	-----

Cuadro 1. Se observa que la similitud a nivel de secuencia entre *CdTV-[IC]* y las variantes de *CdTV* aisladas de jitomate es menos 97% de similitud a nivel de secuencia nucleotídica; mientras que *CdTV-soybean* además de encontrarse en soya tiene una similitud de 92.3% con sus parientes más cercanos. *CdTV-[H6]* (número de acceso AF226665), es una variante que no es mencionada en éste reporte.

Los criterios taxonómicos establecidos por el ICTV señalan que si al comparar el componente A completo de un begomovirus con el respectivo componente A de su pariente más cercano se observa una diferencia entre 89 y 93%, el aislado analizado se considera una nueva cepa viral separada (Fauquet *et al.*, 2008) por lo que, con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se reporta el aislamiento una nueva cepa correspondiente a la especie *CdTV* aislada de plantas de soya y cuyo nombre aceptado por el ICTV es Chino del tomate virus- *Soybean* (Mexico: Sinaloa: 2005), Fauquet *et al.*, 2008.

Los dos virus aislados durante este estudio pertenecen a especies diferentes y como tales presentan iterones muy diferentes entre sí (Arguello *et al.*, 1994) de tal forma que no se esperaría una interacción entre ellos; sin embargo, se ha observado la formación de pseudorecombinantes entre begomovirus que no comparten las mismas secuencias de iterones generando infecciones muy agresivas (Chakraborty

Table 1. The sequence similarity between *CdTV-[IC]* and *CdTV* variants isolated from tomato is at least 97%, while *CdTV-soybean* appears in soybeans and shows a 92.3% similarity with its closest relatives. *CdTV-[H6]* (access number AF226665), is a variant not mentioned in this report.

Taxonomic criteria established by the ICTV state that comparisons of a begomovirus complete A component with the A component of its closest relative showing differences between 89 and 93%, indicate that the analyzed isolate can be considered a new separate viral strain (Fauquet *et al.*, 2008) therefore, based on the results obtained in the present work the isolation of a new strain of the *CdTV* species in soybean plants is reported, whose name accepted by the ICTV is Chino del tomate virus- *Soybean* (Mexico: Sinaloa: 2005), Fauquet *et al.*, 2008.

The two viruses isolated during this study belong to different species and as such have very different iterons (Arguello *et al.*, 1994) thus an interaction between them would not be expected, however, pseudorecombinant formation has been observed between begomoviruses not sharing the same iterons sequences, generating very aggressive infections (Chakraborty *et al.*, 2008) together with the above there is always the possibility that different viruses produce a synergy increasing damages on crops.

*et al.*, 2008) aunado a lo anterior siempre existe la posibilidad de que virus diferentes produzcan un sinergismo que potencie las afectaciones a los cultivos. Lo anterior establece la importancia de analizar más a fondo las posibles implicaciones fitosanitarias sobre la presencia de *RhGMV* y *CdTV* en cultivos de soya así como los riesgos de que estos se propaguen en nuevos hospederos.

Hasta la fecha *CdTV* había sido identificado previamente infectando únicamente plantas de la familia *Solanaceae* en forma natural. En el presente trabajo se reporta el primer aislamiento de *CdTV-Soybean* a partir de una leguminosa por lo que se enfatiza la necesidad de monitorear la incidencia de *CdTV* en cultivos de soya que permitan evitar una epidemia causada por este begomovirus.

## Conclusiones

Se caracterizaron a nivel de secuencia dos begomovirus presentes en plantas de soya colectadas en el estado de Sinaloa, México. El primer aislado resultó ser una variante genéticamente muy cercana a *RhGMV*, reportado con anterioridad en la misma zona geográfica. Sin embargo, un segundo begomovirus aislado resultó ser una nueva cepa de la especie *CdTV* aislada por primera vez de una leguminosa ya que hasta la fecha su presencia estaba restringida a *Solanaceae*. Esto abre nuevas perspectivas con respecto a estos begomovirus las cuales nos permitirán conocer sobre su capacidad para infectar plantas de la familia *Solanaceae*.

## Literatura citada

- Arguello-Astorga, G. R.; Guevara-González, R. G.; Herrera-Estrella, L. R. and Rivera-Bustamante R. F. 1994. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology* 203:90-100.
- Bañuelos-Hernández, B.; Mauricio-Castillo, J. A.; Cárdenas-Conejo, Y.; Guevara-González, R. G. and Arguello-Astorga, G. R. 2012. A new strain of tomato severe leaf curl virus and a unique variant of tomato yellow leaf curl virus from Mexico. *Arch. Virol.* 157:1835-1841.
- Brown, J. K. and Hine R. B. 1984. Geminat particles associated with the leaf curl of "chino" disease of tomatoes in coastal areas of western Mexico. *Phytopathology* 74:844.

This indicates the importance of further analysis on the potential phytosanitary implications of the *RhGMV* and *CdTV* presence in soybean crops and the risks that they may propagate into new hosts.

Until now, *CdTV* had been previously identified naturally infecting only plants of the *Solanaceae* family. In this paper the first isolation of *CdTV-Soybean* is reported from a legume therefore emphasizing the need to monitor the incidence of *CdTV* in soybean crops in order to avoid an outbreak caused by this begomovirus.

## Conclusions

Two begomoviruses present in soybean plants collected in the state of Sinaloa, Mexico were characterized at the sequence level. The first isolate was a variant, genetically very close to *RhGMV*, previously reported in the same geographical area. However, a second isolated begomovirus proved to be a new strain of the *CdTV* species first isolated from a legume since to date its presence was restricted to *Solanaceae*. This opens new perspectives regarding these begomoviruses which will provide insights about their ability to infect plants of the *Solanaceae* family.

*End of the English version*



- Brown, J. K. and Nelson, M. R. 1988. Transmission, host range and virus-vector relationships in chino del tomate virus, a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. *Plant Dis.* 72:866-869.
- Brown, J. K.; Ostrow, K. M.; Idris, A. M. and Stenger, D. C. 2000. Relationships to other begomoviruses and identification of A-component variants that affect symptom expression. *Phytopathology* 90:546-552.
- Brown, J. K.; Idris, A. M.; Torres, J. I.; Banks, G. K. and Wyatt, S. D. 2001. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Arch. Virol.* 146:1581-1598.
- Chakraborty, S.; Vanitharani, R.; Chattopadhyay, B. and Fauquet, B. M. 2008. Supervirulent pseudorecombination and asymmetric synergism between genomic components of two distinct species of begomovirus associated with severe tomato leaf curl disease in India. *J. Gen. Virol.* 89:818-828.
- De la Torre-Almaraz, R.; Monsalvo-Reyes, A.; Romero-Rodríguez, A.; Argüello-Astorga, G. R. and Ambríz-Granados, S. 2006. A new begomovirus inducing yellow mottle in okra crops in Mexico is related to Sida yellow vein virus. *Plant Dis.* 90:378.



- Dellaporta, S. L.; Wood, J. and Hicks, J. B. 1983. A rapid method for DNA extraction from plant tissue. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.
- Fauquet, C. M.; Briddon, R. W.; Brown, J. K.; Moriones, E.; Stanley, J.; Zerbini, M. and Zhou, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch. Virol.* 153:783- 821.
- Gafni, Y. and Epel, B. L. 2002. The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 60:231-241.
- González, G. R. y Cervantes, R. J. 1973. Enchinamiento de las plantas de tomate, enfermedad en observación y estudio en el Valle de Culiacán. *In: Memorias de la Primera reunión sobre plagas y enfermedades en hortalizas en Sinaloa. Secretaría de Agricultura y Ganadería. Culiacán, Sinaloa, México.* 51-56.
- Gutierrez, C.; Ramirez-Parra, E.; Mar, C. M.; Sanz-Burgos, A. P.; Luque, A. and Missich, R. 2004. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Veterinary Microbiol.* 98:111-119.
- Lazarowitz, S. G. 1992. Geminiviruses: genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11:327-349.
- Méndez-Lozano, J.; Perea-Araujo, L. L.; Ruelas-Ayala, R. D.; Leyva-López, N. E.; Mauricio-Castillo, J. A. and Argüello-Astorga, G. R. 2006. A begomovirus isolated from chlorotic and stunted soybean plants in Mexico, is a new strain of *Rhynchosia golden mosaic virus*. *Plant Dis.* 90:972.
- Ndunguru, J.; Legg, J.; Aveling, T.; Thompson, G. and Fauquet, C. 2005. Molecular biodiversity of cassava begomoviruses in Tanzania: evolution of cassava geminiviruses in Africa and evidence for East Africa being a center of diversity of cassava geminiviruses. *Virol. J.* 2:21.
- Rentería-Canett, I.; Xoconostle-Cázares, B.; Ruiz-Medrano, R. and Rivera-Bustamante, R. F. 2011. Geminivirus mixed infection on pepper plants: Synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virol. J.* 8:104.
- Torres-Pacheco, I.; Garzón-Tiznado, J. A.; Brown, J. K.; Becerra-Flora, A. and Rivera-Bustamante, R. F. 1996. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the southern United States. *Phytopathology* 86:1186-1192.