

V. Pérez-Padilla¹,
I. M. Fortes²,
B. Romero-Rodríguez³,
M. Arroyo-Mateos³,
A. G. Castillo³,
C. Moyano¹, L. De León¹
y E. Moriones²

¹Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid.

²Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Estación Experimental "La Mayora", Algarrobo-Costa, Málaga.

³Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Área de Genética, Facultad de Ciencias, Málaga.

Figura 1. A y B) Plantas de tomate infectadas con TYLCV y con los síntomas característicos de la enfermedad. C y D) Detalle de la mosca blanca *Bemisia tabaci* en plantas de tomate.

Evaluación de la transmisión por semilla del virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV)

El virus del rizado amarillo del tomate, TYLCV de las siglas en inglés *Tomato yellow leaf curl virus* (género *Begomovirus*, familia Geminiviridae), infecta los cultivos de tomate en todo el mundo, causando graves daños económicos. Hasta ahora se consideraba que la transmisión de este virus solo la podía realizar la mosca blanca *Bemisia tabaci*. Sin embargo, en un estudio realizado por un grupo de investigación coreano publicado en 2016, se sugirió la transmisión de aislados de la cepa tipo de TYLCV (cepa Israel, TYLCV-IL) a través de semillas de tomate. A raíz de esta información, y dado que TYLCV-IL es el más extendido a nivel mundial, en este trabajo se ha revisado su transmisión por semilla. Para ello, se han empleado plantas de tomate y *Nicotiana benthamiana* infectadas de forma natural o experimental con aislados españoles de TYLCV-IL que mostraban síntomas de la enfermedad y en las que se detectó el ADN del virus. Este trabajo demuestra la presencia de TYLCV-IL en los órganos reproductores de tomate y *N. benthamiana* y una estrecha asociación de este virus con las semillas recogidas de frutos infectados. Sin embargo, la reducción significativa de la carga viral después de la desinfección superficial de las semillas de tomate sugiere que la mayor parte del virus se localiza externamente en la cubierta de la semilla. En los ensayos de transmisión a partir de semillas recogidas de frutos infectados, realizados con más de tres mil plantas de tomate de siete variedades diferentes, no se encontró evidencia alguna de transmisión de TYLCV-IL desde las semillas a la progenie. Se obtuvieron resultados similares para las semillas recolectadas de frutos de plantas de *N. benthamiana* infectadas con TYLCV-IL. Estos resultados indican que TYLCV-IL puede estar presente en las semillas recogidas de plantas de tomate y *N. benthamiana* infectadas por este virus, pero que en estas especies, el virus no es capaz de transmitirse a la descendencia en las condiciones ensayadas.

Tomato yellow leaf curl virus - TYLCV

La enfermedad del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl disease*, TYLCD) es una de las enfermedades más devastadoras que sufre el cultivo del tomate a nivel mundial. Está producida por aislados de diferentes virus del género *Begomovirus* (familia Geminiviridae), entre ellos TYLCV, que produce notables pérdidas económicas en cultivos de tomate en las regiones cálidas y templadas (Moriones y Navas-Castillo, 2000; Rybicki, 2015). La cepa tipo del virus (cepa Israel de TYLCV, TYLCV-IL) es el begomovirus más extendido a nivel mundial asociado con TYLCD (Lefeuvre y col., 2010). Entre los síntomas de la enfermedad observados en tomate destacan la curvatura hacia arriba de los márgenes del foliolo, la coloración amarillenta, la reducción del área foliar y del tamaño de las plantas y el aborto floral (Figura 1A y 1B). Como resultado, las plantas de tomate pierden vigor y producen menor número de frutos y con escaso valor comercial (Hanssen y col., 2010; Moriones y col., 2011; Navas-Castillo y col., 2011; Perefarreres y col., 2012; Rojas y col., 2018). La mosca blanca (*Bemisia tabaci*, Figura 1C y 1D) es el vector natural de los begomovirus y se considera un factor clave en la aparición y dispersión de TYLCV (Cohen y Antignus, 1994; De Barro y col., 2011; Rosen y col., 2015; Gilbertson y col., 2015).

De forma general se acepta que TYLCV no se transmite verticalmente a través de las semillas a las plantas progenie. Sin embargo, un grupo de investigación coreano sugirió en 2016 la posibilidad de que TYLCV-IL se transmitiera a la descendencia a través de semillas recogidas de plantas de tomate infectadas por este virus (Kil y col., 2016). Los estudios realizados por estos autores mostraban unas tasas de transmisión de virus a través de semillas superiores al 80%. Investigaciones posteriores confirmaron la presencia de TYLCV-IL en los tejidos embrionarios de la semilla de tomate (Just y col., 2017), lo que podría apoyar estos resultados.

Las semillas son la principal vía de dispersión, especialmente a larga distancia, de numerosos patógenos

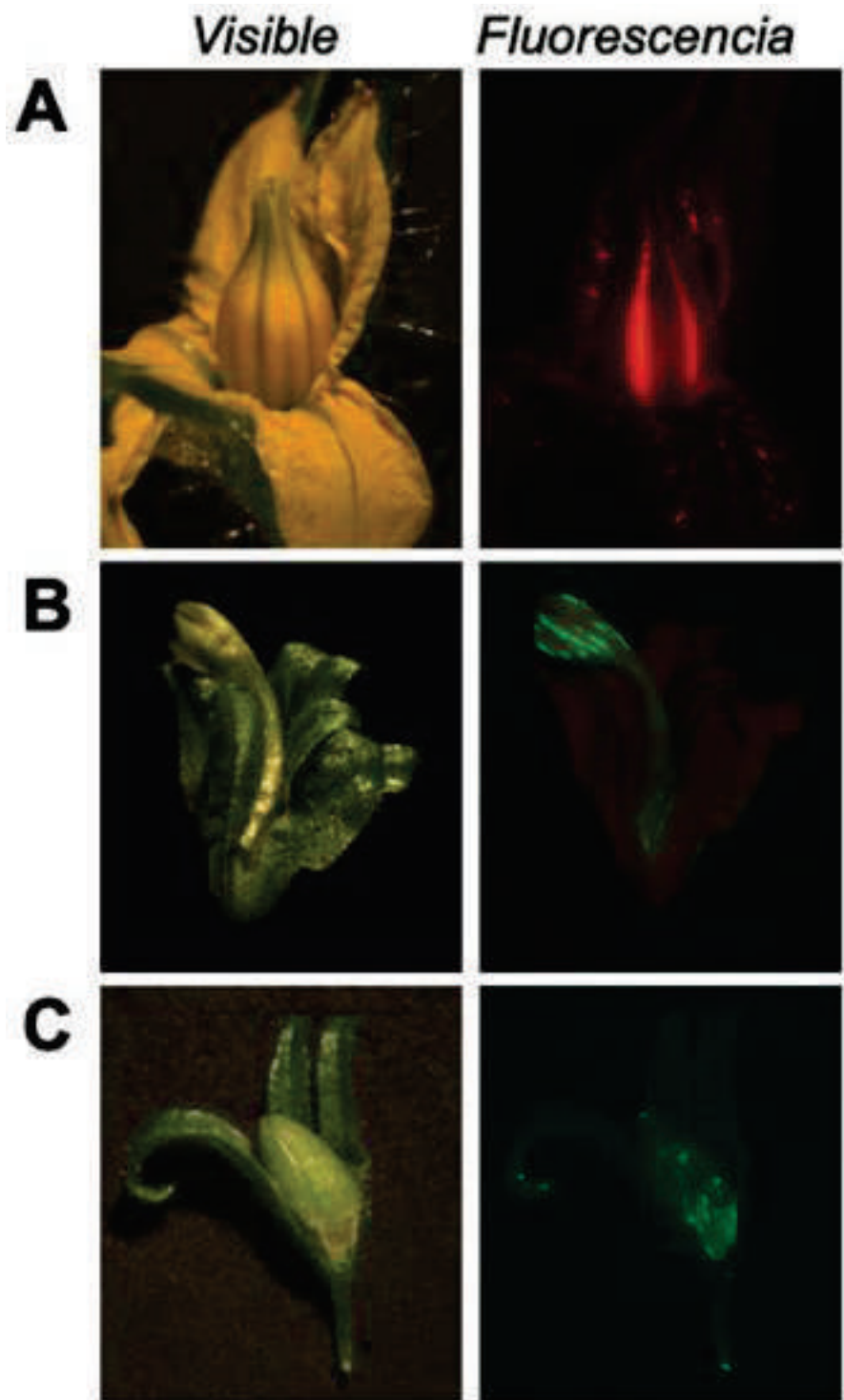


Figura 2. Flores de tomate y *Nicotiana benthamiana* bajo luz visible (panel "visible") y bajo luz ultravioleta (panel "fluorescencia") que permite detectar TYLCV en rojo (tomate, A) o en verde (*N. benthamiana*, B y C). (A) Flor de tomate en la que se han separado los sépalos y pétalos y se visualizan los estambres. (B) Flor de *N. benthamiana* en la que se visualizan los sépalos y pétalos. (C) Silicua que contiene las semillas de *N. benthamiana*.

de plantas y pueden producir brotes severos de enfermedades con efectos devastadores en los cultivos. Por ello, los datos publicados de transmisión de TYLCV por semilla de tomate han supuesto un gran impacto en la comunidad científica y una especial preocupación en las empresas del sector dedicadas a la producción y

comercialización de semillas de tomate. Hasta ahora, las medidas para controlar la enfermedad producida por TYLCV se han basado en limitar la presencia del insecto vector en las parcelas de cultivo además del uso de variedades con resistencia al virus. La presencia de otras vías de transmisión diferentes a las conocidas has-

ta el momento establece un nuevo escenario que obligaría a adoptar nuevos sistemas de control, incluyendo los análisis de semillas y la modificación de las medidas regulatorias existentes.

Debido al impacto que pueden tener los resultados mencionados, se estimó oportuno revisar la transmisión de TYLCV por semilla de tomate. Este trabajo ha sido llevado a cabo conjuntamente por los laboratorios del Departamento de Sanidad Vegetal de la Dirección Técnica de Evaluación de Variedades y Laboratorios del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Madrid) y el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", centro mixto entre la Universidad de Málaga y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC, Málaga).

Presencia de TYLCV en tejidos florales

Se estudió si TYLCV-IL estaba presente en los órganos reproductores de las plantas de tomate y también en *N. benthamiana*, especie experimental habitualmente utilizada en los laboratorios de virología vegetal. Para ello, se utilizaron las líneas transgénicas de tomate (Var. MoneyMaker) y *N. benthamiana* portadoras del transgen 2IRDsRed y 2IRGFP, respectivamente. Estas líneas transgénicas permiten localizar de forma visual los lugares donde el virus se está multiplicando, ya que si esto ocurre se produce emisión de fluorescencia roja (2IRDsRed) o verde (2IRGFP, Morrill y col., 2006) detectable con la ayuda de una lupa de epifluorescencia. Esto permitió comprobar la colonización de los tejidos florales por parte del virus (Figura 2A y 2B). La visualización de cortes transversales y longitudinales de flores de tomate y *N. benthamiana* reveló la presencia de TYLCV-IL en los estambres, el estilo y el ovario en el caso del tomate, y en el septum del ovario y la cápsula de las semillas en *N. benthamiana* (Figura 2C). Estos resultados demuestran que TYLCV se encuentra y se multiplica en los tejidos florales y órganos reproductores de ambas especies y, por lo tanto, podría acceder a las semillas durante su maduración.

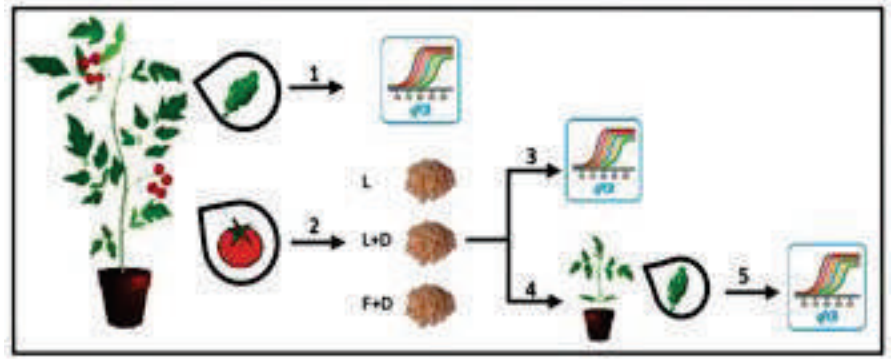


Figura 3. Representación esquemática de los pasos llevados a cabo para determinar la transmisibilidad del virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) por semilla: 1. Detección del virus por PCR cuantitativa (qPCR) en plantas madre de tomate susceptibles a TYLCV; 2. Recolección de frutos de plantas infectadas por TYLCV y extracción de las semillas mediante: i) lavado (L), ii) lavado y desinfección superficial (L+D), y iii) fermentación y desinfección superficial (F+D); 3. Detección de TYLCV en semillas por qPCR; 4. Estudio de transmisión vertical de TYLCV a planta progenie germinando más de 3.000 semillas obtenidas de plantas infectadas con el virus; 5. Análisis por qPCR de los tejidos foliares jóvenes de las plantas de la descendencia (60 días después de la siembra) para evaluar la transmisión de TYLCV de la semilla a la progenie.

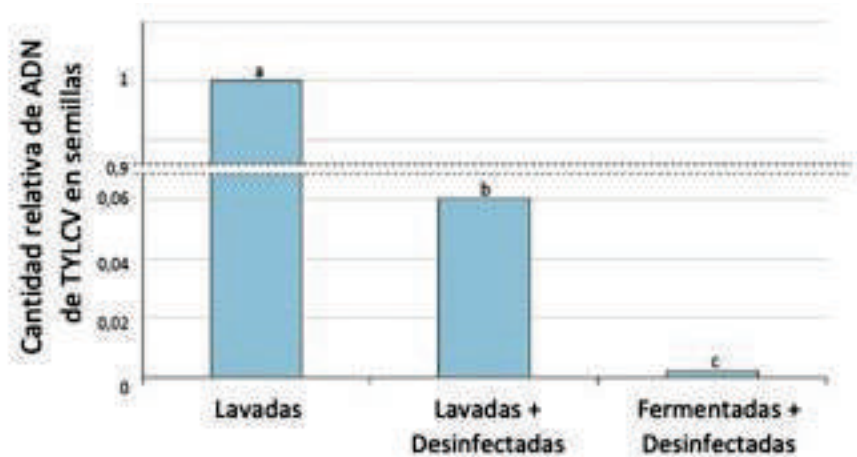


Figura 4. Cantidades relativas de ADN del virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) detectadas por PCR cuantitativa (qPCR) en semillas de tomate obtenidas de frutos de plantas infectadas por TYLCV y extraídas por lavado, lavado más desinfección superficial y fermentación más desinfección. El análisis se realizó en $n = 15$ muestras (10 semillas por muestra) por tratamiento y para cinco variedades de tomate. Se realizaron tres réplicas técnicas por muestra. El umbral de ciclo (Ct) del control endógeno del tomate (gen COX) se usó para normalizar los valores de detección de TYLCV (ΔCt) y corregir la variación experimental. Los niveles relativos de ADN viral se determinaron por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando como referencia el valor medio de las muestras de semillas del tratamiento de lavado (que recibió el valor "1"). Letras diferentes sobre las barras de cada tratamiento indican diferencias significativas; ANOVA unifactorial junto con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

TYLCV se detecta en las semillas

Para el estudio de la presencia de TYLCV en semilla, se recogieron frutos de plantas de tomate con síntomas evidentes de TYLCD de cinco variedades (Melillero, Rondeño, La Carlota, Zahara de la Sierra y Cherry Canadá) infectadas naturalmente en un invernadero comercial de la provincia de Málaga. Las plantas se analizaron por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) e hibridación molecular (Monci y col., 2002), confirmando la presencia de TYLCV-IL,

una de las cepas más ampliamente distribuida en el sur de España y a nivel mundial. El análisis genómico del aislado de TYLCV-IL obtenido de estas plantas mostró una secuencia nucleótida muy similar al aislado de TYLCV-IL previamente descrito en nuestro país y empleado en las infecciones experimentales comentadas a continuación. Con el fin de obtener semillas de plantas infectadas con TYLCV-IL en condiciones controladas, se empleó un clon infectivo de un aislado de este virus (número de acceso del GenBank AJ489258) para inocular experimentalmente plantas

transferencia tecnológica

| hortícolas |

de tomate de las variedades Marmande, Rondeño y Moneymaker y plantas de *N. benthamiana*.

A partir de los frutos recogidos de las plantas infectadas por TYLCV-IL, de forma natural en el invernadero de las cinco variedades de tomate (Melillero, Rondeño, La Carlota, Zahara de la Sierra y Cherry Canadá), se extrajeron semillas mediante tres procedimientos diferentes: i) lavado con agua destilada (L); ii) lavado con agua destilada seguido de desinfección superficial (inmersión en etanol al 75% durante 10 min y lejía al 50% durante 20 min) (L+D); y iii) fermentación durante 48h, lavado con agua destilada y desinfección superficial (F+D) (Figura 3).

Las semillas de las plantas de las tres variedades de tomate (Marmande, Rondeño y Moneymaker) y de *N. benthamiana* infectadas en condiciones controladas, se extrajeron por simple lavado y sin aplicar tratamiento desinfectante (tomate) o colectadas directamente de fructificaciones maduras (*N. benthamiana*). Mediante ensayos de germinación se observó que ninguno de los tratamientos efectuados afectó a la capacidad de germinación de las semillas. Se analizó la presencia de TYLCV en semilla por PCR cuantitativa (qPCR) a partir de muestras trituradas. Los resultados de estos análisis indicaron que el virus estaba presente en grandes cantidades en las semillas obtenidas de frutos de plantas de tomate infectadas, tanto en el campo como en condiciones controladas. El virus también se detectó a partir de muestras de semillas colectadas de fructificaciones de *N. benthamiana*. El análisis genómico de las secuencias de ADN vírico obtenidas a partir del extracto de las semillas de tomate desinfectadas y no desinfectadas superficialmente coincide con la secuencia nucleotídica de la cepa TYLCV-IL detectada en las plantas madre de donde se colectaron las semillas. Es importante destacar que se observó una drástica reducción en la carga de ADN vírico en aquellas semillas sometidas a procesos de desinfección superficial en comparación con las semillas extraídas por lavado y no tratadas (Figura 4), lo que sugiere que TYLCV-IL se encuentra mayoritariamente en el exterior de la semilla como contaminante de la cubierta.

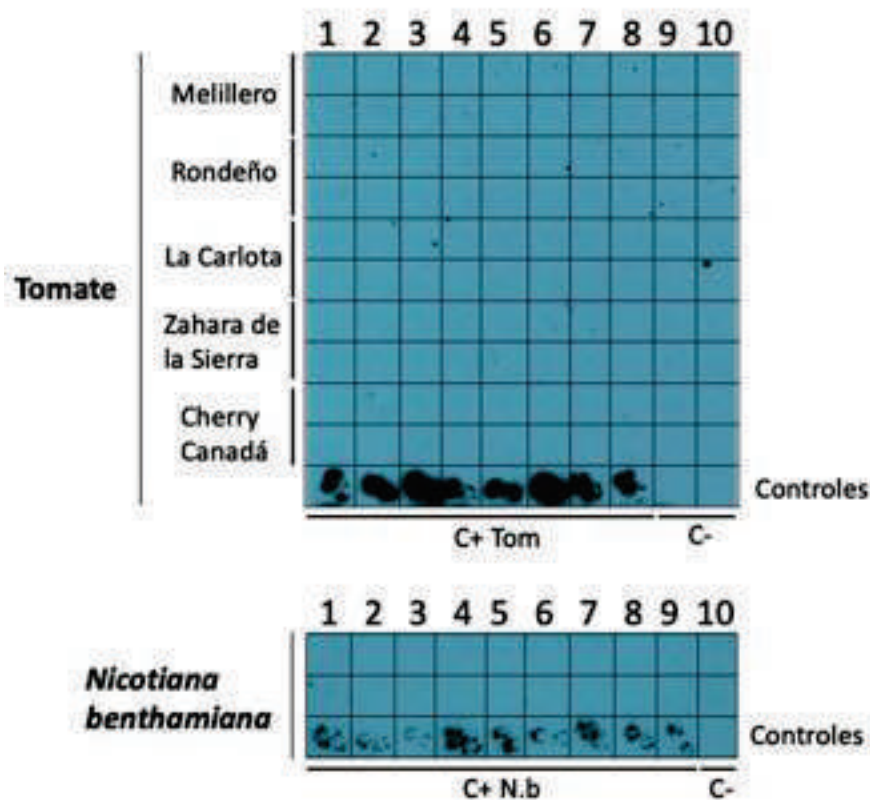


Figura 5. Detección de la presencia de virus en improntas de secciones transversales de peciolo de hoja joven de plantas de cinco variedades de tomate o de *Nicotiana benthamiana* derivadas de semillas recogidas de frutos de plantas infectadas con el virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV). Se muestra el resultado para 20 plantas en cada caso. Como control positivo se incluyen improntas de tejidos equivalente de plantas de tomate cultivar Moneymaker (C+ Tom) o de *N. benthamiana* (C+ Nb) infectadas por TYLCV-IL así como un control negativo de plantas sanas de ambos huéspedes (C-).

No hay evidencias de la transmisión de TYLCV por semilla de tomate

La detección de TYLCV-IL en las semillas de tomate y *N. benthamiana* podría sugerir su posible transmisión a la progenie a través de este material vegetal, como ya se ha observado en otros virus de plantas (Johansen y col., 1994). En este trabajo se analizaron más de 3.000 plantas de tomate y 150 plantas de *N. benthamiana* germinadas a partir de semillas infectadas con TYLCV-IL. En la evaluación se incluyeron semillas de siete variedades distintas de tomate y tres métodos diferentes de extracción de esas semillas. Los estudios se realizaron en dos localizaciones diferentes: el INIA (Madrid) y el IHSM-UMA-CSIC (Málaga). Sesenta días después de la siembra, las plantas obtenidas de las semillas fueron inspeccionadas visualmente para determinar la presencia de síntomas y se recogieron

muestras para su análisis por hibridación y qPCR (en extracciones de agrupamientos o *bulks* de tejido de hoja joven de diez plantas por muestra). En ninguna de las plantas evaluadas se observó síntoma alguno, a diferencia de las plantas inoculadas experimentalmente con TYLCV-IL utilizadas como control, que mostraron los síntomas característicos de TYLCD.

No se detectó infección por TYLCV en los análisis individuales por hibridación molecular realizados a cada una de las plantas de la progenie, a diferencia de lo observado en las plantas control, que mostraron señales intensas de infección por este virus (Figura 5). Los mismos resultados se obtuvieron para los análisis por qPCR de todos los grupos evaluados (Tabla 1).

Conclusiones

Durante el presente estudio no se ha observado evidencias de la transmi-

Tabla 1. Resultados del análisis de PCR cuantitativa (qPCR) para evaluar la transmisión por semillas del virus del rizado amarillo de tomate (TYLCV) en plantas de tomate y *N. benthamiana*. Los ensayos se realizaron en dos laboratorios independientes localizados en el INIA (Madrid) y el IJSM-UMA-CSIC (Málaga). Las semillas se colectaron de frutos de plantas infectadas de forma natural con TYLCV-IL (cinco variedades de tomate) o infectadas artificialmente con el virus (tres variedades de tomate y *N. benthamiana*). Se incluyen semillas recogidas de frutos de plantas sanas de tomate (cv. Moneymaker) o *N. benthamiana* (controles negativos).

	Especie	Nº total de plantas analizadas	Madrid			Málaga	
			Lavado (L) ^a	Lavado + Desinfección (L+D) ^a	Fermentación + Desinfección (F+D) ^a	Lavado (L) ^a	
			Nº bulks positivos /Nº total bulks analizados ^b	Nº bulks positivos /Nº total bulks analizados ^b	Nº bulks positivos /Nº total bulks analizados ^b	Nº total de plantas analizadas	Nº bulks positivos /Nº total bulks analizados ^b
Infección natural	Tomate ^c	2450	0/125	0/60	0/60	750	0/75
Infección experimental ^f	Tomate ^d	150	0/15	-	-	-	-
	<i>N. benthamiana</i>	-	-	-	-	150	0/15
Control negativo	Tomate ^e	40	0/4	-	-	30	0/3
	<i>N. benthamiana</i>	-	-	-	-	100	0/10

^a Las semillas se obtuvieron de frutos de tomate mediante lavado con agua destilada (L), lavado y desinfección superficial con etanol al 75% durante 10 min y lejía al 50% durante 20 min (L+D) o fermentación y desinfección superficial (F+D). En *N. benthamiana* las semillas se colectaron de fructificaciones maduras sin seguir ningún tratamiento de desinfección.

^b El número total de agrupamientos (bulks) analizados corresponde a la suma del número de bulks analizados para cada variedad de tomate. Cada bulk comprende una agrupación de muestras de hojas jóvenes de 10 plantas.

^c Incluye las variedades de tomate Melillero, Rondeño, La Carlota, Zahara de la Sierra y Cherry Canadá.

^d Incluye las variedades de tomate Marmande, Rondeño y Moneymaker.

^e Incluye las variedades de tomate Marmande (empleada como control negativo en los laboratorios de Madrid) y Moneymaker (empleada como control negativo en los laboratorios de Málaga).

^f Plantas infectadas con TYLCV-IL mediante inoculación en condiciones controladas con un clon infectivo del virus.

sión de TYLCV-IL a través de semillas después de analizar más de tres mil plantas de tomate germinadas a partir de semillas recogidas de frutos de plantas infectadas. Esto contrasta con la alta tasa de transmisión del virus de la semilla a la descendencia reportada por Kil y sus colaboradores (Kil y col., 2016). Sin embargo, el ADN de TYLCV-IL se detectó en las semillas procedentes de plantas infectadas, por lo que es posible que el virus no sea transmitido a la progenie aunque se encuentre en la cubierta de la semilla y/o en sus tejidos internos. Las condiciones presentes durante la maduración del embrión pueden interferir en la estabilidad del virus, conduciendo así a una reducción de la transmisión del patógeno a través de la semilla (Bowers y Goodman, 1979; Maule y Wang, 1996). No se puede descartar que existan diferentes aislados de TYLCV-IL con diferentes características biológicas en distintas variedades de tomate, lo cual podría afectar a la capacidad de transmisión del virus a través de las semillas, como se ha visto en otros casos (Hanada y Harrison, 1977; Hampton y Francki 1992; Johansen y col., 1994; Maule y Wang,

1996; Morra y Petty, 2000; Cañizares y col., 2015). Sin embargo, como se ha demostrado en este estudio, la transmisión por semilla no parece ser una estrategia general en la dispersión de TYLCV y la presencia del virus asociado a la semilla no necesariamente implica su transmisión a través de este material vegetal. Por tanto, se hacen necesarias comprobaciones estrictas del papel de la semilla en la transmisión de TYLCV en diferentes condiciones y lugares geográficos a fin de evitar barreras fitosanitarias injustificadas y poder adoptar medidas razonables para el control efectivo de este virus.

Summary

Tomato yellow leaf curl virus – TYLCV (genus Begomovirus, family Geminiviridae) infects tomato crops worldwide causing severe economic damage. Until now it was considered that the transmission of this virus could only be performed by the whitefly *Bemisia tabaci*. However, a study published in 2016 carried out in Korea suggested seed transmission of isolates of the type strain of TYLCV (strain Israel, TYLCV-IL). As TYLCV-IL is the most widespread worldwide, here

we revisited the seed transmission of TYLCV-IL. Symptomatic tomato and *Nicotiana benthamiana* plants infected naturally or experimentally with Spanish isolates of TYLCV-IL were used. This work showed the presence of TYLCV-IL in tomato and *N. benthamiana* reproductive organs and a close association of the virus with seeds collected from infected fruits. However, the significant reduction of the viral load after disinfection of the tomato seed surface suggested that most of the virus is located externally to the seed coat. Transmission tests, conducted with more than 3.000 tomato plants of seven different varieties germinated from seeds collected from infected fruits, revealed no evidence of transmission of TYLCV-IL to the progeny. Similar results were also obtained for seeds collected from *N. benthamiana* plants infected with TYLCV-IL. These results indicated that, under the conditions tested, TYLCV-IL might be present in seeds collected from infected tomato and *N. benthamiana* plants, but the virus is not seed transmitted to the progeny in these species.

Bibliografía



- Bowers, G. R., Goodman, R. M. 1979. *Soybean mosaic virus* infection of soybean seed parts and seed transmission. *Phytopathology*, 69: 569-572.
- Cañizares, M. C., Rosas-Díaz, T., Rodríguez-Negrete, E., Hogenhout, S. A., Bedford, I. D., Bejarano, E. R., Navas-Castillo, J., Moriones, E. 2015. *Arabidopsis thaliana*, an experimental host for tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses by agroinoculation and whitefly transmission. *Plant Pathol.*, 64: 265-271.
- Cohen, S., Antignus, Y. 1994. *Tomato yellow leaf curl virus*, a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. *Adv. Dis. Vector Res.*, 10: 259-288.
- De Barro, P. J., Liu, S. S., Boykin, L. M., Dinsdale, A. B. 2011. *Bemisia tabaci*: A statement of species status. *Annu. Rev. Entomol.*, 56: 1-19.
- Gilbertson, R. L., Batuman, O., Webster, C. G., Adkins, S. 2015. Role of the insect supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses. *Ann. Rev. Virol.*, 2: 67-93.
- Hampton, R. O., Francki, R. I. B. 1992. RNA-1 dependent seed transmissibility of *Cucumber mosaic virus* in *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology*, 82: 127-130.
- Hanada, K., Harrison, B. D. 1977. Effects of virus genotype and temperature on seed transmission of nepo-viruses. *Ann. Appl. Biol.*, 85: 79-92.
- Hanssen, I. M., Lapidot, M., Thomma, B. P. H. J. 2010. Emerging viral diseases of tomato crops. *Mol. Plant Microbe In.*, 23: 539-548.
- Johansen, E., Edwards, M. C., Hampton, R. O. 1994. Seed transmission of viruses: Current perspectives. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 32: 363-386.
- Just, K., Arif, U., Luik, A., Kvarnheden, A. 2017. Monitoring infection of tomato fruit by *Tomato yellow leaf curl virus*. *Plant Pathol.*, 66: 522-528.
- Kil, E.-J., Kim, S., Lee, Y. J., Byun, H. S., Park, J., Seo, H., Kim, C. S., Shim, J. K., Lee, J. H., Kim, J. K., Lee, K. Y., Choi, H. S., Lee, S. 2016. *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. *Sci. Rep.*, 6: 19013.
- Lefevre, P., Martin, D. P., Harkins, G., Lemey, P., Gray, A. J. A., Meredith, S., Lakay, F., Monjane, A., Lett, J. M., Varsani, A., Heydarnejad, J. 2010. The spread of *Tomato yellow leaf curl virus* from the Middle East to the world. *PLoS Pathog.*, 6: e1001164.
- Maule, A. J., Wang, D. 1996. Seed transmission of plant viruses: a lesson in biological complexity. *Trends Microbiol.*, 4: 153-158.
- Monci, F., Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J., Moriones, E. 2002. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology*, 303: 317-326.
- Morilla, G., Castillo, A.G., Preiss, W., Jeske, H. Bejarano, E.R. 2006. A Versatile Transreplication-Based System To Identify Cellular Proteins Involved in Geminivirus Replication. *Journal of Virology*, Vol. 80, pp. 3524-3633.
- Moriones, E., Navas-Castillo, J. 2000. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Res.*, 71: 123-134.
- Moriones, E., Navas-Castillo, J., Díaz-Pendon, J. A. 2011. Emergence of begomovirus diseases. Pgs. 301-320 en: Caranta, C., Aranda, M. A., Tepfer, M., Lopez-Moya, J. J., eds. *Recent Advances in Plant Virology*. Caister Academic Press.
- Morra, M. R., Petty, I. T. D. 2000. Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *Plant Cell*, 12: 2259-2270.
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., Sánchez-Campos, S. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 49: 219-248.
- Perefarres, F., Thierry, M., Becker, N., Lefevre, P., Reynaud, B., Delatte, H., Lett, J. M. 2012. Biological invasions of geminiviruses: case study of TYLCV and *Bemisia tabaci* in Reunion Island. *Viruses*, 4: 3665-3688.
- Rojas, M. R., Macedo, M. A., Maliano, M. R., Soto-Aguilar, M., Souza, J. O., Briddon, R. W., Kenyon, L., Bustamante, R. F. R., Zerbini, F. M., Adkins, S., Legg, J. P., Kvarnheden, A., Wintermantel, W. M., Sudarshana, M. R., Peterschmitt, M., Lapidot, M., Martin, D. P., Moriones, E., Inoue-Nagata, A. K., Gilbertson, R. L. 2018. World management of geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 56: 637-677.
- Rosen, R., Kanakala, S., Kliot, A., Cathrin Pakkianathan, B., Farich, B.A., Santana-Magal, N., Elimelech, M., Kontsedalov, S., Lebedev, G., Cilia, M., Ghanim, M. 2015. Persistent, circulative transmission of begomoviruses by whitefly vectors. *Curr. Opin. Virol.*, 15: 1-8.
- Rybicki, E. 2015. A top ten list for economically important plant viruses. *Arch. Virol.*, 160: 17-20.