

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA
MOLECULAR**

**“Análisis funcional de los promotores *Rep* y *CP* de un
mutante natural del *Virus del rizado foliar amarillo del
tomate (TYLCV)* y un begomovirus co-infectante”.**

Tesis que presenta

Jesús Aarón Avalos Calleros

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga

San Luis Potosí, S.L.P., Diciembre de 2015



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “*Análisis funcional de los promotores Rep y CP de un mutante natural del Virus del rizado foliar amarillo del tomate (TYLCV) y un begomovirus co-infectante*” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Jesús Aarón Avalos Calleros** y aprobada el diecisiete de diciembre del dos mil quince por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Director de la tesis

Dr. Samuel Lara González
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Guillermo Pastor Palacios
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de (Nombre del Laboratorio) de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No.299534) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

El proyecto de investigación descrito en esta Tesis fue financiado con recursos otorgados por el CONACYT (Proyecto interinstitucional FORDECYT/193512/2012 "Sistema Regional de Investigación, Innovación y Desarrollo en Biotecnología, Farmacología y Salud")



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 139 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 17 días del mes de diciembre del año 2015, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Samuel Lara González	Presidente	IPICYT
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Secretario	IPICYT
Dr. Guillermo Pastor Palacios	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Jesús Aarón Avalos Calleros

sobre la Tesis intitulada:

Análisis funcional de los promotores Rep y CP de un mutante natural del Virus del rizado foliar amarillo del tomate (TYLCV) y un begomovirus co-infectante

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 12:05 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 17 días del mes de diciembre de 2015.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A todas aquellas personas que ha enriquecido mi vida con su existencia.

Agradecimientos

Al instituto potosino de investigación científica y tecnológica.

Al consejo nacional de ciencia y tecnología por la beca otorgada.

Al Dr. Gerardo Rafael Arguello Astorga, por su dedicación, apoyo, dirección y su amistad brindada durante mi estancia en el instituto.

Al Dr. Sergio Casas Flores y al Dr. Samuel Lara Gonzales, por su apoyo y consejos.

Al Dr. Guillermo Pastor Palacios, su ayuda en muchos momentos fue crucial en el desarrollo de este proyecto.

Al Biólogo Salvador Ambriz, por su ayuda, paciencia y amistad brindada.

A Rosy Castillo por su apoyo y disposición, siempre con amabilidad.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Angelica, Benita, Tere, Mayra, Norma, Emanuel y Karen.

A mis padres, Jesús José Avalos Escárzaga y Esperanza Yasmin Avalos Calleros por ser los que siempre me han apoyado en las malas y en las peores.

A mi hermana Yasmin Avalos Calleros, por su envidiable –pero bien recibido- optimismo.

A Valeria Ortiz Escobedo, por su compañía, paciencia y cariño.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Abreviaturas	xi
Resumen	xiii
Abstract	xiv
I.-Introducción	1
I.1.-Clasificación de la familia Geminiviridae	1
Tabla 1. Características generales de los Geminivirus	3
Figura 1. Organización de los genomas geminivirales.	5
I.2.-Proteínas codificadas en el genoma de un begomovirus monopartita	6
I.3.Proceso de infección y replicación begomoviral.	9
I.3.1.-Generalidades del Ciclo infectivo	9
I.3.2.- Mecanismos de replicación	10
1.3.2.1.-Mecanismo de RCR.	11
1.3.2.2.-Mecanismo de RDR.	11
Figura 2. Mecanismos en la replicación de geminivirus.	12
I.4.-Elementos de la región intergenica geminiviral.	13
I.5.-Transactivación del promotor de los genes tardíos en begomovirus.	14
I.6.-Estudios de la actividad funcional de los promotores geminivirales	15

I.7.-TYLCV y variante TYLCV-IL[SLP]	16
Figura 3. Organización de la IR de TYLCV-IL[SLP].	18
II.-Hipótesis	19
III.-Objetivos	19
IV.-RESULTADOS	20
IV.1.-Generación de clonas monoméricas de TYLCV-IL[SLP], ToSLCV y ToChLPV.	20
IV.2.-Generación de clonas diméricas de TYLCV-IL [SLP] y ToChLPV	20
Figura 5. Clonación de Monómeros, construcción de dímeros.	21
IV.3.-Generación de hemidímero 1.7 y 1.4 de TYLCV-IL [SLP]	22
Figura 6. Hemidímero de TYLCV-IL[SLP] 1.7.	23
Figura 7. Hemidímero de TYLCV-IL[Sin].	24
IV.5.-Generación de vectores de expresión con las IR begomovirales.	25
Figura 8. Amplificación y clonación en pBSxGUS de las IR de TYLCV-IL[SLP], ToChLPV y ToSLCV. Comprobación por PCR y determinación de la orientación del promotor.	26
Tabla 3 Resultados de secuenciación y secuencias de aminoácidos -	27
IV.6.-Ensayos cuantitativos de expresión de GUS bajo el control de los promotores begomovirales en protoplastos NT1.	28
Figura 9. Datos de tres experimentos independientes (con 3 muestras leídas en cada caso) de actividad de GUS de los promotores begomovirales.	29
Figura 10. Actividad funcional de los promotores de CP begomovirales.	30
Figura 11. Actividad funcional de los promotores de Rep begomovirales.	30
Figura 12. Promedio de la actividad funcional de los promotores begomovirales.	31
IV.7.-Evaluación cualitativa de actividad funcional de los promotores begomovirales en protoplastos.	32
Figura 13. Evaluación cualitativa con X-Gluc de la actividad de los promotores begomovirales en protoplastos NT1.	33
Figura 14. Microscopia de campo claro de protoplastos NT1 electroporados con pBS35SxGUS y pBSXGUS.	34
Figura 15. Microscopia de campo claro de protoplastos NT1 electroporados con la construcción TYLCV SLP-Rep.	35
Figura 16. Microscopia de campo claro de protoplastos NT1 electroporados con la construcción TYLCV SIN-Rep.	36

Figura 17. Fotografías de protoplastos electroporados con la construcción ToCH-Rep.	37
Tabla 4 Resultados de los conteos de protoplastos teñidos con X-Gluc por campo.	38
IV.8.-Plantas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas con la construcción hemidimerica TYLCV- IL [SLP] 1.7 clonada en pBI121MCS.	38
Figura 18. Plantas inoculadas con hemidímero de TYLCV-IL[SLP] 1.7.	40
IV.9.-Detección de TYLCV-IL [SLP] en las plantas inoculadas.	41
Figura 19. Detección de DNA de TYLCV-IL [SLP] en plantas agroinfiltradas con hemidímero de TYLCV-IL[SLP] 1.7.	42
IV.10.-Influencia en el crecimiento de las plantas agroinfiltradas con TYLCV-IL [SLP] VS plantas control.	43
Figura 20. Comparación del crecimiento entre la planta agroinfiltrada con la construcción hemidimerica de TYLCV-IL[SLP] y el control.	44
Figura 21. ANOVA de las plantas agroinfiltradas con la clona hemidimerica de TYLCV-IL[SLP] y las plantas control utilizando el método comparativo de Tukey	45
V.-Discusión	46
VI.- Conclusiones	48
VII.-Materiales y métodos	48
VII.1.-Plásmidos	48
VII.2.-Plantas- Se utilizaron plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> y de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate)	48
VII.3.-Amplificación por PCR de las IR begomovirales	48
VII.4.-Ensayos de actividad de GUS	49
VIII.-Referencias	51
IX.1.-Transformación de células competentes de <i>E.coli</i> Top10f	58
IX.2.-Minipreps	58
IX-3.-Maxipreps	59
IX-4.-Extracción de DNA de tejido vegetal.	60
IX-5-Preparación de Medio NT1	61
IX-6.-Preparación de Protoplastos NT1	62
IX-7.-Protocolo de expresión transitoria de Gus en protoplastos NT1.	63
IX.9.-Tinción histoquímica de protoplastos con X-Gluc.	64

IX-.10-Cuantificación de proteínas por método Bradford.	65
IX.12.-Ensayos de inoculación con carborundum	67
IX.13.-Protocolo para preparación de células electro-competentes de <i>agrobacterium</i> GV3101.	67
IX.14.-Protocolo de agroinfiltración	68
IX.-ANEXOS-2	70

Abreviaturas

ACMV	Virus Africano del mosaico de la yuca.
BCTIV	Virus del rizado del ápice de la remolacha iraní.
BGMV	Virus del mosaico dorado del frijol.
CLCuMuV	Virus multanes del rizado foliar del algodón.
CLE	Elemento tardío conservado.
CMT3	CHROMOMETHYLASE3
CNS	Señalosoma COP9
CP	Proteína de la cápside
CRL	ligasas RING-cullin
dsDNA	DNA de cadena doble
ECSV	Virus del rayado de <i>Eragrostis curvula</i> .
GRS	<i>Geminivirus Rep Sequence</i> .
HS16	Proteína de choque térmico 16.
ICTV	Comité internacional de taxonomía de virus.
IR	Región intergenica.
MET1	METHYLTRANSFERASE1
MP	Proteína de movimiento.
MSV	Virus del rayado del maíz.
NLS	Señal de localización nuclear.
NSP	Proteína de transporte nuclear.
NW	Nuevo Mundo (Américas).
ORF	Marco abierto de lectura
OW	Viejo mundo (África, Eurasia, sub-continente indio y Oceanía).
PCNA	Antígeno de proliferación celular nuclear.
pRBR	Proteína homóloga a Retinoblastoma en plantas.
PTGS	Silenciamiento génico pos-transcripcional.
RCR	Replicación viral por circulo rodante .
REP	Proteína asociada a la replicación viral.
RF	Forma replicativa.
RF-C	Factor de replicación C.
SpCTAV	Virus del rizado del ápice de la espinaca Arizona.
ssDNA	DNA de cadena sencilla.
TCTV	Virus del raizado del ápice del nabo
TGMV	Virus del mosaico dorado del tomate.
TGS	Silenciamiento génico transcripcional.
TLCV	Virus del rizado foliar del tomate.
ToChLPV	Virus chino del tomate La Paz.
ToGMV	Virus del moteado dorado del tomate.
ToSLCV	Virus del rizado foliar severo del tomate.
TPCTV	Virus del pseudo-rizado del ápice del tomate
SLP-Rep	Construcción del promotor de Rep de TYLCV-IL [SLP] en pBSXGUS.
SIN-Rep	Construcción del promotor de Rep de TYLCV-IL [SIN] en pBSXGUS.

ToCH-Rep	Construcción del promotor de Rep de ToChLPV en pBSXGUS.
ToS-Rep	Construcción del promotor de Rep de ToSLCV en pBSXGUS.
SLP-CP	Construcción del promotor de CP de TYLCV-IL [SLP] en pBSXGUS.
SIN-CP	Construcción del promotor de CP en TYLCV-IL [SIN] en pBSXGUS.
ToCH-CP	Construcción del promotor de CP de ToChLPV en pBSXGUS.
TrAP	Proteína Transactivadora.
TYLCV	Virus del rizado foliar amarillo del tomate.
TYLCV-IL[SIN]	TYLCV-IL aislado de Sinaloa
TYLCV-IL	Virus del rizado foliar amarillo del tomate.-Israel
TYLCV-IL[SLP]	Virus del rizado foliar amarillo del tomate variante San Luis potosí.
UAS	elemento activador rio arriba
WmCSV	Virus del enanismo clorótico de la sandia
CRL	cullin-RING ligase
CSN	COP9 signalosome

Resumen

Análisis funcional de los promotores *Rep* y *CP* de un mutante natural del *Virus del rizado foliar amarillo del tomate (TYLCV)* y un begomovirus co-infectante.

En el 2011, una variante del begomovirus invasor *Tomato yellow leaf curl virus-Israel* (TYLCV-IL) se aisló de dos plantas colectadas en la Huasteca Potosina: una de *Solanum pimpinellifolium* coinfectada con el begomovirus nativo ToChLPV; y otra de *Solanum lycopersicum* coinfectada con el begomovirus, ToSLCV. Ésta variante, denominada TYLCV-IL [SLP], difiere de otras descritas a la fecha por dos alteraciones en la región intergénica del genoma: una delección de 29 pb corriente arriba del elemento “tallo-asa” conservado, y la duplicación de un segmento de 42 pb corriente abajo del mismo elemento. Estas mutaciones podrían haber alterado las propiedades funcionales de los promotores divergentes y, eventualmente, las características patogénicas de TYLCV-IL. En el presente trabajo analizamos funcionalmente los promotores de los genes que codifican las proteínas *Rep* y *CP* de TYLCV-IL [SLP] y la variante no mutada TYLCV-IL [Sin]. Para esto se fusionaron los promotores virales al gen reportero GUS y se analizaron por medio de ensayos de expresión transitoria en protoplastos de tabaco. Los resultados experimentales revelaron que la actividad del promotor *Rep* de TYLCV-IL [SLP] es muy débil, más de 15 veces menor que la del promotor homólogo de TYLCV-IL [Sin]. La actividad de este último fue 6 veces mayor a la del promotor 35S de CaMV utilizado como control. En contraste, los promotores *CP* de las dos variantes de TYLCV-IL no mostraron diferencias significativas en su actividad. Un hallazgo adicional fue que el promotor *Rep* del virus co-infectante ToChLPV exhibe una actividad muy superior a la de TYLCV-IL [Sin] y otros begomovirus, por lo que tiene un potencial biotecnológico importante. La capacidad infectiva de TYLCV-IL [SLP] en ausencia de los begomovirus coinfectantes, se evaluó inoculando por agroinfiltración plantas de *N. benthamiana*. Todas las plantas desarrollaron síntomas y el genoma viral fue detectado por PCR en los tejidos jóvenes.

Palabras clave: promotor, begomovirus, GUS, protoplastos, 35SCaMV, agroinoculación.

Abstract

Functional analysis of *Rep* and *CP* promoters of a natural mutant of Tomato yellow leaf curl Virus (TYLCV) and a co-infecting begomovirus.

In 2011, a variant of the invader begomovirus Tomato yellow leaf curl virus Israel (TYLCV-IL) was isolated from two plants collected in the Huasteca: one of *Solanum pimpinellifolium* coinfecting with native begomovirus ToChLPV; and other *Solanum lycopersicum* coinfecting with begomovirus, ToSLCV. This variant, designated TYLCV-IL [SLP], differs from others described to date for two changes in the intergenic region of the genome: a deletion of 29 bp upstream of the conserved “stem-loop” element and duplication of a segment 42 bp downstream of the same element. These mutations may have altered the functional properties of the divergent promoters and eventually the pathogenic characteristics of TYLCV-IL. In the present work we functionally analyze the promoters of the genes encoding Rep and CP proteins of TYLCV-IL [SLP] and the unmutated variant TYLCV-IL [SIN]. To this the viral promoters were fused to the GUS reporter gene and analyzed by transient expression assays in tobacco protoplasts. To this the viral promoters were fused to the GUS reporter gene and analyzed by transient expression assays in protoplasts snuff. The experimental results revealed that the promoter activity of Rep TYLCV-IL [SLP] is too weak, more than 15 times lower than the homologous TYLCV-IL promoter [SIN]. The Activity of the latter was 6 times higher than the CaMV 35S promoter used as a control. In contrast, the CP promoters of the two variants of TYLCV-IL showed no significant difference in their activity. An additional finding was that the Rep promoter of the co-infecting virus, ToChLPV exhibits a much higher activity than TYLCV-IL [Sin] and other begomoviruses, Therefore it has an important biotechnological potential. The infectivity of TYLCV-IL [SLP] in the absence of the co-infecting begomoviruses, was evaluated inoculating *N. benthamiana* plants by agroinfiltration. All the plants developed symptoms and viral genome was detected by PCR in young tissues.

Keywords: Gene promoter, begomoviruses, GUS, protoplasts, CaMV 35S promoter, agroinoculation.

I.-Introducción

Los geminivirus integran la familia más grande de virus fitopatógenos, y se caracterizan por poseer genomas compuestos por una o dos moléculas circulares de DNA de cadena sencilla (ssDNA). Los genomas de estos virus presentan una región no codificante, designada como Región Intergénica (IR) de ~200pb. La IR contiene el origen de replicación y elementos reguladores para la expresión de genes virales. Esta es la región más variable entre los geminivirus, incluso entre miembros de la misma especie. La variabilidad de la IR permite obtener información de la diversidad genómica en una infección mixta y, a su vez, de la posible recombinación entre especies geminivirales (Duffy y Holmes, 2007; Martin *et al*,2011).

El begomovirus TYLCV-IL es el principal agente causal de la enfermedad del rizado foliar amarillo del tomate, la cual constituye uno de los factores limitantes más importantes de la producción de esta hortaliza en muchos países. El transporte y comercio internacional de plantas infectadas con TYLCV-IL, así como el incremento de las poblaciones del insecto vector en todos los continentes, han contribuido a la diseminación de este patógeno a otras regiones del mundo. La introducción de TYLCV-IL a nuestro país tuvo lugar, de acuerdo a la evidencia existente, por dos rutas distintas: 1) por la región del Golfo de México, al menos desde 1996; y 2) por la costa del Pacífico (Sinaloa y Baja California, en ~2004). Los descendientes de los grupos colonizadores de TYLCV-IL se han esparcido por gran parte del territorio nacional. En el curso del proceso de propagación, se han producido diversas mutaciones que han dado lugar a poblaciones genéticamente diferenciadas de este begomovirus exótico (Duffy y Holmes, 2007).

I.1.-Clasificación de la familia Geminiviridae

La familia *Geminiviridae* se divide actualmente en 7 géneros (**Tabla 1** y **figura 1**), clasificados en base a sus características y organización genómica (Varsani *et al*, 2014). De acuerdo a su distribución geográfica, los geminivirus se

pueden dividirse en virus del Nuevo Mundo y del Viejo Mundo (NW y OW, respectivamente, por sus siglas en inglés).

El genoma de estos virus está empacado en viriones con forma de dos cuasi-icosaedros unidos por una cara. El tamaño del genoma es de 2.5Kb a 3.0Kb y puede estar conformado por un cromosoma (monopartita) o dos (bipartita). (Rojas *et al*,2005; Mubin *et al* 2011). Los viriones están formados por 110 subunidades de la proteína CP, organizadas en 22 pentámeros (Goodman;1981;Unsel *et al* 2004;Nguyen y Brooks,2008). La proteína de la cápside se encuentra en todos los geminivirus, pero entre géneros, las propiedades de la CP divergen en la especificidad por el insecto vector (Rojas *et al* ,2005; Qazi *et al* ,2007).

Tabla 1. Características generales de los Geminivirus

Genero	Virus	Genoma	ORF's	Vector	Distribución geográfica	Características Principales
Mastrevirus (μ)	MSV	Monopartita	3-4	<i>Cicadellidae</i>	OW	Con 29 miembros reportados, son los virus genéticamente más diversificados y probablemente los más antiguos de la familia (Lefeuve <i>et al</i> , 2011). Evolucionaron del ancestro en común de los geminivirus, posiblemente después de la separación de Gondwana(Harkins <i>et al</i> ,2009) Estos virus usualmente infectan plantas monocotiledóneas (Kumar <i>et al</i> ,2014). La expresión de dos proteínas Rep: RepA codificada en el ORF de C1 y Rep codificada en la fusión del mRNA de los ORF'S C1 y C2 por splicing (Nahid <i>et al.</i> ,2011).
Curtovirus (δ)	BCTV	Monopartita	7	<i>Circulifer tenellus</i>	OW/NW	El género tiene 3 miembros. Sin embargo, infectan a más de 300 especies de 44 familias de plantas dicotiledóneas. (Lam <i>et al</i> .2009 , Chen <i>et al</i> ,2011).
Begomovirus(μδ)	TYLCV/PHYVV ^a	Monopartita/ Bipartita	6-8 ^b	<i>Bemisia tabaci</i>	OW/NW	Con >250 miembros reportados es el género más numeroso de los <i>Geminivirus</i> (Rodríguez-Negrete <i>et al</i> 2013).Las especies de éste género presentes en el NW, poseen un genoma bipartita (Melgarejo <i>et al</i> ,2013), en contraste con los presentes en el Viejo Mundo (Eurasia, India, Africa y Oceanía) la mayoría de cuales son monopartitas. (Castillo <i>et al</i> ,2003). El componente A posee dos ORFs en el sentido del virion y cuatro en el sentido complementario, mientras que el componente B contiene 2 ORF's uno en cada sentido (Briddon <i>et al</i> 2010). Los monopartitas suelen encontrarse con pequeños satélites de ssDNA denominados alfa y beta, estos últimos responsables de la aparición de síntomas. (Nawaz-UI-Rehman y Fauquet ,2009; Zhang <i>et al</i> ;2012)
Topocuvirus(δ)	TPCTV	Monopartita	6	<i>Hemiptera Membracidae</i>	N/A ^d	El TPCTV es el único miembro de este género. Infecta a plantas dicotiledóneas. El análisis del genoma de TPCTV sugiere que comparte características a nivel de secuencia y organización con begomovirus y mastrevirus. TPCTV es capaz de trans-complementar el movimiento en begomovirus bipartitas en ausencia de su componente B cognado. De esta evidencia se genera la hipótesis de que TPCTV es producto de la recombinación de un begomovirus y un mastrevirus (Rojas, et al 2005). El genoma de los virus pertenecientes a este género es monopartita y contiene 6 ORF's (Govindappa et al,2011;Varma y Malathi,2003;Nawaz-ul-Rehman y Fauquet,2009).

Turncurtovirus(δ)	TCTV	Monopartita	6	<i>Circulifer haematoceps</i>	N/A ^d	El TCTV es el único miembro de este género. La organización de su genoma es parecido al de los miembros del genero <i>Curtovirus</i> , pero es filogenéticamente distante.(Varsani <i>et al</i> , 2014).
Eragrovirus(μ)	ECSV	Monopartita	4	Desconocido	N/A ^d	El único miembro de éste género es ECSV. El genoma de este virus es monopartita y contiene solo 4 ORF's. La secuencia de origen de replicación de este género es TAAGATTCC la cual difiere de la secuencia TAATATTAC canónica. Hasta el momento solo se ha reportado que infectan plantas dicotiledóneas (Varsani <i>et al</i> , 2014). La proteína de la cápside de este virus es filogenéticamente cercana a la de los miembros del genero <i>Mastrevirus</i> ; mientras que la proteína asociada a la replicación no se parece a ninguna proteína Rep reportada hasta el momento. (Varsani <i>et al</i> , 2014).
Becurtovirus(δ)	BCTIV	Monopartita	5	<i>Circulifer haematoceps</i> ^c	N/A ^c	Los virus BCTIV y SpCTAV son los integrantes de este género. El genoma de estos virus es monopartita y contiene 5 ORF'S. Las proteínas V1, V2 y CP son similares a las del género Curtovirus, La organización del gen que codifica a la proteína de replicación es similar a los virus del genero Mastrevirus. La secuencia del origen de replicación es igual a la presente en el género Eragrovirus TAAGATTCC. (Varsani <i>et al</i> , 2014).

a)TYLCV es monopartita y PHYVV es bipartita

b)Solo en genomas bipartitas

c)Aún se desconoce si otros miembros de este género cumplen con esta característica

(μ)infecta monocotiledoneas

(δ)infecta dicotiledóneas)

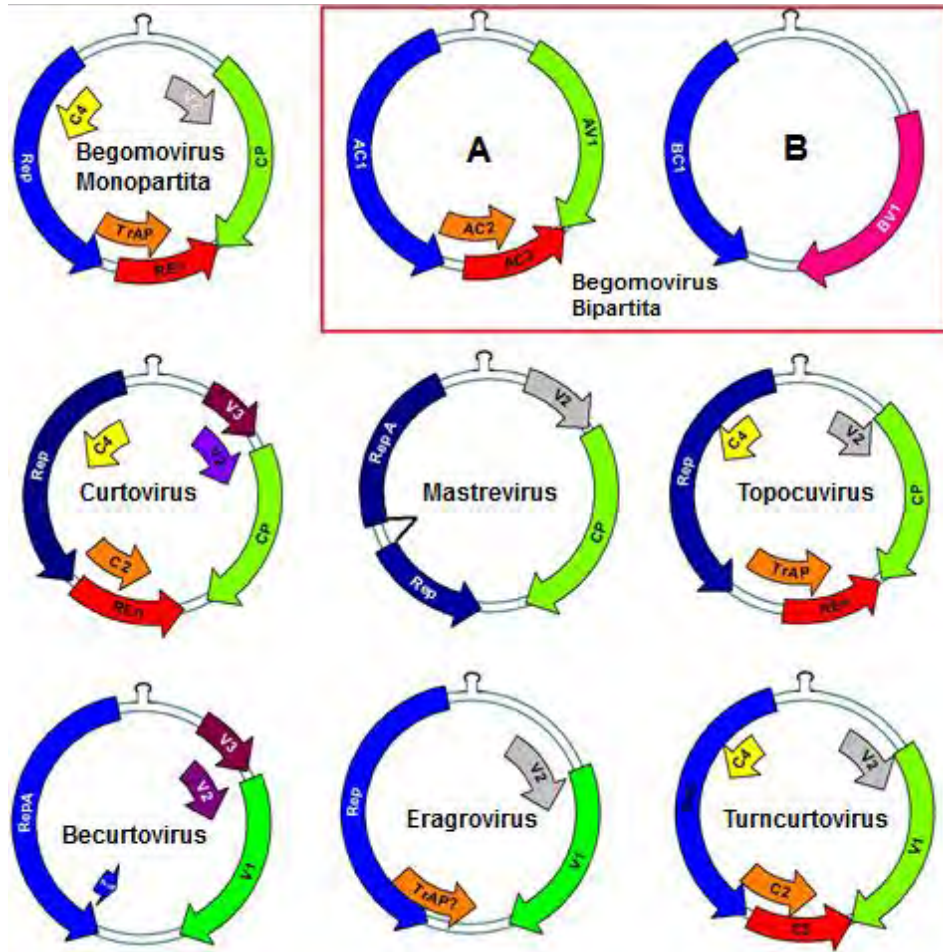


Figura 1. Organización de los genomas geminivirales.

La organización genómica de los 7 géneros de la familia *geminiviridae* de acuerdo a la ICTV. En color azul, se representan los ORF's de Rep en cada género. En verde se representa los ORF's de la proteína de la cápside, en Begomovirus bipartitas, esta se encuentra en el componente A. TrAP y otras proteínas homologas, las cuales se sospecha que están encargadas de activar la transcripción de genes tardíos, son representados con naranja. En rojo se representa el ORF de REN, la cual es una proteína que intensifica la replicación viral (Settlage *et al.*, 2005). En *Begomovirus* bipartitas, el componente B codifica para la MP (en azul) ; y NSP (en color rosa) (Bridson *et al.*, 2010). La CP de los begomovirus monopartitas funciona como MP, en otros casos se encuentra en otro ORF (Rojas *et al.*, 2001).

I.2.-Proteínas codificadas en el genoma de un begomovirus monopartita

El genoma de los begomovirus monopartitas consta de 6 ORF'S. Estos son designados como C1,C2,C3 y C4 correspondientes a los genes tempranos; mientras que V1 y V2 son genes tardíos. .

Gen C1: Codifica para la proteína iniciadora de la replicación (Rep). Ésta proteína es indispensable para el mecanismo de Replicación por Círculo Rodante (RCR). La proteína Rep posee un dominio de unión a DNA que tiene la función de “unión y corte a DNA”, importante para el mecanismo de RCR. El dominio de unión a DNA comprende los aminoácidos 1 al 120. Dentro de ésta región se encuentran tres motivos conservados entre las proteínas Rep. El motivo I (**FLTY**) necesario para la unión de Rep al DNA y se encuentra entre el aa 16 y 19 (Orozco *et al.*, 1997, Nash *et al.*, 2011). Los residuos aminoácidos de éste motivo participan indirectamente en la unión específica a los iterones cognados que se encuentran en la IR (Argüello-Astorga *et al.*, 2001). En varios estudios *in vitro* se ha observado que al mutar este dominio la formación del complejo Rep-DNA queda abolida y por lo tanto la replicación del genoma viral. Sin embargo, en un estudio *in vitro* con el virus TLCV de Australia, se demostró que Rep no necesita tener una alta afinidad para unirse al DNA. Esto se observó en mutantes de este dominio capaces de replicar el virus TLCV y a su virus satélite (Lin *et al.*, 2003). El motivo II, **HUH** (U= aminoácido no polar) es un sitio de unión putativo a un ion metálico divalente (Mg^{++} o Mn^{++}). Finalmente, el Motivo III (**YxxKD/E**), forma parte del sitio catalítico de la endonucleasa (Orozco., *et al* 1997; Nash., *et al* 2011). Entre los motivos II y III, se encuentra el motivo GRS del cual se desconoce su función. Sin embargo, al mutar algún aminoácido de este motivo, Rep pierde la capacidad de generar un corte en el DNA y, por consecuencia, la replicación por RCR y RDR se afecta. Hasta el momento se especula que el motivo GRS posiblemente está implicado en la conformación de la estructura de la proteína y no es un sitio catalítico (Nash *et al.*, 2011).

Otro dominio de la proteína Rep, es denominado “dominio de oligomerización”. Éste se localiza entre el aminoácido 121 al 180, y permite interacción con otras unidades de Rep así como con otras proteínas del hospedero. Entre las cuales se encuentran la proteína pRBR (Kong y Hanley-Bowdoin,2002; Arguello-Astorga *et al*,2004), RF-C y PCNA (Bagewadi *et al*,2004).

Además de la participación de Rep en la RCR, la proteína Rep puede suprimir el silenciamiento génico transcripcional (TGS) mediante la reducción de las metiltransferasas de mantenimiento CMT3 y MET1 (Rodríguez-Negrete., *et al* 2013).

Gen C2: Codifica para una proteína con función de activador transcripcional (TrAP) de los genes tardíos V1 (*CP*) y V2 (Sunter y Bisaro *et al*, 1992). Éste gen está presente en 5 de los 7 géneros de la familia *Geminiviridae*. TrAP es una proteína multifuncional y se relaciona con distintos roles durante la infección, por ejemplo, suprimir el silenciamiento génico (Raja *et al*, 2010); reprimir las defensas de la célula hospedera (Sunter *et al*, 2001); e incluso interactuar con el complejo del signalosome COP9 (CSN) (Lozano-Duran *et al*, 2011) que es una proteasa con múltiples subunidades encargada de regular la actividad de las proteínas designadas como cullin–RING ligase (CRL) (Wei *et al*, 2008).

Gen C3: Éste gen codifica para una proteína denominada proteína potenciadora de la replicación o REn (Replication Enhancer protein). La función que se relaciona a ésta proteína es promover la acumulación de DNA viral, así como el desarrollo de síntomas en plantas infectadas. Algunas evidencias sugieren que REn interacciona con las proteínas Rep y PCNA para llevar a cabo su función (Settlage *et al*. 2005).

Gen C4: La región codificante del gen C4, se localiza por completo dentro del ORF C1. La proteína C4 parece ser un determinante de síntomas. Algunos reportes indican que C4 es una proteína capaz de revertir el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) el cual es un mecanismo de defensa de la planta. Además tiene un papel potenciador en la supresión del Silenciamiento génico

transcripcional (TGS) generada por Rep (Rodríguez-Negrete., *et al* 2013). En ausencia de la proteína C4, TYLCV es incapaz de generar una infección sistémica (Jupin *et al*,1994; Rojas *et al* 2001), por lo que actualmente se sospecha que está involucrada en el desarrollo de síntomas y el movimiento del virus (Hak *et al*, 2015).

Gen V1: El gen V1 codifica la única proteína estructural de la cápside de los geminivirus. Además de las funciones de unión y empaquetado del genoma, CP se asocia a otras funciones como el transporte del DNA viral dentro y fuera del núcleo, así como de la propagación sistémica y célula–célula del virus; y determina la especificidad del insecto vector (Noris *et al*, 1998). La localización de CP en la célula huésped es en el núcleo, y se suele encontrar asociada con ssDNA al nucléolo (Kunik *et al* 1998; Rojas *et al*, 2001). La señal de localización nuclear (NLS) en CP, se encuentra en dos dominios localizados en los primeros 29 aminoácidos del N- terminal de la proteína. El primer dominio compuesto por los primeros 14 aa de CP (1-msKRpgdiiistpv-14). Y el segundo corresponde del aa 15 al 29 (15-sKvRRRinfdspyss-29).El primer dominio por sí mismo es capaz de importar la proteína al núcleo. Sin embargo, esta capacidad se ve reducida ~50% en ausencia del segundo dominio (Kunik *et al* 1998). Datos experimentales sugieren que la CP de TYLCV es capaz de exportar el ssDNA y dsDNA fuera del núcleo y de la célula infectada, funcionando como un homólogo de NSP, la cual realiza esta función en begomovirus bipartitas (Wartig *et al*,1993;Rigden *et al*,1997; Priyadarshini *et al*, 2011).

Gen V2: El marco abierto de lectura de éste gen se encuentra dentro del marco abierto de V1. Previamente, la proteína V2 fue descrita como una proteína funcionalmente homóloga a MP (proteína de movimiento), necesaria para la aparición de síntomas e infección sistémica, debido a que mutantes de V2 de TYLCV afectan la concentración de DNA viral, causando infecciones asintomáticas. En estudios recientes, al utilizar una versión de V2 etiquetada con la proteína YFP se mostró que V2 se localiza en el citoplasma, alrededor del núcleo y en asociación con los filamentos citoplasmáticos, pero no en los

plasmodesmos (Sharma et al 2001;Hak *et al*, 2015). Esta nueva evidencia descarta a V2 como una proteína con funciones de movimiento. Por otro lado, V2 está relacionada con la supresión del TGS, mediante la reducción de la metilación de citosinas en los sitios CHH (Hak *et al*, 2015) al interactuar posiblemente con DRM2; una metiltransferasa de citosinas que metila al DNA *de novo*. Además, V2 suprime al PTGS al interactuar con la proteína SGS3 (Rodríguez-Negrete *et al*, 2013).

I.3.Proceso de infección y replicación begomoviral.

I.3.1.-Generalidades del Ciclo infectivo

La transmisión de las partículas virales de la planta infectada hacia la mosquita blanca tiene lugar durante la ingesta de la savia del floema. Las partículas virales atraviesan el estilete, moviéndose a través del tubo digestivo hasta el intestino medio del insecto, posteriormente llegan a la hemolinfa y a las glándulas salivales. Los viriones que selectivamente atravesaron las células de las glándulas salivales hasta el sistema del conducto salival, pueden ser transmitidos directamente al floema durante la siguiente ingesta (Czosnek *et al* 2001;Rana *et al*,2012; Tiwari *et al*,2013). Endosimbiontes bacterianos de la mosquita blanca sintetizan la proteína GroEL, la cual interactúa con la CP del virion (Rana *et al*, 2012) y la proteína HS16 de la flora de la mosquita blanca. Estas interacciones pueden proteger o facilitar el transporte del virión durante su recorrido en el insecto (Ohnesorge y Bejarano, 2009;Hanley-Bowdoin *et al* 2013). Algunos datos sugieren que la eficiencia de transmisión viral se correlaciona con las isoformas de GroEL presentes en el insecto (Gottlieb, *et al* 2010).

El genoma del virus adquiere su forma replicativa (RF) y transcripcionalmente activa cuando las moléculas ssDNA viral son convertidas en dsDNA por las DNA polimerasas de la célula vegetal (Gutierrez, 2000; Chapa-Oliver *et al*,2011). Al dsDNA se unen histonas (Preiss y Jeske *et al* 2003; Raja *et al*,2010) y forman trece nucleosomas que cubren todo el DNA viral (Pilartz y Jeske,2003; Jeske,2007). Los *Begomovirus*, al igual que todos los miembros de la

familia *Geminiviridae*, carecen de la maquinaria necesaria para su replicación y transcripción, por lo que los transcritos son sintetizados por la RNA polimerasa II de la planta (Sunter y Bisaro, 1997). Las primeras proteínas sintetizadas son Rep y TrAP, lo que permite iniciar la RCR. Además, Rep modifica el ciclo celular ocasionando que la célula infectada entre en politenia, al inducir los factores necesarios para la replicación del DNA. Rep conjuntamente con TrAP y otras proteínas virales como C4, reduce los mecanismos de defensa de la planta. La proteína REn, al ser sintetizada, también potencia la síntesis de Rep y con ello las copias del genoma viral.

Más tarde durante la infección, Rep inhibe su propia transcripción al unirse a la región promotora del gen que la codifica. Este evento también lleva a potenciar la expresión de TrAP (Lucioli et al ,2007, Shung y Sunter,2007). La proteína TrAP activa la transcripción del ORF de CP y de NSP. La proteína CP encapsida a los genomas virales en forma ssDNA, mientras que NSP exporta el DNA viral fuera del núcleo. En begomovirus monopartitas, como TYLCV, no existe la proteína NSP, por lo que la proteína CP lleva a cabo esta función (Rojas *et al*, 2001). La proteína MP permite el transporte del genoma viral por el plasmodesmata. Sin embargo, se desconoce si el DNA viral transportado es ssDNA o dsDNA en forma circular o lineal (Hanley-Bowdoin, *et al* 2013).

I.3.2.- Mecanismos de replicación

Los miembros de la familia *Geminiviridae* replican su genoma al utilizar la maquinaria de replicación de las células que infectan. Las proteínas virales modifican el ciclo celular de la célula vegetal que se encuentra en quiescencia, promoviendo la expresión de los factores necesarios para la replicación. Los geminivirus pueden replicarse por dos mecanismos: Replicación por Círculo Rodante (RCR), y Replicación dependiente de recombinación(RDR).

1.3.2.1.-Mecanismo de RCR.

El modelo de la replicación por círculo rodante explica que una vez que el genoma ssDNA ha sido convertido a dsDNA (RF) Rep se une a la IR-Rep y corta en la secuencia nonanucleotídica **5'-TAATATT/AC -3'** en una sola cadena (**figura 2, A4**). Este corte genera un grupo hidroxilo libre en el 3', que sirve como primer para la síntesis de una cadena nueva, en tanto que el grupo fosfato 5' se mantiene unido covalentemente a Rep mediante el residuo conservado de tirosina en la posición 103 (Lafus et al,1995;Desbiez et al,1995;Luque et al,2002). La cadena parental es desplazada mientras la nueva cadena se sintetiza (**figura 2,A5**). Al regenerarse la secuencia nonanucleotídica en la nueva cadena, ésta es cortada y ligada (**figura 2, A6**).

1.3.2.2.-Mecanismo de RDR.

La replicación es iniciada por recombinación homóloga entre replicados parciales de ssDNA y una dsDNA circular (**figura 2, B1**). En el proceso, se forma una estructura tipo bucle (**figura 2 ,B2**) que funciona como plantilla (**figura 2,B3**) para la síntesis de ssDNA y dsDNA (**figura 2,B4**)(Jeske et al,2001;Preiss y Jeske,2003; Pooggin,2013)

Ambos mecanismos de replicación parecen ocurrir en las infecciones por begomovirus, tanto en la naturaleza como en condiciones controladas (Jeske et al,2001;Preiss y Jeske,2003).

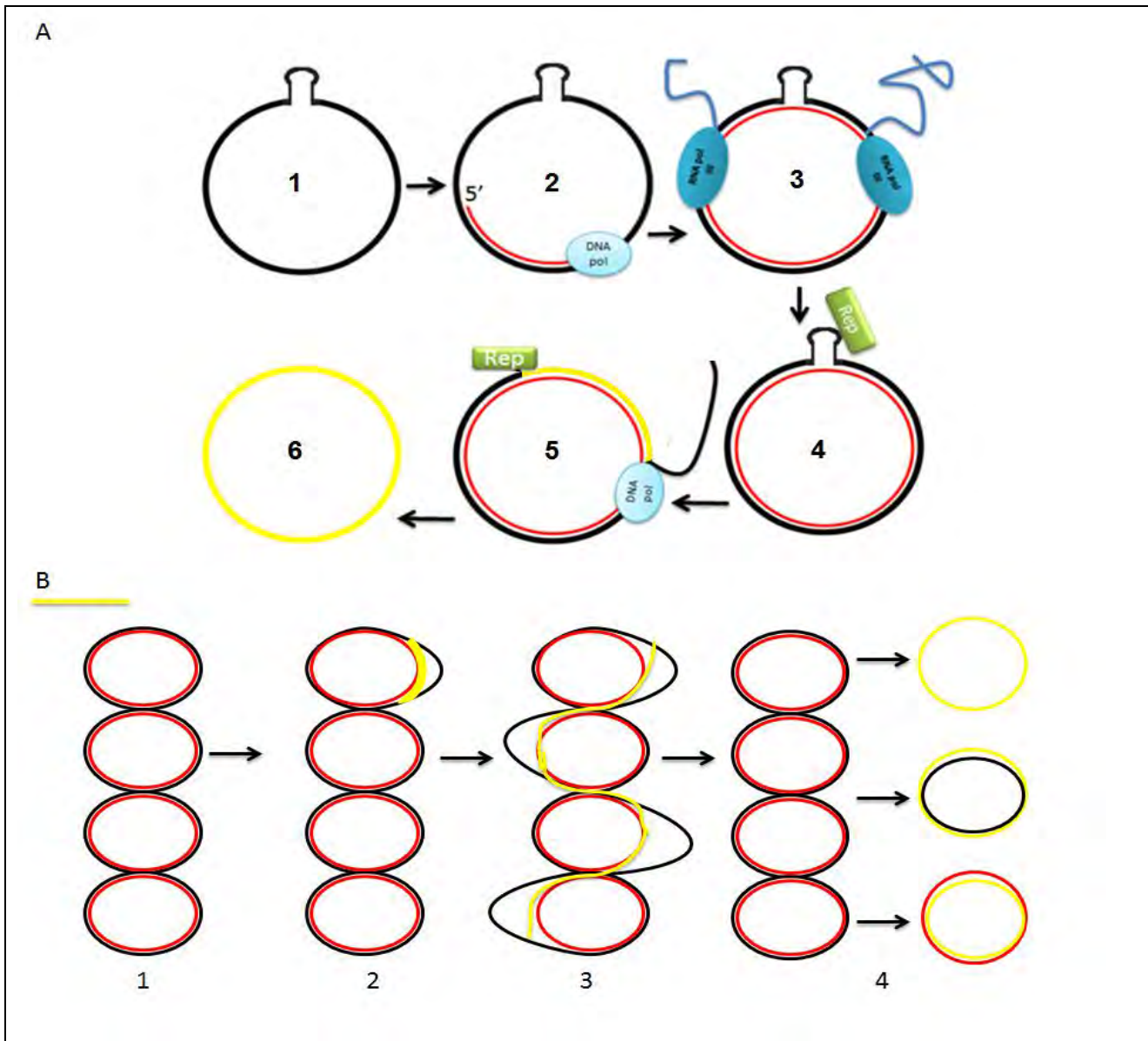


Figura 2. Mecanismos en la replicación de geminivirus.

A) El proceso de replicación del genoma en geminivirus se realiza mediante RCR, el cual se describe brevemente: (1) ssDNA es convertido a dsDNA por las DNA polimerasas de la planta, (2) el genoma del virus adquiere así la configuración RF, transcripcionalmente activa (3), y se producen ARNm virales. Una vez sintetizada Rep (4) esta proteína se une en la IR de la RF que contiene distintos elementos reguladores y una secuencia conservada. (5) Produce un corte en la cadena (+) dentro de la secuencia 5'-TAATATTAC-3', generando un grupo hidroxilo 3' que sirve como "primer" para la síntesis de una cadena nueva. El grupo fosfato 5' se mantiene unido covalentemente a Rep mediante el residuo conservado 103 de tirosina y es desplazado mientras la nueva cadena se sintetiza (6) que vuelve a ser cortada y ligada una vez que se produce una nueva copia de la secuencia nonanucleotídica. B) El mecanismo de RDR: (1) fragmento de un geminivirus replicado parcialmente y una molécula de dsDNA circular de un genoma begomoviral (2) recombinación homóloga entre el replicado parcial y el genoma viral. (3) se sintetiza una nueva cadena de ssDNA usando como plantilla el dsDNA viral y como primer el fragmento de replicación. (4) ssDNA y dsDNA sintetizados a partir del proceso de recombinación-polimerización. (figuras basadas en las de Jeske *et al*, 2001 y Pooggin, 2013)

I.4.-Elementos de la región intergenica geminiviral.

La región intergénica, en los genomas monopartitas, se encuentra flanqueada por los extremos 5' de los ORF's de los genes de Rep, CP y V2. La IR es fundamental para la replicación viral por RCR debido a que en ella se encuentran la secuencia nonanucleotídica TAATATT/AC, importante para el corte por Rep; y la secuencia que forma la estructura tipo tallo-asa, esencial para el inicio de la replicación. Otros elementos importantes para la replicación del genoma viral ubicados en la IR son los Iterones. Éstos son secuencias repetitivas de 6-12 nt que funcionan como sitios de unión de la proteína Rep. Los Iterones son considerados como determinantes de especificidad en la replicación viral. (Anju *et al*,2001). Estos elementos se encuentran a una distancia variable dentro de la IR, situados entre el codón de inicio de Rep y el brazo izquierdo de la estructura tipo tallo-asa de la IR. En algunos géneros se encuentra un iterón adicional río arriba de esta estructura (Arguello-Astorga,1994^b; Ramos *et al*,2003; Melchor *et al*, 2011; Anju *et al*, 2001). Los iterones funcionan como elementos de unión específica para la proteína Rep cognada (Willment, 2007) necesaria para la replicación del virus. La especificidad de la interacción entre la proteína Rep y los iterones es considerada como uno de los mayores determinantes para la formación viable de pseudo-recombinantes infectivos entre distintas cepas e incluso especies (Silva *et al*,2014). Es decir, los factores responsables del ciclo replicativo e infectivo son intercambiables entre componentes virales no cognados.

La IR también contiene elementos reguladores en *cis* y sitios de unión a factores de transcripción. En esta región se encuentran dos promotores parcialmente sobrepuestos que regulan la expresión del gen que codifica para la proteína Rep y los genes tardíos. Algunos elementos bien caracterizados involucrados en la regulación transcripcional de geminivirus son las cajas "G" y "GC", así como el elemento conservado tardío (CLE, por sus siglas en inglés). La caja "G" (CACGTG) se localiza en la vecindad de la estructura tipo tallo-asa en la mayoría de los begomovirus del Nuevo Mundo, y es crítica para la actividad del promotor Rep en esos virus (Eagle y Hanley-Bowdoin, 1997). Un análisis por

mutagénesis dirigida de la caja GC (un elemento de ~20pb rico en GCs, y adyacente a la horquilla de replicación) del mastrevirus *MSV*, mostró que su modificación resulta en una reducción del 70% en la actividad funcional de su región promotora en el sentido del virion (Khan *et al*, 2015; Briddon *et al*, 1990).

I.5.-Transactivación del promotor de los genes tardíos en begomovirus.

En los begomovirus, la proteína TrAP es un factor que regula la transcripción de los genes tardíos en el mesófilo y floema. TrAP además tiene función de suprimir el silenciamiento génico y ser un determinante de patogenicidad (Sunter y Bisaro, 1997). Se compone por 3 dominios conservados: un dominio básico NLS bipartita en el extremo N-terminal; un dominio de dedo de zinc no clásico en la parte media de la proteína; y un dominio ácido de activación en el extremo C-terminal.

La conservación de los tres dominios, permite que un begomovirus con una TrAP no funcional, pueda ser trans-complementado con la proteína de otro (Rajeswaran *et al*, 2007). Incluso entre proteínas TrAP de begomovirus monopartitas y bipartitas los cuales comparten una alta similitud de secuencia.

Estudios en protoplastos, han mostrado que la actividad del promotor de CP por si sólo es débil, pero en presencia de TrAP su actividad es potenciada (Sunitha; *et al* 2012). El mecanismo por el cual TrAP promueve la activa del promotor de los genes tardíos aún no está dilucidado. Sin embargo, en el virus del chile huasteco (*Pepper Huasteco Virus*. PHV) TrAP necesita al CLE para la transactivación de los genes tardíos (Ruiz-Medrano *et al*, 1999; Cazzonelli, *et al* 2005). En los virus *TGMV* y *BGMV*, no es necesaria esta secuencia para la transactivación de los genes tardíos (Hung y Petty, 2001). Hasta ahora en la región promotora de begomovirus no ha sido posible encontrar alguna secuencia consenso de unión y/o interacción con TrAP (Sunter y Bisaro, 2003). Adicionalmente, algunos datos indican que TrAP se une de manera no específica a DNA de cadena doble, por lo que su interacción con el promotor de los genes

tardíos posiblemente sea de manera indirecta por unión con factores de transcripción de la planta (Van Wezel et al,2003)

I.6.-Estudios de la actividad funcional de los promotores geminivirales

El estudio de Fenoll, *et al* en 1988 fue uno de los primeros estudios que demostraron que la región intergénica contiene secuencias reguladoras. En dicho estudio, se mostró que una secuencia de 122pb perteneciente a la IR del virus MSV, incluyendo el elemento tipo tallo-asa, funcionaba como elemento activador de la transcripción río arriba (UAS) en protoplastos de maíz. La secuencia puede ser intercambiada con un elemento similar del promotor 35Score y activa su funcionalidad como promotor. No obstante, mediante análisis de retardo en gel, se observa que esta región UAS de MSV interactúa con proteínas distintas a las de la secuencia UAS del promotor 35S de CaMV.

Debido a la riqueza de secuencias reguladoras en las IR's geminivirales, el interés por esta familia de virus de planta para el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas se ha acrecentado. En algunos estudios en los que se analizaron funcionalmente promotores de origen begomoviral, se ha observado que éstos pueden tener una actividad que supera a la actividad del promotor 35S de CaMV., el promotor más utilizado en la biotecnología vegetal. (Xie, *et al* 2003; Ashraf, *et al* 2014; Abu El-Heba, *et al* 2015).

En estudios recientes con la región intergénica de TYLCV y del virus del enanismo clorótico de la sandía WmCSV, fusionadas con el gen reportero GUS, mostraron ser promotores más fuertes que el 35S, en distintos tipos de tejido y plantas incluyendo tomate, arroz y sandía (Abu El-Heba, *et al* 2015).

I.7.-TYLCV y variante TYLCV-IL[SLP]

El virus TYLCV es el causante de la enfermedad del rizado foliar amarillo del tomate. La expansión geográfica de este virus es uno de los mayores factores que limitan la producción de tomate en muchos países. Entre ellos México, principalmente en estados del norte como Sinaloa y Sonora.

TYLCV fue aislado en el valle de Jordania, Israel. Un año después de que el ministerio de agricultura incentivara al sector agrícola para dejar de cultivar la variedad “marmande”, por una variedad más apropiada para la exportación denominada “moneymaker”. Los agricultores observaron los síntomas enfermedad con una etiología hasta ese momento desconocida. Entre los síntomas se presentaba brotes erectos, rizado foliar, clorosis y enanismo. No fue hasta 1964 que el virus que provocaba esta enfermedad se le asignó un nombre: “*Tomato Yellow Leaf Curl Virus*”(Cohen y Harpaz,1964). TYLCV fue aislado y secuenciado en 1988 (Navot *et al* 1991).

TYLCV se ha expandido fuera del Medio Oriente hacia Europa, Asia, Africa e incluso las Américas. Posiblemente, al continente americano entró por la República Dominicana o Cuba a mediados de 1990, por el transporte y comercio de plantas infectadas con este virus proveniente de Oriente Medio (Monci, *et al* 2002). Posteriormente se propagó hacia las islas caribeñas y Norteamérica (Morales, *et al* 2006). Se ha observado que especies nativas de begomovirus que infectan tomate, co-existen con TYLCV en infecciones mixtas o han sido remplazados por este (Anfoka, *et al* 2008).

El ingreso de TYLCV-IL a México es un caso particular. Presumiblemente ingresó por dos rutas distintas, mutó en algunos casos y generó una progenie viral divergente, lo cual puede observarse por pequeñas firmas dentro de la IR, que separan en clados diferentes a aquellos virus que ingresaron por una de las siguientes rutas: 1) Por la región del Golfo de México, al menos desde 1996; 2) Por la costa del Pacífico (B.C.-Sinaloa) durante el 2004 (Duffy y Holmes,2007).

En una localidad del municipio de Aquismón de la Huasteca Potosina, se aisló una variante de TYLCV-IL [SLP] la cual contiene un par de mutaciones en la IR con respecto a TYLCV-IL. Estas mutaciones en la organización del origen de replicación se muestran a modo de esquema en la **figura 3**.

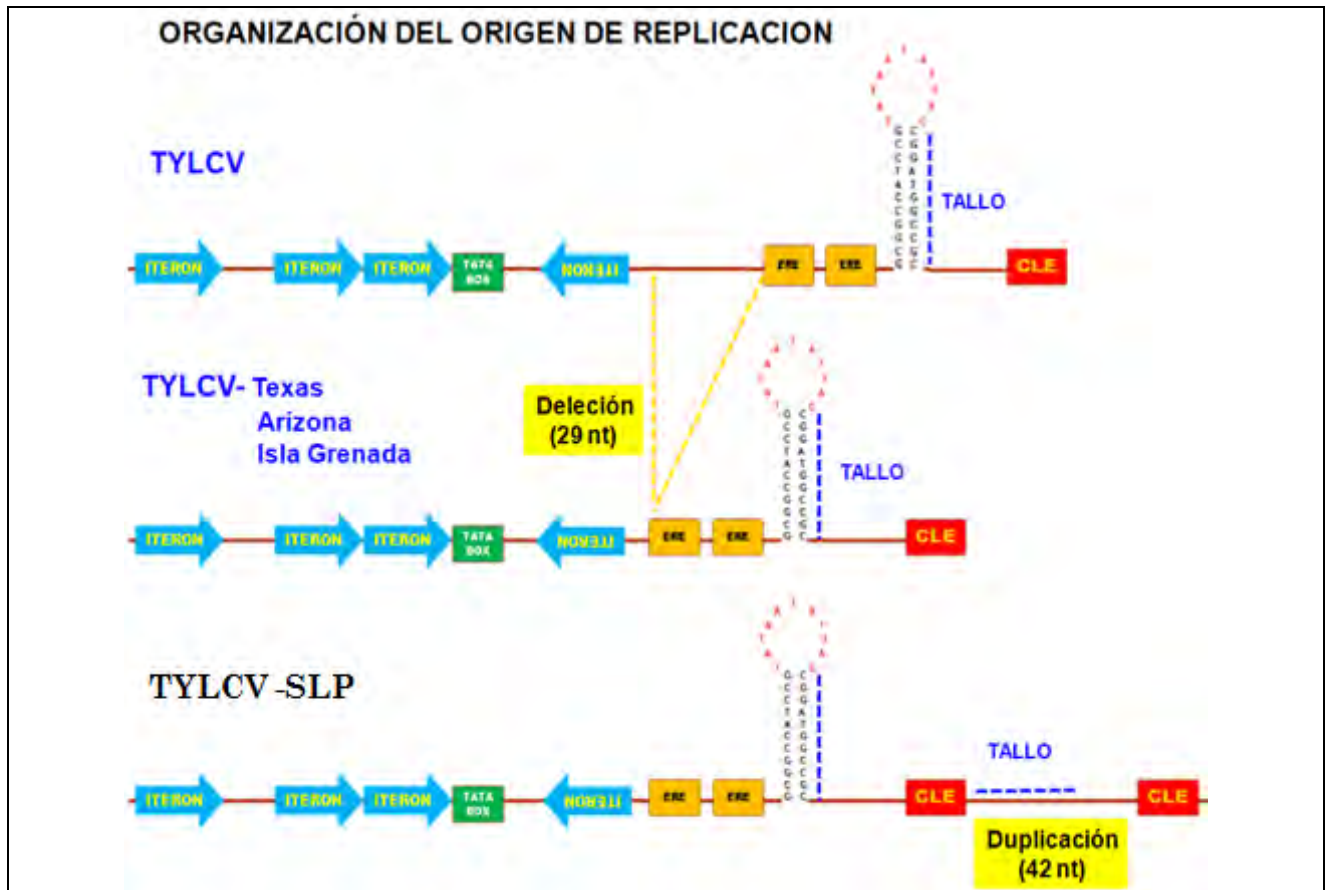


Figura 3. Organización de la IR de TYLCV-IL[SLP].

Representación esquemática de los elementos que conforman la IR de TYLCV-IL y las mutaciones de la variante TYLCV-IL [SLP]. El aislado de TYLCV de Texas y SLP presentan una delección de 29nt entre el iterón que se encuentra corriente abajo de la caja TATA y los elementos de respuesta a etileno (ERE). La variante TYLCV-IL [SLP] contiene además una duplicación de 42 nt la cual contiene el brazo derecho de la estructura tallo-asa y el elemento tardío conservado (CLE).

II.-Hipótesis

Las mutaciones observadas en la región intergénica del aislado TYLCV-IL [SLP] aislado en la Huasteca Potosina, han alterado la actividad funcional del promotor bidireccional begomoviral, y probablemente también sus características patogénicas.

III.-Objetivos

Objetivo general

El presente trabajo está orientado en analizar y comparar la actividad de los promotores de los genes que codifican las proteínas Rep y CP de las variante de TYLCV-IL de San Luis Potosí y de Sinaloa, así como los del begomovirus coinfectante ToCHLPV, mediante ensayos de expresión transitoria en protoplastos de tabaco.

Objetivos particulares

- Generar clonas infectivas (dímeros o hemidímeros) de TYLCV-IL[SLP], TYLCV-IL[SIN] y ToChLPV.
- Generar vectores de expresión con los promotores bidireccionales begomovirales de TYLCV-IL[SLP], TYLCV-IL[SIN] (aislado de TYLCV-IL Sinaloa) y los begomovirus co-infectantes ToCHLPV y ToSLCV, en fusión con el gen reportero *uidA* (GUS).
- Analizar la actividad funcional de los promotores begomovirales de TYLCV-IL[SLP], TYLCV-IL[SIN] y del begomovirus co-infectante ToCHLPV en un sistema de expresión transitorio.

IV.-RESULTADOS

IV.1.-Generación de clonas monoméricas de TYLCV-IL[SLP], ToSLCV y ToChLPV.

El genoma monopartita de TYLCV-IL[SLP], y el componente genómico A (DNA-A) de ToChLPV y ToSLCV, se amplificaron por RCA con la DNA pol del fago Phi29, a partir de DNA total de las muestras vegetales colectadas por Bañuelos-Hernández. Los componentes genómicos virales fueron clonados en pBlueScript SK- (pBSsk-), en el sitio único de corte de la enzima *SacI*.

IV.2.-Generación de clonas diméricas de TYLCV-IL [SLP] y ToChLPV

Los dímeros se generaron mediante digestiones parciales de los monómeros, y subsecuente la clonación de un duplicado del genoma de TYLCV – SLP y ToChLPV en el sitio natural *SacI*. La orientación de los insertos se comprobó por digestión con endonucleasas de restricción y secuenciación. La motivación para generar las clonas diméricas o hemidiméricas de TYLCV-IL[SLP] se basó en la literatura existente, que señala que generalmente las clonas monomérica de TYLCV-IL resultan ineficientes para inducir una infección mediante la inoculación por biobalística. Las clonas dimericas son una mejor alternativa para la inoculación por biobalística. Además se generó un hemidímero de TYLCV-IL[SLP] en pBlueScript KS- y se subclonó en una versión modificada del vector binario pBI121 para inocular plantas con el virus por agroinfiltración, que es un método más eficiente.

En la **figura 5** se muestra la representación esquemática y la comprobación de cada construcción por patrones de digestión.

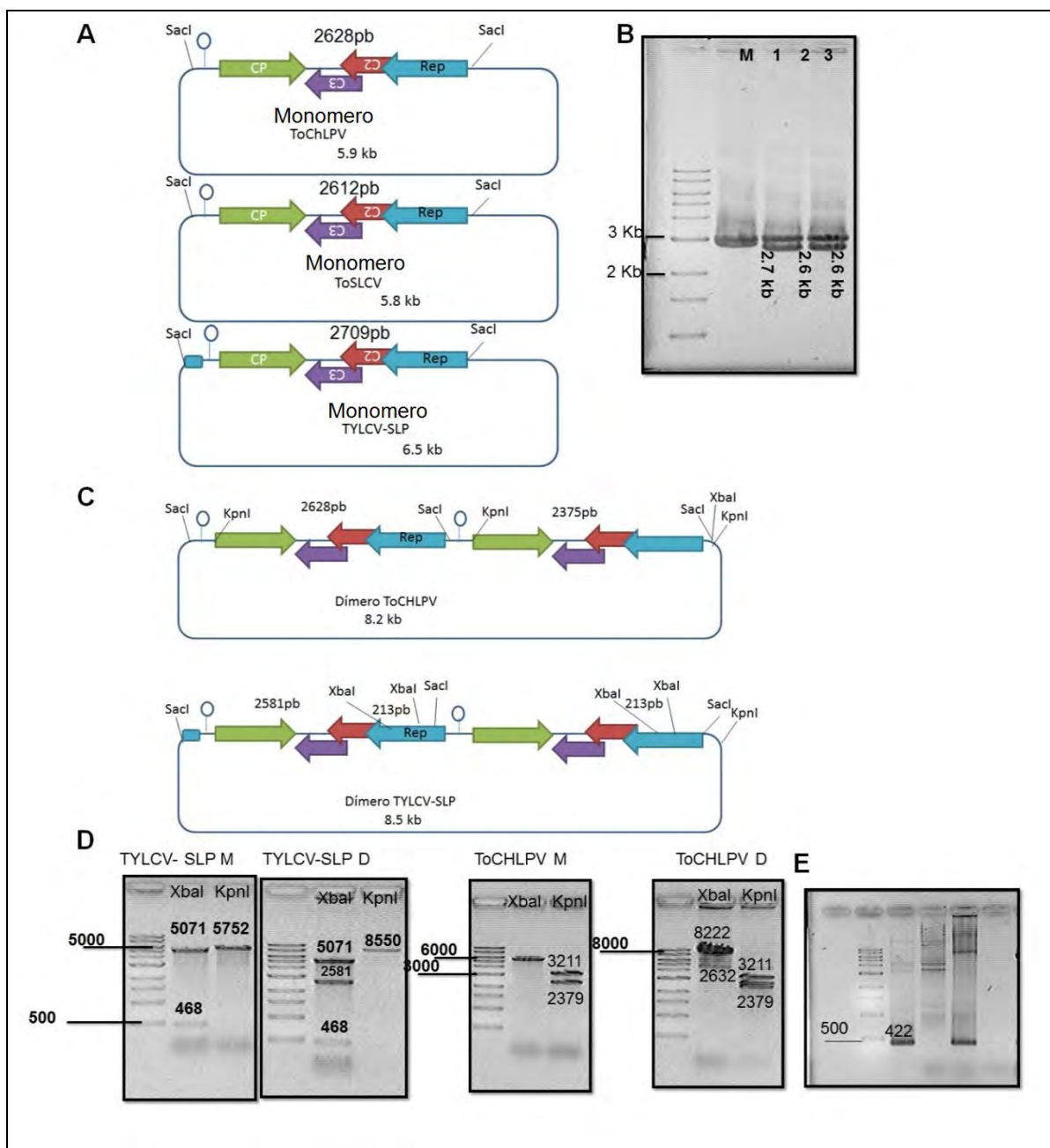


Figura 5. Clonación de Monómeros, construcción de dímeros.

A) Mapas de las clonas monoméricas **B)** Patrón de digestión de las construcciones monoméricas digeridas con *Sacl*, los números representan cada virus: 1 TYLCV-IL[SLP], 2 ToSLCV y 3 ToChLPV. **C)** Mapas de las construcciones dimericas de TYLCV-IL[SLP] y ToChLPV, **D)** patrones de digestión con *KpnI* y *XbaI*, los cuales muestran bandas diferenciales entre la clona monomérica y dimerica. **E)** PCR de la IR de ToChLPV. al estar clonada en *Sacl* la construcción monomérica impide que se pueda amplificar la IR (Carril 2) ya que los cebadores amplificarían el vector. La clona dimerica (Carril 3) al completar la IR esta puede ser amplificada. Como control positivo se uso a la región intergenica de ToChLPV clonada en pGemT-easy (carril 1) y como control negativo mix de PCR sin DNA.

IV.3.-Generación de hemidímero 1.7 y 1.4 de TYLCV-IL [SLP]

La construcción del hemidímero de TYLCV- IL [SLP] se realizó mediante dos pasos de subclonación. Primero se subclonó en el vector pBSK un fragmento del monómero correspondiente a la región entre el sitio de corte *SacI*, que se encuentra dentro del ORF de C4, y el sitio *XbaI* más próximo al final del ORF de C1 (Rep). Esta construcción se designó como pBS-TYLCV 0.7. Posteriormente se subclonó el componente viral completo en el sitio natural *SacI*. Esto último permite completar el ORF de Rep. En ésta construcción el genoma viral es flanqueado por las regiones intergénicas del virus. La **figura 6** muestra esquemáticamente la construcción y la comprobación de esta por digestión. La construcción fue comprobada por digestión y secuenciación.

IV.4.-Generación de hemidímero 1.4 de TYLCV-IL [SIN]

La metodología para la generación de hemidímeros de TYLCV-IL [SIN] fue similar a la anterior. . Primero se clonó en el vector pBlueScript KS la región que se encuentra entre el sitio *XbaI* y *BamHI* correspondiente al origen de replicación viral. Esta construcción se le denominó pBSTYLCV-IL[SIN]0.4. Enseguida la clona monómerica fue digerida con *XmnI* y *XbaI*; para evitar la religación con el vector y liberar el componente viral de este respectivamente. El genoma viral completo fue clonado en pBSTYLCV-IL[SIN]0.4 en el sitio *XbaI*. La ligación genera una construcción que contiene todo el genoma viral flanqueado por las regiones intergénicas. La **figura 7** muestra esquemáticamente la construcción y la comprobación de esta por digestión. La construcción fue comprobada por digestión y secuenciación.

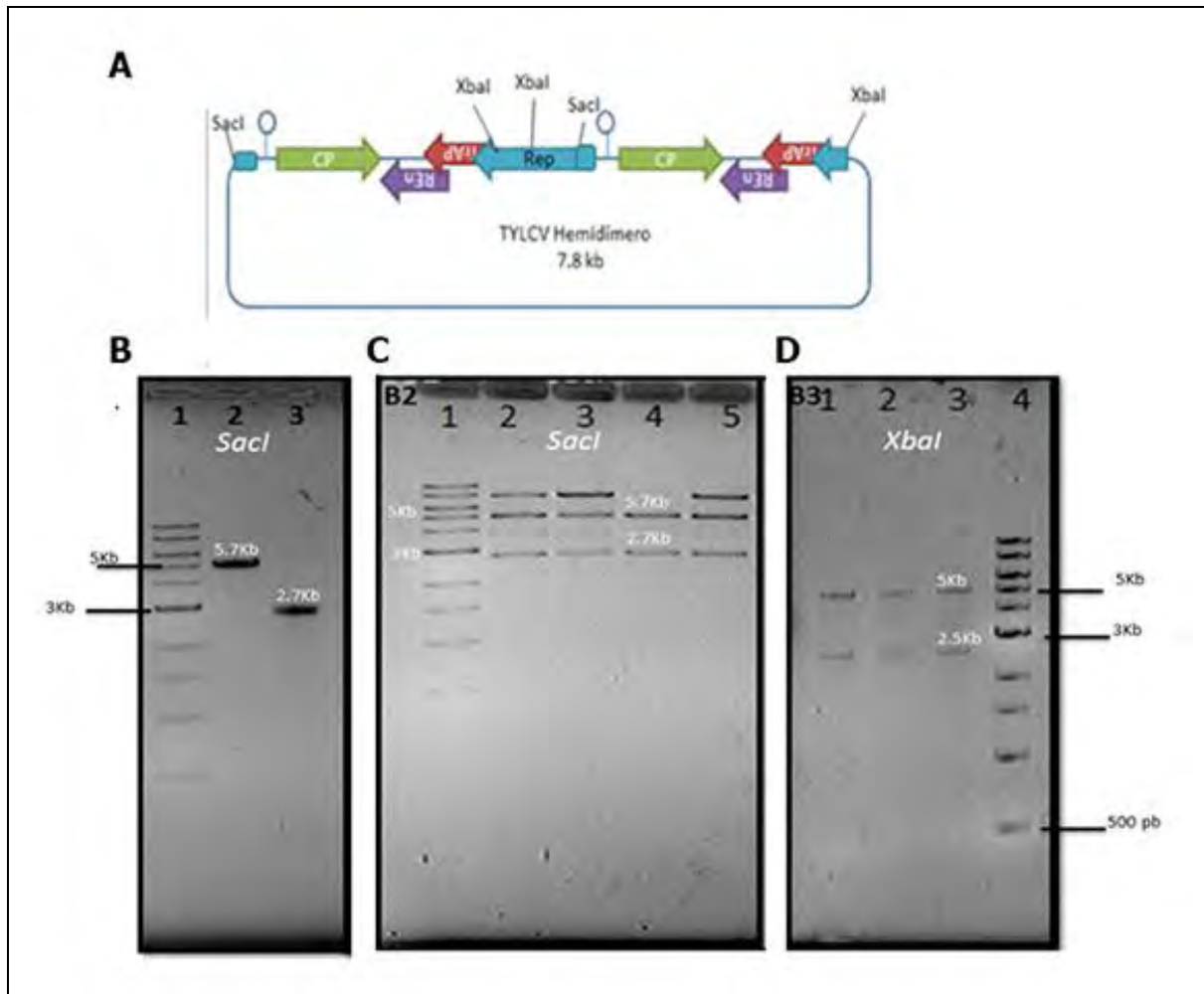


Figura 6. Hemidímero de TYLCV-IL[SLP] 1.7.

A) Representación esquemática de la construcción hemidimérica. B1). En el carril 1 la digestión con *SacI* de la construcción que contiene TYLCV-IL[SLP] 0.7 y en el carril 2 del monómero de TYLCV-IL[SLP] B2) patrón de digestión con *SacI* de los minipreps de la construcción del hemidímero la cual genera un patrón que une las construcciones originales. B3) Digestión con *XbaI* para verificar la orientación del componente viral completo en el hemidímero de TYLCV-IL[SLP].

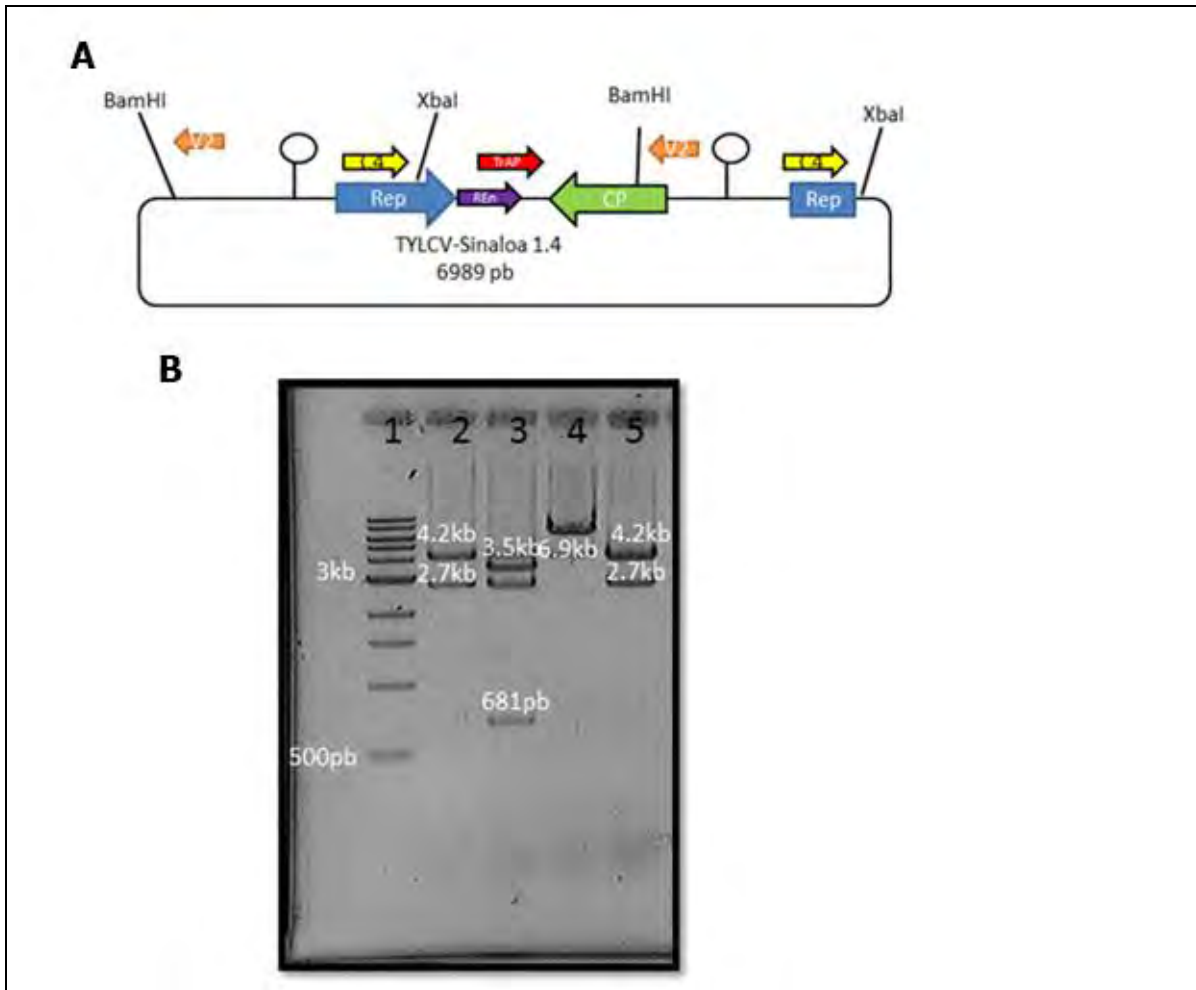


Figura 7. Hemidímero de TYLCV-IL[*Sin*].

A) Representación esquemática del hemidímero de *tylcv* Sinaloa. B) gel con patrones de digestión. Carril 1) marcador de peso molecular, 2) XbaI, 3) SacI, 4) KpnI, 5) BamHI. El peso molecular de cada fragmento se encuentra escrito en blanco. Todos corresponden al tamaño esperado.

IV.5.-Generación de vectores de expresión con las IR begomovirales.

La región intergenica de cada uno de los virus del estudio se amplificó por PCR con oligonucleótidos diseñados en base a la secuencia de la base de datos GenBank. Los primers tienen una secuencia de corte TCTAGA la cual es reconocida como blanco por la enzima *Xba*I. Esto nos permite clonar el producto de PCR en pBSxGUS, el cual es un pBlueScript donde se clono previamente el gen reportero uidA (GUS) y la secuencia terminadora de la nopalina sintasa. Los primers fueron diseñados para que los primeros aminoácidos de las proteínas que flanquean la región promotora estén en fase con el marco abierto de lectura del gen reportero.

La orientación de la IR insertada corriente arriba de GUS se determinó por digestión con enzima *Xba*I. En la **Figura 8** se muestra los amplicones obtenidos, así como la comprobación por PCR y digestión de las clonas. Las regiones intergénicas fueron clonadas en pBSxGUS en ambas orientaciones (C1::GUS; V1::GUS) Fueron comprobadas por PCR, patrón de digestión y secuenciación. Los resultados de la secuenciación y la fusión traduccional de los primeros aminoácidos de cada proteína (C1 /V1) con el gen reportero se muestran en la **tabla 3**.

Las construcciones fueron utilizadas en los ensayos fluorimétricos de actividad enzimática de la beta-glucoroindasa (uidA/GUS). Las construcciones pBS35sxGUS y pBSxGUS se manejaron como control positivo y negativo, respectivamente.

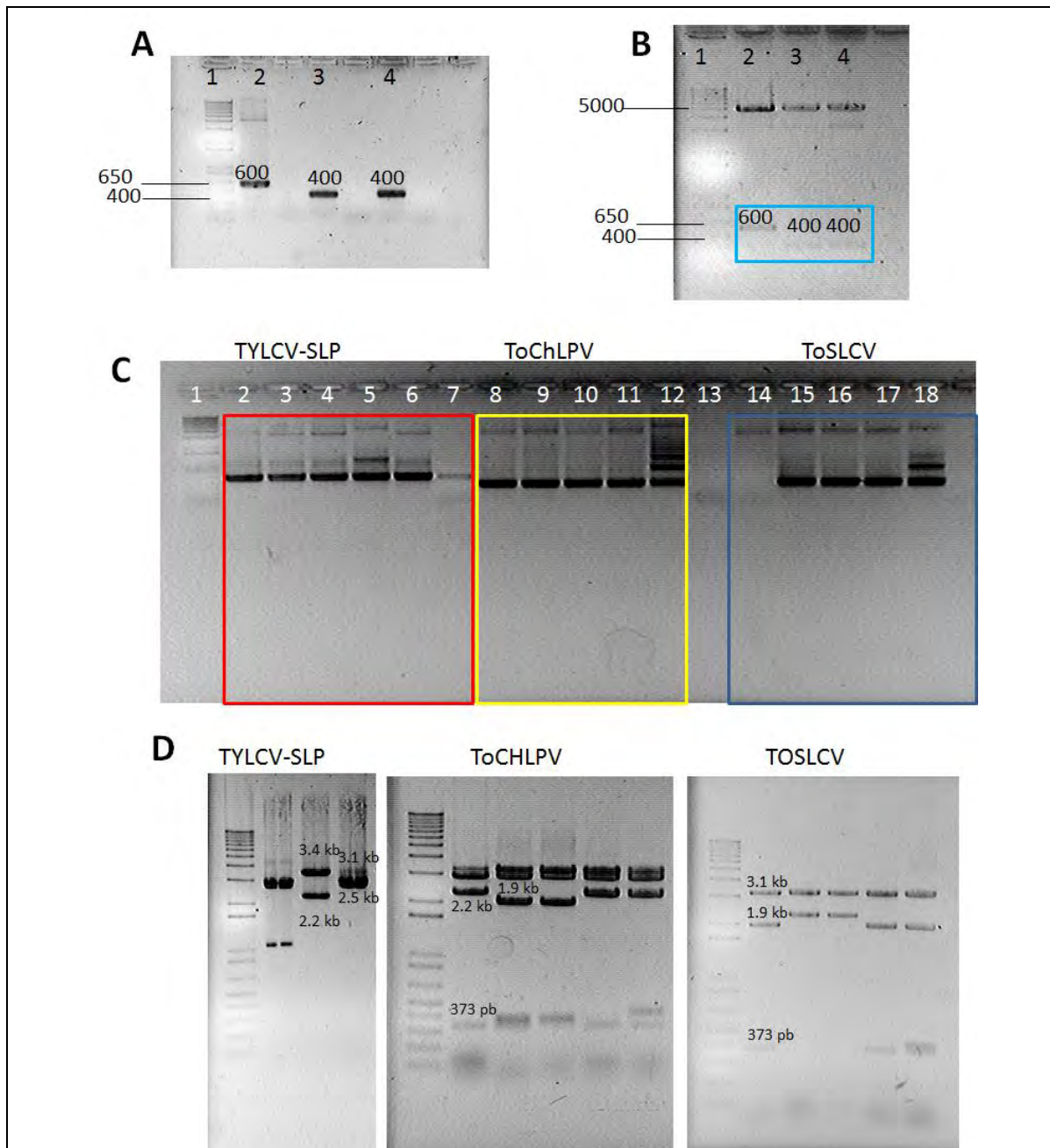


Figura 8. Amplificación y clonación en pBSxGUS de las IR de TYLCV-IL[SLP], ToChLPV y ToSLCV. Comprobación por PCR y determinación de la orientación del promotor.

A) Amplificación de las IR begomovirales. los carriles 2, 4 y 6 corresponden al amplicón de la IR de TYLCV-IL[SLP], ToChLPV y ToSLCV mientras que 3, 5, y 7 son los controles negativos. **B)** La digestión de los vectores de expresión; la banda correspondiente al vector pBSxGUS (5 kb) y las regiones intergénicas clonadas (Abajo) carril 2, 3, y 4 corresponden a IR de TYLCV, ToChLPV, y ToSLCV respectivamente. **C)** PCR de las clonas transformadas las cuales amplifican la IR de cada virus. **D)** patrón de digestión diferencial entre las clonas en orientación de Rep y CP de cada virus (para TYLCV se utilizó la enzima *ApaI*. Para ToChLPV y ToSLCV, *SacI*).

Tabla 3 Resultados de secuenciación y secuencias de aminoácidos -

Construcción	Secuencia de nucleótidos
SLP Rep	ATGCCTCGTTTATTTAAAATATATGCCAAAAATTATTTCTAACA TATCCCAATTGTTCTCTCTCTAGAGGATCCCCGGGTGGTCAGT CCCTTATGTTACGTCCTGTA...
SLP CP	ATGTCGAAGCGACCAGGCGATATAATCATTTCACGCCCTCTA GAGGATCCCCGGGTGGTCAGTCCCTTATGTTACGTCCTGTA...
SIN Rep	ATGCCTCGTTTATTTAAAATATATGCCAAAAATTATTTCTAACA TATCCCAATTGTTCTCTCTCTAGAGGATCCCCGGGTGGTCAGT CCCTTATGTTACGTCCTGTA...
SIN CP	ATGTCGAAGCGACCAGGCGATATAATCATTTCACGCCCTCTA GAGGATCCCCGGGTGGTCAGTCCCTTATGTTACGTCCTGTA...
ToCH Rep	ATGCCCTTAGTTCCAAAGAGGTTTCTAGAGGATCCCCGGGT GGTCAGTCCCTTATGTTACGTCCTGTA...
ToCH CP	ATGCCTAAGCGGGATGCCCGTGCGTTTATCTAGAGGATCC CGGGTGGTCAGTCCCTTATGTTACGTCCTGTA...
ToS-Rep	ATGCCACGGAACCCTCTAGAGGATCCCCGGGTGGTCAGTCC CTTATGTTACGTCCTGTA
Construcción	Secuencia de aminoácidos
SLP-REP	MPRLFKIYAK N YFLTYPNCSLSRGSPGGQSLMLRPV...
SLP-CP	MSKRPGDIIIISTPSRGSPGGQSLMLRPV...
SIN-REP	MPRLFKIYAKNYFLTYPNCSLSRGSPGGQSLMLRPV...
SIN-CP	MSKRPGDIIIISTPSRGSPGGQSLMLRPV...
ToCH-REP	MPLVPKRFSRGSPGGQSLMLRPV...
ToCH-CP	MPKRDAPWRLSRGSPGGQSLMLRPV...
ToS-REP	MPRNPSRGSPGGQSLMLRPV...

En rojo y en verde se muestran los nucleótidos de los genes Rep/C1 y CP /M1 respectivamente de cada virus, subrayado el sitio XbaI, en negro y cursiva los nucleótidos del vector y en azul los nucleótidos que corresponden al gen de GUS. Secuencias de aminoácidos generados por la fusión traduccional. en rojo y en verde se muestran los aminoácidos pertenecientes a las proteínas Rep y CP respectivamente, en negro los aminoácidos generados entre la proteína viral y el gen reportero y en azul los aminoácidos pertenecientes a GUS.

IV.6.-Ensayos cuantitativos de expresión de GUS bajo el control de los promotores begomovirales en protoplastos NT1.

Para determinar los niveles de expresión de los promotores begomovirales se usó un método fluorométrico utilizando 4-methylumbelliferilgalactopiranosido (MUG) como sustrato. Las lecturas fueron realizadas en placa opaca Microlon utilizando el fluorómetro GENios by Tecan.

Las lecturas obtenidas fueron normalizadas con el blanco (protoplastos electroporados solo con el plásmido con el gen GUS carente de promotor). El triplicado con los datos crudos de cada lectura se encuentran graficados en la **figura 9**.

Se promediaron las 3 lecturas, se calculó la desviación estándar y mediante un ANOVA con un CI de 95% se determinó que existía diferencia significativa entre cada tratamiento (construcción electroporada), por medio de un t-test por parejas se determinó cuales tienen diferencias significativas entre sí. Las barras que comparten el mismo color no mostraron diferencia significativa entre ellas.

En la **figura 10** se presentan gráficamente el promedio de las lecturas obtenidas con los promotores CP begomovirales contra el del 35S de CaMV; lo mismo para los promotores de Rep en la **figura 11**. Todos los datos fueron graficados en la **figura 12**. Para cada grafica se utilizó ANOVA y t-test para determinar las diferencias estadísticas de los datos.

Los datos sugieren que los promotores *Rep* tienen, en ausencia de proteínas virales, una actividad mayor que los de *CP*; con excepción de TYLCV-IL[SLP] donde el promotor *Rep* exhibió una actividad menor que la del gen CP. Los promotores *Rep* y *CP* de TYLCV-IL [SIN] y *CP* de TYLCV-IL [SLP] mostraron una actividad mayor que el promotor 35S, como se puede observar en la **figura 12**.

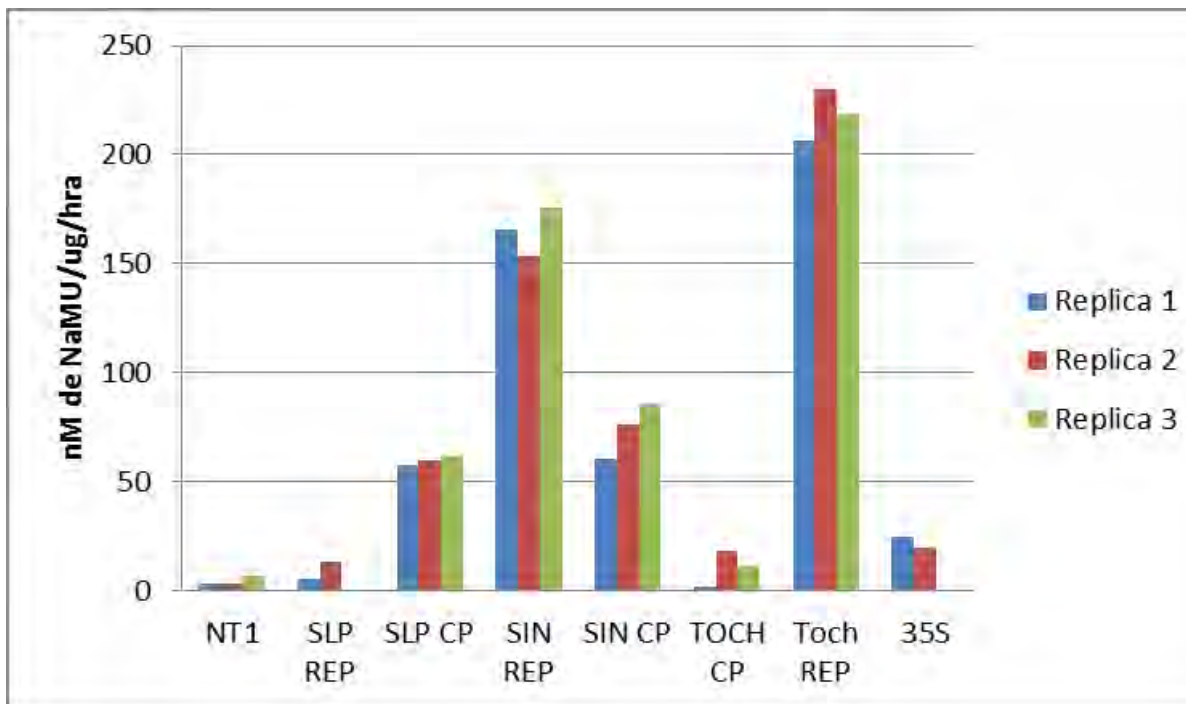


Figura 9. Datos de tres experimentos independientes (con 3 muestras leídas en cada caso) de actividad de GUS de los promotores begomovirales.

En los 3 experimentos independientes se utilizó la misma cantidad de DNA para electroporar. La grafica siguiente muestra los datos de los 3 experimentos independientes de nM de NaMu generados por μg de proteína por hora.

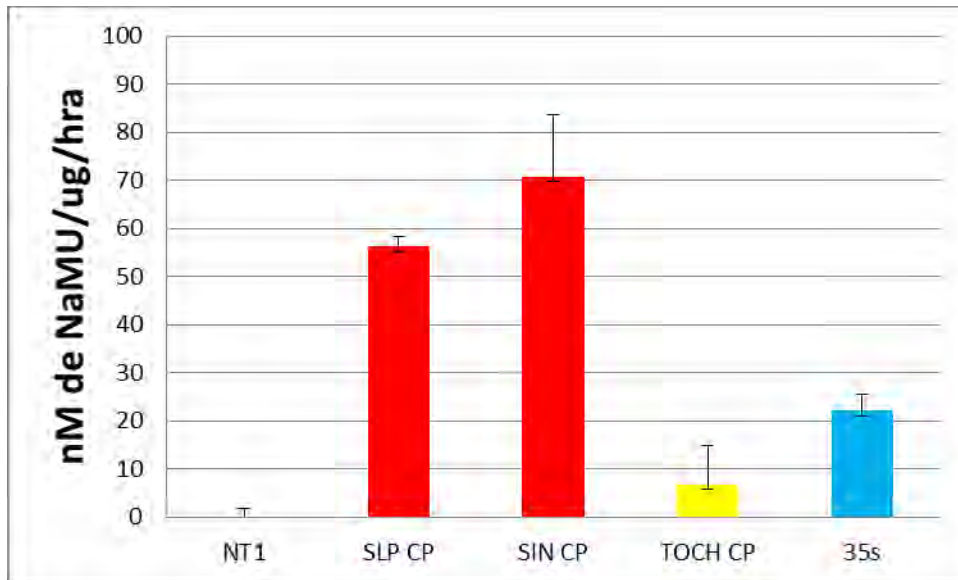


Figura 10. Actividad funcional de los promotores de CP begomovirales.

La grafica muestra el promedio de cada construccion de los promotores en orientacion de CP electroporada, las barras indican la DS

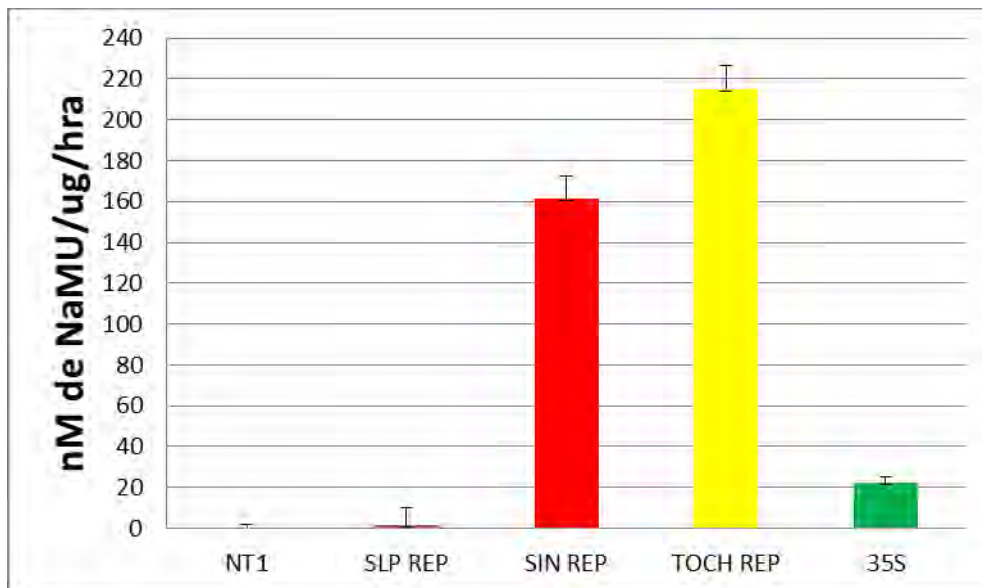


Figura 11. Actividad funcional de los promotores de Rep begomovirales.

La grafica muestra el promedio de cada construccion de los promotores en orientacion Rep electroporada; las barras indican la DS

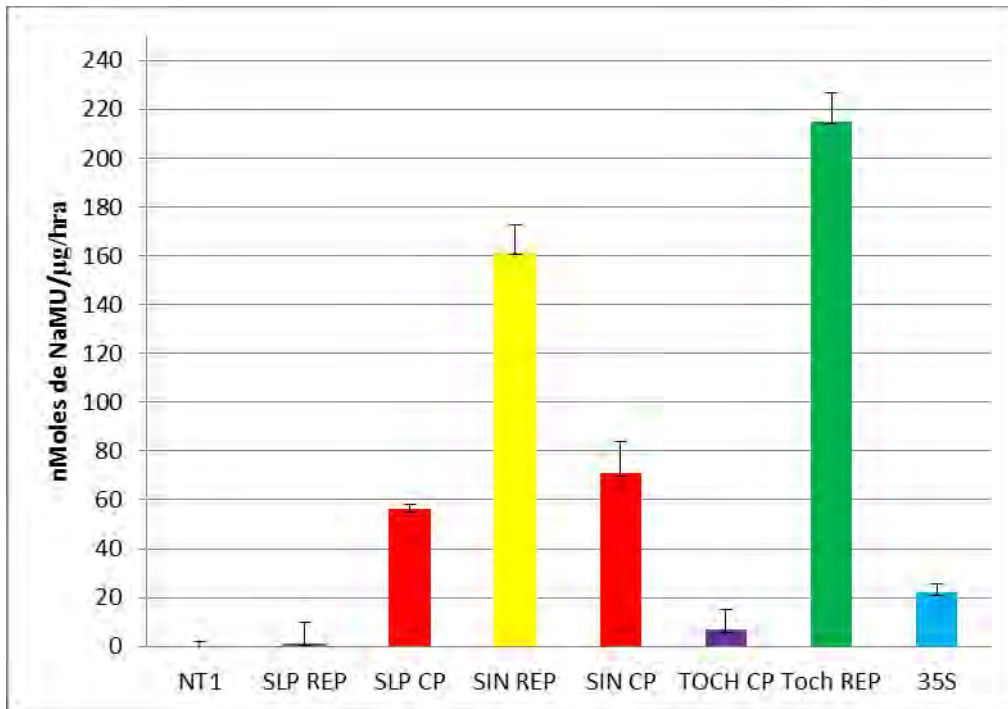


Figura 12. Promedio de la actividad funcional de los promotores begomovirales.

Por medio de ANOVA con CI 95% se determinó que existía diferencia significativa entre tratamiento (Generación de NaMU a partir de MUG extracto crudo de los protoplastos electroporados con las distintas construcciones). Se utilizó un test-t por parejas para determinar cuales tienen o no diferencias significativas entre si. Barras del mismo color representa que no tienen diferencia significativa. Las barras indican la DS

IV.7.-Evaluación cualitativa de actividad funcional de los promotores begomovirales en protoplastos.

Para evaluar la expresión de GUS en protoplastos NT1, se optó por utilizar un método colorimétrico utilizando X-Gluc como sustrato. El procedimiento de electroporación fue el mismo que se utilizó en los experimentos fluorimétricos.

En la **figura 13** se puede observar que a nivel macroscópico es detectable la tinción de GUS en los protoplastos electroporados con la construcción Rep-ToCH. La diferencia con los protoplastos transfectados con el promotor Rep de TYLCV-IL[*Sin*], el segundo más fuerte de los probados en este estudio, que no aparecen claramente teñidos como los de Rep-ToCH., no guarda la proporción esperada a partir de las mediciones de actividad de GUS por fluorometría. Esta observación se repitió en un experimento subsecuente, previa verificación de la identidad de las construcciones por secuenciación.

Utilizando el microscopio Zeiss Axio Imager M2 en campo claro, se obtuvieron las micrografías de los protoplasto electroporados con cada construcción; en la **figura 14** con pBS35SxGUS y pBSXGUS, en la **figura 15** con SLP-Rep, la figura 16 con SIN-Rep y la **figura 17** con la construcción ToCH-Rep. Se contaron el número de protoplastos teñidos por cada campo y se promediaron; los datos se pueden encontrar en la **tabla 4**.

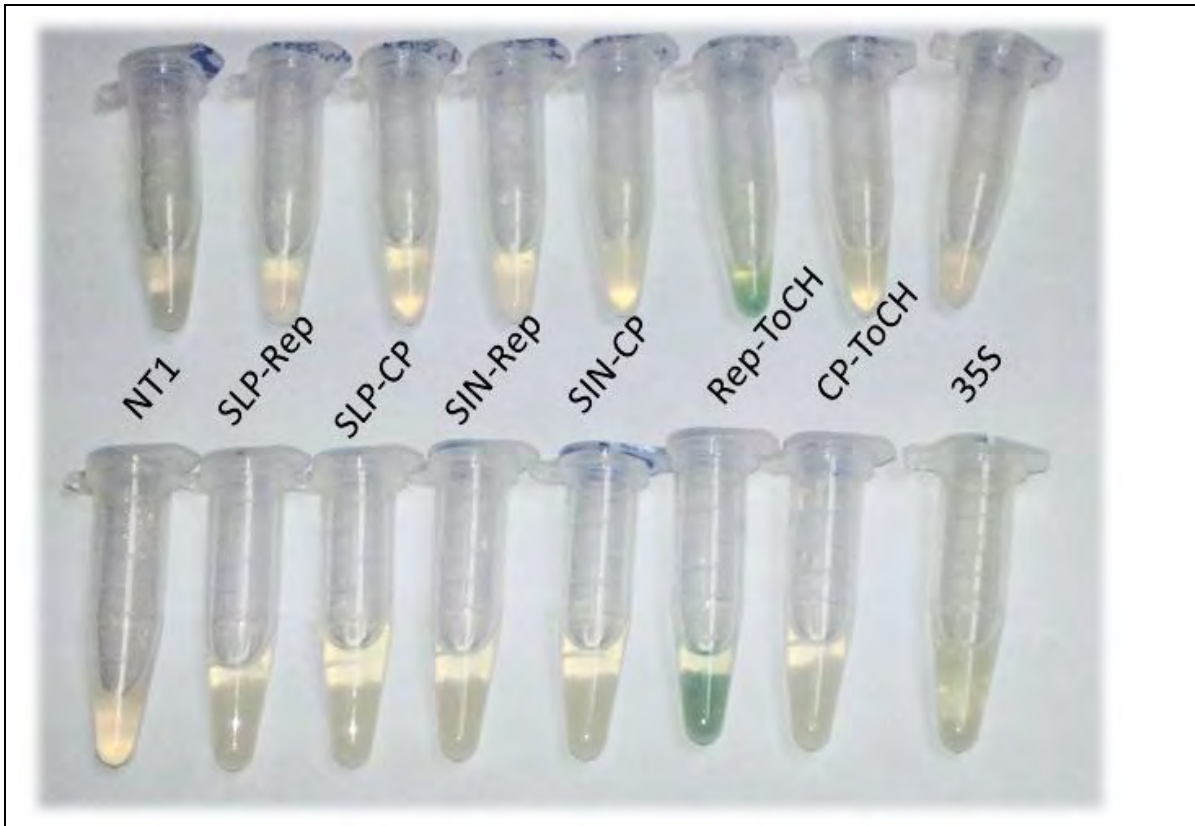


Figura 13. Evaluación cualitativa con X-Gluc de la actividad de los promotores begomovirales en protoplastos NT1.

En cada tubo se colocaron las células colectadas 48 horas después de la electroporación en buffer de tinción de X-Gluc en completa oscuridad a 37°C durante 16 horas. Los protoplastos transformados con la construcción que contenía el promotor de Rep del virus ToChLPV fueron los únicos que generaron una tinción azulada notoria macroscópicamente. Los resultados son de dos experimentos independientes.

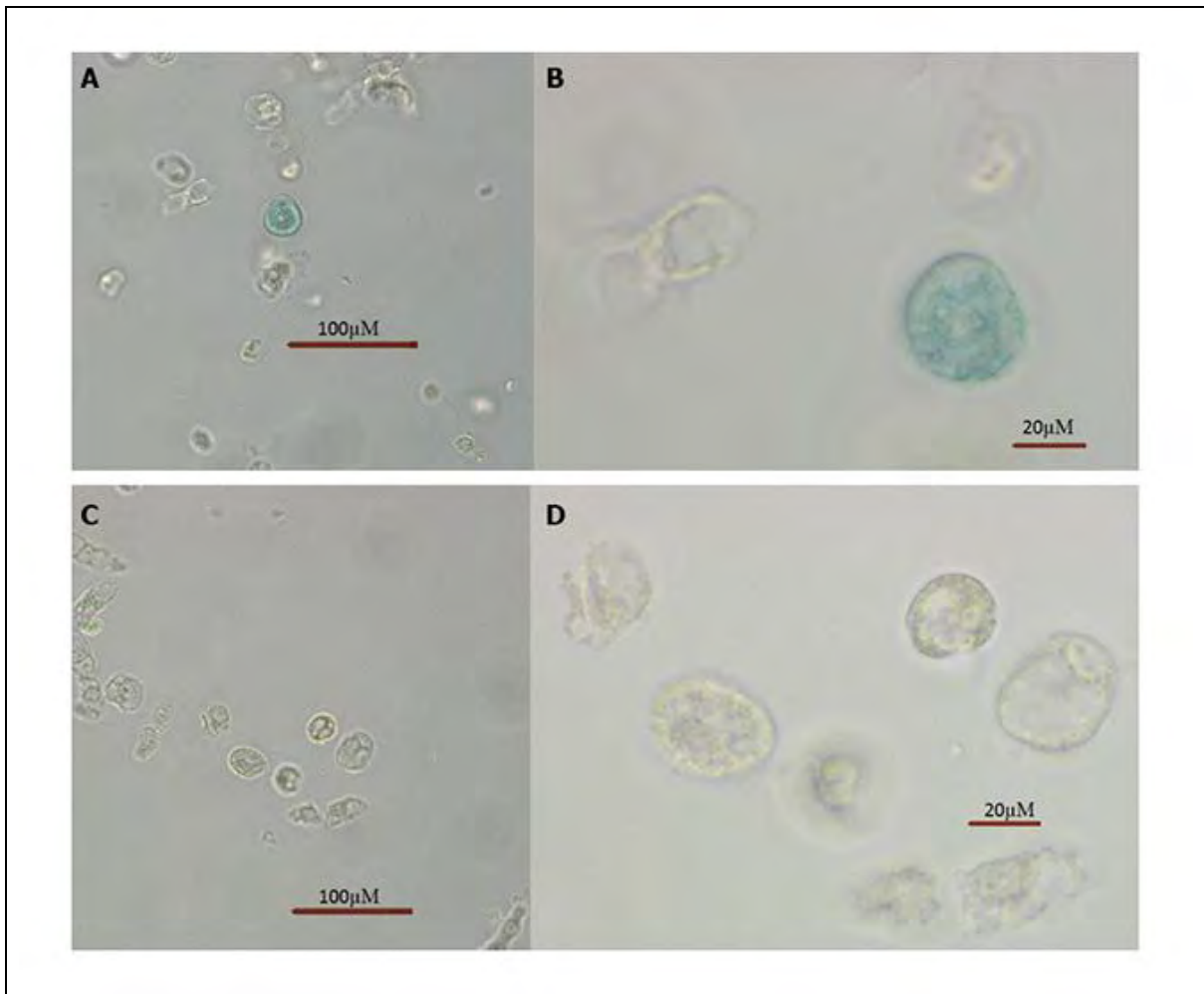


Figura 14. Microscopia de campo claro de protoplastos NT1 electroporados con pBS35SxGUS y pBSXGUS.

Fotografías de protoplastos electroporados con la construcción pBS3SxGUS. A)10X B)40X. en marrón la barra de tamaño, Fotografías de protoplastos electroporados con la construcción pBSXGUS, C) 10X y D) 40X .en marrón la barra de tamaño. Los protoplastos electroporados mostraron una coloración azulada; a diferencia del control negativo. Esta prueba demuestra que la actividad de GUS puede ser detectada mediante el método de tinción con X-Gluc; además de que la coloración azulada solo cuando el gen reportero se encuentra bajo un promotor de planta (35S).

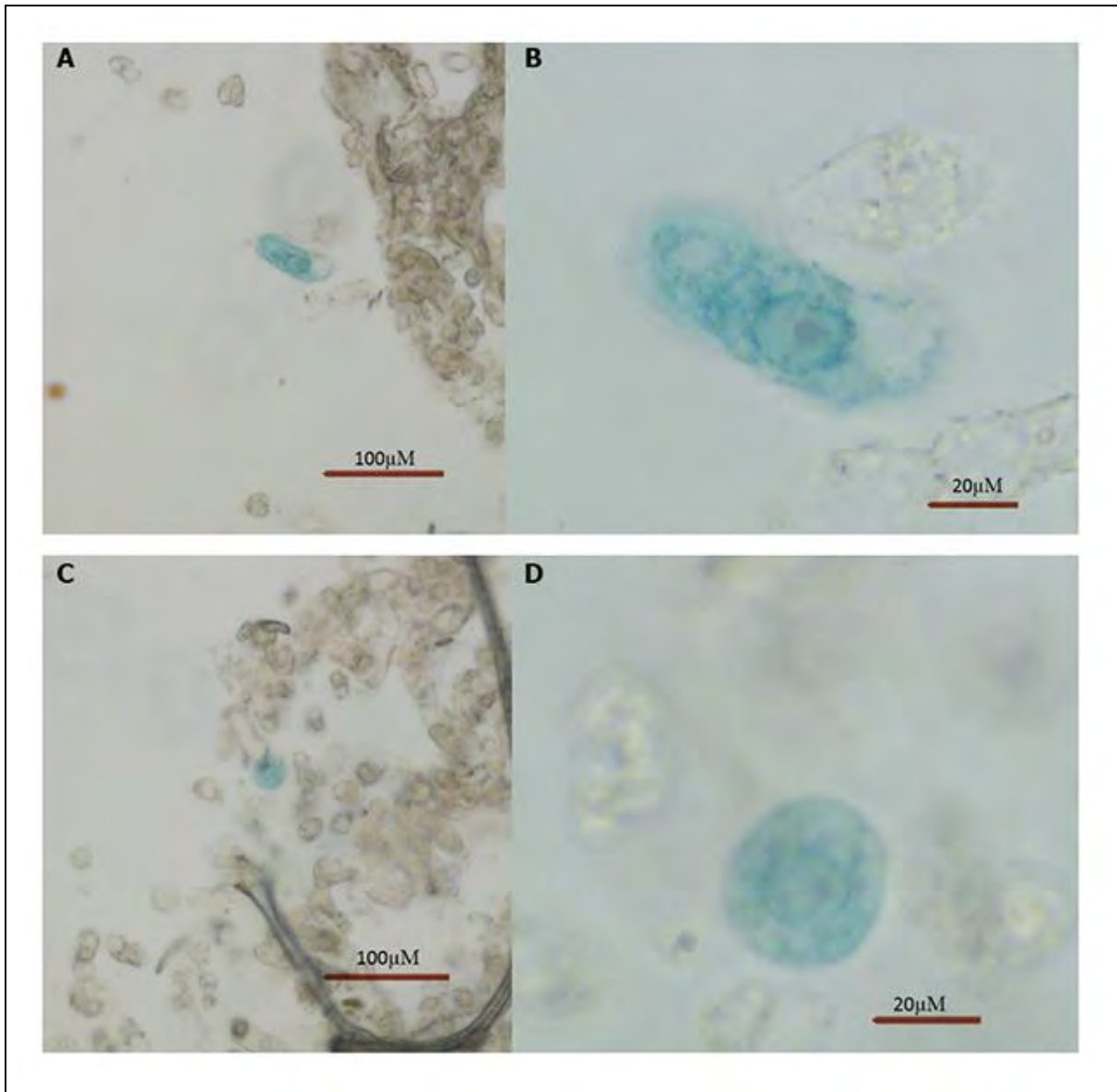


Figura 15. Microscopia de campo claro de protoplastos NT1 electroporados con la construcción TYLCV SLP-Rep.

Fotografías de protoplastos electroporados con la construcción SLP-Rep. A) 10X B) 40X. En marrón la barra de tamaño; los protoplastos electroporados mostraron una coloración azulada.

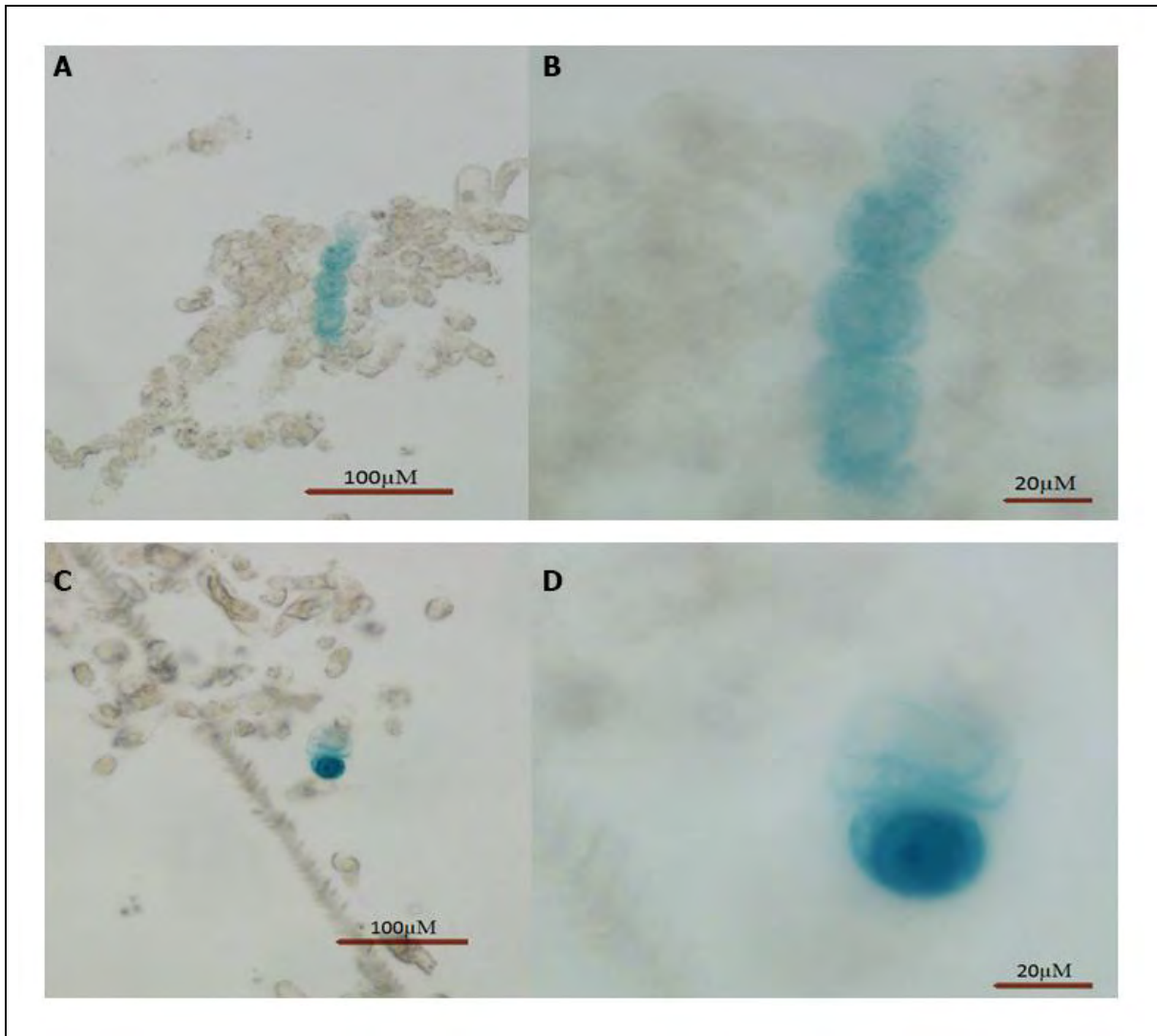


Figura 16. Microscopia de campo claro de protoplastos NT1 electroporados con la construcción TYLCV SIN-Rep.

Fotografías de protoplastos electroporados con la construcción promSIN-Rep. A)10X B)40X; en marrón la barra de tamaño. Los protoplastos electroporados mostraron una coloración azulada más fuerte que los protoplastos electroporados con SLP-Rep. Se observó una proporción ligeramente mayor de protoplastos teñidos comparado con los protoplastos electroporados con SLP-Rep.

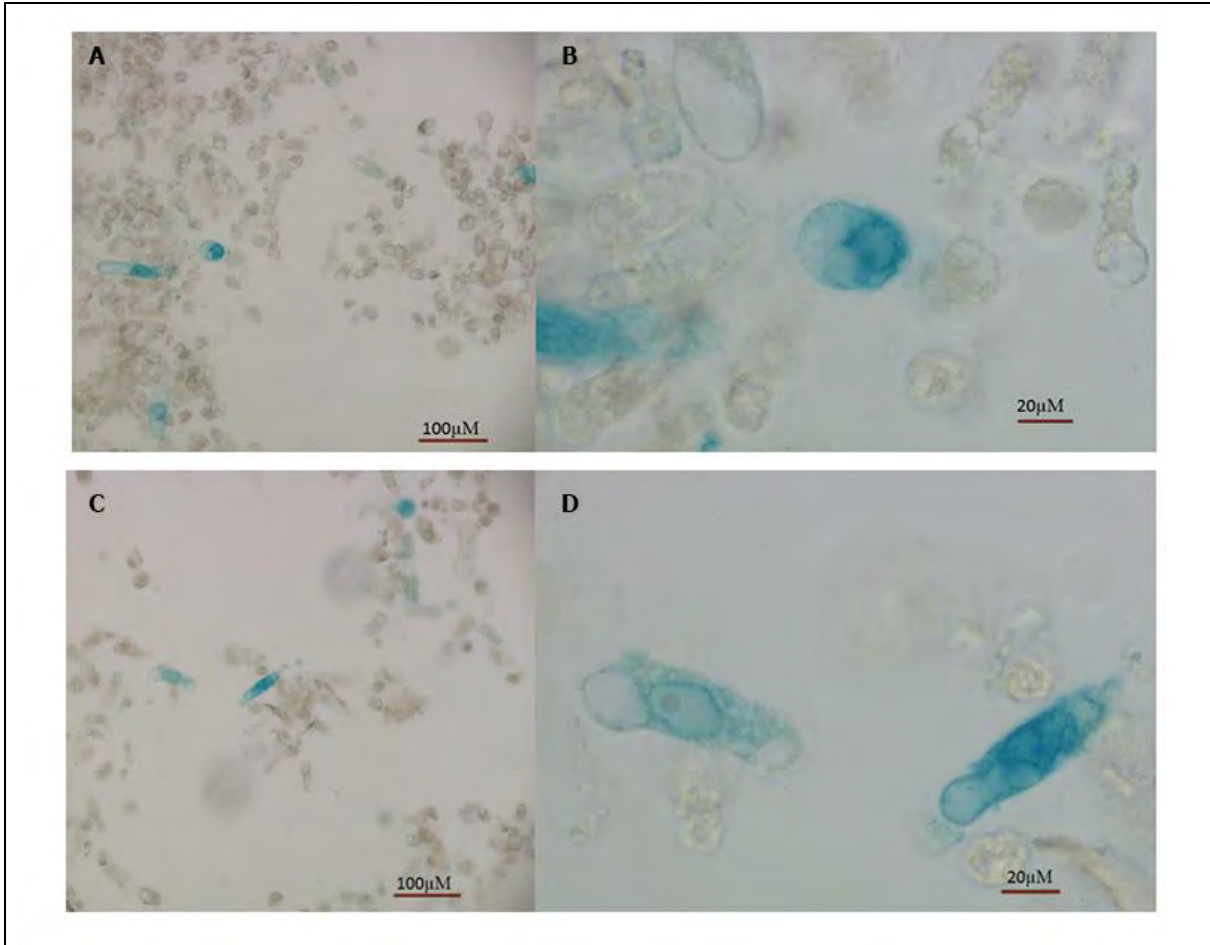


Figura 17. Fotografías de protoplastos electroporados con la construcción ToCH-Rep.

En los protoplastos electroporados con la construcción ToCH- Rep se observó una mayor densidad de protoplastos teñidos comparado con los protoplastos electroporados con las otras construcciones del estudio.

Tabla 4 Resultados de los conteos de protoplastos teñidos con X-Gluc por campo.

Construcción	Campos	Protoplastos teñidos	Promedio
pBS35SXGUS	7	8	1.1
pBSXGUS	7	0	0
Rep-SIN	12	24	2
Rep-SLP	11	13	1.1
ToCH-Rep	8	38	4.7

Se contabilizaron los protoplastos que fueron teñidos con X-Gluc, de los campos obtenidos de las microscopias de campo claro obtenidas con el microscopio Zeiss Axio Imager M2. La densidad de protoplastos teñidos con X-Gluc fue mayor en aquellos electroporados con la construcción ToCH-Rep, con un promedio de 4.7 protoplastos teñidos por campo; en comparación con pBS35SXGUS, con 1.1 protoplastos teñidos por campo (Tabla 4).

IV.8.-Plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con la construcción hemidimerica TYLCV- IL [SLP] 1.7 clonada en pBI121MCS.

La clona hemidimerica clonada en pBlueScript, fue subclonada en pBI121MCS (una versión modificada del plasmido pBI121 donde el promotor 35s, el gen GUS y el terminador NOS fueron remplazados por un sitio múltiple de clonación). La construcción fue digerida con la enzima PvuII, la cual genera extremos romos compatibles con el sitio SmaI donde fue subclonada en el pBI121.

Se agroinfiltraron las plantas de la siguiente manera:

7 plantas con TYLCV- IL [SLP] 1.7.

3 plantas con pBI121SMC.

3 planta con GV3101.

1 planta solo con buffer de agroinfiltración

Los síntomas aparecieron 13 días después de la inoculación en plantas agroinfiltradas con la cepa de agrobacterium GV3101 que fueron transformadas con las construcciones TYLCV-IL [SLP] 1.7.

En la **figura 18** se muestran la zona apical de las plantas agroinfiltradas con TYLCV-IL [SLP] 1.7 y un control.

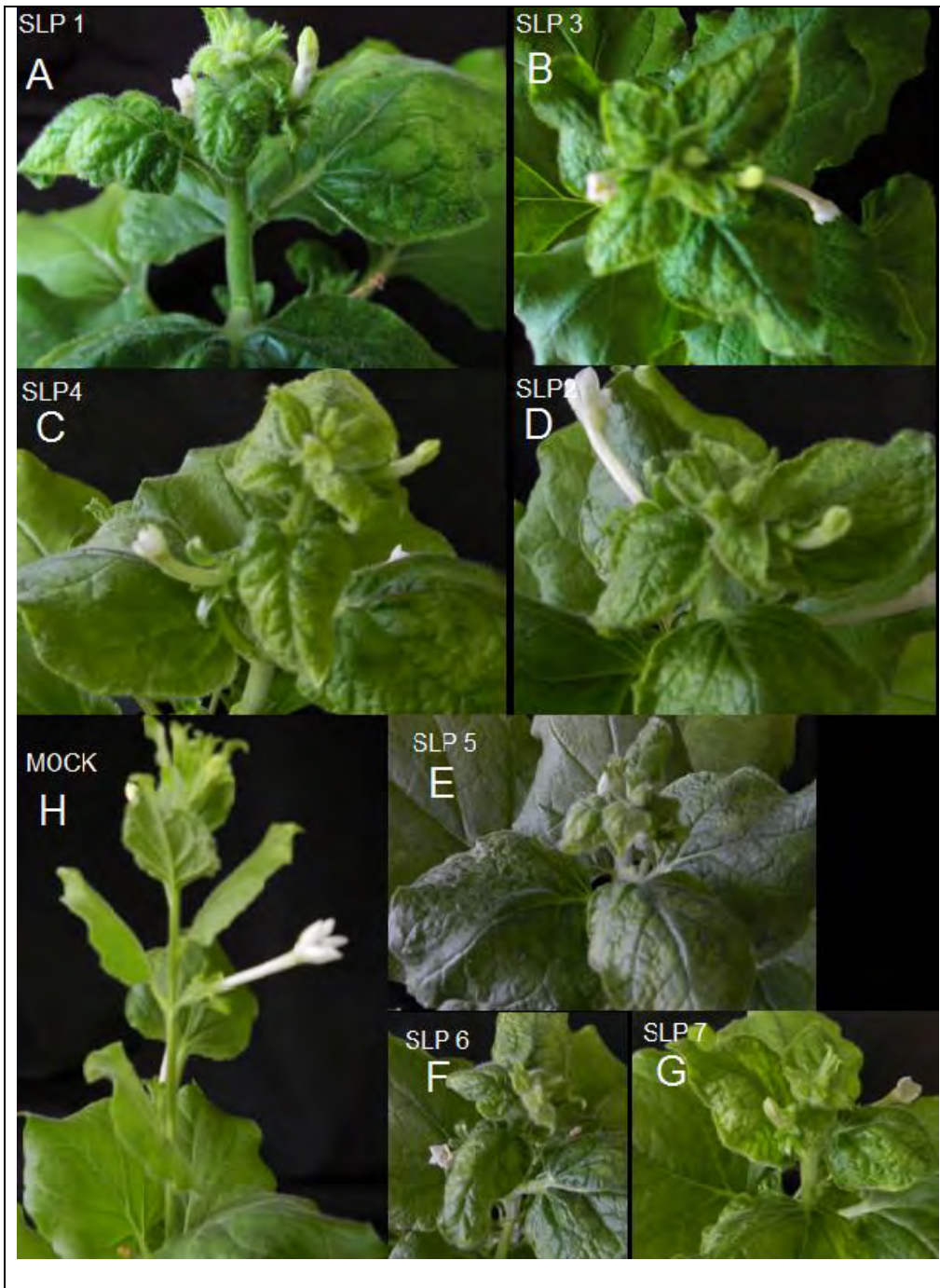


Figura 18. Plantas inoculadas con hemidímero de TYLCV-IL[SLP] 1.7.

De A) a G) Plantas de *N. benthamiana* agroinfiltrada con la construcción hemidimérica de TYLCV-IL[SLP] 1.7. H) Planta de *N. benthamiana* agroinfiltrada solo con buffer de agroinfiltración, las fotografías fueron tomadas a los 20 días después de la inoculación (dpi).

IV.9.-Detección de TYLCV-IL [SLP] en las plantas inoculadas.

Para confirmar la presencia y replicación activa e infectividad de TYLCV-IL [SLP] en tejido nuevo de las plantas inoculadas, Extractos de DNA de las plantas agroinfiltradas fueron utilizados como plantilla para una reacción de PCR; utilizando 2 pares de primers degenerados diseñados en nuestro laboratorio. El primer par de primers son Rep-DGRforward y YMAC-Nreverse, cuyo amplicón de ~1.5kb contiene casi en su totalidad el gen de CP, la IR completa y una región parcial de Rep, mientras que YMAC-Nforward y Rep-DGRreverse generan un amplicón de ~1.2 kb, que incluye versiones parciales de los genes Rep, C4 y Cp como la totalidad de los genes C2 y C3. La obtención de ambos amplicones provenientes del mismo extracto de DNA de hojas nuevas correspondería a que el virus es capaz de replicarse y desplazarse, y por tanto, es capaz de generar una infección sistémica. En la **figura 19** se presenta los resultados del PCR de cada planta.

IV.10.-Influencia en el crecimiento de las plantas agroinfiltradas con TYLCV-IL [SLP] VS plantas control.

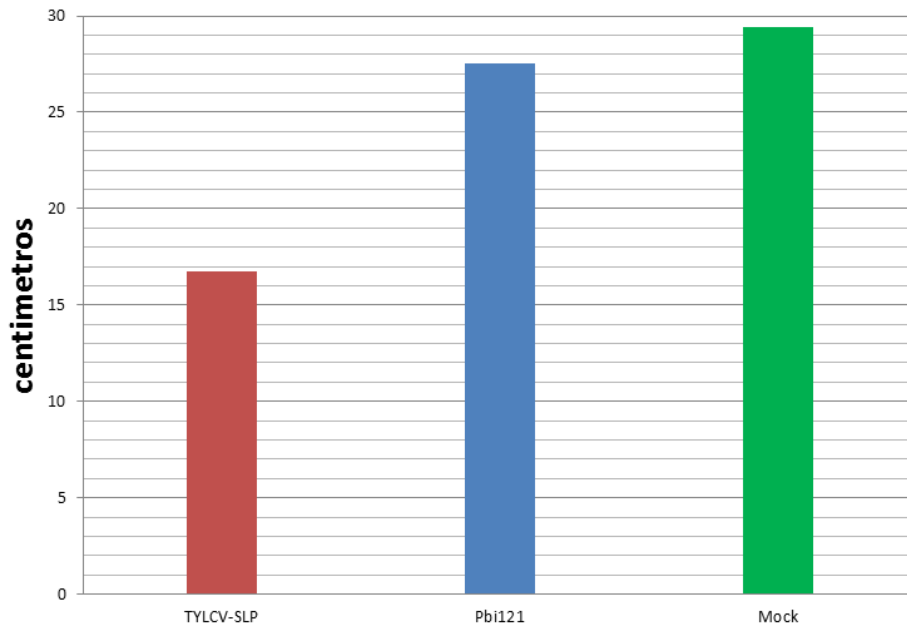
Las plantas agroinfiltradas con la clona hemidimerica presentaron síntomas característicos de las infecciones por TYLCV-IL, como el rizado foliar y un retraso en su crecimiento. Las plantas infectadas presentaron un menor tamaño que las plantas control como puede apreciarse en la **figura 20**.

Para determinar si esta diferencia de tamaño entre la planta infectada y el control es estadísticamente significativa, se midieron las plantas de este experimento desde donde brotan las hojas dicotiledóneas hacia el ápice. Los datos obtenidos de cada planta fueron promediados y graficados para su posterior análisis mediante ANOVA y utilizando el método comparativo de Tukey como se muestra en la **figura 21**. Las plantas control en promedio midieron entre 27-29 cm de altura, mientras que las plantas que presentaron los síntomas tenían un promedio de ~16cm.



Figura 20. Comparación del crecimiento entre la planta agroinfiltrada con la construcción hemidimérica de TYLCV-IL[SLP] y el control.

La planta agroinfiltrada con la construcción hemidimérica de TYLCV-IL[SLP] (izquierda) en comparación del control (derecha) la cual fue agroinfiltrada con agrobacterium que alberga al plásmido pBI121 sin la clona viral.



Anova utilizando el método comparativo de Tukey con un CI de 95%

Factor	N	Media	Grupo
Mock	4	29.38	A
pBI121	7	27.53	A
SLP	7	16.73	B

Medias que no comparten la misma letra son significativamente diferentes.

Figura 21. ANOVA de las plantas agroinfiltradas con la clona hemidimerica de TYLCV-IL[SLP] y las plantas control utilizando el método comparativo de Tukey

V.-Discusión

Los promotores son regiones de DNA no codificantes que regulan la expresión de genes. Es importante identificar y caracterizar nuevos elementos reguladores y promotores con potencial valor biotecnológico. La región intergénica (IR) de los virus que integran la familia *Geminiviridae* contiene secuencias que regulan la expresión de los genes tempranos y tardíos. El estudio de estas regiones nos permite identificar y caracterizar funcionalmente las secuencias involucradas en la transcripción de los genes virales en la plantas. La IR es la región más variable del genoma de los miembros de esta gran familia viral, y previsiblemente constituye una valiosa fuente de potenciales elementos reguladores para la agrobiotecnología. No sorprende, por tanto, que el interés por los promotores de origen geminiviral se haya acrecentado en los últimos años, lo que ha conducido al descubrimiento y caracterización funcional de promotores muy potentes; con una actividad varias veces superior a la del promotor 35S de CaMV; el promotor constitutivo más utilizado en biología molecular de plantas. Promotores como el del gen *Rep* del virus del rizado foliar del algodón de Burewala, fusionado al gen reportero GUS, mostró en hoja, tallo, y raíz de plantas transgénicas una actividad 3 veces más fuerte que el promotor 35S (Khan et al,2015) Datos similares fueron reportados en *Gossipium histrum*, *Vigna.unguiculata*, *Phaseolus .vulgaris*, y *V.radiata* (Ashraf et al,2014). Nuestros datos muestran una actividad del promotor *CP* de TYLCV-IL [SLP] y TYLCV-IL [SIN] de 2 a 3 veces mayor que el promotor 35S de CaMV en protoplastos de tabaco; esto es comparable con lo reportado en un estudio reciente donde se examinó la fuerza del promotor en orientación de los genes tardíos de un aislado de Egipto de TYLCV, tanto en plantas monocotiledóneas como en dicotiledóneas (tomate, sandía y arroz) (Abu El-Heba et al,2015).Por otra parte, nuestros resultados en los ensayos de expresión transitoria mostraron que el promotor ***Rep*** de TYLCV-IL [SIN], un aislado de Sinaloa con una identidad muy alta (~99%) con el aislado original de Israel, exhibe una actividad 6 veces más fuerte que el promotor 35S. En marcado contraste con esto, el promotor homólogo de TYLCV-

IL[SLP], con una región intergénica mutada, mostró una actividad muy débil, 15 veces más baja que la de TYLCV-IL [SIN].

Es importante hacer notar que la actividad del promotor 35S es comparativamente baja en células NT1, como fue previamente reportado por Allen et al. (1993) al utilizarlo en ensayos de expresión transitoria y estable fusionado al gen reportero GUS (Allen et al, 1993).

Bajo las condiciones experimentales de nuestro estudio la actividad de los promotores de *Rep* y *CP* de TYLCV-IL [SIN] y *CP* de TYLCV-IL [SLP] exhibieron, una actividad 6, 2.8 y 2 veces mayor, respectivamente, que el promotor 35S de CaMV (ver graficas de la **figura 10** y **figura 11**). Los datos sugieren que el promotor de *Rep* de ToChLPV posee una actividad todavía mayor que el de TYLCV-IL [Sin], 9-10 veces superior a la del promotor 35S. No obstante es necesario hacer ensayos *in planta* de estos promotores, ya que la actividad funcional de un promotor varía tanto de acuerdo a la especie de planta utilizada como del tipo de tejido donde se exprese.

El análisis mostró que existe una diferencia extraordinaria en la actividad del promotor *Rep* de TYLCV –IL [SLP] respecto al promotor homólogo del aislado de Sinaloa, muy probablemente debido a la delección de 29 nt dentro del promotor *Rep*. Esta disminución de la actividad no ocurre en el caso del promotor *CP*, ya que no existe diferencia estadísticamente significativa entre la actividad del promotor de *CP* de TYLCV-IL [SLP] y el mismo de TYLCV-IL [SIN]; por lo que la duplicación de 42 nt presente en el promotor de TYLCV-IL [SLP] (que contiene parte de la horquilla de replicación viral y un CLE) no parece afectar la fuerza de este promotor, al menos en ausencia de factores virales, como TrAP.

En la tinción histoquímica se observó la expresión de GUS en los protoplastos electroporados con las construcciones que contenían las IR begomovirales fusionadas con el gen reportero.

La inoculación por bombardeo con clonas monoméricas de TYLCV-IL[SLP] no produjo infección alguna; ya otros laboratorios han reportado la ineficacia de

clonas monoméricas de TYLCV para infectar plantas de tomate, e incluso de clonas diméricas (Lapidot *et al*,2007). Solo con el sistema de *Agrobacterium* parece que es eficaz la inoculación de este virus.

VI.- Conclusiones

La conclusión más importante de este trabajo es que la doble mutante natural de TYLCV-IL aislada en SLP y reportada por Bañuelos-Hernández *et al.*,(2012) posee un promotor Rep muy débil, comparado a la versión silvestre del virus, representada por TYLCV-IL [SIN]. Esta doble mutante es capaz de generar una infección en *N. benthamiana* con síntomas similares aunque menos severos que los reportados en otros estudios con TYLCV-IL.

VII.-Materiales y métodos

VII.1.-Plásmidos

Los plásmidos usados fueron pBlueScriptSK-(Stratagene™) pGEM-Teasy(Promega™) y pbi121. Endonucleasas de restricción fueron utilizadas según el fabricante (New England's BioLabs™, Fermentas™).

VII.2.-Plantas- Se utilizaron plantas de *Nicotiana benthamiana* y de *Solanum lycopersicum* (tomate)

VII.3.-Amplificación por PCR de las IR begomovirales

Las regiones intergenicas virales fueron obtenidas por PCR se utilizaron oligonucleótidos diseñados en base a la secuencia nucleotídica de cada virus. En

la **Tabla 2** se presentan los primers que se utilizaron para amplificar cada IR begomoviral.

Tabla 2. Primers utilizados para amplificar las IR de TYLCV, ToChLPV y ToSLCV

Primer	Secuencia	TA	Virus
C1Xtyl	CCGGTCTAGAGAGAGAACAATTGGGATATGTTAGG	56	TYLCV
V2Xtyl	GAGTCTAGAGGGCGTGGAATGATTATATCG	55	TYLCV
Rep-LP	GGCCTCTAGAAAACCTCTTTGGA ACTAAGGGC	58	ToChLPV
CP-LP	GGGCTCTAGATAAACGCCANGGGGCATCC	59	ToChLPV
RepSLX	GGCGTCTAGAGGGTTCCGTGGCATT TTTGTA	60	ToSLCV
V1SLX	CGGGTCTAGAGACATTAACGCCATGGGGCATCCC	62	ToSLCV

Las condiciones de PCR fueron:

Desnaturalización inicial	94°C/2 min	
Desnaturalización	94°C/ 1 min	} 28 ciclos
Alineamiento	55-60/ 30s	
Extensión	72°C/ 30S	
Extensión final	72°C/2min	

VII.4.-Ensayos de actividad de GUS

El análisis de la actividad funcional de los promotores begomovirales se realizó mediante la obtención de construcciones que contenían la IR en fusión con el gen reportero GUS .Posteriormente éstas construcciones fueron electroporadas en protoplastos de células en suspensión de *Nicotiana tabacum* de la línea celular NT1. En la **figura 4**, se esquematiza la metodología general empleada en el estudio para caracterizar la actividad funcional de los promotores begomovirales.

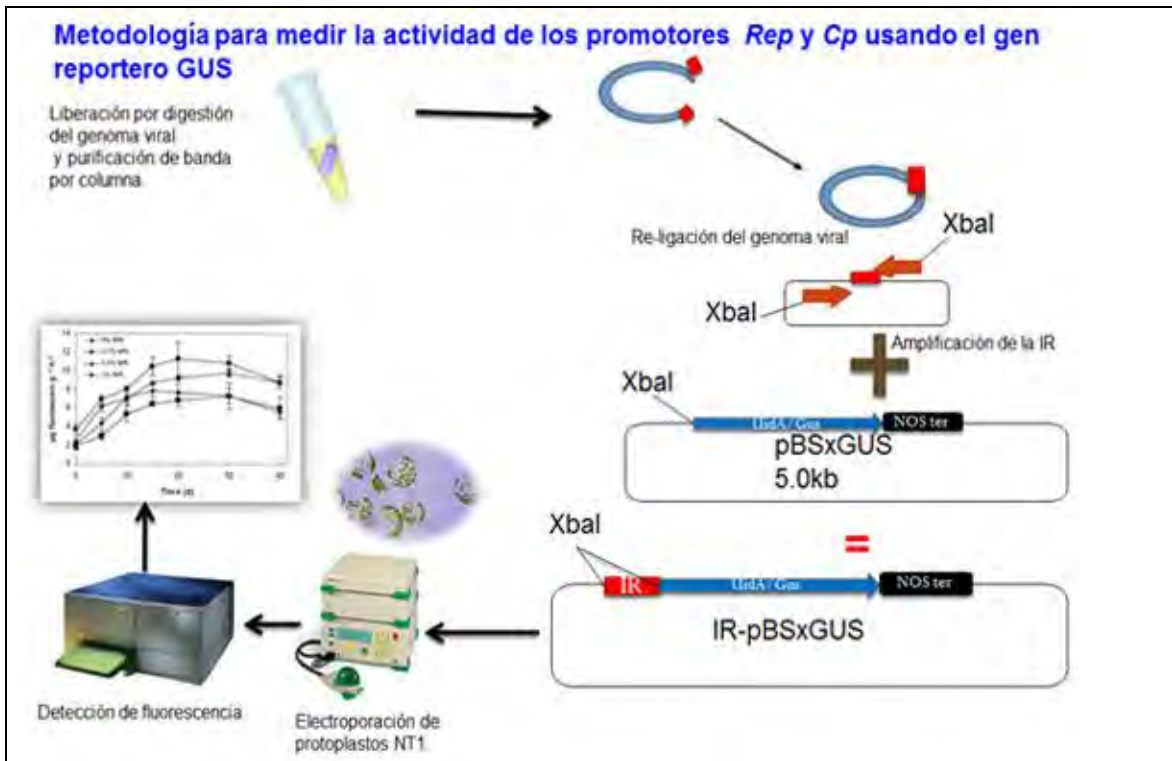


Figura 4. Metodología para la generación de vectores de expresión con los promotores begomovirales y medición de esta mediante fluorescencia.

VIII.-Referencias

1. Abu El-Heba GA, Hussein GM, Fahmy IF, Abdou SM, Faisal A, Taha O y Abdallah NA(2015) Impact of *cis*-acting elements' frequency in transcription activity in dicot and monocot plants. 3 Biotech.
2. Allen GC, Hall GE., Childs L, Weissinger AK, Spiker S, y Thompson WF(1993) Scaffold Attachment Regions Increase Reporter Gene Expression in Stably Transformed Plant Cells. *The Plant Cell*,5(6):603-613.
3. Anfoka G, Abhary M, Haj Ahmad F, Hussein AF, Rezk A, Akad F, Abou-Jawdah Y, Lapidot M, Vidavski F, Nakhla MK, Sobh H, Atamian H, Cohen L, Sobol I, Mazyad H, Maxwell DP y Czosnek H(2008) Survey of tomato yellow leaf curl disease-associated viruses in the eastern mediterranean basin. *Journal of Plant Pathology* , 90: 313-322
4. Argüello-Astorga GR y Ruiz-Medrano R. (2001) An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Archives of Virology* 146(8):1465–1485.
5. Arguello-Astorga GR, Herrera-Estrella LR, Rivera-Bustamante RF (1994) Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Molecular Biology*,26(2):553–556.
6. Arguello-Astorga GR, Lopez-Ochoa L, Kong L-J, Orozco BM, Settlege SB y Hanley-Bowdoin L (2004) A Novel Motif in Geminivirus Replication Proteins Interacts with the Plant Retinoblastoma-Related Protein. *Journal Of Virology*. 78(9): 4817–4826.
7. Argüello-Astorga GR;Guevara-González RG,Herrera-Estrella LR, Rivera-Bustamante RF(1994) Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: A model for replication. *Virology*, 203:90-100.
8. Argüello-Astorga, Guevara-González, Herrera-Estrella, y Rivera-Bustamante. (1994). Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology* 203. 90-100 .
9. Ashraf MA , Shahid AA, Rao AQ, Bajwa KS y Husnain T.(2014) Functional Characterization of a Bidirectional Plant Promoter from Cotton Leaf CurlBurewala Virus Using an Agrobacterium-Mediated Transient Assay. *Viruses*,6(1):223-242.
10. Bagewadi B, Chen S, Lal SK, Choudhury NR, y Mukherjee SK(2004) PCNA Interacts with Indian Mung Bean Yellow Mosaic Virus Rep and Downregulates Rep Activity. *Journal of virology*, 78(21):11890–11903.
11. Behjatnia, SAA, Dry IB, y Rezaian MA(1998) identification of the associated protein binding somain within the intergenic region of tomato leaf curl Geminivirus. *Nucleic Acids Research*, 26(4): 925-931.
12. Briddon RW, Patil BL, Bagewadi B, Nawaz-ul-Rehman MS y Fauquet CM.(2010) Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evolutionary Biology* 2010, 10:97.
13. Castillo AG, Collinet D, Deret S, Kashoggi A, y Bejarano ER,(2003) Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (REn) and viral replication protein (Rep). *Virology*, 312(2): 381–394.

14. Cazzonelli CI, Burke J y Velten J.(2005) Functional characterization of the geminiviral conserved late element (CLE) in uninfected tobacco. *Plant molecular biology*,58(4):465-481.
15. Chapa-Oliver AM, Guevara-González RG, González-Chavira MM, Ocampo-Velázquez RV, Feregrino-Pérez AA, Mejia Teniente L, Herrera-Ruiz G y Torres-Pacheco. (2011) Analogies between geminivirus and oncovirus: Cell cycle regulation. *African Journal of Biotechnology* , 10(55):11327-11332.
16. Chatterji A, Beachy RN y Fauquet CM(2001) Expression of the Oligomerization Domain of the Replication-associated Protein (Rep) of Tomato Leaf Curl New Delhi Virus Interferes with DNA Accumulation of Heterologous Geminiviruses. *Journal of Biological Chemistry* , 276(27) 25631–25638.
17. Chen L-F, Vivoda E y Gilbertson RL (2011) Genetic diversity in curtoviruses: a highly divergent strain of Beet mild curly top virus associated with an outbreak of curly top disease in pepper in Mexico. *Archives of virology*,156(4);547-555
18. Cohen S y Harpaz I(1964) Periodic, rather than continual acquisition of a new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*bemisia tabacigennadius*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* ,7:155–166.
19. Cohen S, Duffus JE, Larsen RC, Liu HY y Flock RA (1983) Purification, serology, and vector relationships of squash leaf curl virus, a whitefly-transmitted geminivirus. *Phytopathology*, 73(12): 1669-1673.
20. Czosnek H, Mori S , Rubinstein G , Fridma V , Zeida M , Ghani M (2001) Tomato Yellow Leaf Curl Virus: A disease sexually transmitted by whiteflies. *Virus-Insect-Plant Interactions*. 1-27
21. Desbiez C, Davidt C, Metfouchit A, Laufs J y Gronenborn B(1995) Rep protein of tomato yellow leaf curl geminivirus has an ATPase activity required for viral DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12) 5640-5644.
22. Duffy S y Holmes EC(2007) Multiple Introductions of the Old World Begomovirus Tomato yellow leaf curl virus into the New World. *Applied and environmental microbiology*,73(21): 7114–7117
23. Fenoll C, Black DM y Howell SH(1988) The intergenic region of maize streak virus contains promoter elements involved in rightward transcription of the viral genome. *The EMBO Journal* ,7(6):1589 – 1596.
24. Gafni Y(2002) Tomato yellow leaf curl virus, the intracellular dynamics of a plant DNA virus. *Molecular plant pathology*, 4(1):9-15.
25. Goodman RM(1981) Geminiviruses *J. gen. Virol.*, 54: 9-21
26. Gottlieb Y, Zchori-Fein E, Mozes-Daube N, Kontsedalov S, Skaljac M, Brumin M, Sobol I, Czosnek H, Vavre F, Fleury F y Ghanim M(2010) The Transmission Efficiency of Tomato Yellow Leaf Curl Virus by the Whitefly *Bemisia tabaci* Is Correlated with the Presence of a Specific Symbiotic Bacterium Species. *Journal of virology*,84(18):9310–9317.
27. Govindappa MR, Anjeneya Reddy B, Wickramaarachchi W.A.R.T., Shankarappal KS. Shankergoud I y Rangaswamy KT (2011) Molecular Detection and Partial Characterization of Begomovirus Associated with Leaf Curl Disease of Sunflower (*Helianthus annuus*) in Southern India . *Plant Pathology Journal*, 10: 29-35.

28. Gutierrez C (2000) DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *The EMBO Journal*, 19 (5) :792–799.
29. Hak H, Levy Y, Chandran SA, Belausov E, Loyter A, Lapidot M y Gafni Y (2015) TYLCV-Is movement in planta does not require V2 protein. *Virology*, 447:56-60.
30. Hanley-Bowdoin L, Bejarano ER, Robertson D y Mansoor S (2013) Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11): 777–788
31. Harkins GW, Martin DP, Duffy S, Monjane AL, Shepherd DN, Oliver P. Windram, Betty E. Owor, Lara Donaldson, Tania van Antwerpen, Rizwan A. Sayed, Bradley Flett, Moses Ramusi, Edward P. Rybicki, Michel Peterschmitt y Arvind Varsani. (2009) Dating the origins of the maize-adapted strain of maize streak virus, MSV-A. *Journal of General Virology*, 90(12): 3066–3074.
32. Holger Jeske (2007) Replication of Geminivirus and the use of rolling circle amplification for their diagnosis. Springer H Czosnek (ed) *tomato yellow leaf curl virus disease* 141-156.
33. Hung H-C y Petty ITD(2001) Functional equivalence of late gene promoters in bean golden mosaic virus with those in tomato golden mosaic virus. *Journal of General Virology*, 82:667–672.
34. Jeske H, Lütgemeier M, y Preiß W(2001) DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *The EMBO journal*, 20 (21) 6158-6167.
35. Jupin I, De Kouchkovsky F, Jouanneau F y Gronenborn B(1994) Movement of Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus (TYLCV): Involvement of the Protein Encoded by ORF C4. *Virology*, 204(1): 82-90.
36. Khan ZA, Abdin MZ y Khan JA(2015) Functional Characterization of a Strong Bidirectional Constitutive Plant Promoter Isolated from Cotton Leaf Curl Burewala Virus. *PLoS One.* ; 10(3).
37. Kong L-J y Hanley-Bowdoin L(2002) A Geminivirus Replication Protein Interacts with a Protein Kinase and a Motor Protein That Display Different Expression Patterns during Plant Development and Infection. *The Plant Cell*, 14:1817–1832
38. Kosugi S, Ohashi Y, Nakajima K, Arai Y (1990) An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. *Plant Science*, 70:133-140
39. Kumar J, Kumar J, Singh SP y Tuli R (2014) Association of satellites with a mastrevirus in natural infection: complexity of Wheat dwarf India virus disease. *Journal of Virology*, april.
40. Kunik T, Planichelvam K, Czosnek H, Citovsky V y Gafni Y (1998) Nuclear import of the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus(TYLCV) in plant and insect cells. *The Plant Journal*, 13(3):393-399.
41. Lam N, Creamer R, Rascon J y Belfon R(2009) Characterization of a new curtovirus, pepper yellow dwarf virus, from chile pepper and distribution in weed hosts in New Mexico. *Archives Virology*, 154(3):429-36.
42. Lapidot M , Weil G , Cohen L, Segev L y Gaba V(2007) Biolistic inoculation of plants with Tomato yellow leaf curl virus DNA. *Journal of Virological Methods*, 144(1-2): 143–148.

43. Laufs J, Schumacher S, Geisler N, Jupina I, Gronenborn B (1995) Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. *FEBS Letters*, 377(2):258-265
44. Lefeuvre P, Harkins GW, Lett J-M, Briddon RW, Chase MW, Moury B y Martin DP (2011) Evolutionary Time-Scale of the Begomoviruses: Evidence from Integrated Sequences in the *Nicotiana* Genome. *PLoS ONE*, 6 (5):16-19.
45. Lett J-M, Granier M, Hippolyte I, Grondin M, Royer M, Blanc S, Reynaud B y Peterschmitt M (2002) Spatial and Temporal Distribution of Geminiviruses in Leafhoppers of the Genus *Cicadulina* Monitored by Conventional and Quantitative Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology*, 92 (1): 65-74.
46. Lin B, Akbar Behjatnia SA, Dry IB, Randles JW y Rezaian MA (2003) High-Affinity Rep-Binding Is not Required for the Replication of a Geminivirus DNA and Its Satellite. *Virology*, 305(2): 353–363.
47. Lozano-Duran R y Bejarano ER (2011) Geminivirus C2 protein might be the key player for geminiviral co-option of SCF-mediated ubiquitination. *Plant Signaling & Behavior*, 6(7):999-1001.
48. Lucioli A, Noris E, Brunetti A, Tavazza R, Ruzza V, Castillo AG, Bejarano ER, Accotto GP y Tavazza M (2007) Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus Rep-Derived Resistance to Homologous and Heterologous Geminiviruses Occurs by Different Mechanisms and Is Overcome if Virus-Mediated Transgene Silencing Is Activated. *Journal of virology*, 77(12): 6785–6798.
49. Luque A, Sanz-Burgos AP, Ramirez-Parra E, Castellano MM, y Gutierrez C (2002) Interaction of Geminivirus Rep Protein with Replication Factor C and Its Potential Role during Geminivirus DNA Replication. *Virology*, 302(1):83–94.
50. Martin D, Lefeuvre P, Varsani A, Hoareau Murielle, Semegni Jean-Yves, Dijoux Betty, Vincent Claire, Reynaud Bernard, Lett Jean-Michel (2011) Complex Recombination Patterns Arising during Geminivirus Coinfections Preserve and Demarcate Biologically Important Intra-Genome Interaction Networks. *PLoS Pathogens*, 7(9):1-14.
51. Melchor OYL, Guzmán Uriarte R; García Estrada RS y León Félix J (2011) Geminivirus Transmitidos por Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*) en Tomate, en el Valle Agrícola de Culiacán, Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29(2):109-118.
52. Melgarejo TA, Kon T, Rojas MR, Paz-Carrasco L, Zerbini M y Gilbertson RL (2013) Characterization of a New World Monopartite Begomovirus Causing Leaf Curl Disease of Tomato in Ecuador and Peru Reveals a New Direction in Geminivirus Evolution. *Journal of Virology*, 87(10): 5397–5413.
53. Monci F, Sánchez-Campos S, Navas-Castillo J, y 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 (2): 317–326.
54. Morales FJ (2006). History and current distribution of begomoviruses in Latin America. *Advances in Virus Research*. 67(6):127–162.
55. Morilla G, Janssen D, García-Andrés S, Moriones E, Cuadrado IM, y Bejarano ER (2005). Pepper (*Capsicum annuum*) is a dead-end host for Tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathology* 95:1089-1097.

56. Mubin M, Hussain M, Briddon RW y Mansoor S (2011) Selection of target sequences as well as sequence identity determine the outcome of RNAi approach for resistance against cotton leaf curl geminivirus complex. *Virology Journal*, 8(1):122.
57. Nahid N, Amin I, Briddon RW y Mansoor S (2011) RNA interference-based resistance against a legume mastrevirus. *Virology Journal*, 8(1):499.
58. Nash TE, Dallas MB, Reyes MI, Buhrman GK, Ascencio-Ibañez JT y Hanley-Bowdoin L (2011) Functional Analysis of a Novel Motif Conserved across Geminivirus Rep Proteins. *Journal of Virology*, 85(3):1182-1192.
59. Navot N, Pichersky E, Zeidan M, Zamir D, y Czosnek H (1991). Tomato yellow leaf curl virus: a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. *Virology*, 185(1):151–161.
60. Nawaz-ul-Rehman MS y Fauquet CM (2009) Evolution of geminiviruses and their satellites. *FEBS Letters*, 583(12):1825–1832.
61. Nawaz-ul-Rehman MS, Mansoor S, Briddon RW y Fauquet CM (2009) Maintenance of an Old World Betasatellite by a New World Helper Begomovirus and Possible Rapid Adaptation of the Betasatellite. *Journal of Virology*, 83(18):9347-9355.
62. Nguyen HD y Brooks CL III (2008) Generalized Structural Polymorphism in Self-Assembled Viral Particles. *Nano Letters*, 8(12): 4574–4581.
63. Noris E, Vaira AM, Caciagli P, Masenga V, Gronenborn B y Accotto GP (1998) Amino Acids in the Capsid Protein of Tomato Yellow Leaf Curl Virus That Are Crucial for Systemic Infection, Particle Formation, and Insect Transmission. *Journal of virology*, 72(12):10050–10057.
64. Ohnesorge S. y Bejarano E R (2009) Begomovirus coat protein interacts with a small heat-shock protein of its transmission vector (*Bemisia tabaci*). *Insect Molecular Biology*, 18(6):693–703.
65. Orozco BM, Miller AB, Settlege SB y Hanley-Bowdoin L. (1997) Functional domains of a geminivirus replication protein *Journal of Biological Chemistry*, 272(15):9840-9846.
66. Pilartz M y Jeske H (2003) Mapping of Abutilon Mosaic Geminivirus Minichromosomes. *Journal Of Virology*, 77 (20):10808–10818
67. Pooggin MM (2013) How Can Plant DNA Viruses Evade siRNA-Directed DNA Methylation and Silencing?. *International Journal of Molecular Science*, 14(8): 15233-15259.
68. Poornima CG, Ambika MV, Tippeswamy R y Savithri H S (2011) Functional Characterization of Coat Protein and V2 Involved in Cell to Cell Movement of Cotton Leaf Curl Kokhran Virus-Dabawali. *PLoS ONE*, 6(11):1-12.
69. Preiss W y Jeske H., (2003). Multitasking in replication is common among geminiviruses. *Journal of Virology*, 77(5):2972 – 2980.
70. Qazi J, Ilyas M, Mansoor S y Briddon RW (2007) Legume yellow mosaic viruses: genetically isolated begomoviruses. *Molecular Plant Pathology*, 8(4): 343–348.
71. Raja P, Wolf JN y Bisaro DM. (2010) RNA silencing directed against geminiviruses: post-transcriptional and epigenetic components. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*; 1799(3-4):337–351.

72. Ramos P L, Guevara-González RG, Peral R, Ascencio-Ibañez JT, Polston JE, Argüello-Astorga, GR, Vega-Arreguín JC, Rivera-Bustamante RF (2003) Tomato mottle Taino virus pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: Implications for the delimitation of cis- and trans-acting replication specificity determinants. *Archives of Virology*, 148(9):1697-1712.
73. Ramos PL, Guevara-Gonzalez RG, Peral R, Ascencio-Ibanez JT, Polston JE, Arguello-Astorga GR, Vega-Arreguin JC, Rivera-Bustamante (2003) Tomato mottle Taino virus pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: Implications for the delimitation of cis- and trans-acting replication specificity determinants. *Archives of Virology*, 148(9):1697–1712.
74. Rana VS, Singh ST, Priya NG, Kumar J y Rajagopal R. (2012) *Arsenophonus groel* interacts with CICuV and is localized in midgut and salivary gland of whitefly *B. Tabaci*. *PLoS ONE*, 7(8).
75. Rigden JE, Dry IB, Mullineaux PM, Rezaian MA (1993) Mutagenesis of the virion-sense open reading frames of tomato leaf curl geminivirus. *Virology* 193: 1001–1005.
76. Rodríguez-Negrete E, Lozano-Duran R, Piedra-Aguilera A, Cruzado L, Bejarano ER y Castillo AG (2013) Geminivirus Rep protein interferes with the plant DNA methylation machinery and suppresses transcriptional gene silencing. *New Phytologist*, 199(2): 464–475.
77. Rojas MR, Hagen C, Lucas WJ, y Gilbertson RL (2005) Exploiting Chinks In The Plant's Armor: Evolution And Emergence Of Geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 361–94.
78. Rojas MR, Jiang H, Salati R, Xoconostle-Cazares B, Sudarshana MR, Lucas WJ, y Gilbertson RL (2001) Functional Analysis of Proteins Involved in Movement of the Monopartite Begomovirus, Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *Virology*, 291(1): 110–125.
79. Settlege SB, See RG y Hanley-Bowdoin L (2005) Geminivirus C3 Protein: Replication Enhancement and Protein Interactions. *Journal Of Virology*, 79(15): 9885–9895.
80. Sharma P, Gaur RK., Ikegami M (2011) Subcellular localization of V2 protein of Tomato leaf curl Java virus by using green fluorescent protein and yeast hybrid system. *Protoplasma* 248(2): 281–288.
81. Shung C-Y. y Sunter G. (2007). AL1-dependent repression of transcription enhances expression of Tomato golden mosaic virus AL2 and AL3. *Virology*, 364:112–122.
82. Silva FN, Lima ATM, Rocha CS, Castillo-Urquiza GP, Alves-Júnior M y Zerbini FM (2014) Recombination and pseudorecombination driving the evolution of the begomoviruses Tomato severe rugose virus (ToSRV) and Tomato rugose mosaic virus (ToRMV): two recombinant DNA-A components sharing the same DNA-B. *Virology Journal*. 11:66.
83. Sunitha S, Mahajan N, Veluthambi K (2012) The TrAP/REn monodirectional promoter of Mungbean yellow mosaic geminivirus (MYMV) displays root-specific expression in transgenic tobacco. *Plant cell*, 109(3):535–545.
84. Sunter G y Bisaro DM (1992). Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell*, 4(10):1321-1331.

85. Sunter G y Bisaro DM (1997) Regulation of a Geminivirus Coat Protein Promoter by AL2 Protein (TrAP): Evidence for Activation and Derepression Mechanisms. *Virology* ,232(2):269–280.
86. Sunter G y Bisaro DM (2003) Identification of a Minimal Sequence Required for Activation of the Tomato Golden Mosaic Virus Coat Protein Promoter in Protoplasts. *Virology* ,305(2): 452–462.
87. Sunter G, Sunter JL y Bisaro DM(2001). Plants expressing tomato golden mosaic virus AL2 or beet curly top virus L2 transgenes show enhanced susceptibility to infection by DNA and RNA viruses. *Virology*,285(1):59–70.
88. Tiwari SP, Nema S y Khare MN(2013) Whitefly- a strong transmitter of plant viruses. *ESci J. Plant Pathol*, 1(2) :102-120
89. Unseld S, Frischmuth T y Jeske H(2004) Short deletions in nuclear targeting sequences of African cassava mosaic virus coat protein prevent geminivirus twinned particle formation. *Virology*, 318(1): 90-101.
90. Varma A y Malathi VG (2003), Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology*, 142(2): 145-164.
91. Varsani A , Navas-Castillo J, Moriones E, Hernandez-Zepeda C, Idris A, Brown JK, Zerbini FM, Martin DP(2014) Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. *Archives of Virology*, 159(8):2193–2203.
92. Wartig L, Kheyr-Pour A, Noris E, De Kouchkovsky F, Jouanneau F, Gronenborn B y Jupin I. (1997) Genetic analysis of the monopartite tomato yellow leaf curl geminivirus: roles of V1, V2, and C2 ORFs in viral pathogenesis. *Virology* 228: 132–140.
93. Wei N, Serino G, Wang Deng X (2008) The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends in Biochemical sciences*,33(12): 592-600.
94. Willment JA, Martin DP, Palmer KE, Schnippenkoetter WH, Shepherd DN y Rybicki EP(2007) Identification of long intergenic region sequences involved in maize streak virus replication. *Journal of General Virology*, 88(6):1831–1841.
95. Xie Y, Liu Y, Meng M, Chen L y Zhu Z(2003) Isolation and identification of a super strong plant promoter from cotton leaf curl Multan virus. *Plant Molecular Biology*, 53(1.2): 1–14.
96. Zhang J, Wang Y-Q, Hou H-W y Qian Y-J(2012) Characterization of the replication-associated protein (Rep) promoter of an alpha-satellite associated with Tobacco curly shoot virus. *African Journal of Biotechnology*, 11(15):3522-3530.

IX.-ANEXOS

Protocolos y Medios

IX.1.-Transformación de células competentes de *E.coli* Top10f'

- 1-Descongelar las células competentes en hielo (5-10 minutos).
1. Añadir de 1-10 μ l de reacción de ligación.
2. Mezclar suavemente e incubar las células por 20 minutos en hielo.
3. Aplicar un choque térmico de 42°C por 1 minuto con 30 segundos.
4. Incubar en hielo por 11 minutos.
5. Adicionar 250 μ l de medio LB e incubar por 45 minutos a 37°C en agitación constante.
6. Sembrar las células en medio LB con el antibiótico correspondiente resistencia que el casete del plásmido confiriere a la célula.

IX.2.-Minipreps

1. Picar la colonia de interés e inocular de 3-5ml de medio LB con el antibiótico indicado.
2. Incubar durante toda la noche a 37°C.
3. Centrifugar en tubos de 1.5 ml a máxima velocidad. Desechar el sobrenadante. secar en servitoallas.
4. Adicionar 100 μ l de solución I y resuspender la pastilla con vortex.
5. Adicionar 200 μ l de solución II, mezclar suavemente por inversión de 8-13 veces.
6. Adicionar 150 μ de solución III, mezclar suavemente por inversión de 8-13 veces.
7. Colocar a -20°C por 5 min.
8. Centrifugar a máxima velocidad por 5 min,
9. Colectar el sobrenadante en tubo nuevo.
10. Adicionar 7 μ l RNAs (2mg/ml, opcional) e incubar a T.A.

11. Agregar 2 Vol. de etanol absoluto y 1/10 de acetato de sodio 3M. mezclar por inversión y mantener a -20°C por al menos 15 min.
12. Centrifugar a máxima velocidad, eliminar el sobrenadante.
13. Lavar la pastilla con etanol al 70%.
14. Secar en servitoalla y resuspender en 50µl de H₂O o Buffer TE.

IX-3.-Maxipreps

1. Inocular una colonia en un matraz con 200 ml de medio LB con antibiótico, e incubar durante toda la noche a 37°C, en agitación constante a 200 rpm.
2. Colectar las células, centrifugar a 6,000 rpm por 10 min.
3. Eliminar el sobrenadante y resuspender en 5 ml de Sol. I.
4. Adicionar 10 ml de Sol. II, mezclar por inversión.
5. Incubar 5 min. a temperatura ambiente.
6. Agregar 7.5 ml de la Sol. III, mezclar por inversión.
7. Colocar en hielo durante 10 min.
8. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min.
9. Transferir el sobrenadante a tubos sorvall de 40 ml.
10. Adicionar 18 ml de Isopropanol (0.8 Vol. aprox.).
11. Reposar 20 min. en hielo.
12. Centrifugar a 10,000 rpm por 20 min. y eliminar el sobrenadante.
13. L
Lavar la pastilla con 5 ml de Etanol al 70 %.
14. Centrifugar a 10,000 rpm por 5 min.
15. Eliminar el sobrenadante y secar en servitoallas.
16. Resuspender en 500 µl de TE pH 8, transferir a microtubos de 1.5 ml.
17. Adicionar 1 Vol. de Fenol:Cloroformo y mezclar en vortex.
18. Centrifugar a 13,000 rpm, por 3 min.
19. Agregar 10 µl de RNAsa (2mg/ml, opcional), e incubar a T.A. por 30 min.
20. Adicionar 1/10 Vol. de Acetato de Na, 3M y 2 Vol. de Etanol absoluto.
21. Colocar en hielo durante 15 min.

22. Centrifugar a 13,000 rpm, durante 10 min.
23. Lavar la pastilla con Etanol al 70%.
24. Centrifugar a 13,000 rpm, por 3 min., eliminar el sobrenadante y secar en servitoalla.
25. Resuspender en 250 μ l de H₂O o buffer TE.

Soluciones

Solución I	Para 150 ml
Glucosa (50 mM)	1.35 g
Tris, 25 mM pH 8	3.75 ml (Stock 1 M)
EDTA, 10mM pH 8	3 ml (Stock 0.5M)
Solución II	Para 10 ml
NaOH (0.2 M)	400 μ l (Stock 5 M)
SDS (1%)	500 μ l (20%)
Solución III	Para 100 ml
Acetato de Potasio (3 M)	29.5 g
Ácido acético glacial	11.5 ml

IX-4.-Extracción de DNA de tejido vegetal.

1. Pesar 50 mg de tejido vegetal en tubo de 1.5 ml y moler en nitrógeno.
2. Agregar 480 μ l de buffer de extracción (moler)
3. Adicionar 37.5 μ l de SDS 20%; mezclar por inversión de 8-10 veces.
4. Colocar el tubo en termoblock a 65°C por 10 min.
5. Enfriar a temperatura ambiente.
6. Agregar 94 μ l de acetato de potasio 5M, mezclar por inversión.
7. Colocar en hielo por 5 min.
8. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min, transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
9. Adicionar 600 μ l de fenol-cloroformo (1:1), mezclar con vortex.
10. Centrifugar a 13000 rpm por 3 minutos; transferir el sobrenadante cuidadosamente y transferir a un tubo nuevo.
11. Agregar 10 μ l de RNAasa (2mg/ml) e incubar a temperatura ambiente por 15 min.
12. Agregar 600 μ l de isopropanol, mezclar por inversión.

13. Colocar en hielo por 5 min.
14. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos
15. Lavar la pastilla con etanol al 70%.
16. Eliminar el sobrenadante y secar en servitoallas.
17. Resuspender en 50 µl de TE o H₂O.

Buffer de extracción de DNA de plantas

Buffer de extracción de DNA de tejido vegetal 10 ml

Tris 1M pH8	1ml (100mM)
EDTA 0.5M pH8	1ml (50mM)
NaCl ₂ 5M	1ml (500mM)
TE pH 8	400 ml
Tris 1M pH 8	4 ml (10 mM)
EDTA 0.5M pH8	0.8 ml (1mM)

Aforar al volumen final y esterilizar en autoclave.
De ser necesario, ajustar a pH8 en buffer TE

IX-5-Preparación de Medio NT1

Solución	Reactivo	450ml (100X)	Almacenar
I- (Nitratos)	Nitrato de amonio	74.25 g	T.A.
	Nitrato de potasio	85.5 g	
II- (Sulfatos)	Sulfato de magnesio 7H ₂ O	15.426 g	4°C
	Sulfato de manganeso H ₂ O	0.7605 g	
III- (Halógenos)	Sulfato de Zinc 7H ₂ O	0.387 g	
	Sulfato cúprico 5H ₂ O	0.001125 g	
	Cloruro de calcio 2H ₂ O	19.8 g	4°C
	Yoduro de potasio	0.0378 g	
IV- (Fosfatos)	Cloruro de cobalto 6H ₂ O	0.001125 g	
	KH ₂ PO ₄	7.65 g	4°C
V- (Quelatos y vitaminas)	Ácido bórico	0.279 g	
	Na ₂ MoO ₄	0.001125 g	
	FeSO ₄ 7H ₂ O (a 4°C)	1.251 g	4°C (Cubrir con aluminio)
	EDTA 2H ₂ O	1.6785 g	
	Myo-inositol	4.5 g	

Tiamina HCL

0.045 g

Preparar por separado un stock de ácido 2-4, Diclorofenoxiacético (2-4, D) a una concentración de 1.0 mg/ml. Almacenar a -20°C.

Preparación del Medio NT1 Para un litro:

1. Agregar 10 ml de c/u de las soluciones Stock.
2. Agregar 30 g de sacarosa.
3. Agregar 2 ml de 2-4,D a 1.0 mg/ml (Almacenado a -20).
4. Aforar a 1.0 L.
5. Ajustar el pH entre 5.2 – 5.7 con KOH .
6. Esterilizar al momento de la preparación y almacenar a -4°C .

Esterilizar nuevamente cada alícuota que se vaya a usar para cambio de medio

IX-6.-Preparación de Protoplastos NT1

1. Mantener las células NT1 en fase logarítmica.
2. Subcultivar cada cuatro días, al menos dos pases antes.
3. En campana de flujo laminar, transferir el cultivo de células NT1 (3-4 días después del subcultivo, al final se obtiene un paquete de ~ 1.0 ml de células, suficiente para seis electroporaciones) en tubos falcon de 50ml y centrifugar a 1000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente.
4. Retirar el sobrenadante.
5. Lavar con 15 ml de Manitol 0.4M Centrifugar a 1000 rpm por 2 min y retirar sobrenadante.
6. Agregar 1.5 volúmenes de solución enzimática (manitol 0.4 M, MES 20mM, celulasa 1% y pectoliasa 0.1%) de células compactada.
7. Mezclar lentamente por inversión hasta que todo el pellet esté disuelto.
8. Incubar en el mismo tubo, a 25°C con agitación a 65 rpm por unos 45 minutos
9. Para evaluar la eficiencia de la preparación, observar en microscopio de campo claro a los 45 minutos.

10. Cuantificar con cámara de Neubauer. Una buena preparación tendrá una concentración mayor o igual a $3-5 \times 10^6$.
11. Una vez que más del 95% de las células adquieren una forma redondeada o elíptica; Colectar los protoplastos. Centrifugar a 1500 RCF por 2 minutos.
12. Eliminar la solución enzimática evitar perturbar el paquete de células.
13. Agregar 15 mL de manitol 0.4M; resuspender el paquete de células con movimientos suaves.
14. Centrifugar a 1500 RCF por 2 minutos
15. Eliminar el sobrenadante; evitar perturbar el paquete celular,
16. Repetir desde el paso 13 al 15.
17. Repetir desde el paso 13 al 16 con buffer de electroporación.
18. Resuspender el paquete en 2 volúmenes de buffer de electroporación
19. Continúe con el protocolo de expresión transitoria de GUS en protoplastos NT1.

IX-7.-Protocolo de expresión transitoria de Gus en protoplastos NT1.

Electroporación, y extracción de GUS.

1. Precipitar el DNA a electroporar y resuspender en buffer de electroporación (~40µg de DNA).
2. Agregar 300ul de suspensión de protoplastos al DNA.
3. Mantener las celdas en hielo previo a la electroporación.
4. Electroporar con una capacitancia de 500 µF, a 250v; en una celda de 2mm, un solo pulso.
5. Pasar a hielo y reposar máximo 10 min.
6. Tomar las células electroporadas resuspender en 1ml de medio de protoplastos con manitol 0.4M, pasar a caja Petri con 6 ml de medio.
7. Dejar a 25°C por 48 horas en ausencia de luz.
8. Colectar los protoplastos en tubos de 15 ml
9. Centrifugar a 800 rcf por 5 minutos

10. Eliminar el sobrenadante (medio nt1 + manitol 0.4M), resuspenda la pastilla en 250ul de buffer de extracción de Gus
11. Colectarla y pasarla a tubos eppendorf de 1.5 ml.
12. Sonicar con 3 pulsos (amplitud 30 y 3 segundos por cada pulso)
13. Centrifugar a 16000 rcf por 2 minutos
14. Recolectar el sobrenadante (usar pipeta y evitar tomar de la pastilla) y haga alícuotas de cada extracto
15. Inmediatamente congele con nitrógeno líquido y almacene a -70 hasta su uso.

IX-8.-Buffer de extracción de Gus

Reactivo	Concentración final
Fosfato de sodio pH 7.0	50 mM
Ditiotreitol	10 mM
Na ₂ EDTA	10 mM
Lauril-sarcosina	0.1% w/v
Triton X-100	0.1% v/v
Notas	

- Se puede utilizar β -mercaptoetanol en sustitución de DTT

IX.9.-Tinción histoquímica de protoplastos con X-Gluc.

Este protocolo es una modificación del método reportado por Kosugi *et al*, 1990.

El buffer de reacción de tinción con X-Gluc se compone:

Reactivo	Concentración final
X-Gluc	1.9 mM
ferricianuro de potasio	0.5 mM
ferrocianuro de potasio	0.5 mM
Metanol	20%
Manitol	0.5 M
Buffer de fosfato de Na pH 7	50mM

1. Colectar los protoplastos 48 horas después de la electroporación centrifugar a 800 rcf por 5 minutos.
2. Eliminar el medio con pipeta y se reemplaza con 250 ul de buffer de tinción con X-Gluc.
3. En placa de cultivo celular de 94 pozos colocar los protoplastos en cada pozo.
4. Incubar a 37°C en ausencia de luz por 16 horas
5. Observar en microscopio de campo claro 20 ul de cada reacción a 10X y 40X.

IX-.10-Cuantificación de proteínas por método Bradford.

Para cuantificar la concentración de proteínas total de los extractos de protoplasto; se utilizó el método de Bradford. Este método se basa en la coloración de un compuesto hidrofóbico que al estar en contacto con el ácido fosfórico tiene una tonalidad grisácea, pero al encontrarse en un entorno hidrofóbico (como los pockets de una proteína) esta se torna azulada. Esta dilución luego su absorbancia es medida con un filtro de 595nm. Se utilizan concentraciones de proteína conocidas; en este caso BSA como estándar. Con estos datos se grafica la absorbancia contra concentración; con esta grafica se obtiene la ecuación $y = mx + b$. R debe ser cercano a 1; la ecuación puede ser simplificada; ya que b , tiende a 0 por lo tanto; $y=mx$. Donde y es absorbancia, m es la pendiente de la curva y x es la concentración. Esta curva estándar la usamos para extrapolar los datos de absorbancia de un extracto y conocer la concentración de proteína de este. Al despejar $x=y/m$.

Reactivo de Bradford

1-Mezclar 10 mg de Coomassie Blue G-250 con 10 ml de ácido fosfórico al 88% y 4,7 ml de etanol absoluto.

2- Añadir H₂O hasta 100 ml. Utilizar filtro de 22mm. Guardar a 4°C cubriéndolo de luz.

IX- 11. Ensayo de actividad de GUS

1. En placa opaca agregar 180 ul de buffer stop (carbonato de sodio 0.2M).
2. En tubos de PCR (o placa) diluir en 1/10 el extracto crudo (es recomendable cuantificar mediante el método de Bradford para conocer la concentración de proteínas del extracto crudo previo al ensayo) con buffer de ensayo de GUS, (buffer de extracción con 1mM de MUG), esta será la reacción de GUS.
3. Tomar el tiempo 0. tomar 20 ul de reacción de GUS en los 180 ul de buffer stop, luego colocar a 37 °C a la reacción de GUS y volver a tomar 20 ul a un tiempo arbitrario (normalmente 30 minutos, 1 hora; o más).
4. Para medir la fluorescencia de NaMu producida por GUS se deben utilizar los filtros de: excitación 360 nm y de emisión 465 nm.
5. En el caso de el fluorómetro Genios by Tecan es recomendable usar una ganancia manual de 60.

Notas

- El tritón debe estar diluido en el momento que se haga la lectura con fluorómetro a una concentración final de 0.001% o inferior, debido a que el tritón puede interferir y obtener lecturas irregulares.
- El buffer Stop tiene dos funciones según Jefferson, además de detener la reacción aumenta la fluorescencia 7 veces.
- Las mediciones deben hacerse inmediatamente después de agregar la reacción de actividad de GUS al buffer stop debido a que el compuesto fluorescente es inestable al exponerse a la luz. Puede cubrirse la placa para reducir este efecto.

Curva estándar de NaMU

La curva estándar se generó con el fluorómetro GENios by TECAN; para conocer la concentración de NaMU; un compuesto fluorescente que genera GUS al hidrolizar MUG.

IX.12.-Ensayos de inoculación con carborundum

Para infectar plantas por este método abrasivo. Se espolvorea carborundum en las hojas a infectar. Agregar de 1-5µg de DNA resuspendidos en agua miliQ estéril en cada hoja a inocular (2-3 hojas por planta). Con doble guante se frota suavemente la hoja desde la base hasta la punta 10 veces. Después de la inoculación, se limpia la hoja con agua; esto último para eliminar el exceso de carborundum residual en las hojas.

IX.13.-Protocolo para preparación de células electro-competentes de *agrobacterium* GV3101.

1. Preinocular 5 ml de medio YEB/LB, crecer a 28°C T/N
2. Utilizar el precultivo para inocular 200 ml de medio nuevo hasta alcanzar una O.D600 entre 0.500 y 1.500.
3. Al alcanzar la O.D deseada colocar en hielo y transferir a tubos estériles.
4. Centrifugar a 10000g por 10 min a 4°C.
5. Eliminar el sobrenadante.
6. Lavar la pastilla con 20 ml de H₂O estéril.
7. Centrifugar a 10000g por 10 min a 4°C.
8. Repetir desde el paso 6.
9. Eliminar el sobrenadante.

10. Repetir desde el paso 6 al 9, usar glicerol al 10% frío.
11. Resuspender con 800µl.
12. Alícuotar en 40µl en tubos estériles, y almacenar a -80°C.

IX.14.-Protocolo de agroinfiltración

1. Inocular 30ml de medio SOC con *Agrobacterium* previamente transformada; agregar los antibióticos apropiados y crecer toda la noche a 28°C, 200 rpm.
2. Colectar las células centrifugando a 2500 g por 10min a temperatura ambiente.
3. Remover el sobrenadante y resuspender en 5 ml buffer de infiltración.
4. Repetir el paso 2-3.
5. Medir la absorbancia a 600nm. La concentración no debe ser mayor de 1.5; e idealmente debe ser de 0.7.
6. Diluir la concentración de células con buffer de infiltración si es necesario; utilizando fórmula $C_2 = (C_1 V_1) / V_2$.
7. Seleccionar las hojas que serán infiltradas. En *N. Benthamiana* las se deben seleccionar las hojas más grandes ya que es más fácil de agroinfiltrarlas.
8. Con una jeringa estéril sin aguja, tomar 1ml de células en suspensión.
9. Frotar suavemente el envés de la hoja con la jeringa (sin aguja) para remover la cutícula cerosa. Esto facilita la agroinfiltración ya que se necesita aplicar menos presión en el embolo, lo que reduce la probabilidad de dañar la hoja.
10. Presionar suavemente el embolo; el líquido se difundirá en la hoja.
11. Agroinfiltrar las hojas deseadas, es recomendable que sea una sola hoja por rama.
12. Llevar las plantas a cámara de crecimiento, regar periódicamente.

Notas

- Los lavados del paso 2 y 3 son necesarios para remover los remanentes de antibiótico en el medio; el cual puede matar las hojas agroinfiltradas además de que la Acetosiringona al ser detectada por VirA; estimula la activación de los genes Vir por VirG, necesarios para inducir la conjugación.
- Es recomendable esperar hasta 15 días después de la inoculación para tomar muestra de tejido para detectar replicación viral en hojas nuevas
- Es recomendable marcar las hojas inoculadas con un rotulador; esto para evitar tomar una hoja inoculada y obtener falsos positivos durante la detección de DNA viral por PCR.
- La agroinfiltración no debe de causar daños severos a los tejidos de las hojas inoculadas, en caso de que esto ocurra, reducir la concentración de células en suspensión agroinfiltradas puede resolver el problema.

Buffer de infiltración

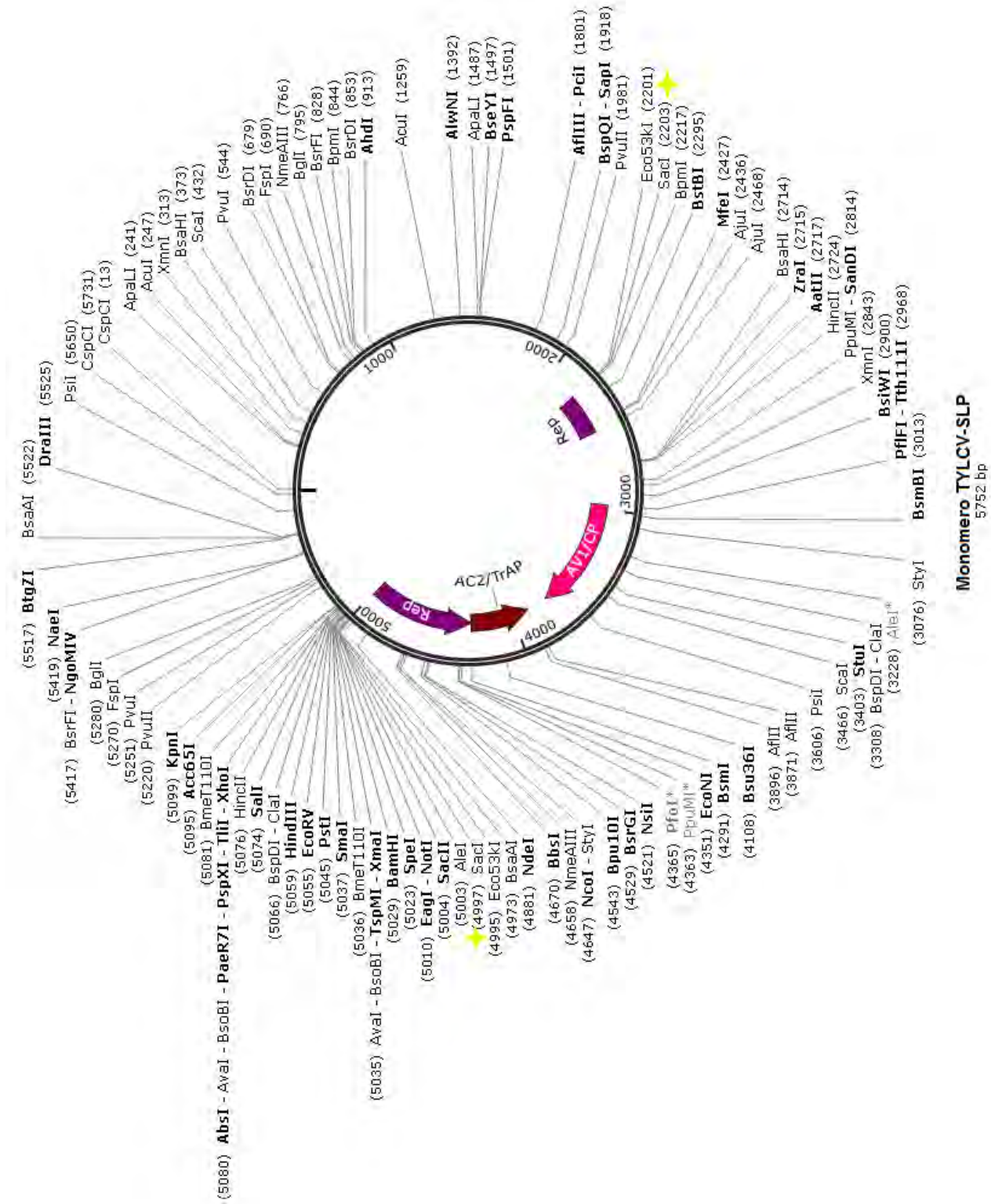
Stock	100ml
MgCl ₂ (2M)	500 μ l (10mM)
Acetosiringona(1M)	10 μ l (100mM)
MES pH 5.7(100mM)	10ml (10mM)

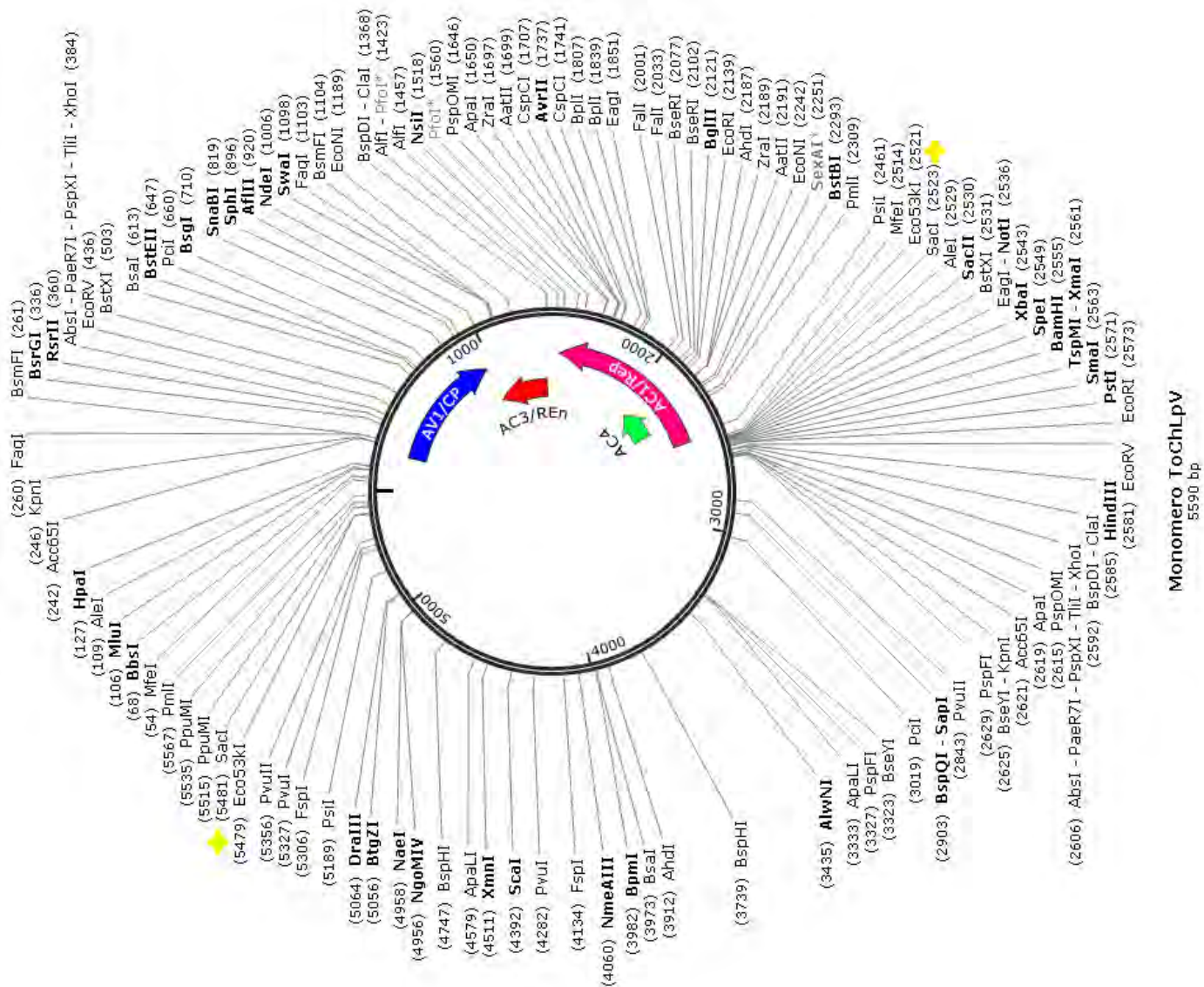
Medio SOC

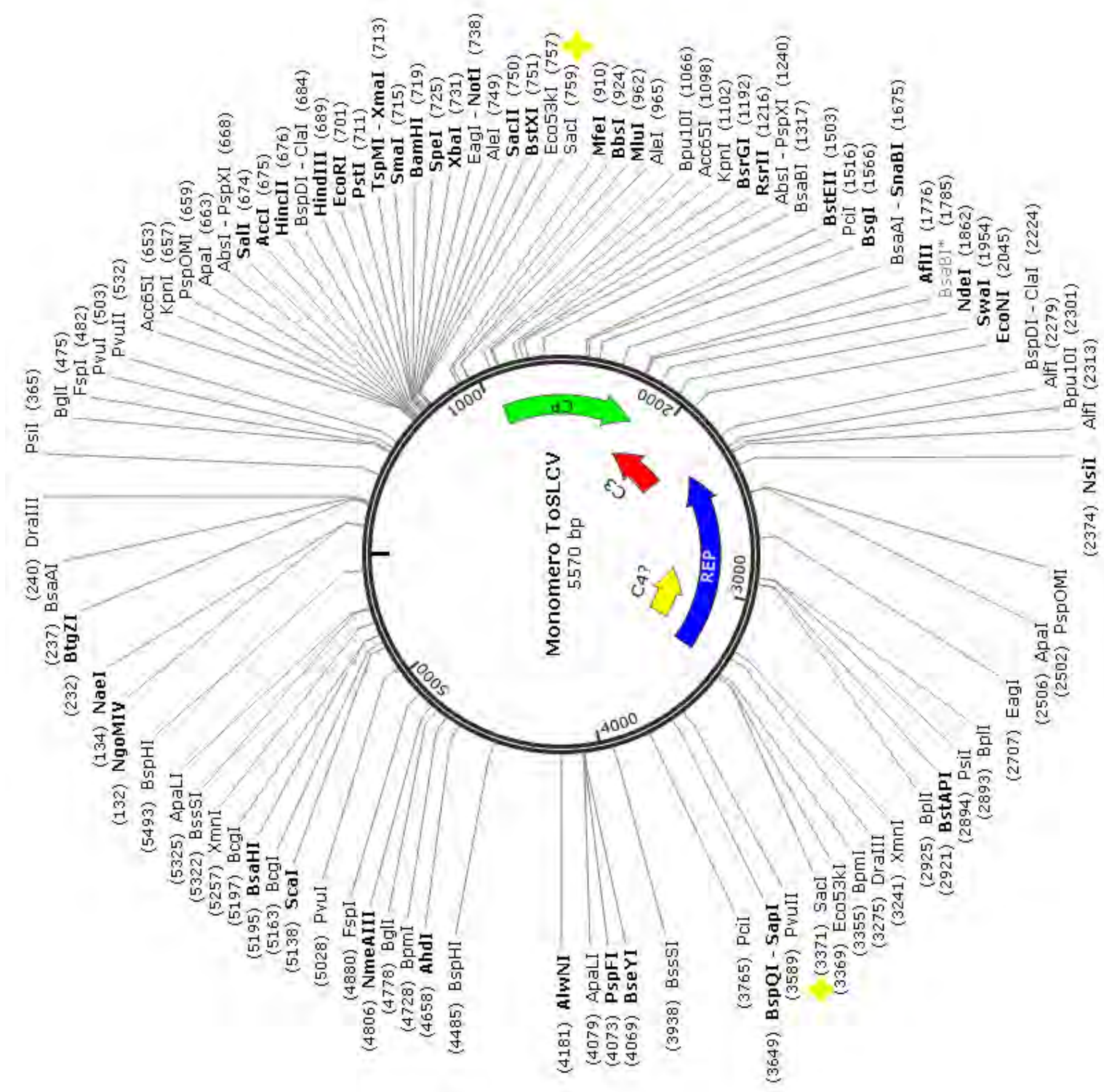
Reactivo	Para 500 ml
Tripton 2%	10g
Extracto de levadura 0.5%	2.5g
NaCl 10Mm	0.292g
KCl 25mM	0.093g
MgCl 10 Mm	0.476g
MgSo ₄ (heptahidratado) 10Mm	1.2335g
Glucosa 20 mM	1.8015g

IX.-ANEXOS-2

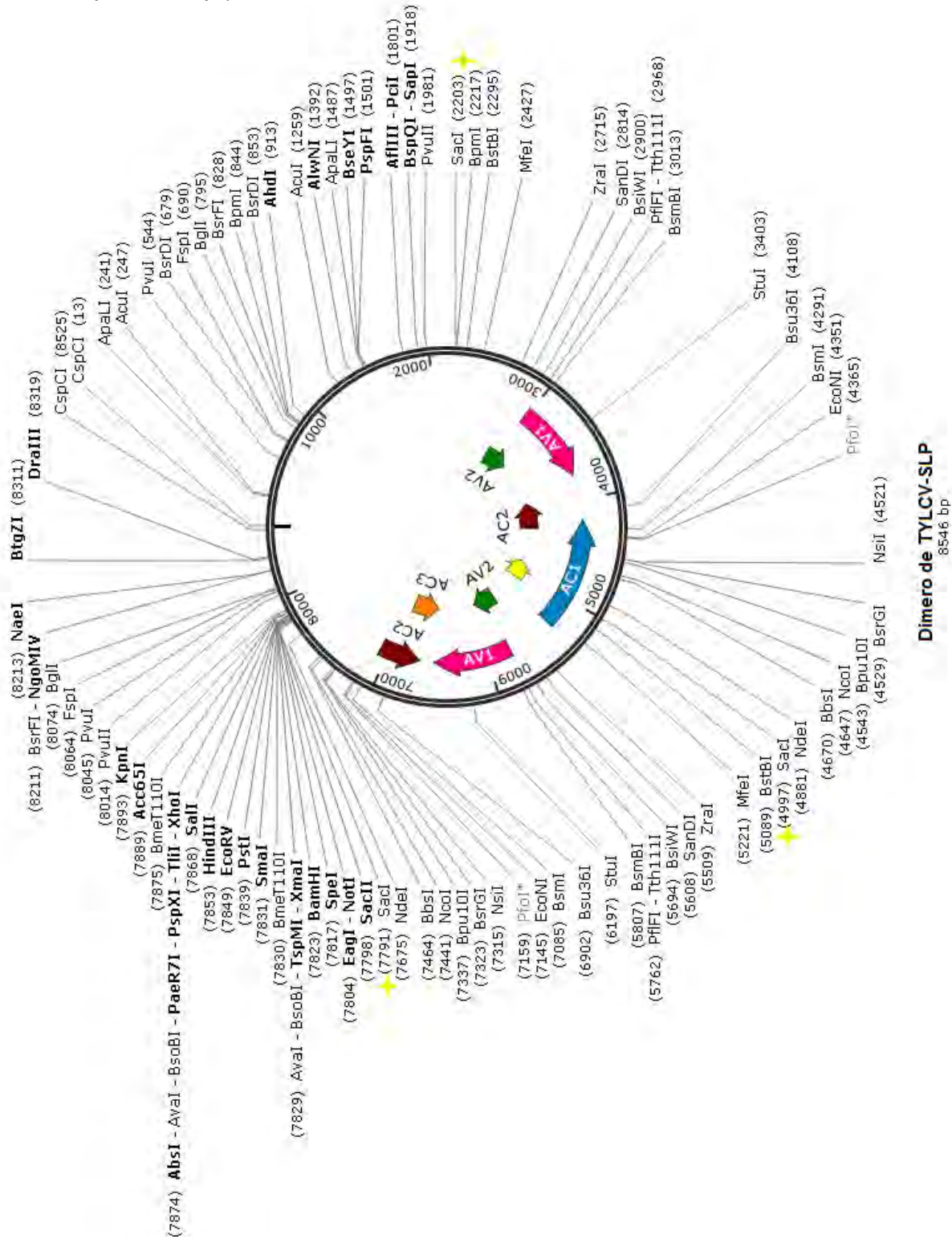
Mapas de construcciones monoméricas begomovirales (clonadas en pBlueScript)

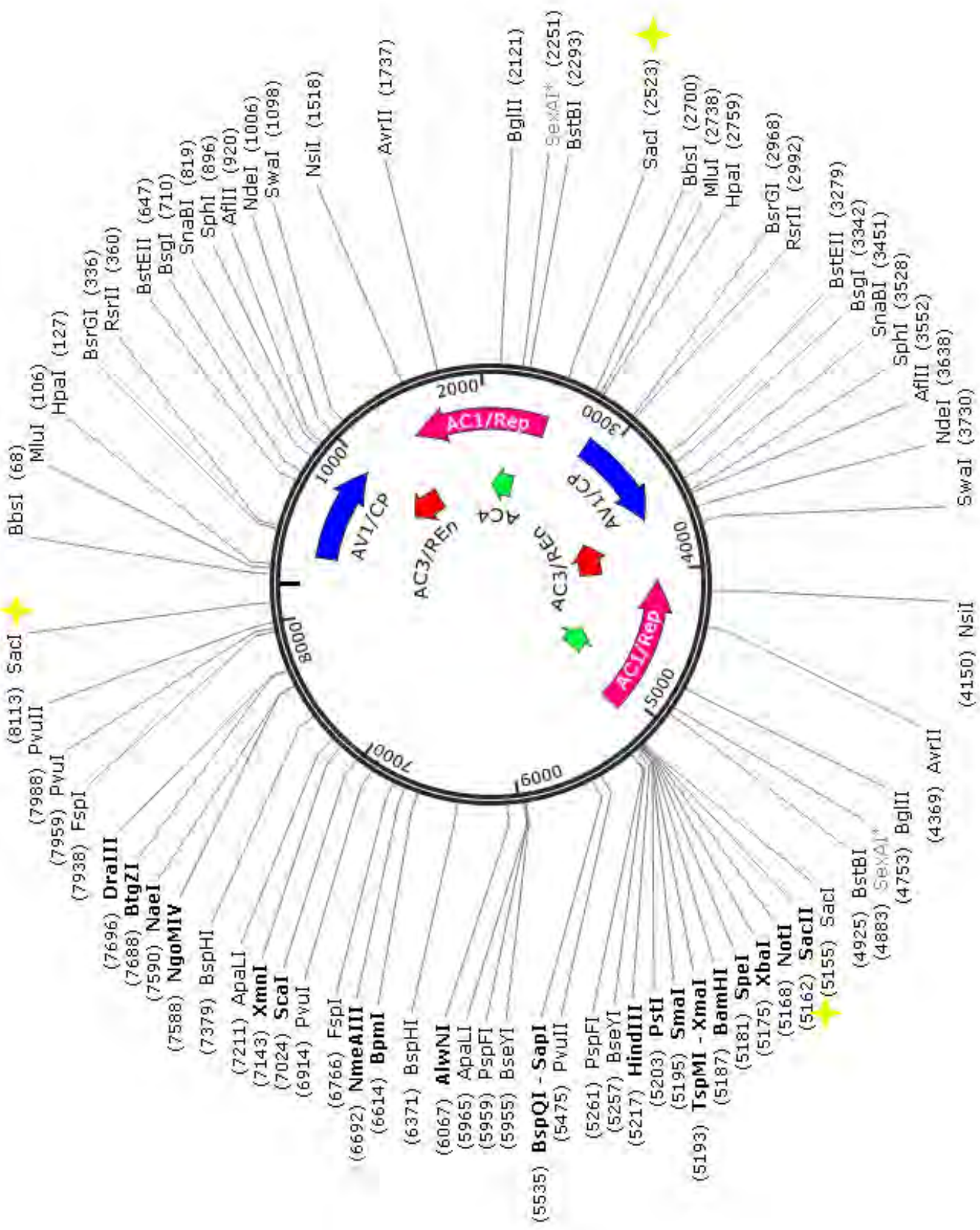




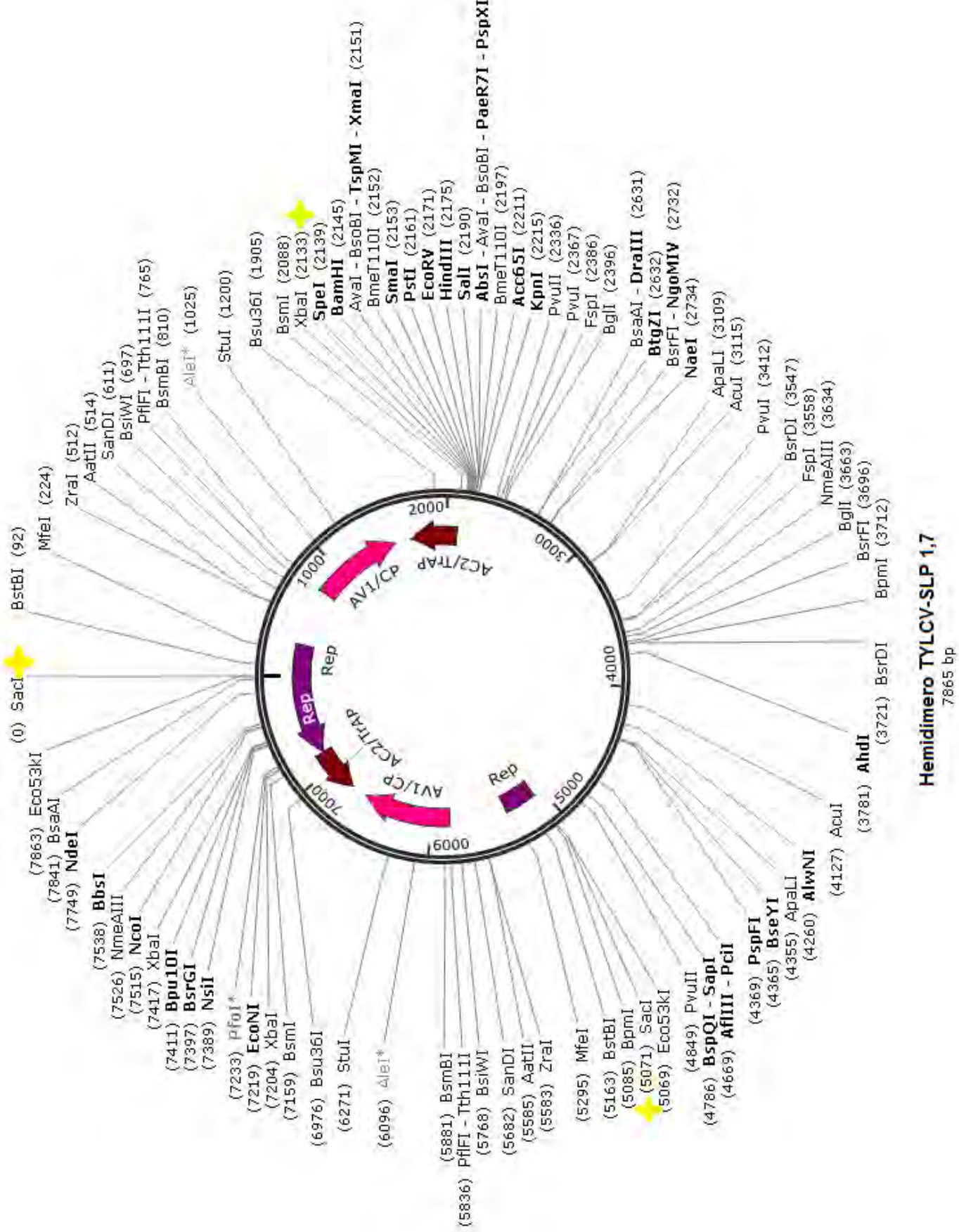


Mapas de construcciones dimericas y hemidimericas begomovirales (clonadas en pBlueScript)





Dimero de ToChLpV
8222 bp



Hemidimero TYLCV-SLP 1,7
7865 bp

