



**IPICYT**

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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Identificación de determinantes de especificidad de la  
proteína de replicación de begomovirus y un elemento  
activador conservado en los promotores de *Rep*”**

Tesis que presenta

**Jesús Aarón Avalos Calleros**

Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de la Tesis:**

**Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga**

San Luis Potosí, S.L.P., Diciembre del 2021



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Identificación de determinantes de especificidad de la proteína de replicación de begomovirus y un elemento activador conservado en los promotores de Rep**” presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Jesús Aarón Avalos Calleros** y aprobada el **16 de noviembre de 2021** 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. Ángel Gabriel Alpuche Solís**

Miembro del Comité Tutorial

**Dr. Bernardo Bañuelos Hernández**

Miembro del Comité Tutorial

**Dra. Carolina Granados Mendoza**

Miembro del Comité Tutorial

**Dr. Ramón Gerardo Guevara  
González**

Miembro del Comité Tutorial

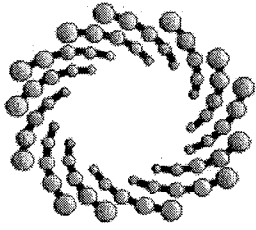


## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas 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.

Las investigaciones descritas en esta tesis fueron financiadas con recursos otorgados al Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga por el CONACYT, Proyecto **SEP-CB-2015-257136**.



**IPICYT**

# 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 127 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 13 días del mes de diciembre del año 2021, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Bernardo Bañuelos Hernández</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>Universidad De La Salle</b>
<b>Dra. Carolina Granados Mendoza</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>UNAM</b>
<b>Dr. J. Sergio Casas Flores</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Ramón Gerardo Guevara González</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>UAQ</b>

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

**DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó el C.

**Jesús Aarón Avalos Calleros**

sobre la Tesis intitulada:

*Identificación de determinantes de especificidad de la proteína de replicación de begomovirus y un elemento activador conservado en los promotores de Rep*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga**

El Jurado, después de deliberar, determinó

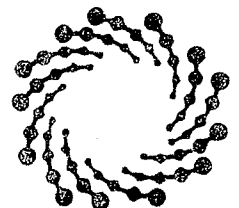
**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 18:39 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 13 días del mes de diciembre de 2021.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



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

## **Dedicatorias**

A todos aquellos que tienen sueños, sin permitirles que estos los dominen.

## **Agradecimientos**

Al instituto potosino de investigación científica y tecnológica, A.C..

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

A mi director de tesis, Dr. Gerardo Rafael Arguello Astorga, por nuevamente darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, siempre ofreciéndome la posibilidad de mejorar mi trabajo de investigación y ayudándome a cultivar mis capacidades de reflexión y deducción.

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís, por su apoyo, sus excelentes consejos y amistad brindada durante mi estancia.

Por supuesto al Dr. Bernardo Bañuelos Hernández, Dra. Carolina Granados Mendoza y Dr. Ramón Gerardo Guevara González, por sus comentarios, aportes y ayuda para la mejora de este trabajo.

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

Al Dr. Guillermo Pastor Palacios, por supuesto por su amistad brindada, pero no puedo omitir su amabilidad y disposición, las cuales ayudaron mucho al desarrollo de este trabajo.

Al Biólogo Salvador Ambriz, por su ayuda durante todo el doctorado, su paciencia y amistad brindada.

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

A mis compañeros y amigos de laboratorio, especialmente a la Dra. Karen Lizbeth Reyes a quien sin duda podría decir que es la personificación del concepto de resiliencia, Al Dr. Edgar Daniel Páez a quien considero un verdadero profesional y un muy buen amigo.

Por supuesto a mis padres, Esperanza Yasmin Calleros Rincón y Jesús José Avalos Escárzaga, me considero incompetente para redactar el agradecimiento que les tengo a los dos, aunque puedo afirmar que es inconmensurable.

A mi hermana Yasmin Avalos y su Esposo Dr. Efraín Ríos, a quienes les tengo un gran afecto y respeto.

A Arturo F. López y a Cristina Silva, a quienes considero los amigos más cercanos que he tenido nunca. Agradezco toda su ayuda y sobre todo comprensión en ciertos momentos no tan brillantes de mi vida.

Por supuesto faltan más amigos y compañeros, algunos de ellos ausentes, a todos ustedes, gracias.

# Contenido

<b>Constancia de aprobación de la tesis</b>	<b>ii</b>
<b>Créditos Institucionales</b>	<b>iii</b>
<b>Dedicatorias</b>	<b>v</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>viii</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>xi</b>
<b>Resumen</b>	<b>xv</b>
<b>Abstract</b>	<b>xvi</b>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo I</b>	<b>30</b>
<b>Análisis experimental de la compatibilidad replicativa de dos cepas del begomovirus Rhynchosia golden mosaic Sinaloa virus (RhGMSV).</b>	<b>30</b>
<b>Objetivo</b>	<b>34</b>
<b>Resultados</b>	<b>34</b>
<b>Discusión</b>	<b>49</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>53</b>
<b>Perspectivas a futuro</b>	<b>54</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>54</b>
<b>Capitulo II</b>	<b>66</b>
<b>La comparación de los promotores bidireccionales de dos variantes de TYLCV revela una secuencia compleja conservada en los begomovirus del Viejo Mundo</b>	<b>66</b>
<b>Objetivos</b>	<b>70</b>

<b>Resultados</b>	<b>70</b>
<b>Discusión</b>	<b>85</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>88</b>
<b>Perspectivas a futuro</b>	<b>88</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>88</b>
<b>Capitulo III</b>	<b>92</b>
<b>Desarrollo de un sistema de resistencia de amplio espectro contra begomovirus mediante CRISPR/Cas9.</b>	<b>92</b>
<b>Objetivo</b>	<b>99</b>
<b>Resultados</b>	<b>99</b>
<b>Discusión</b>	<b>112</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>114</b>
<b>Perspectivas a futuro</b>	<b>114</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>116</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>147</b>
<b>Artículos</b>	<b>147</b>

#### **Lista de figuras**

<b>figura 1 organización genómica de la familia <i>geminiviridae</i>.</b>	<b>13</b>
<b>figura 2 organización del genoma de los nuevos géneros de la familia <i>geminiviridae</i>.</b>	<b>17</b>
<b>figura 3 ciclo infectivo de los begomovirus.</b>	<b>21</b>
<b>figura 4 fenotipos inducidos por reordenamiento de componentes genómicos de rhgmsv y pepgmv.</b>	<b>37</b>
<b>figura 5 detección de dna-b en extractos de plantas de los experimentos de pseudorecombinación mediante southern blot.</b>	<b>41</b>



figura 6 alineamiento de las secuencias de nucleótidos de la sonda con la secuencia diana tanto en pepgmv b como rhgmsv-gu b.	42
figura 7 alineación del dominio de unión al dna (aa 1-130) de las proteínas rep codificadas por los cuatro aislados conocidos de rhgmsv, ordenados según las similitudes de sus iterones afines.	44
figura 8 modelos estructurales de los dominios de unión al dna de las proteínas rep de rhgmsv-co y rhgmsv-gu.	45
figura 9 alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los dominios n-terminales de las proteínas rep codificadas por begomovirus del linaje del slcv, agrupadas de acuerdo con sus iterones cognados.	48
figura 10 representación esquemática de los promotores de las variantes de tylcv y los vectores experimentales.	71
figura 11 actividad de gus de los promotores rep de tylcv-il[sin] y tylcv-il[slp].	73
figura 12 actividad de gus de los promotores cp de las variantes de tylcv y la transactivación de estos en presencia tylcv.	75
figura 13 co-inoculación de los promotores virales de cp con la proteína ac2	77
figura 14 fenotipos de infección de <i>N. benthamiana</i> con las variantes de tylcv-il.	79
figura 15 comparación de la carga viral relativa de tylcv-il[sin] vs. Tylcv-il[slp] en plantas de <i>N. benthamiana</i> .	81
figura 16 la asai se encuentra conservada en distintos begomovirus del viejo mundo en arreglo conservado.	83
figura 17 secuencia consenso del asai.	84
figura 18 estrategia general para conferir resistencia de amplio espectro a begomovirus en plantas.	98
figura 19 alineamientos de distintos begomovirus y los sgrnas diseñados con blanco a esas secuencias conservadas.	101
figura 20 validación funcional de los sgrnas contra distintos begomovirus mediante el ensayo de endonucleasa t7.	105
figura 21 validación de los sgrnas contra tylcv y el componente a y b de pepgmv mediante el ensayo de endonucleasa.	107

**figura 22 interferencia generada por los sgrnas contra distintas regiones del  
genoma de pepgmv. 109**

**figura 23 análisis tider para detectar la proporción de indels generados al genoma  
de pepgmv por el complejo cas9/sgrna. 111**

## **Abreviaturas**

ACMV: *African cassava mosaic virus*

ALCV: *Alfalfa leaf curl virus*

BCTIV: *Beet curly top iranian virus*

BCTV: *Beet curly top virus*

BeYDV: *Bean yellow dwarf virus*

BGMV: *Bean golden mosaic virus*

CaCDaV: *Camellia chlorotic dwarf-associated virus*

CCDaV: *Citrus chlorotic dwarf associated virus*

CP: Capsid protein (Proteína de la cápside)

CRISPR/Cas: Clustered regulary interspaced short palindromic repeats/ CRISPR associated protein. (Repetidos palíndromos cortos interespaados y regularmente agrupados/ Proteínas asociadas a éstos)

DCL: Dicer like protein (RNAasa III tipo Dicer)

DNA: siglas en inglés de ácido desoxirribonucleico

EcmLV: *Euphorbia caput-medusae latent virus*

ECSV: *Eragrostis curvula streak virus*

EmLV: *Exomis microphylla latent virus*

EuMV: *Euphorbia mosaic virus*

FbSLCV: *French bean severe leaf curl virus*

GRBD: *Grape red blotch disease* (Enfermedad de la mancha roja de la uva)

GRBV: *Grapevine red blotch virus*

GRS: Geminivirus Rep Sequence (Secuencia de la rep de geminivirus)

GV: Geminivirus

HIR1/HIR3: Hiper sensitive reaction 1 & 3

HR: Respuesta de hipersensibilidad

HrCTV: *Horseradish curly top virus*

JGV1/JaMV: *Juncus maritimus geminivirus 1*

LIR: Siglas en inglés de región intergénica larga

LRR: Leucine rich repeats (Repetidos ricos en leucina)

MP: Proteína de movimiento

MSV: *Maize streak virus*

NCTV: *Nightshade curly top virus*

NLS: Nuclear localization signal (Secuencia de localización a núcleo)

NMR: Nuclear magnetic resonance (Resonancia magnética nuclear)

NSP: Proteína transbordadora de núcleo a citoplasma

nt: nucleótidos

NW: Nuevo Mundo

ODV: *Oat dwarf virus*

OW: Viejo Mundo

PAM: Potospacer adjacent motif (motivo adyacente al protoespaciador)

pb: Pares de bases

PepGMV: *Pepper golden mosaic virus*

PILV: *Plantago lanceolata latent virus*

PrLV: *Prunus latent virus*

REn: Proteína potenciadora de la replicación

Rep: Proteína iniciadora de la replicación viral

RhGMSV: *Rhynchosia golden mosaic Sinaloa virus*

RISC: RNA Induced silencing complex

RITSC: RNA Induced transcriptional silencing complex

RNA: siglas en inglés de ácido ribonucleico

RNAi: RNA interferente

RVD: Repeat-variable di-residues (Repetidos de diresiduos variables)

SAR: Resistencia sistémica adquirida

SCTAV: *Spinach curly top Arizona virus*

SeCTV: *Sesame curly top virus*

SIR: Siglas en inglés de región intergénica corta

S-Lin: Linaje del SLCV

SPD: Determinantes de especificidad (Specificity determinants)

SSCTV: *Spinach severe curly top virus*

TbCSV: *Tobacco curly shoot virus*

TCTV: *Turnip curly top virus*

TGMV: *Tomato golden mottle virus*

TIDER: Tracking of Insertions, Deletions and Recombination events

TLCYnV: *Tomato leaf curl Yunnan virus*

ToLCNDV: *Tomato leaf curl New Delhi virus*

ToMoTV: *Tomato mottle taino virus*

TPCTV: *Tomato pseudo-curly top virus*

TrAP: Proteína transactivadora

TuLCV: *Turnip leaf roll virus*

TYLCCnV: *Tomato yellow leaf curl China virus*

TYLCV: *Tomato yellow leaf curl virus*

WCSV: *Watermelon chlorotic stunt virus*

WDV: *Wheat dwarf virus*

WvLV: *Wild Vitis latent virus*

\*Nota aclaratoria sobre *Rhizobium radiobacter*

Actualmente las especies del genero *Agrobacterium* fueron reclasificadas en el género *Rhizobium*, sin embargo en este documento se usara *Agrobacterium tumefaciens* como sinónimo de *Rhizobium radiobacter*, nombre actualmente aceptado.

## Resumen

### Identificación de determinantes de especificidad de la proteína de replicación de begomovirus y un elemento activador conservado en los promotores de *Rep*

En este documento se describen tres trabajos independientes pero relacionados, sobre begomovirus. **En el primer estudio se analizó la compatibilidad replicativa de dos cepas de *Rhynchosia golden mosaic Sinaloa virus* (RhGMSV),** las cuales presentan iterones diferentes en su origen de replicación; se demostró que las cepas de RhGMSV (-Gu y -Co) son replicativamente incompatibles. En cambio, la cepa RhGMSV-Co A pudo transreplicar al DNA-B de otro begomovirus, *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), que posee iterones idénticos. Los pseudorecombinantes fueron viables de acuerdo a los resultados obtenidos por PCR y ensayos de Southern blot. El análisis comparado de las proteínas Rep codificadas por las cepas y variantes de esos virus permitió identificar dos aminoácidos (aa) potencialmente involucrados en el reconocimiento específico de los iterones. Ambos aa residen en una de las hebras de la mini hoja  $\beta$  ( $\beta 1/\beta 5$ ) que posiblemente interactúa directamente con el DNA en el origen de replicación geminiviral y se localizan cerca del Motivo II conservado en las proteínas iniciadoras de la replicación por círculo rodante (RCR) de una gran variedad de virus. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los determinantes de especificidad de Rep se localizan en dos segmentos cortos ampliamente separados entre sí y en la vecindad de los Motivos RCR I y II. Las conclusiones de este estudio adquieren especial relevancia a la luz de la conservación de esos Motivos RCR en las proteínas Rep de todos los miembros del filo *Cressdnaviricota*, que agrupa a siete familias virales. **El segundo estudio fue el análisis funcional de los promotores de dos variantes de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-IL) una de Sinaloa (TYLCV-IL[*Sin*]),** que representa al virus nativo de Israel, y una variante (TYLCV-IL[*SLP*]) que contiene dos mutaciones naturales: 1) una delección de 29nt en el promotor *Rep*, y 2) una duplicación de 42 nt en el promotor *CP*. Se generaron dos construcciones para cada promotor fusionándolos con el gen reportero GUS por cada variante de TYLCV y mediante experimentos de expresión transitoria *in planta* se logró establecer que el promotor Rep con la delección de 29 nt tiene menor actividad (~50%) que su contraparte TYLCV-IL[*Sin*], sugiriendo la existencia de un elemento regulador positivo en el segmento deletado. Al analizar esta región en TYLCV-IL[*SLP*] se identificó un elemento de 18 nt conservado en la mayoría de los begomovirus del Viejo Mundo (OW), pero inexistente en los BGVs del Nuevo Mundo (NW). En el caso del promotor CP no se apreció un cambio significativo en la actividad relacionada con la duplicación de 42 nt, pues los promotores de ambos aislados de TYLCV expresaron el gen reportero a un nivel similar. En presencia de una fuente de TrAP, la actividad de ambos promotores *CP* aumentó > 20 veces, en comparación con el promotor en ausencia del transactivador. **Por último, se usó la tecnología CRISPR/Cas9 para desarrollar un sistema de interferencia de la replicación de begomovirus.** Los sgRNAs se diseñaron seleccionando regiones conservadas en los genomas de estos virus. En total se diseñaron 11 sgRNAs, de los cuales 6 mostraron actividad mediante el ensayo de endonucleasa T7. Mediante esta técnica, se demostró que los sgRNAs son capaces de generar indels en TYLCV, RhGMSV y PepGMV. En experimentos de agroinfiltración en plantas de *N benthamiana*, mezclando los sgRNAs se logró reducir la carga viral de PepGMV ~9 veces en comparación con el control. Los sgRNAs usados en este trabajo potencialmente pueden interferir con la replicación de una gran variedad de begomovirus. **Palabras clave: Rep, Iterones, S-Lin, Secuencia activadora, CRISPR/Cas9.**

## Abstract

### Identification of specificity determinants of the begomovirus replication protein and a conserved activator element in Rep promoters

Three independent but related studies about begomoviruses are described in this document. **In the first study, the replicative compatibility of two strains of Rhynchosia golden mosaic Sinaloa virus (RhGMSV) was analyzed**, both presenting different iterons at their replication origins; the strains (-Gu and -Co) were shown to be incompatible in replication. In contrast, the DNA-A of RhGMSV-Co was able to transreplicate the DNA-B of another begomovirus, Pepper golden mosaic virus (PepGMV), which has identical iterons. The pseudo-recombinants were viable according to the results obtained by PCR and Southern blot assays. The comparative analysis of the Rep proteins encoded by the strains and variants of these viruses, allowed the identification of two amino acids (aa) potentially involved in the specific recognition of iterons. Both residues reside in one of the strands of the mini  $\beta$  sheet ( $\beta 1/\beta 5$ ) that presumably interact directly with the DNA at the geminiviral replication origin, and located near the Motif II which is conserved in the rolling circle replication (RCR) initiator proteins of a wide variety of viruses. These results support the hypothesis that the specificity determinants of Rep are located in two short segments widely separated from each other within the vicinity of the RCR Motifs I and II. The conclusions of this study acquire special relevance in light of the conservation of these RCR Motifs in the Rep proteins of all members of the phylum Cressdnaviricota, which harbor seven viral families. **The second study was the functional analysis of the promoters of two variants of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL)**, one from Sinaloa (TYLCV-IL [Sin]), which represents the WT virus of Israel, and a variant (TYLCV- IL [SLP]) containing two natural mutations: 1) a 29 nt deletion in the Rep promoter, and 2) a 42 nt duplication in the CP promoter. Two constructions were generated for each promoter fused with the GUS reporter gene for each TYLCV variants, and by transient expression experiments *in planta* it was established that the Rep promoter with the 29 nt deletion has lower activity (~ 50%) than its WT counterpart, TYLCV- IL [Sin], suggesting the existence of a positive regulatory element in the deleted segment. When analyzing this region in TYLCV-IL [SLP], an 18 nt element was identified that was conserved in most of the Old World (OW) begomoviruses, but nonexistent in the New World (NW) BGVs. In the case of the CP promoter no significant change in the activity related to the 42 nt duplication was observed, since the promoters of both TYLCV isolates expressed the reporter gene at a similar level. In the presence of a TrAP source, the activity of both CP promoters increased > 20-fold, compared to the promoter in the absence of the transactivator. **Finally, the CRISPR / Cas9 technology was used to develop a replication interference system against begomovirus.** The sgRNAs were designed by selecting conserved regions in the genomes of these viruses. In total 11 sgRNAs were designed, 6 of them displayed activity, this was demonstrated through the T7 endonuclease assay. Using this technique, it was shown that sgRNAs are capable of generating indels in TYLCV, RhGMSV and PepGMV. In agroinfiltration experiments in *N.benthamiana* plants, using a mix of sgRNAs it was possible to reduce the viral load of PepGMV ~ 9 times compared to the control. The sgRNAs presented this work can potentially interfere with the replication of a wide variety of begomoviruses.

**Key words: Rep, Iterons, S-Lin, Activator sequence, CRISPR/Cas9.**



## Introducción

Los virus de DNA de cadena sencilla (ssDNA) son una parte importante de la diversidad de la virósfera [1]. Aunque hace no mucho tiempo los virus de DNA eucariotas eran considerados comparativamente poco comunes con respecto a sus equivalentes de RNA, los estudios metagenómicos han demostrado la enorme diversidad de virus de ssDNA que infectan eucariotas en diferentes hábitats [2–8].

Los virus de ssDNA eucariotas se encuentran clasificados en diez familias. Ocho de estas familias se encuentran dentro del reino *Shotokuviriae* (nombre dado en honor a la emperatriz Shōtoku/kōken Tennō, a quien se le atribuye el poema que podría ser el primer registro en el 752 E.C. de una enfermedad causada por un virus de ssDNA en plantas de *Eupatorium* [9]). Estos virus tienen genomas pequeños de 1.7-13 kb [10]. Algunas especies de este reino cuentan con genomas segmentados de dos a ocho componentes [10–13]. De estas ocho familias, siete tienen genomas de ssDNA circular y tienen la particularidad que en este se encuentra codificada una proteína iniciadora de la replicación por círculo rodante (Rep) [10]. Esta proteína cuenta con cuatro dominios básicos. Un dominio de endonucleasa, con tres motivos característicos: Motivo I (FLTYP)[14], motivo II (HUH) y motivo III (YXXKD/E)[14,15]. Dentro de este dominio se encuentran los potenciales determinantes de especificidad replicativa en *trans* [16,17]. El motivo de oligomerización se encuentra parcialmente superpuesto con el anterior, y seguido de este se encuentra el dominio de helicasa de la superfamilia 3 (S3H) [10,18]. Este último dominio es característico solo en los miembros de este filo que infectan eucariotas [18]. En conjunto, estas siete familias se unificaron recientemente en el Filo *Cressdnaviricota*, nombre que viene de la denominación informal de “Virus circulares de DNA de cadena sencilla que codifican una proteína Rep” (del inglés, Circular Rep Encoding Single Stranded –CRESS- DNA virus). El filo se subdivide en dos clases *Arfiviricetes* y *Repensiviricetes*; esta última tiene un solo orden denominado *Geplafuvirales*, que a su vez incluye dos familias: *Genomoviridae* y *Geminiviridae*.

*Geminiviridae* cuenta con >500 especies [13,19], siendo la familia con el mayor número de especies dentro de este filo e incluso de toda la virósfera conocida [19]. La peculiar estructura de la cápside que le da el nombre a esta familia, asemeja a dos icosaedros incompletos fusionados por una de sus caras [20,21]. La cápside está compuesta de 110 subunidades de una sola proteína en arreglos de 22 pentámeros. Para obtener dicha estructura geminada, la proteína de la cápside adopta hasta tres conformaciones distintas en el extremo N-terminal [22]. Las dimensiones del virión son de ~ 22 nm de ancho x 35 nm de largo [13,22]. Esta estructura alberga una sola molécula de ssDNA circular 2.5-3.2 kb, por lo que en el caso de geminivirus (GVs) con dos componentes genómicos, su genoma total es de hasta 5 kb [13,23]. Los genes de los GVs, al tener un genoma considerablemente pequeño, se encuentran codificados en ambas cadenas, separados por una Región Intergénica (IR), además de que varios de ellos se encuentran superpuestos [24]. Infectan a una amplia gama de plantas, incluyendo monocotiledóneas y eudicotiledóneas. Los virus de esta familia son transmitidos por insectos del orden Hemíptera [25–27], de manera circular no propagativa. Dependiendo de la organización del genoma, la identidad en secuencia global, el rango de hospederos y el insecto vector, la familia está dividida en nueve géneros: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* y *Turncurtovirus*. Los cuatro géneros más estudiados y que a su vez albergan a las especies más destructoras son: *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Grablovirus* y *Mastrevirus* [28]. El momento en el desarrollo y la especie de la planta es determinante para que las enfermedades causadas por las infecciones de estos virus puedan provocar grandes pérdidas agroeconómicas, que en algunos casos alcanzan el 80-100% de la cosecha, en países en desarrollo [29,30].

A continuación, se describen brevemente los nueve géneros de la familia *Geminiviridae*:

## ***Mastrevirus***

Los miembros del género *Mastrevirus* infectan principalmente a monocotiledóneas, aunque existen algunas especies que también son capaces de infectar eudicotiledóneas [31–33]. Son transmitidos por chicharritas o salta-hojas (“leafhoppers”), principalmente *Cicadulina* sp. [34], aunque algunas especies son transmitidas por *Nesoclutha* sp. [35], *Psammotettix alienus* sp. [36], y *Orosius* sp. [37]. Tienen un genoma compuesto por una sola molécula de ssDNA de 2.7-2.8 kb, la cual codifica para cuatro proteínas: en el sentido del virión, V2 (proteína de movimiento, MP) y V1 (proteína de la cápside) [38]; mientras que en el sentido complementario C1 (Rep A) y mediante splicing C1::C2 (Rep). RepA está involucrada en la modificación del ciclo celular durante la infección uniéndose a la proteína del retinoblastoma (pRBR) de las plantas mediante el motivo LXCXE [39], mientras que Rep está involucrada en el corte de la secuencia nonanucleotídica “TAATATT’AC” para iniciar la replicación por círculo rodante (RCR) [40], además de secuestrar al factor de replicación C, posiblemente facilitando el inicio de la síntesis de DNA mediante la DNA pol  $\delta$  [41]. La proteína de la cápside está involucrada en la transmisión por el insecto vector, además en el extremo N-terminal se encuentra una secuencia de localización a núcleo (“Nuclear localization signal”, NLS) en los residuos 5-22, lo que permite el movimiento núcleo-citoplasma [42–44]. La interacción de CP con MP parece permitir el movimiento del DNA viral a células adyacentes, ya que si bien MP permite el movimiento de célula a célula, esta última no se une al DNA como lo hace CP [45]. Los ORFs son separados por dos regiones intergénicas, en el 5’ se encuentra la región intergénica larga (Long intergenic region, LIR), y en el 3’ la región intergénica corta (Short intergenic region, SIR) [13]. Estos virus se encuentran principalmente en África subsahariana donde al menos varias cepas (de la A-K) del *Mastrevirus Maize streak virus* (MSV) y *Maize streak Reunion virus* (MSRV) (denominados en conjunto como “African streak viruses”) afectan diversas especies de poáceas silvestres o de interés económico como el maíz (*Zea mays*), siendo este último el cereal más importante de dicha región [46]. En Europa, el cercano oriente, India y Asia se han encontrado aislados del mastrevirus, *Wheat*

*dwarf virus* (WDV), infectando Avena (*Avena sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), cebada (*Hordeum vulgare*) [47]. Es destacable que en Australia se han encontrado una gran diversidad de mastrevirus, principalmente emparentados con MVS. Estos son capaces de infectar maíz y trigo, aunque fueron encontrados en distintos pastos silvestres [48]. Hasta el momento, se han descrito cerca de 40 especies distintas de Mastrevirus.

### ***Begomovirus***

Este género es el más diverso en la familia con >400 especies reportadas que infectan solo a eudicotiledóneas [13,49]. Los begomovirus son transmitidos por un complejo de insectos morfológicamente indistinguibles [50–52] denominados colectivamente como “mosquita blanca” [53], los cuales al igual que los begomovirus, se encuentran diseminados en prácticamente todo el mundo, exceptuando la antártica [54].

A diferencia del resto de los miembros de la familia *Geminiviridae*, los begomovirus tienen un genoma compuesto por una (monopartita) o dos (bipartita) moléculas de DNA de cadena sencilla, con un tamaño de ~2.5 kb [13]. Cada molécula se encuentra encapsidada en un solo virión. Los begomovirus (BGVs) históricamente se dividen en dos grandes clados, los del Viejo Mundo (OW) y los del Nuevo Mundo (NW) [13]. La mayoría de los del NW son bipartitas [55–57] mientras que lo contrario ocurre en los del OW [57,58]. Dentro de cada clado (OW y NW) existen grupos o subclados, que se segregan de cada clado principal y son distintos de los begomovirus típicos del OW y NW. Estos grupos incluyen a los sweepovirus y los legumovirus, originarios del OW [59–61] y los virus del linaje del *Squash leaf curl virus* (S-Lin) originarios del NW [62].

Su distribución e importancia agroeconómica ha hecho a este el género más estudiado de la familia [28,63]. Los genomas tienen una capacidad de codificar de 6-8 ORFs [13]. En el caso de los begomovirus monopartitas o en el DNA-A de los bipartitas, en el sentido complementario se encuentran de 3 a 4

ORFs, *C1*, *C2*, *C3* y *C4*. En el sentido del virión de 1-2 ORFs, *V1* y *V2* (éste último exclusivo de los BGVs del OW) [13]. En el componente B se encuentran solo dos ORFs, uno en cada sentido, *BC1* y *BV1* [13]. *AC1* o *C1* codifica para la proteína Rep, indispensable para la replicación de estos virus debido a que inicia la RCR al introducir un corte endonucleolítico en la cadena “+” del virus [64–66], además de ligar la molécula de ssDNA generada en cada ciclo de replicación [67–69]. Adicionalmente, Rep modifica el ciclo celular interactuando con pRBR con un sitio de unión no canónico [70]. La proteína Rep de los miembros de este género (y en algunos otros dentro de esta familia) tienen un motivo dentro del dominio de unión al DNA (localizado entre el motivo II y III) denominado Geminivirus Rep Sequence (GRS). Mutaciones en este motivo impiden a Rep generar el corte al DNA [71]. *AC2* o *C2* codifica para TrAP, una proteína multifuncional con la capacidad de transactivar los promotores de los genes tardíos (ver más adelante) [72,73] y, dependiendo de la especie [74], tiene función como determinante de patogenicidad [75–77] y supresora de silenciamiento génico [77–80]. *AC3* o *C3* codifica para la proteína potenciadora de la replicación (Replication Enhancer protein, REn), una proteína que incrementa los niveles de replicación viral hasta 50 veces [81], interactúa con Rep, pRBR y la proteína PCNA [23,82]. *AC4* o *C4* codifica para una proteína para la cual se han descrito la mayor variedad de funciones dentro del género [83,84]. Su actividad tan variada se debe a que es una proteína intrínsecamente desordenada, es decir, que con pocos cambios de aa puede perder o ganar funciones, además de tener la capacidad de interactuar con una gran cantidad de proteínas [84]. Entre sus funciones más destacadas está la de supresor de silenciamiento génico [85–87], es una proteína de movimiento, modifica el límite de exclusión del plasmodesmo, facilitando el movimiento de célula a célula [80,88,89] y es un determinante de patogenicidad [90]. Estas funciones pueden estar o no presentes dependiendo de la especie e incluso puede ser no necesaria para la infección del virus [91,92]. Un ejemplo interesante es PepGMV, uno de los mayores patógenos que limitan la producción de chile en México, el cual carece de dicho ORF [93]. En el sentido del virión *AV1/VI* codifica para la proteína de la cápside (CP). La cual es el principal determinante de la

especificidad del insecto vector. CP tiene además función en el movimiento del DNA viral al núcleo mediante importinas/carioferinas [94–98]. Por otra parte, el gen AV2/V2 (ausente en los virus del NW) tiene funciones de movimiento, supresión de silenciamiento [80,99,100] y determinante de patogenicidad [74,76,100,101]. En el componente B, *BC1* codifica para la proteína del movimiento (MP) y *BV1* codifica la proteína transbordadora nuclear (Nuclear shuttle protein, NSP) que mueve el DNA viral del núcleo al citoplasma y viceversa. Juntas, las proteínas MP y NSP permiten el movimiento de célula a célula y de núcleo a citoplasma, respectivamente [102]. Para que exista una infección sistémica exitosa, en begomovirus bipartitas generalmente se requiere que ambos componentes se encuentren presentes [103]. Ambos componentes tienen una IR la cual es la región más variable en el genoma de estos virus, incluso entre cepas de la misma especie [104–106]. Dentro de dicha IR se encuentran los promotores principales para los genes que se transcriben en ambas direcciones [107–109], y el origen de replicación viral, caracterizado por un elemento con el potencial de adoptar una estructura tallo-asa, con la secuencia nonanucleotídica “TAATATT’AC” en el ápice, donde Rep genera el corte para iniciar la RCR [64–66]. Igualmente, dentro de la IR se encuentran los determinantes de especificidad replicativa en *cis*, denominados iterones [110–112], los cuales son reconocidos de forma secuencia específica [112] por aa presentes en la proteína Rep localizados en los primeros 130 aa de la misma. Los aa que determinan el reconocimiento específico del origen de replicación, es decir los que interactúan con los iterones, son denominados “determinantes de especificidad en *trans*” [17]. Los iterones son secuencias repetitivas de cinco a ocho nt con un arreglo característico, esto es, con un número de copias y una distribución de estas en la IR característico de su clado o subclado (o más ampliamente, su linaje viral) [62,111]. La IR del componente B, aunque de mayor tamaño que la del componente A, es casi idéntica en aproximadamente ~200 nt de la IR del componente A, por lo que se le denomina “Región Común” (RC) [13]. Otra característica de muchas especies de begomovirus es su asociación con satélites de DNA, denominados como *Alfasatelites*, *betasatelites* y *deltasatelites* (estos últimos pertenecientes a la familia

*Toleucusatellitidae*) [49]. En el caso de los Alfasatélites pueden replicarse por su cuenta y son encapsidados por su virus auxiliar o anfitrión (“helper”); los betasatélites suelen estar asociados con begomovirus del OW y dependen del virus helper para su replicación y encapsidación [113]; codifican para una proteína  $\beta$ C1, la cual es necesaria para la inducción de síntomas en algunos virus y también tiene actividad como supresor de silenciamiento [101,114–116]. Por último los deltasatélites son moléculas de DNA no codificantes y función desconocida, aunque en algunos casos reducen la acumulación del virus “helper” [117].

Debido al gran número de especies dentro de este género, los begomovirus en conjunto pueden infectar una gran cantidad de especies de plantas distintas, sin embargo, individualmente el rango de especies que pueden infectar es limitado [23].

### ***Curtovirus***

Género de importancia económica principalmente en Norteamérica[118]. Históricamente en las zonas semiáridas el suroeste de Estados Unidos [119–121] aunque recientemente también en el noroeste pacifico de dicha región[122]. Son transmitidos por el insecto salta-hojas (*Circulifer tenellus* [121]) El genoma de estos virus se compone de una sola molécula de ssDNA de ~3.0kb. Afectan los cultivos como la remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) [122], con pérdidas de este último del 10-100% en los Estados Unidos [122], son capaces de infectar a 300 especies de plantas de importancia económica [63,119,123]. Su genoma codifica 7 proteínas, 3 en el sentido del virión: V1, que codifica para la proteína de la cápside [124]; V2, que parece ser una proteína multifuncional, con actividad de proteína de movimiento homologa a la de begomovirus OW [63] además de estar asociada con la acumulación de ssDNA [124] y supresión de silenciamiento génico post-transcripcional [125]. V3, la cual parece estar involucrada en el movimiento junto a V2 y en la regulación de la proporción de ssDNA y dsDNA durante la infección [126]. Poseen además cuatro

genes en el sentido complementario: *C1*, codifica para la proteína Rep. *C2* promueve la susceptibilidad a infecciones [127] además de ser un supresor del silenciamiento [128] y potenciador de la replicación viral incluso de otros GVs [129]. *C3*, codifica para una proteína potenciadora de la replicación viral [130] y *C4* que codifica para una proteína involucrada en la modificación del ciclo celular y como determinante de patogenicidad [130,131]. Su genoma cuenta con una región intergénica, la cual contiene el origen de replicación viral, la estructura tallo-asa donde Rep genera un corte en la secuencia “TAATATT’AC” para iniciar la replicación por RCR [13]. Las tres especies que conforman este género son: *Beet curly top virus* (BCTV), la más diseminada de las tres especies, con ~10 cepas descritas hasta el momento, con mayor o menor distribución y síntomas variados [123], *Spinach severe curly top virus* (SSCTV) y *Horseradish curly top virus* (HrCTV) que infectan espinaca (*Spinacia oleracea*) [132,133] y rábano picante (*Armoracia rusticica*) [130] respectivamente.

### ***Becurtovirus***

El tamaño del genoma de estos virus es de ~3.0 kb. En este se encuentran codificados cinco ORFs. Tres en el sentido del virión: *V1*, *V2* y *V3* [134], que codifican proteínas similares a las encontradas en *Curtovirus*, principalmente con *V1*, que codifica para la proteína CP [133]. En el sentido complementario: *C1* y *C1:C2* [134] las cuales parecen estar evolutivamente más relacionados con los genes homólogos de mastrevirus [133]. La región intergénica, contiene los diversos elementos reguladores además de la estructura tallo-asa con el inusual sitio de corte “TAAGATT’CC” [133]. Al igual que los Mastrevirus, tiene una SIR localizada en el sitio de terminación de los genes de ambos sentidos. Son transmitidos por el salta-hojas *Circulifer haematoceps* [135]. El género se compone a la fecha de 3 especies, *Exomis microphylla latent virus* (EmLV) [136], *Spinach curly top Arizona virus* (SCTAV) y las cuatro cepas (A-D) de *Beet curly top iranian virus* (BCTIV) [134], infectando solo plantas eudicotiledóneas [137].



## ***Turncurtovirus***

El genoma de los miembros de este género tiene una organización similar al observado en *Curtovirus* [138], codificando para cuatro proteínas superpuestas en el sentido complementario (*C1-C4*) y con la diferencia que solo codifica para dos proteínas en el sentido de virión (*V1* y *V2*) [134]. Las proteínas codificadas por *C1* y *C4* (especialmente esta al tener una identidad de 70% con su homóloga de BCTV/Svr) están filogenéticamente más cercanas a las proteínas homologas vistas en los curtovirus [138]. Mientras que *V1* codifica para una proteína CP cercana pero claramente distinta a la de los curtovirus [138], el resto de sus proteínas, aunque no se ha demostrado su función, parecen ser homólogas a las de los curtovirus [134]. Como todos los GVs, tiene una IR donde se encuentra el origen de replicación y la estructura tallo-asa conservada con la secuencia nonanucleotídica "TAATATT'AC". El género está compuesto por tres especies: *Turnip curly top virus* (TCTV), *Turnip leaf roll virus* (TuLCV) [134] y el recientemente descrito *Sesame curly top virus* (SeCTV) [139]. El rango de especies vegetales que infectan estos virus no ha sido muy estudiado, aunque TCTV puede infectar y generar síntomas en nabo (*Brassica rapa*) y rábano (*Raphanus sativa*), mientras que en otras plantas las infecciones resultan asintomáticas [137]. Mediante experimentos en invernadero se determinó que son transmitidos por el salta-hojas *Circulifer haematoceps* [139] .

## ***Capulavirus***

Su genoma de ssDNA codifica para 7 proteínas: En el sentido del virión *V1* (Cápside) y *V2,V3,V4*, las cuales se encuentran superpuestas y pueden ser responsables de codificar para la proteína de movimiento mediante splicing [140]. En el sentido complementario, *C1,C1::C2* (similar al mecanismo de splicing en mastrevirus, aunque RepA, y por ende Rep, carece del sitio de unión canónico a pRBR, LXCXE [141], aunque conserva el motivo GRS [71,141]. El gen *C3* que se

encuentra superpuesta dentro de C1 de forma similar a C4, su función es desconocida [140]. los marcos abiertos de lectura están separados por dos regiones no codificantes (LIR y SIR) [140]. Actualmente el género tiene cuatro especies reportadas *Alfalfa leaf curl virus* (ALCV) infecta alfalfa (*Medicago sativa*), *Euphorbia caput-medusae latent virus* (EcmLV) genera una infección asintomática en la suculenta *Euphorbia caput medusae*, pero genera infecciones sintomáticas en tomate y tabaco (*Nicotiana benthamiana*). *Plantago lanceolata latent virus*. (PILV) y *French bean severe leaf curl virus* (FbSLCV) infectan *Plantago lanceolata* y frijol, respectivamente [140]. Los áfidos, parecen ser insecto vector que transmite a estos virus. Al menos para ALCV, se sabe que el insecto vector es el áfido con distribución prácticamente global, *Aphis craccivora* [141–143] y para y para PILV *Dysaphis plantaginea*, para el segundo [144]. Sin embargo, en ambos casos su transmisión por estos insectos resulta poco eficiente [143,144].

### **Grablovirus**

Los grablovirus son GVs de interés agroeconómico pues sus infecciones que causan la *Grape red blotch disease* (GRBD) están asociadas a la reducción en la calidad de frutos y semillas de la planta *Vitis vinífera* [145]. El tamaño de su genoma de ssDNA es de ~3.2 kb [146]. La organización de su genoma en el sentido del virión codifica para tres ORFs V1, V2 y V3, que codifican para la proteína de la cápside, y putativamente para proteínas de movimiento. El sentido complementario es similar a los *Capulavirus* codificando para 3 proteínas C1, C1::C2 y C3 que codifican para RepA, Rep y un ORF superpuesto en C1 que codifica para una putativa proteína con función desconocida [140,147]. Actualmente el género alberga tres especies *Grapevine red blotch virus* (GRBV) [140], *Wild Vitis latent virus* (WvLV) [148] y *Prunus latent virus* (PrLV) [147]. Son transmitidos por el salta-árboles (“treehopper”) de la alfalfa *Spissistilus festinus*, de forma circulativa no propagativa, con una eficiencia variable que depende de las condiciones experimentales [149].

### ***Topocuvirus***

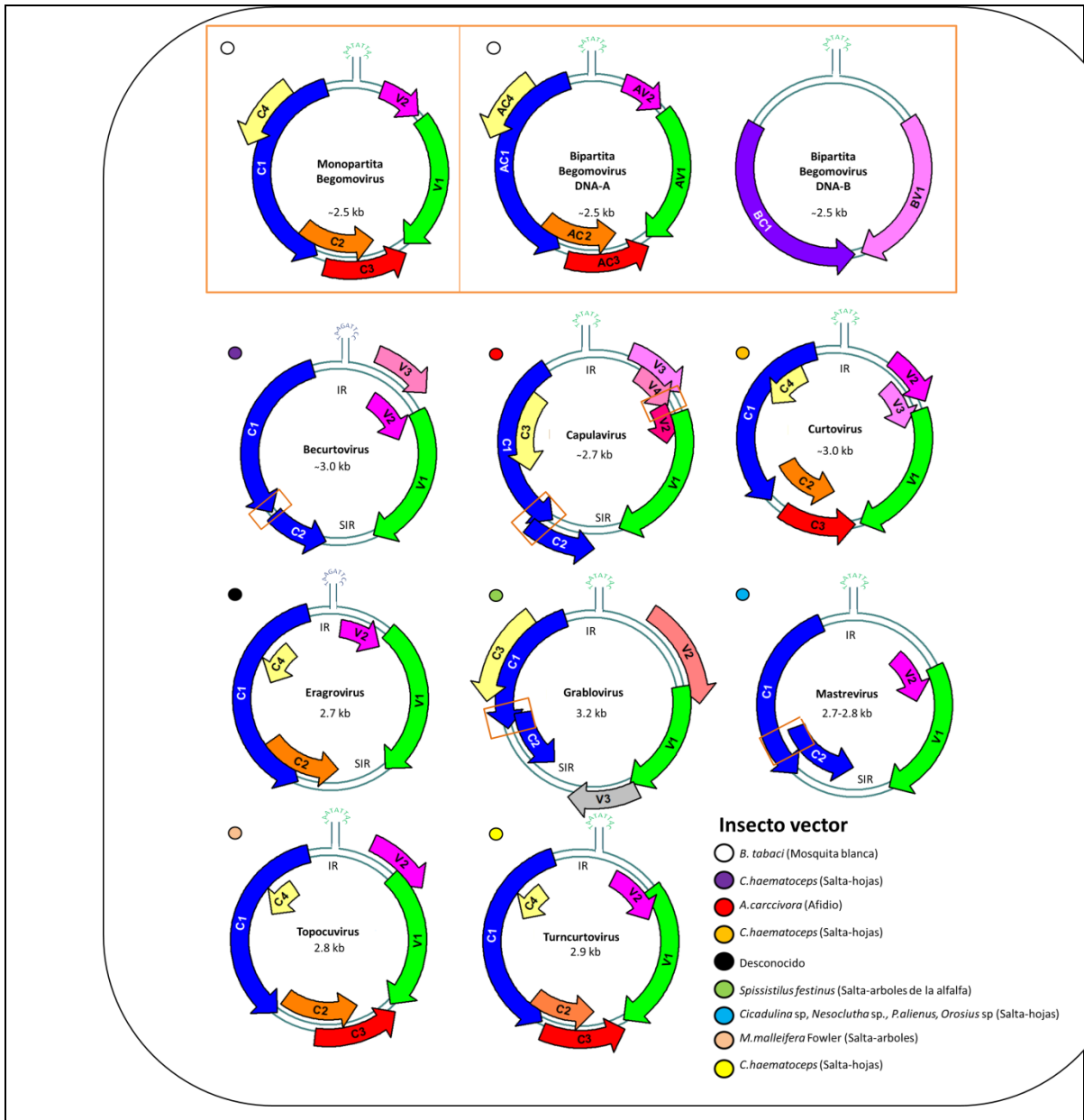
El género tiene un solo miembro que infecta plantas eudicotiledoneas: TPCTV. La organización de su genoma de 2.8 kb es prácticamente idéntica a la de los begomovirus, y el gen *V1* que codifica para la proteína de la cápside, es más similar a las encontradas en los curtovirus; no obstante, los análisis iniciales sugieren que su origen es recombinante, posiblemente entre un begomovirus y un mastrevirus [150]. Esta hipótesis se reforzó por la capacidad de TPCTV para permitir la infección sistémica del componente genómico A de los begomovirus TGMV y ACMV en ausencia de su componente B [151]. Son transmitidos por el salta-árboles *Micrutalis malleifera* Fowler [150]. Hasta el momento solo se había encontrado en el sur de Estados Unidos. Recientemente en la provincia de Zhejiang, China, mediante secuenciación masiva de muestras sintomáticas de hierba mora (*Solanum nigrum*) se generaron contigs que pertenecían a una molécula de DNA circular. Dicha molécula tiene 77.1% de similitud de secuencia con TPCTV. Mediante agroinfiltración se determinó que esta molécula era en realidad un virus con el nombre provisional de *Nightshade curly top virus* (NCTV) que podía infectar sistémica y sintomáticamente a *S. nigrum*, *N. benthamiana*, *S. lycopersicum* y papa (*S. tuberosum*) [152].

### ***Eragrovirus***

Este género se compone de solo una especie de virus, *Eragrostis curvula streak virus* (ECSV) la cual fue aislada de la planta conocida como pasto llorón (*Eragrostis curvula*) [153], (Con dos cepas reportadas A-B) [134]. Los aislados de estos virus se han encontrado en especies monocotiledóneas. Su genoma de 2.7 kb codifica para cuatro proteínas, dos en cada sentido y separadas por una IR y una SIR (En este caso la SIR es más pequeña que la IR) [134]. La proteína CP está filogenéticamente más emparentada, con los mastrevirus euroasiáticos colocándose dentro del clúster de WDV y *Oat dwarf virus* (ODV) [134]. Su putativa

MP, codificada por V2 no tiene similitud con otras MP dentro de la familia [134] y carece del dominio hidrofóbico que tienen las MP de mastrevirus [153]. Mientras que la proteína Rep es similar a la de otros GVs. Su región intergénica contiene el origen de replicación y la secuencia nonanucleotídica “TAAGATT’CC”, al igual que los *Becurtovirus* [134]. Aunque, como se mencionó previamente la proteína CP de este virus es similar a la vista en los mastrevirus; se desconoce su insecto vector [134,153].

La Figura 1 muestra esquemáticamente la organización del genoma de cada género de la familia *Geminiviridae*.



**Figura 1 Organización genómica de los virus de la familia *Geminiviridae***

Se muestran los marcos abiertos de lectura de cada componente viral. En cian la secuencia nonanucleotídica más representada en la familia “TAATATTAC” mientras que en azul oscuro la secuencia “TAAGATTCC” presente en los miembros de los géneros *Eragrovirus* y *Becurtovirus*. El círculo de color en la izquierda superior de cada componente indica el insecto vector. La leyenda de cada círculo se muestra en la parte inferior derecha.

Los begomovirus del NW no tienen el gen V2.

## Géneros en clasificación

Recientemente se clasificaron a 12 virus divergentes a los géneros existentes, formando 5 nuevos géneros: *Citlodavirus*, *Maldovirus*, *Mulcrilevirus*, *Opunvirus* y *Topilevirus*.

Los *Citlodavirus* con cuatro especies: *Camellia chlorotic dwarf-associated virus* (CaCDaV) [154] *Citrus chlorotic dwarf associated virus* (CCDaV) [155] *Paper mulberry leaf curl virus 2* (PMLCV-2) [156] y *Passion fruit chlorotic mottle virus* (PCMoV) [157]. Cuentan con un genoma de ~3.7 kb, y codifican para 5-6 proteínas. Al igual que los becurtovirus, capulavirus, grablovirus y mastrevirus, la proteína Rep se encuentra codificada en dos ORFs que se pueden unir mediante splicing C1:C2. De manera interesante, todos estos virus se encuentran agrupados en un clado cercano a los becurtovirus. En la IR dentro de estructura tallo-asa está la secuencia nonanucleotídica “TAATATT’AC” y además poseen una SIR. En el sentido del virión, se encuentran 3-4 ORFs, por los dominios que se encuentran en dicha secuencia se puede considerar que V1, codifica para CP, V2 para una MP similar a la de los GVs del OW, y V3 codifica para una proteína hipotética y V4 codifica para una MP similar a la codificada en el componente B de los begomovirus bipartitas [154–157]. Estas características llamativas han permitido especular que posiblemente son un eslabón entre los begomovirus monopartitas/becurtovirus y los begomovirus bipartitas [157]. Aunque se ha logrado infectar plantas con estos virus en el laboratorio [154–157], se desconoce si realmente su cápside es geminada y sobre su insecto vector, se especula que al menos para CCDaV son posiblemente transmitidos por la mosquita *Parabemisia myricae*, presente en América, Asia y Europa [155].

MCLV (*Mulberry crinkle leaf virus*) y PMLCV-1 formarían parte del género *Mulcrilevirus*. Aunque similares a los anteriores, su genoma es comparativamente más pequeño de ~3 kb. Igualmente cuentan con un gen para la proteína Rep compuesta por dos ORFs C1:C2 separados por un intrón, y son los únicos genes codificados en el sentido complementario [156,158]. En el sentido del virión existen cuatro ORFs, V1 codifica CP, V2 lo que parecer ser una MP, V3 es

aparentemente un determinante de patogenicidad; la función de V4 es desconocida. En la IR se encuentra la estructura tallo-asa y en esta la secuencia nonanucleotídica “TAATATT’AC” [158]. Aunque con una eficiencia relativamente baja, al menos MCLV es transmitido por el salta-hojas *Tautoneura mori* [159]

Los *Maldovirus*, se componen de AGV1 (Apple geminivirus 1) Grapevine geminivirus A (GGVA) y *Juncus maritimus geminivirus 1* (JGV1 o JaMV) [136], su genoma de ~2.9 kb contiene seis ORFs, en una organización similar a los begomovirus OW o a los *Curtovirus*. En el sentido complementario se encuentran los genes C1, C2, C3 y C4, mientras que en el sentido del virión V1 junto con V2. C1 codifica una proteína Rep, ya que contiene todos los dominios característicos de esta, además de ser un posible determinante de patogenicidad [160]. C2 y C3, debido a su localización nuclear putativamente serían equivalentes a TrAP y REN [160], y al menos en GGVA C2 es un determinante de patogenicidad [161]. La función de la proteína codificada en C4, no se ha determinado todavía, sin embargo parece ser un determinante de patogenicidad [160,161], y esta noción se refuerza debido a su localización en cloroplastos [162], no se descarta que pueda tener múltiples funciones como otras proteínas C4 [160]. Estos virus tiene una IR con la estructura tallo-asa característica y la secuencia nonanucleotídica “TAATATT’AC”, Por otra parte V1 y V2 codificarían para la proteína CP y un supresor del PTGS [160,161], respectivamente.

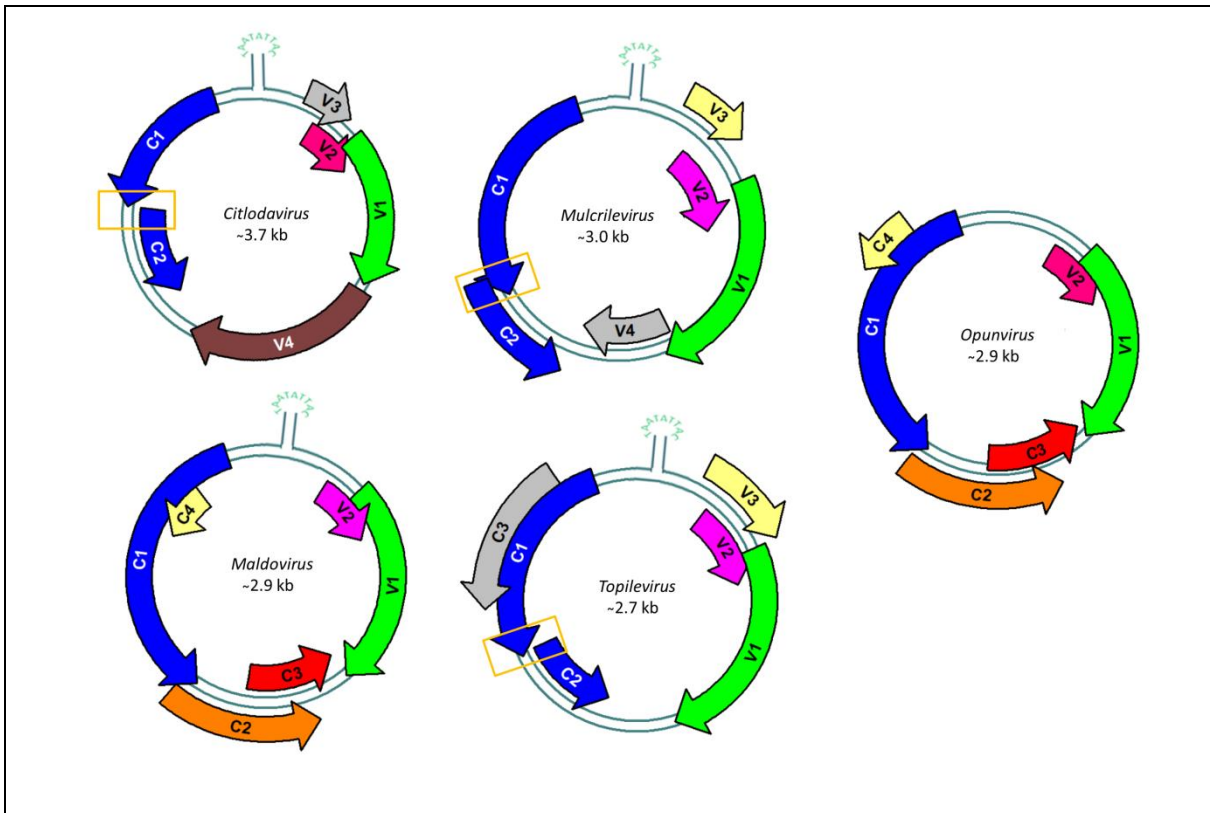
El género *Topilevirus* tiene dos especies ToALCV [163] y TaGV1 [164]. Los genomas de estos virus tienen un tamaño de ~2.7 kb, codificando a 5-6 ORFs, 3 en el sentido del virión y de 2 a 3 en el complementario. La organización de su genoma parece modular, como si fueran producto de la recombinación de un capulavirus (genes C1:C2) [163,164] y un becurtovirus/curtovirus/topocuvirus [163]. La función de las proteínas hasta el momento se ha determinado basado en la identidad de secuencia y los dominios característicos presentes en estas [164]. C1 codifica para RepA y C1:C2 mediante splicing codifica para Rep.V1, V2 y V3 codifican para CP, una posible MP y una proteína reguladora de la proporción de ssDNA/dsDNA, tienen tanto una IR con su respectiva estructura tallo-asa y la

secuencia nonanucleotídica “TAATATT’AC” y una SIR [163]. El insecto vector, basado en la secuencia de la proteína CP podría ser el salta-arboles (treehoper) *Micrutalis malleifera* [163].

Por último, el género *Opunvirus*, con OpV1 como único miembro. En un trabajo reciente se obtuvieron de plantas cactáceas de 20 especies distintas y de cochinillas que se alimentan de esas plantas (*Dactylopius* sp.) un total de 79 aislados de este virus divergente [165]. Con un genoma de ~2.9 kb con al menos 6 ORFs que potencialmente codifican para proteínas posicionalmente conservadas. En el sentido del virión se encuentran los genes *V1* y *V2*, que codifican para CP y presumiblemente una MP, respectivamente; mientras que *C1*, *C2*, *C3* y *C4* en el sentido complementario, codifican para una proteína Rep y presumiblemente para TrAP, REn y un determinante de patogenicidad, respectivamente [165]. Rep y CP como las proteínas más conservadas dentro de la familia, cuentan con sus respectivos dominios motivos y conservados. Al tener una baja identidad de secuencia con otros GVs reportados (>64.9%) pueden ser considerados como nuevo género de GVs que se encuentra en cactáceas y su infección no genera síntomas incluso en la planta modelo *N.benthamiana* [165]. Estos virus se les denomina simplemente como “Opuntia virus” con 15 genotipos que comparten >78.4% de secuencia entre ellos [165]. Al igual que todos los GVs, su genoma contiene una región intergénica con una estructura tallo asa y la secuencia nonanucleotídica “TAATATTAC”, además se localizaron los putativos iterones siendo la secuencia core “GGGTCC” la más común, pero existen variantes y en arreglos de dos a tres copias, localizados entre el ORF de *C1* y la caja TATA [165]. Aunque el DNA de estos virus también fue detectado en cochinillas (*Dactylopius* sp.) y su proteína CP forma un clúster separado al resto de los GVs reportados [166], se necesitan experimentos para comprobar esta hipótesis [165].

La Figura 2 muestra esquemáticamente la organización del genoma de los 5 nuevos géneros de la familia *Geminiviridae*.





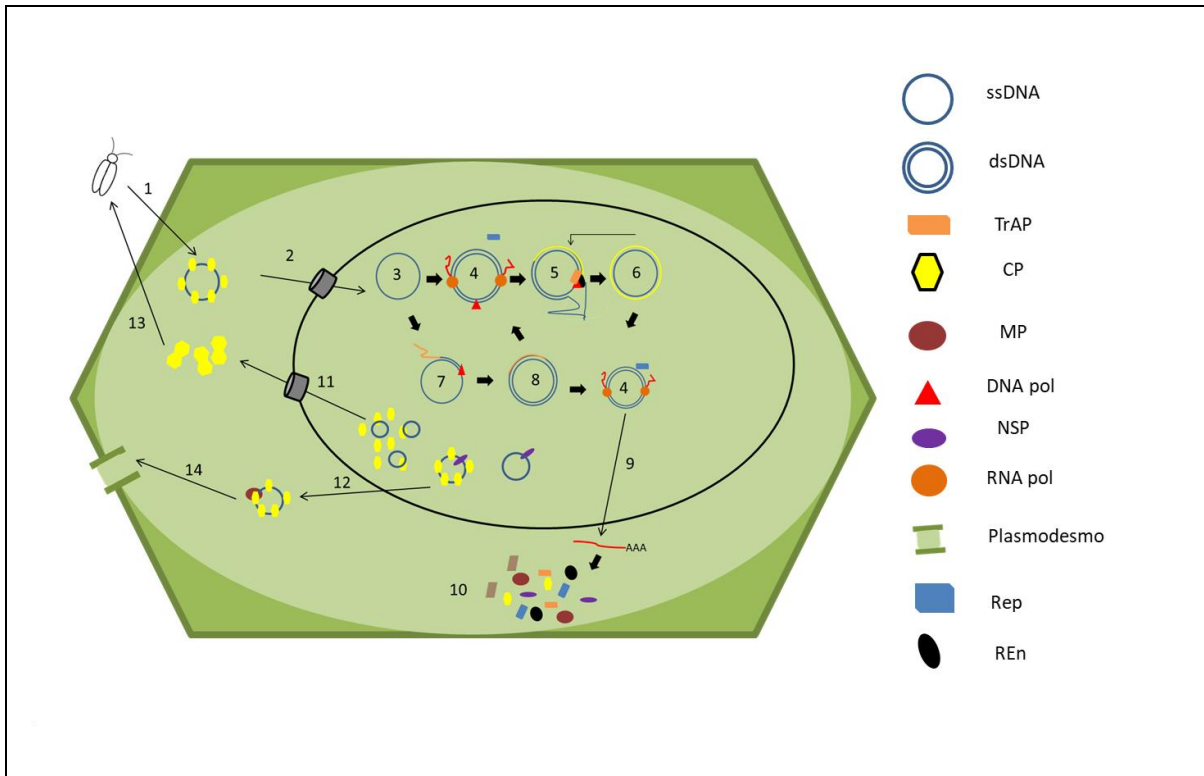
**Figura 2 Organización del genoma de los nuevos géneros de la familia Geminiviridae.** Se muestra esquemáticamente la organización del genoma de cada género. Se mantiene el color de los ORFs representando su posible función. Azul eléctrico para la proteína Rep, naranja para la proteína TrAP, rojo para REn, amarillo para determinante de patogenicidad (como C4), magenta para MP y verde para CP. El color café representa un tipo distinto de MP, similar al del componente B en begomovirus bipartitas y el color gris indica una función desconocida.

## Ciclo infectivo

Al ser los begomovirus el género más estudiado de la familia *Geminiviridae* [28,63], se usarán como ejemplo para describir la replicación de estos virus (Figura 3). El ciclo infectivo inicia cuando el insecto vector introduce su estilete para alimentarse de la savia de la planta, introduciendo las partículas virales que se encuentran en las glándulas salivales primarias del insecto [167–169]. La proteína de la cápside cuenta con una NLS [94,170], la cual le permite transmitir el genoma del virus al núcleo de la célula vegetal a través de los poros nucleares con la asistencia de carioferinas ( $Kap\alpha 1$  e  $Imp\alpha$ , en el caso de begomovirus OW y NW, respectivamente) [96–98]. Una vez dentro del núcleo de la célula huésped, la molécula de ssDNA se convierte en un intermediario de doble cadena (dsDNA) mediante las DNA polimerasas de la planta. A esta molécula se le incorporan de 12-13 nucleosomas [171,172]. Aunque el mecanismo no ha sido tan estudiado como en los mastrevirus (MSV y WDV) donde un iniciador (“primer”) de DNA de ~80 nt, que hibrida con una secuencia de la SIR, se encuentra presente dentro de la cápside y funciona como iniciador para la síntesis de la cadena anti-sentido del virus [37,173,174]. En el caso de los begomovirus, al menos en ACMV existe un trabajo que propone un modelo con un mecanismo similar, donde el iniciador de RNA se encuentra entre los nucleótidos 2581 y 221 nt, dentro de la IR [175]. La molécula de dsDNA generada tiene actividad transcripcional y replicativa. La RNA pol II de la planta permite la transcripción del genoma [176], iniciando con el gen AC1/C1, permitiendo la síntesis de la proteína Rep. Después de ser sintetizada esta proteína es translocada del citoplasma al núcleo [177,178]. Los GVs se replican en tejidos completamente diferenciados (hojas o tejido vascular) [179], por lo que previo a la replicación, las proteínas virales promueven un ambiente propicio para la replicación alterando el ciclo celular pasándolo del arresto de G0/G1 a promover los genes tempranos durante las fases S/G2, pero evitando la mitosis [180]. La proteína Rep, al ser la única proteína esencial para la replicación viral, interactúa con proteínas del hospedero para activar la síntesis del replisoma. Rep interactúa con la proteína relacionada a Retinoblastoma (RBR), la cual regula negativamente la expresión de los genes de la maquinaria de replicación

interactuando con los factores de transcripción E2F [181]. Durante la infección, Rep interactúa con RBR, permitiendo que los factores E2F activen los genes que promueven la replicación [182]. Rep (junto con REn) interactúa con PCNA (la cual se acumula en los tejidos infectados [179]), el cual es un factor de procesividad de la DNA pol  $\delta$ . Rep reconoce a la región intergénica al interactuar con secuencias repetitivas denominadas iterones [110–112,183,184], que se encuentran a distancias cortas pero variables del elemento tallo-asa del *Ori* viral. subsecuentemente, Rep genera un corte de cadena sencilla en la secuencia TAATATT'AC [65]. Rep, mediante el grupo OH presente en la tirosina del motivo III, genera un enlace covalente con el 5'-PO<sub>4</sub> de la cadena cortada [185]. Dicha cadena, desde el 3'-OH generado es usada como primer por las DNA polimerasa de la planta [186–188], mientras que la cadena naciente remueve a la cadena complementaria. Una vez que termina de replicarse, la cadena parental es desplazada y religada por la proteína Rep [40]. Esta molécula de ssDNA puede reiniciar el proceso previamente descrito. La recién generada molécula de dsDNA es un híbrido compuesto por la cadena nueva y la parental, que fue usada como plantilla durante la replicación. Esta molécula resultante puede ser encapsidada, y translocada a una célula adyacente de la planta o reiniciar la RCR. Más tarde, durante la infección, la misma proteína Rep reprime la expresión de del gen AC1/C1, permitiendo la expresión del gen AC2/C2. La proteína TrAP, resultante del transcrito del gen previamente mencionado, activa los genes “tardíos” AV1/V1 y BV1, que codifican para la proteína de la cápside y la proteína lanzadera nuclear, respectivamente [72]. NSP, se encarga de mover al DNA viral (al parecer, dependiendo del virus) como ssDNA [43,189] o dsDNA [190]), al citoplasma [191] para ser encapsidado por CP y después ser adquirido nuevamente por el insecto vector durante la ingesta, o bien, translocado a otra célula por MP [192–194]. Esta última proteína al interactuar con la proteína SYTA (la cual promueve la endocitosis en planta), además de incrementar el tamaño de exclusión del plasmodesmo [88] promoviendo la infección sistémica de la planta [195]. Otro mecanismo de replicación del DNA viral es la Replicación Dependiente de Recombinación (RDR), en el que la molécula de dsDNA es invadida por otra

molécula de ssDNA lineal, resultante de otro replicón, esta molécula funciona como primer, facilitando la replicación viral, independiente del corte inicial de Rep [196–199]. Este mecanismo además de explicar la aparición de variantes o especies de origen recombinante [196,198], también explica la frecuente reversión de mutantes a versiones WT [197].



**Figura 3 Ciclo infeccioso de los begomovirus**

1) La infección inicia cuando el insecto vector *B. tabaci* se alimenta de la savia del floema introduciendo las partículas virales. 2) Las proteínas de la cápside ayudan a introducir la molécula de ssDNA al núcleo a través de los poros nucleares, con la asistencia de carioferinas. 3) la molécula de ssDNA es convertida a dsDNA. 4) por las DNA pol de la planta, siendo esta molécula replicativa y 9) transcripcionalmente activa (permitiendo la transcripción de los genes tempranos como Rep y los genes tardíos como CP, mediante TrAP) y 10) traducción de las proteínas virales. 5) La proteína viral Rep se une a la región intergénica interactuando con los iterones. Genera un corte en la estructura tallo-asa y, generandoun enlace covalente con el 5'-PO4 de la cadena cortada. Dicha cadena es usada como primer por las DNA polimerasa de la planta iniciando el mecanismo de RCR. La proteína REn potencia la replicación. Al finalizar se regenera una nueva molécula de ssDNA y 6) una molécula dsDNA permitiendo el reinicio del proceso de replicación. 7) RDR es otro mecanismo que le permite al virus usar moléculas de ssDNA complementarias a una región de genoma viral. Esta molécula funciona como primer para las DNA pol de la planta y da lugar a

moléculas recombinantes 8). Las moléculas de ssDNA tienen tres posibles destinos, ya sea reiniciar la replicación, 11) ser encapsidadas en el núcleo, transportadas al citoplasma y colectadas por el insecto vector durante la ingesta, 12) ser translocadas del núcleo a citoplasma por NSP, y a continuación 13) colectadas por el insecto vector durante la ingesta, o 14) mediante MP a otras células adyacentes mediante plasmodesmata. Siendo esta la ruta general para los begomovirus bipartitas del NW. V2 (que codifica para una proteína distinta a la codificada por BC1 aunque también denominada a veces como MP) y posiblemente C4, permiten el movimiento de célula a célula en begomovirus monopartitas mediante un mecanismo distinto. Adaptado de Kumar, 2019[200], Hanley-Bowdoin et al, 2013 [201] y Pooggin, 2013 [202].

## **Mecanismos de defensa de las plantas contra geminivirus**

Aunque no existen registros fósiles y el origen del ancestro común de los geminivirus no ha sido elucidado [203–205], existe evidencia molecular que los GVs ya habían divergido al menos en los géneros *Mastrevirus* y *Begomovirus* [206], coexistiendo con las plantas desde antes de la fragmentación del súpercontinente Gondwana hace ~100 millones de años [204,207].

Las plantas han evolucionado, perfeccionando mecanismos para contrarrestar las infecciones causadas por estos virus. Dichos mecanismos pueden clasificarse en sistema inmune innato y adaptativo. Ambos sistemas no son totalmente independientes uno del otro, y suele ocurrir que algunas señales (como fitohormonas) al activar al sistema innato esta se superpone con la del sistema adaptativo [208,209].

El sistema innato depende de genes de resistencia, mientras que el adaptativo depende del silenciamiento mediante RNAs. Los genes de resistencia son dirigidos específicamente a un patógeno o a un grupo de estos, teniendo un espectro más limitado [210,211], aunque dicha defensa depende de la activación por algún tipo de molécula perteneciente al patógeno localizada en el citosol, denominada efector. Esta defensa en ausencia del efector (o fitohormona), se mantiene inactiva o es mantenida de forma basal en la planta [211–214]. El sistema adaptativo es más general, y consiste en el silenciamiento génico transcripcional o postranscripcional (TGS y PTGS, respectivamente). Aunque PTGS y TGS comparten el uso de RNAs pequeños, su mecanismo y localización son diferentes.

La PTGS es quizás la ruta más versátil que tiene la planta para contrarrestar distintos virus [78,80,128,215]. Ocurre en el citoplasma, degradando al RNA blanco derivado de un transcrito o del genoma de un virus. Para generar esta degradación, primero se tienen que generar moléculas de RNAi (21-22 nt) [216–218]. Para la biosíntesis de estas moléculas de RNA pequeñas las enzimas DCL 2/4 cortan las moléculas de dsRNA (ya sea por traslape de transcritos de

sentido opuesto o directamente, si el genoma del virus es dsRNA) [80] y es posteriormente que estas moléculas serán amplificadas por RdRp de la planta (RDR1-RDR2 y/o RDR6) [219,220]. La metiltransferasa HEN1 agregará un grupo metilo en las moléculas de dsRNA amplificadas en el 2'-O, evitando la adición de uridinas al 3'-OH y por lo tanto su degradación [218]. Estas moléculas de RNA son capturadas por AGO 1 [221], la cual forma parte del complejo RISC que tiene la actividad de ribonucleasa, este complejo de manera secuencia- dependiente generará un corte en el RNA blanco generando moléculas aberrantes que serán degradadas [222].

En el caso del TGS, este ocurre en el núcleo y funciona directamente en el DNA viral o principalmente con genes de la planta [128]. El mecanismo es similar al visto en PTGS. La molécula de RNA de la secuencia blanco es generada por la RNA Pol IV, enseguida, la RDR2 asociada sintetizara la cadena complementaria del transcrito de RNA Pol IV [223]. La molécula de dsRNA es cortada en fragmentos de 24 nt por DCL3 [217,224] y HEN1 mediante el mismo mecanismo de metilación evita la degradación de estos [218]. Las moléculas de ssRNA son tomadas por AGO4 del citoplasma al núcleo [221], donde será reclutada por el complejo RITSC. Este complejo mediante AGO4 interactúa directamente con el carboxilo terminal de la RNA Pol V solo si el transcrito de esta corresponde mediante hibridación con el que porta AGO4. Completada la fase anterior el complejo secuestra a la metiltransferasa DRM2 metilando las citosinas del DNA blanco (independientemente de su contexto) [202,225]. Prácticamente todo el genoma de estos virus es blanco de metilación en citosinas, ya sea en patrones simétricos como CG y CHG o asimétricos como CHH, estos últimos asociados a la metilación de histonas [226] y siendo los primeros los más representados en plantas. Esta forma de metilación es reversible pues es usada durante el desarrollo de la planta para regular la expresión de genes endógenos y contrarrestar la actividad de transposones [227].

Los GVs son propensos al silenciamiento génico, ya sea por interferencia mediante el complejo RISC o RITSC [78–80,85–87,99–101,216,228–230]. Como



se mencionó previamente, los geminivirus tienen genes superpuestos codificados en ambas cadenas que generan transcritos que pueden hibridar y ser precursores de RNAi para PTGS. Además, la molécula dsDNA transcripcionalmente activa es reconocida por la RNA pol IV, por lo cual es blanco de TGS. La IR de los GVs es propensa a la metilación [223,231], y es de hecho una marca característica en el genoma de PepGMV presente en plantas recuperadas [231]. Esto sustenta la importancia de la DCL3, esencial para la metilación del DNA, ya que a diferencia de DCL1 y DCL2, al ser abolida en *A.thaliana*, esta fue incapaz de recuperarse de la infección por curtovirus [232].

Otra ruta dentro de este mecanismo en eucariotas, es la metilación de histonas. El DNA viral en su estado replicativamente activo, es decir dsDNA, usando las histonas del hospedero [233] es capaz de generar mini cromosomas compuestos de 11-13 nucleosomas, siendo este último su estado inactivo [172].

Las metiltransferasas de mantenimiento conservan el estado de metilación del DNA. La remodeladora de cromatina DEFICIENT IN DNA METHYLATION 1 (DDM1) permite el acceso de las metiltransferasas al dsDNA [234]. Las enzimas de mantenimiento son: METHYL TRANSFERASE 1 (MET1) para CG, CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3) para CHG y CHROMOMETHYLASE 2 (CMT2) para CHH. En el caso de la marca de heterocromatina "H3K9Me" es mantenida por las metiltransferasas KRYPTONITE SUVH4/KYP [235] la cual a su vez interactúa con CMT3 y CMT2 y estas últimas se unen a H3K9Me2 [236]. En conjunto estos mecanismos se complementan mutuamente y podría considerarse, (al carecer de anticuerpos o células inmunitarias especializadas) como la respuesta inmune adaptativa de la planta, pues se adecua dependiendo del patógeno.

Los genes de resistencia (genes R) en cambio, suelen tener una función más limitada, pero fuerte contra los patógenos. Los genes de resistencia cuentan con mecanismos muy variados, normalmente interrumpen al ciclo viral en uno o más de sus estados evitando la infección. Aunque la mayoría pertenecen a la familia de proteínas con un dominio de unión a nucleótidos-repetidos ricos en leucina (NB-

LRR, por sus iniciales en inglés) [237], las cuales, sin importar al patógeno que reconozcan, consiste en tres dominios: 1) En el N-terminal, una estructura tipo “coiled-coil” o receptores tipo Toll o interleucina (TIR), encargado en la interacción con otras proteínas para activar mecanismos que confieran la respuesta de resistencia. 2) En el centro, el sitio de unión a nucleótidos. 3) El repetido rico en leucinas, el cual permite la detección del patógeno específico, siendo la parte más variable de la proteína [238].

La mayoría de los genes R dominantes son monogénico, producen una respuesta de HR y suelen perder su efectividad relativamente rápido. En cambio los genes R recesivos suelen estar más involucrados en la resistencia celular específica. Estos últimos suelen generar una resistencia más duradera, que sus contrapartes dominantes.

Con la agricultura y la posterior domesticación de plantas, se han seleccionado caracteres que promueven fenotipos deseados en la agricultura como los siguientes: mayor rendimiento, mejores características organolépticas, mayor tamaño, etc. Sin embargo, esta domesticación dio lugar a la pérdida de genes de resistencia [239], volviendo a las variedades cultivables más susceptibles a patógenos y por ello a enfermedades [240,241].

Diversos genes de resistencia contra geminivirus han sido descritos, aunque no existe evidencia que un solo gen funcione para resistencia general contra GVs.

Se han encontrado al menos 6 genes de resistencia, *Ty-1* a *Ty-6*. *Ty-1* y *Ty-3* (llamado actualmente *Ty-1/3*), se encuentran en el cromosoma 6 y obtenido en jitomate mediante introgresión con *S. chilense*, (>80% de las concesiones de esta especie tienen algún grado de resistencia a TYLCV [242]), ambos genes son alelos que codifican para una RdRp clase  $\gamma$  [229], su mecanismo posiblemente esté involucrado en la metilación de citosinas del DNA viral, aunque su efectividad se ve disminuida en coinfección con otros virus [229,243]. *Ty-2* se encuentra en el cromosoma 11 [244] y fue obtenido mediante la introgresión con *S. habrochaites*,

codifica para una Nb-LRR denominada TYNBS1 [245], la cual le proporciona resistencia a TYLCV como se demostró en plantas transgénicas de *S. lycopersicum* [245]. *Ty-5* del cromosoma 4 proveniente, posiblemente de *S. peruvianum* o *S. lycopersicum* [246], el gen también es gen conocido como “Pelota” o “Pelo” codifica para una versión mutante de un factor de vigilancia de mRNA [246]; esta versión mutante evita que los ribosomas puedan ser reciclados evitando la traducción de los mRNAs virales disminuyendo el título viral, aunque su efecto en el rendimiento de la planta es considerable en plantas homocigotas de este gen, condición necesaria para generar un fenotipo de resistencia [246] y *Ty-6*, el cual se encuentra en el cromosoma 10 de *S. chilense*; aún se desconoce que codifica dicho gen pero se sabe que confiere resistencia a TYLCV y al begomovirus bipartita *Tomato mottle virus*, se ha observado que su eficiencia como gen de resistencia es del tipo dominante parcial, puede complementarse de igual manera con los genes *Ty-3* y *Ty-5*, los cuales son dominante parcial y recesivo, respectivamente [246–248]. En comparación con los otros genes de resistencia, *Ty-4* no genera una resistencia tan efectiva y duradera [249].

Se han encontrado resistencia para PHYVV [250] y PepGMV [250–252]. En una planta de *Capsicum chinense* (no. de acceso BG-3821) se observó que expresaba una proteína tipo germin, denominada CchGLP, la cual era sobreexpresada en interacciones con distintos patógenos, incluyendo PHYVV [251]. Sobreexpresión de CchGLP en plantas de *N. tabacum* transgénicas, confería una tolerancia media a PHYVV, aunque ésta era reducida en coinfección con PepGMV, sin tener un fenotipo tan severo como las plantas WT infectadas [252]. Las plantas transgénicas sobreexpresantes de CchGLP también tenían una mayor producción de ROS, en comparación de las plantas WT infectadas [252].

### **Mecanismos de contradefensa de los geminivirus**

Para contrarrestar a los mecanismos de defensa de la planta, los GVs han evolucionado adaptando sus proteínas.

Durante las infecciones causadas por patógenos, el sistema de defensa innato produce una HR. Dicha respuesta consiste en la aparición transitoria de ROS y subsiguientemente la producción de fitoalexinas [74], dando lugar a la muerte celular evitando la propagación del patógeno. Subsecuentemente, la planta en futuras infecciones puede actuar de manera similar mediante SAR, inducida por el ácido acetilsalicílico.

Las infecciones causadas por estos virus no causan HR, aunque sí por la sobreexpresión de algunas proteínas virales, tales como Rep, V2, y NSP. Se ha sugerido que el motivo de este fenómeno es causado por distintas proteínas virales que evitan el proceso de muerte celular [74,100,253–255].

La C2 de *Papaya leaf curl virus* (PaLCuV), *Cotton leaf curl Kokhran virus* (CLCuKoV) y *Tomato leaf curl New Delh virus* (ToLCNDV), parece contrarrestar la HR causada por la sobreexpresión de V2 de los primeros dos [74] y la NSP del último [74,253]. Es importante mencionar que la capacidad de C2 para contrarrestar la HR no es conservada, un ejemplo es la proteína homóloga de TYLCSV y TYLCCV, la cual en lugar de contrarrestarla la promueve [76,78].

La proteína Rep de ACMV al ser sobreexpresada también causa un fenotipo de HR, se especula que posiblemente C4 sea la proteína encargada de contrarrestar dicho fenotipo [255]. En el caso TLCYnV (una especie resultante de la recombinación de TYLCCV como parental mayor y con otro begomovirus que le aporó una C4 más virulenta [256] ) C4, durante la infección activa la expresión del gen de *Hypersensitive induced reaction* o *HIR1*, el cual codifica una proteína que se asocia a la membrana celular y provoca la HR en arroz, chile y trigo (junto con *HIR3*) [257–259]. En *N.benthamiana* la proteína C4 de TLCYnV interactúa con la proteína *HIR1*, esta interacción inhibe la homodimerización de la proteína *HIR1*, necesaria para la HR. Además, promueve el reconocimiento de *HIR1* por la proteína *LRR1* la cual regula positivamente la degradación de *HIR1*, evitando la HR [260].

Como se mencionó previamente, el genoma de los begomovirus es relativamente pequeño lo que obliga a que sus proteínas sean multifuncionales [261]. Más allá de sus funciones canónicas las proteínas Rep y REn de PHYVV también tienen actividad de supresores de PTGS y TGS, respectivamente. Estas funciones parecen ayudar a PepGMV a sobrepasar dichas defensas de la planta durante una superinfección con ambos virus, es decir que incluso cuando PepGMV ya se encuentra silenciado y la planta está en recuperación, una posterior infección con PHYVV reactiva a PepGMV [231].

Una de las actividades más extendidas de TrAP es la de suprimir el silenciamiento génico [77–80,262,263]. Las proteínas TrAP de begomovirus tienen tres dominios conservados, en el N-terminal tiene una NLS, entre los aa 36-53 se encuentra un dedo de zinc y por último el dominio de activación en el C-terminal [78,264,265]. Los tres dominios al parecer influyen en la supresión del silenciamiento [265]. La TrAP de TGMV interfiere con la metilación del DNA al evitar que la adenosina sea fosforilada manteniendo la proporción de SAH, un inhibidor en la síntesis de SAM, la molécula donadora de metil principal usada para los procesos de transmetilación. La TrAP de *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) y TGMV inhiben la metilasa de histonas SUVH4/KYP interactuando con dominio catalítico (SET), reduciendo la metilación de histonas [77]. La TrAP de TGMV influye en la sobreexpresión de rgsCaM de *N.benthamiana* y la moviliza del citoplasma al núcleo, reduciendo el silenciamiento génico y aumentando la carga viral mediante un mecanismo desconocido [262]. Se sabe que  $\beta$ C1 del betasatélite de TYLCNNV también provoca la sobreexpresión de rgsCaM, y esta última interactúa con el co-factor SGS3 de RDR6, promoviendo la autofagia de esta polimerasa y reduciendo la actividad de PTGS de la planta [266], por lo que pudiese ser que el mecanismo sea similar. La TrAP de TGMV interactúa con la SnRK1 [267]. SnRK1 fosforila a la TrAP de CaLCuV en la serina 109, inhibiendo su actividad [268].

## Capítulo I

### **Análisis experimental de la compatibilidad replicativa de dos cepas del begomovirus *Rhynchosia golden mosaic Sinaloa virus (RhGMSV)*.**

El género *Begomovirus* (*Geminiviridae*) es el taxón más grande de los virus que infectan plantas [13,49]. Este grupo incluye a algunos de los virus de mayor importancia económica, por las enormes pérdidas que ocasionan a cultivos destinados a proveer alimentos y fibras (tomate, papa, chile, calabaza, yuca, frijol, soya, algodón; entre otros) en países de las regiones cálidas y templadas del mundo [27,53,54,59–61,269–273]. Los begomovirus son transmitidos por el hemíptero cosmopolita *Bemisia tabaci* [50–52], que es en realidad un complejo de varias especies morfológicamente indistinguibles denominadas como mosquita blanca. Por su extraordinaria importancia económica, se han estudiado varios aspectos biológicos de los begomovirus (BGVs), destacando aquellos orientados a entender el proceso básico de su replicación. Actualmente se sabe que los BGVs se replican por dos mecanismos diferentes aunque relacionados: 1) por Círculo Rodante (RCR) y 2) por Replicación Dependiente de Recombinación (RDR). Dado que éste mecanismo depende en gran medida de la generación de cadenas monocatenarias producidas por RCR, nos concentraremos en éste último mecanismo, del que se conocen los procesos principales. La proteína viral esencial en este proceso es codificada por el gen denominado de varias maneras, *AC1*, *C1*, *Rep*. Esta proteína multifuncional de ~360 aa contiene en su extremo N-terminal (primeros 120-130 aa) un dominio con actividad endonucleolítica y de unión específica al DNA. El origen de replicación (*Ori*) de los BGVs varía entre los distintos linajes y sublinajes, pero contienen elementos que son comunes a todos ellos: 1) la presencia de un elemento conservado de ~30nt que potencialmente adopta una estructura de tallo-asa (“horquilla”); 2) la caja TATA del gen *Rep*, y 3) una serie de secuencias repetidas de 5 a 8 pb, estrechamente asociadas a los dos elementos mencionado. Estas secuencias repetidas se denominan “iterones” y su número varía de 3 a 6 copias en el *Ori* [111]. En el ápice o “asa” de la horquilla se encuentra la secuencia invariante TAATATT’AC, que es reconocida por Rep para

introducir un corte endonucleolítico (') en la cadena positiva del DNA, evento que da inicio a la replicación por círculo rodante (RCR). Diversos estudios han mostrado que los iterones son sitios de unión específica de la proteína Rep [16,112,274–277]. El “nick” creado por Rep en la cadena positiva genera el “primer” para iniciar la RCR, usando como templado la cadena complementaria. En los begomovirus bipartitas los iterones se encuentran dentro de la Región Común (RC), que es un segmento de la IR con una secuencia prácticamente idéntica en ambos componentes, y que por lo general tiene una extensión de 160-200 pb [111,274,278]. Se ha observado en varios estudios que Begomovirus diferentes pero con iterones idénticos pueden intercambiar sus componentes y generar una infección más o menos exitosa [276,277]. A este fenómeno se le denomina pseudo-recombinación [184,278].

Aunque actualmente es generalmente aceptado que los iterones son los principales determinantes de especificidad replicativa en *cis* de los begomovirus, poco se sabe sobre los determinantes de especificidad en *trans*, es decir, los residuos aminoácidos de Rep que determinan que la proteína sea capaz de reconocer a sus iterones cognados. El dominio de reconocimiento y unión a los iterones de Rep se encuentra en la región N-terminal (1-116 aa), lo cual ha sido determinado experimentalmente tanto para el curtovirus BCTV, como para el begomovirus bipartita ToLCNDV [16,275]. Chatterji *et al.*, 1999 mostraron que el intercambio del aa en la posición 10 de las proteínas Rep de dos cepas de ToLCNDV incompatibles en replicación dio como resultado un intercambio de su especificidad de replicación. La diferencia en los iterones de ambas cepas es un solo nucleótido en la posición tres, “GG(T/C)GTC” [16]. En concordancia con este estudio, ensayos de pseudorecombinación con cepas del begomovirus bipartita del NW, *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) perteneciente al linaje del SLCV, que tienen iterones distintos en un solo nucleótido “GG(T/A)GTCC”, fueron incompatibles en replicación (esto es, no formaron pseudorecombinantes viables). El análisis comparado de las proteínas Rep de esas dos cepas sugirió al residuo aa en la posición 11 (A11 y Q11, respectivamente) como el posible responsable de este cambio de especificidad [279]. Resulta importante resaltar que EuMV es un

begomovirus perteneciente al linaje del *Squash leaf curl virus*, un clado atípico de begomovirus bipartitas del NW [62,279]. Los ~35 miembros conocidos de este linaje tienen dos características principales que los diferencia de otros begomovirus (tanto OW como NW): 1) El número de copias y arreglo de los iterones es diferente, y el *Ori* cuenta con dos copias extra que flanquean la estructura tallo-asa y 2) el dominio N-terminal (los residuos aa 1 a 150) de sus proteínas Rep muestran un bajo porcentaje de identidad de secuencia (<50%) con proteínas codificadas por los begomovirus típicos del NW, además de presentar varios motivos que no se conservan tanto en proteínas Rep de BGVs del NW como del OW [279]. El análisis detallado de la secuencia del DNA-A de los virus del clado del SLCV mostró que contienen un módulo de aproximadamente 670 pb de origen desconocido. Ese módulo comprende el *Ori*, el gen *AC4*, y los primeros ~ 160 codones del gen *Rep* [62].

En conjunto, los estudios de ToLCNDV [16] y EuMV [279] mostraron una fuerte correlación entre aa específicos de Rep y ciertos nucleótidos en la secuencia del iterón, una idea que se formuló explícitamente en un trabajo teórico publicado en el 2001 por Argüello-Astorga *et al.*, en el que se identificó al "dominio relacionado con iterón" (IRD, por sus siglas en inglés) en un segmento aa corto que precede al "motivo I" conservado en las proteínas iniciadoras de la RCR, el cual es esencial para el mecanismo de RCR geminivirus y virus relacionados, como los circovirus [280].

Campos-Olivas *et al.*, 2002 [14] logaron resolver la estructura terciaria (3D) del dominio endonucleolítico (aa 4-120) de la proteína Rep de TYLCV por espectroscopia NMR, basado en comparaciones estructurales y similitudes funcionales entre Rep y las proteínas de iniciación de la replicación del SV40 (T-ag) y del virus del papiloma (E1) (dos virus que no se replican mediante RCR). Campos-Olivas *et al.*, 2002 [14] propusieron que la proteína Rep de TYLCV reconoce específicamente el dsDNA en el origen de replicación a través de un grupo de aa cargados positivamente, que sobresalen de una mini lámina- $\beta$  de doble hebra (compuesta por las así llamadas hebras  $\beta 1$  y  $\beta 5$ ). Una observación



relevante es que la hebra  $\beta 1$  de esa mini-hoja- $\beta$  está contenida dentro del IRD que se predijo participaría en el reconocimiento específico de los iterones [14,280].

En un trabajo teórico posterior de Londoño *et al.* [17], en el que se utilizaron como instrumentos heurísticos a los iterones de varias familias de virus de ssDNA circular, como *Circoviridae*, *Geminiviridae*, *Nanoviridae* y *Alphasatellitidae* para identificar de modo tentativo a los residuos aa de las proteínas Rep que potencialmente determinan la especificidad de unión al DNA (o SPDs, del inglés “Specificity Determinants”). Se concluyó que los SPDs potenciales, identificados por este método, se agrupan en dos segmentos discretos la proteína, ubicados a una distancia definida de los motivos I y II conservados de las proteínas iniciadoras de la RCR, los cuales coincidieron con la secuencia central de las llamadas hebras  $\beta 1$  y  $\beta 5$  de la proteína Rep de TYLCV.

En este trabajo se llevó a cabo la caracterización funcional y se analizó la complementariedad replicativa de dos cepas de un begomovirus perteneciente al clado S-Lin, *Rhynchosia golden mosaic virus* (RhGMSV), denominadas RhGMSV-Gu y RhGMSV-Co, que fueron originalmente descritas en la tesis de maestría de Omayra Bolaños [281]. Estas cepas exhiben iterones claramente distintos. Experimentos de pseudorecombinación en plantas de *N.benthamiana* inoculadas mediante agroinfiltración, demostraron que dichas cepas no son compatibles en replicación y no producen pseudorecombinantes infecciosos. Comparaciones sistemáticas de los dominios de unión al DNA de sus proteínas Rep revelaron que dos residuos de aa diferenciales, ubicados en las posiciones 71 a 74, muy probablemente estén implicados en la especificidad de unión al DNA. Un dato relevante es que estos residuos aa están muy distantes del motivo RCR I conservado (posiciones 13-19), que está precedido por los SPDs putativos de EuMV y ToLCNDV, lo que indica que las proteínas Rep de estos BGVs podrían tener una distribución discreta de SPDs dentro del dominio N-terminal, lo cual no había sido demostrado experimentalmente hasta este estudio.

## Objetivo

Identificar los determinantes de especificidad en *trans* dentro del dominio de unión al DNA en la proteína Rep de las variantes de RhGMSV, -Gu y -Co, este último perteneciente al linaje del SLCV. Esto se determinara mediante experimentos de pseudoreplicación y análisis de secuencia. Los resultados de pseudorecombinación serán validados mediante PCR y Southern blot.

## Resultados

**La construcción hemidimérica del aislado de Sinaloa de RhGMSV genera una infección agresiva pero menos severa que PepGMV en *N.benthamiana*.**

Mauricio-Castillo, en su trabajo de tesis doctoral demostró mediante biobalística, que clones monoméricos de RhGMSV-Gu (Guasave) generan una infección sistémica con síntomas en tres especies de plantas, *N.benthamiana*, *Glycine max* y *Rhynchosia mininma* [282]. Bolaños Martínez, en su tesis de maestría describió dos cepas de RhGMSV-Gu aisladas en Colima, a las que denominaron RhGMSV-GuCo y RhGMSV-Co [281]. Esta última cepa exhibió iterones claramente distintos (TGGTGTCC) a los observados en RhGMSV-Gu (TGGAGGTA). Puesto que RhGMSV-Co es la cepa con los iterones más diferentes con respecto a RhGMSV-Gu, fue utilizada para determinar si las diferencias en los iterones las hacían replicativamente incompatibles. Para ello se generaron construcciones hemidiméricas de los componentes virales A de las cepas mencionadas, que se subclonaron en vectores binarios para con estos, transformar células de *A.tumefaciens* GV3101 y con estas transformantes inocular plantas de *N.benthamiana*. Primero generamos las construcciones pBI::RhGUA1.4 y pC1300::RhGUB1.8, las cuales son dímeros parciales del componente A y B de RhGMSV-Gu en pBI121 y pCambia1300, respectivamente.

Las plantas de *N.benthamiana* que fueron inoculadas con las construcciones hemidiméricas virales cognadas mediante agroinfiltración generaron los síntomas típicos provocados por las infecciones begomovirales.

En el caso de las plantas inoculadas con pBI::RhGUA1.4/pC1300::RhGUB1.8, los primeros síntomas aparecieron a los 14 días posteriores a

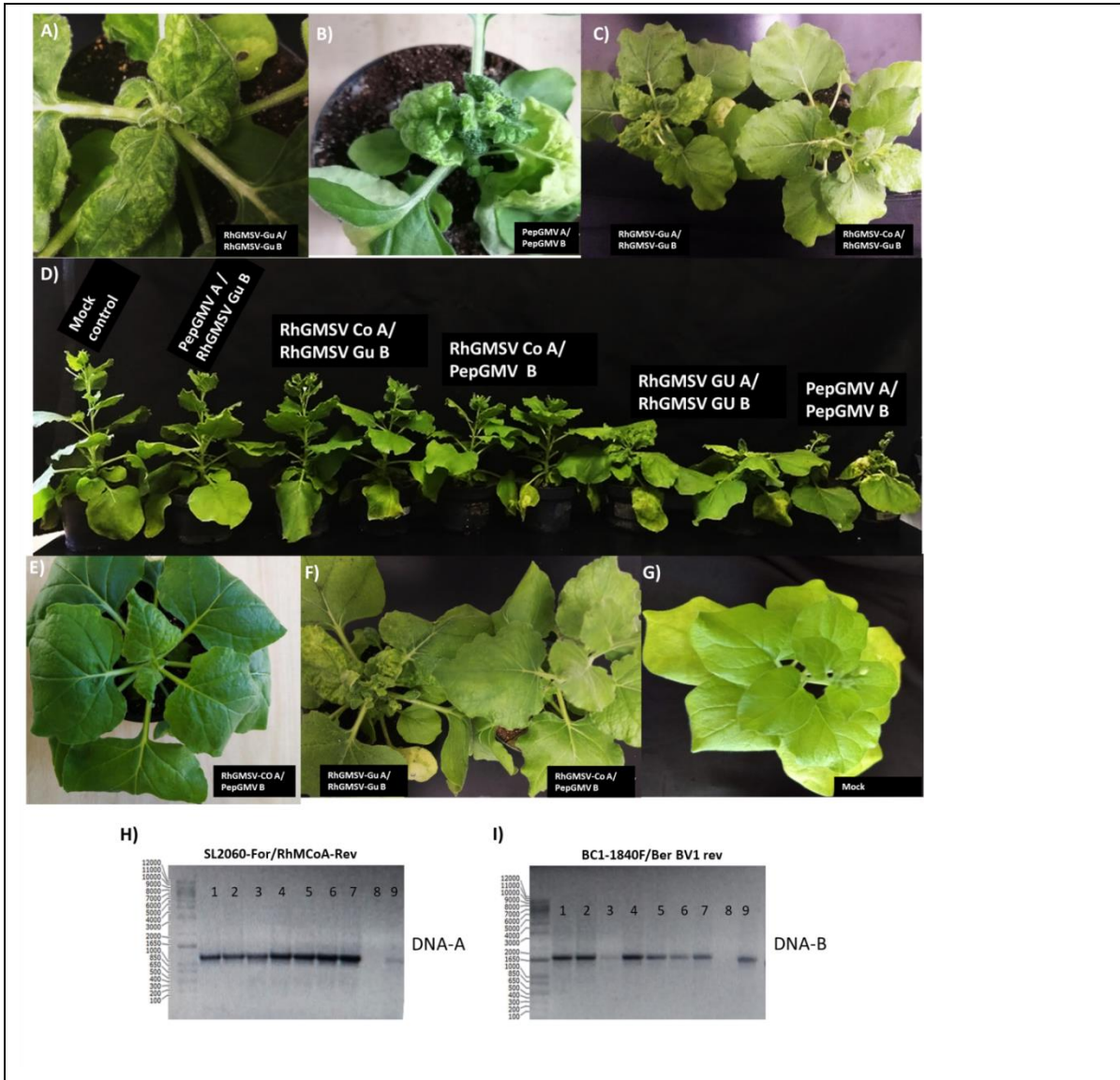
la inoculación (dpi) (Figura 4 A) y a los 21 dpi los síntomas fueron muy notorios en todas las plantas inoculadas.

Por otra parte se generó una clona hemidimérica de la cepa de Colima, pC1300 :: RhCOA1.5. Como no fuimos capaces de obtener el componente B de la cepa RhGMSV colectada en Colima, llevamos a cabo la inoculación del componente A de RhGMSV-Co (pC1300 :: RhCOA1.5.) con el componente B de RhGSMV-GU a fin de establecer si la proteína Rep de RhGMSV-Co era capaz de transreplicar el DNA-B de la cepa RhGSMV-GU. A los 14 y 21 días dpi no se observó ningún síntoma en las plantas inoculadas. La ausencia de síntomas no excluye la posibilidad de una infección, por lo que preparamos extractos de DNA total de las hojas jóvenes para examinarlas por PCR, utilizando iniciadores específicos para amplificar el DNA-A y el DNA-B de RhGMSV. En ningún caso se logró amplificar DNA viral, por lo que concluimos que la proteína Rep de RhGMSV-Co no fue capaz de reconocer los iterones del componente B de RhGSMV-GU, demostrando así que las cepas examinadas no son compatibles en replicación, tal como se anticipaba por las diferencias en sus iterones.

Ahora bien, aunque el resultado fue el que se anticipaba, quedaba la duda legítima de si la clona infectiva del DNA-A de RhGMSV-Co era realmente funcional, lo que no habíamos podido demostrar en ausencia del componente genómico B de esa cepa. Por tanto, habría que examinar a la clona pC1300::RhCOA1.5. en un experimento en el que se co-inoculase con un componente genómico B heterólogo pero con iterones idénticos a los de RhGMSV-Co, para establecer inequívocamente que la clona hemidimérica de éste último virus (pC1300::RhCOA1.5) era funcional y podía transreplicar a un DNA-B heterólogo. En consecuencia, buscamos un BGV con un componente B con iterones idénticos a los de RhGMSV-Co, y elegimos a *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) que satisfacía ese criterio primordial. Por lo tanto, generamos en pCambia1300 las construcciones pCPepGA1.35 y pCPepGB1.32, dímeros parciales de los componentes genómicos A y B de PepGMV, respectivamente (ver Materiales y Métodos).

Las plantas de *N.benthamiana* agroinoculadas con pCPepGA1.35/pCPepGB1.32, desarrollaron síntomas visibles en los primeros siete días y a los 10 días los síntomas eran muy notorios en todas las plantas inoculadas (Figura 4 B).

Aunque en el caso de la inoculación con los componentes A y B de RhGMSV-GU se presentaron síntomas típicos de infección, en el caso de PepGMV los síntomas fueron más severos, provocando una mayor deformación en las hojas, incluyendo su tamaño y color, de tal forma que en algunas plantas la clorosis se extendía prácticamente a toda la hoja, con excepción de las nervaduras centrales. Los síntomas provocados por la cepa RhGMSV-GU incluyeron deformaciones en las hojas (“acucharamiento”) y clorosis en mosaico. En ambos casos el enanismo causado por estos virus fue notorio al compararlas con las plantas control, y especialmente marcado en las plantas infectadas con PepGMV (Figura 4).



**Figura 4 Fenotipos inducidos por reordenamiento de componentes genómicos de RhGMSV y PepGMV.** (A y B) Plantas de *N.benthamiana* sintomáticas infectadas con RhGMSV-GU y PepGMV, respectivamente. (C) Vista apical de una planta inoculada con RhGMSV-GU (izquierda) y RhGMSV-Co A + RhGMSV-GU B (derecha). (D) Plantas representativas de *N.benthamiana* inoculadas con diferentes combinaciones de componentes virales a 30 dpi. (E) *N.benthamiana* infectada con RhGMSV-Co A y PepGMV a 14 dpi. (F) Una planta inoculada con RhGMSV-GU (izquierda) y RhGMSV-Co A + PepGMV B (derecha). (G) Una planta mock. (H e I) Detección por PCR de RhGMSV-Co DNA-A (1130 bp) y PepGMV DNA-B (1718 bp), a 14 dpi. Carriles 1-7, muestras experimentales: carril 8, una planta inoculada con pCambia1300; carril 9, control positivo

## Experimentos de pseudorecombinación

Previamente, en el trabajo de tesis de Omayra C. Bolaños-Martínez [281], se demostró por biobalística de clonas monoméricas que el componente A de RhGMSV-Co era aparentemente incapaz de transreplicar al componente B de RhGMSV-Gu. Sin embargo, la eficiencia relativamente baja de infección efectiva lograda por ese método, y ciertas observaciones incongruentes en posteriores ensayos de biobalística, nos convencieron de la necesidad de generar clonas infectivas susceptibles de utilizarse en experimentos de inoculación por *Agrobacterium tumefaciens*, para tener controles extras y aumentar significativamente el número de réplicas. Para ello se generaron clonas infectivas en los vectores binarios pBI121 y pCambia1300. Plantas de *N.benthamiana* fueron agroinfiltradas con las siguientes combinaciones: PepGMV A + B, RhGMSV-Gu-A + B, PepGMV A + RhGMSV-Gu B, RhGMSV-Gu A + PepGMV B, RhGMSV-Co A + RhGMSV-Gu B y RhGMSV-Co A + PepGMV B. Además, se agroinfiltraron plantas con los vectores pBI121 y pCambia1300 vacíos (plantas mock). Como se mostró previamente, en el caso de las plantas inoculadas con los componentes homólogos, es decir, PepGMV A + B y RhGMSV-Gu A + B, los síntomas aparecieron durante la primera y segunda semana posterior a la inoculación, siendo PepGMV, considerablemente más virulento que RhGMSV-Gu. En el caso de plantas inoculadas con las combinaciones heterólogas, RhGMSV-Co A + RhGMSV-Gu B (Figura 4 C), PepGMV A + RhGMSV-Gu B y RhGMSV-Gu A + PepGMV B no se detectaron síntomas evidentes ni se logró amplificar DNA viral por PCR en extractos de DNA total de tejidos jóvenes, ni a los 14 ni a los 21 dpi, cuando se concluyó el experimento (Figura 4 D, Tabla 1). En el caso de la combinación de RhGMSV-Co A + PepGMV B, aparecieron síntomas leves a los 13-14 dpi, que consistieron en arrugamientos apenas perceptibles de las hojas y pequeñas áreas amarillas en algunas plantas (Figura 4 E y F, Tabla 1). No obstante, la infección sistémica fue detectada por PCR en todas las plantas agroinoculadas (Figura 4 G y H) y persistió hasta el final del experimento (21 dpi).

**Tabla 1. Resumen de resultados de detección de los componentes virales en los experimentos de pseudorecombinación.**

Componentes	Síntomas <sup>a</sup>	Plantas inoculadas	DNA A	DNA B	Porcentaje de detección	
			Detectado/Inoculadas <sup>b</sup>	Detectado/Inoculadas <sup>b</sup>	DNA A	DNA B
RhGMSinV-Gu A+B	A, RF,EN	20	20/20	20/20	100%	100%
PepGMV A+ B	A,RF,EN,EP	20	20/20	20/20	100%	100%
RhGMSinV-Gu A + PepGMV B	Asintomático	7	1/7	0/7	14%	0%
RhGMSinV-Co A + RhGMSinV-Gu B	Asintomático	15	4/15	0/15	26%	0%
RhGMSinV-Co A + PepGMV B	LDF,MA	14	14/14	14/14	100%	100%
PepGMV A + RhGMSinV-Gu B	Asintomático	7	1/7	0/7	14%	0%
pCambia1300	n/a	3	0/3	0/3	0%	0%
Plantas no inoculadas	n/a	3	0/3	0/3	0%	0%

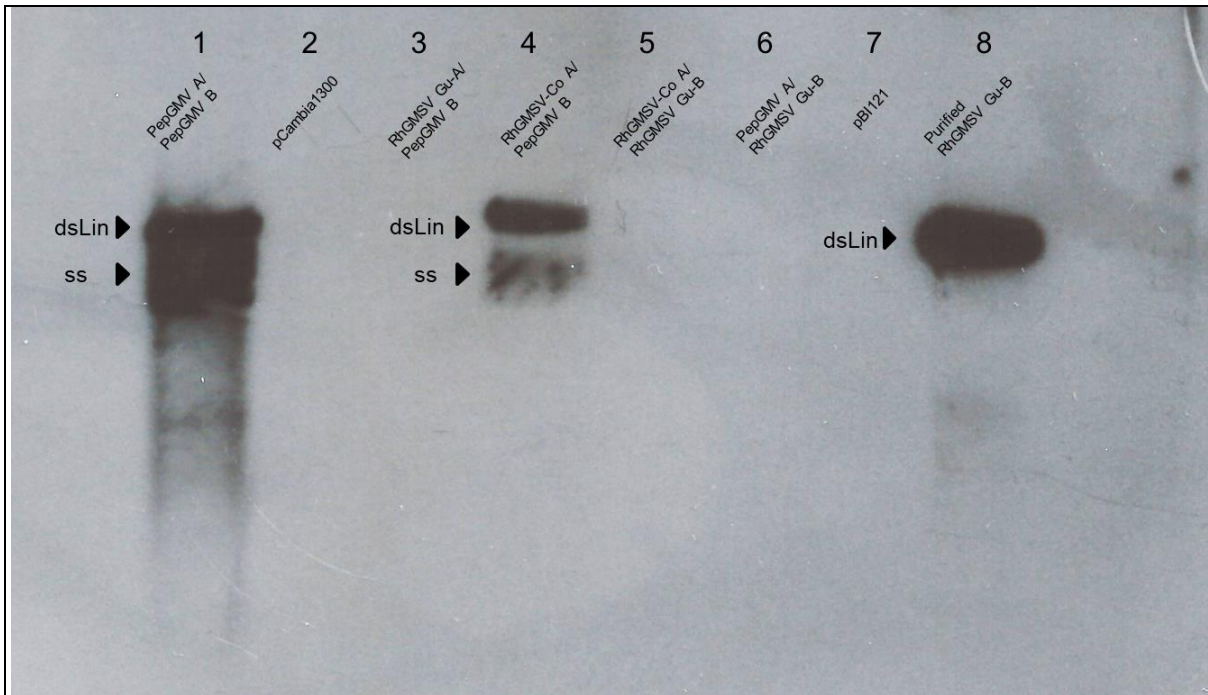
<sup>a</sup> “MA” puntos de amarillamiento menores, “LDF” ligera deformación en las hojas, “A” amarillamiento, “RF” rizado foliar, “EN” enanismo, “EP” epinastia.

<sup>b</sup> Número de plantas en las que se detectó el componente de ADN mediante PCR / Total de plantas inoculadas.

## Detección del DNA-B mediante Southern blot

Para confirmar la replicación del DNA-B en las diferentes combinaciones de los componentes genómicos de RhGMSV-Gu, RhGMSV-Co y PepGMV, se realizó un análisis de Southern blot usando como sonda un segmento de 584 pb de longitud del gen BC1 de PepGMV. La sonda se generó mediante PCR con primers específicos para el DNA-B. Este amplicón se marcó con biotina en el extremo 3' del DNA. Usando estreptavidina conjugada con un compuesto quimioluminiscente (ver Métodos) para detectar el DNA diana, se procedió a realizar un autoradiograma. La autorradiografía reveló que RhGMSVCO-A fue capaz de transreplicar al DNA-B de PepGMV, pero no al DNA-B de RhGMSV-Gu (Figura. 5, carriles 4 y 5, respectivamente), apareciendo solo en la primera combinación las isoformas de dsDNA y ssDNA. De manera similar, PepGMV A transreplica a su DNA-B homólogo, pero no al heterólogo RhGMSV-Gu-B (Figura. 5, carriles 1 y 6, respectivamente). No se detectó señal de hibridación de DNA-B para la combinación RhGMSV-Gu A + PepGMV B (Figura 5, carril 3) o RhGMSV-Co-A + RhGMSV-Gu B (Figura 5, carril 5), lo que indica que las cepas de RhGMSV no son compatibles en replicación. El análisis de Southern blot reveló que solo el control (componente B de RhGMSV-Gu purificado) y las combinaciones PepGMV A + PepGMV B y RhGMSV-Co A + PepGMV B generaron una señal de hibridación para el DNA-B de PepGMV. Estos resultados son consistentes con los resultados de la PCR (Tabla 1). La sonda utilizada en este experimento se diseñó para hibridar tanto con PepGMV B como con RhGMSV-Gu B (Figura 6). Esto se hizo con la intención de evitar ambigüedades en la detección del componente B, y como se muestra en el último carril (Figura 5, carril 8), la sonda es capaz de hibridar con el componente RhGMSV-Gu B aislado, obtenido por purificación en gel de una banda de 2.5 kb generada por digestión de la construcción hemidimérica pC1300 :: RhGUB1.8 con *Apal*. No se detectó señal de hibridación con los vectores vacíos pCambia o pBI121 (Figura 5, carril 2 y 7, respectivamente).





**Figura 5 Detección de DNA-B en extractos de plantas de los experimentos de pseudorecombinación mediante Southern blot.** Carril 1, PepGMV A + PepGMV B; carril 2, pCambia1300; carril 3, RhGMSV GU A + PepGMV B; carril 4, RhGMSV-Co A + PepGMV B; carril 5, RhGMSV-Co-A + RhGMSV-Gu B; carril 6, PepGMV A + RhGMSV-Gu B; carril 7, pBI121; carril 8, RhGMSV-Gu B purificado. Para obtener DNA linealizado, los extractos que contienen el componente DNA-B de PepGMV se digirieron con *EcoRV*, y los inoculados con RhGMSV GU B se digirieron con *ApaI*. Los carriles 1 y 8 se utilizaron como controles positivos. Por pozo se cargaron 1.5  $\mu$ g de DNA total, excepto en el caso de RhGMSV-Gu B purificado, que fue obtenido de la purificación en gel de la banda de 2.5 kb generada por digestión de pC1300 :: RhGUB1.8 con *ApaI*, en el que 500 ng fueron cargados.

```

                20                40                60
Probe  GATCTAGAGYRCTYCTKGAAGCCCATGACTCACCTGGCCTCAATTCAATTGGGCCTGTAA 60
BC1 PepGMV (AF499442) G-----TGCTCCTGGAAGCCCATGACTCACCTGGCCTCAATTCAATTGGGCCTGTAA 52
BC1 RhGMSV (DQ406673) G-----TGCTCCTGGAAGCCCACGACTCGCCTGGTTTAATTCTATTGGGCCTGTTA 52

                80                100               120
Probe  GCCCAACCCTTGACATTGAATTGGACCGTAAGACTTTGCGCTCCCCTGGCCATAGTCCA 120
BC1 PepGMV (AF499442) GCCCAACCCTTGACATTGAATTGGACCGTAAGACTTTGCGCTCCCCTGGCCATAGTCCA 112
BC1 RhGMSV (DQ406673) GCCCAAGACGTGACATGGATGTGGACCTTATTGTCTTCCGTCCCATGGGCCGTAATCCA 112

                140               160               180
Probe  CATGGGAGAAGTCCACATCGTTATGGGAGAAATTGTTTAGATAGTATTTTGACAGTGGGAG 180
BC1 PepGMV (AF499442) CATGGGAGAAGTCCACATCGTTATGGGAGAAATTGTTTAGATAGTATTTTGACAGTGGGAG 172
BC1 RhGMSV (DQ406673) CATGCGAGAAGTCCACATCGTTATGGGAGAACTGTTTAGAAAGATTTTGACCGTGGGCG 172

                200               220               240
Probe  CCCGGAATGGTATATCTACCGAGTGCTTAGCTGTGTGAGAGTTTTAGCTTGCCTTTGAAC 240
BC1 PepGMV (AF499442) CCCGGAATGGTATATCTACCGAGTGCTTAGCTGTGTGAGAGTTTTAGCTTGCCTTTGAAC 232
BC1 RhGMSV (DQ406673) CCCGAAATGGTATATCTACAGAGTGCTTTGCGCTGGATAGTTTTAATTTGCCTTTGAAC 232

                260               280               300
Probe  TGGCAAAATGAGTCCTTTGATGTACATTTGTGTCGGACACTCGGTAGTATAATCTCCATG 300
BC1 PepGMV (AF499442) TGGCAAAATGAGTCCTTTGATGTACATTTGTGTCGGACACTCGGTAGTATAATCTCCATG 292
BC1 RhGMSV (DQ406673) TGGCAAAATGTGTCCTTTGATGGACATTTGTATCGGACACTGTAGTATAAATTTCCATG 292

                320               340               360
Probe  GAATGGGGTCCTTCAGTGAAGAAGATGACGACGAGAAGTAATGTAGGTCATGTTGCATC 360
BC1 PepGMV (AF499442) GAATGGGGTCCTTCAGTGAAGAAGATGACGACGAGAAGTAATGTAGGTCATGTTGCATC 352
BC1 RhGMSV (DQ406673) GAATGGATCCTTTAGCGAAAAGAATGACGATGAGAAAATAATGGAGATCTATGTTACATC 352

                380               400               420
Probe  GTATTGGAAATGTCCAAGATGCTTGTAATGACTCGTTATCCGTCATTCTTTGGTCATGAA 420
BC1 PepGMV (AF499442) GTATTGGAAATGTCCAAGATGCTTGTAATGACTCGTTATCCGTCATTCTTTGGTCATGAA 412
BC1 RhGMSV (DQ406673) TTATGGGAAATGTCCAGGACGCTTGATGCGATTCGTTGTCGTCATTCTTTGTGTCATGAA 412

                440               460               480
Probe  TCTCCACAATGACCGACCCAGAGGCGTTAATCGGAACCTGCTGTCTATATTCTATGACGC 480
BC1 PepGMV (AF499442) TCTCCACAATGACCGACCCAGAGGCGTTAATCGGAACCTGCTGTCTATATTCTATGACGC 472
BC1 RhGMSV (DQ406673) TTTCCACAATTACCGAGCCAGTTGCGTTAATCGGAACCTGTTGTCTGTATTCAATGACGC 472

                500               520               540
Probe  AGTGGTCAATTTTCATACAGCTGCGACTTAGTCGTGCCGTTAGCTGTGATGCCGTGGAAG 540
BC1 PepGMV (AF499442) AGTGGTCAATTTTCATACAGCTGCGACTTAGTCGTGCCGTTAGCTGTGATGCCGTGGAAG 532
BC1 RhGMSV (DQ406673) AATGGTCAATTTTCATACAGCTCCGATTTAGTCTTGCTGTTAACTGGCAGCGCTGTGAAG 532

                560               580
Probe  GAAACTGAAGGACTATCTC - GTCAGATCATGNGAHARYTGATAYTCRTCTCTAGACG 596
BC1 PepGMV (AF499442) GAAACTGAAGGACTATCTC - GTCAGATCATGCGACAGCTGGTATTCATCTCTA - - - 584
BC1 RhGMSV (DQ406673) GGAATTGAAGCACATCTCAGTTAGATCATGAGACAATTGATATTCATCTCT - - - 584

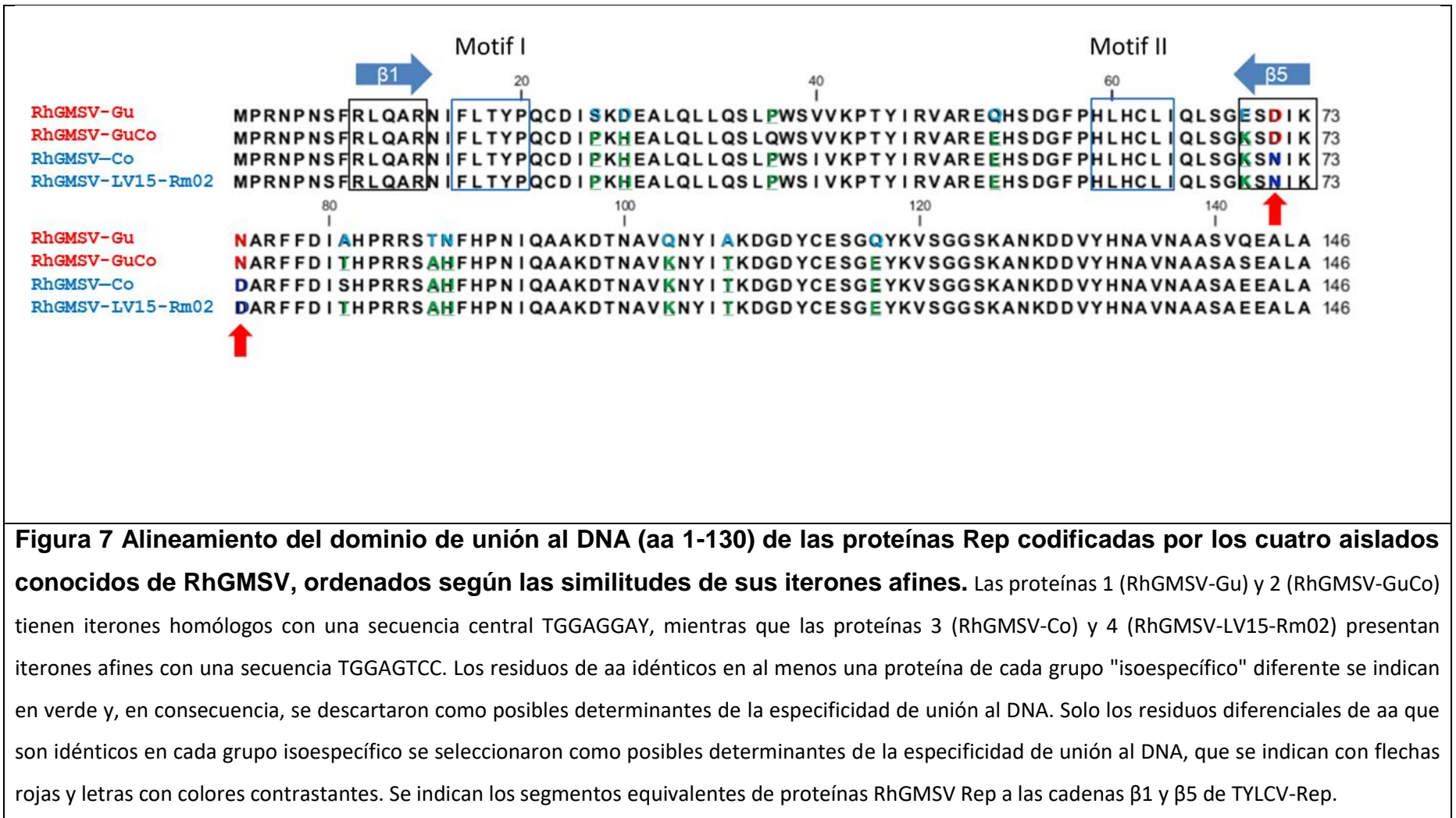
```

Figura 6 Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de la sonda con la secuencia diana tanto en PepGMV B como RhGMSV-Gu B.

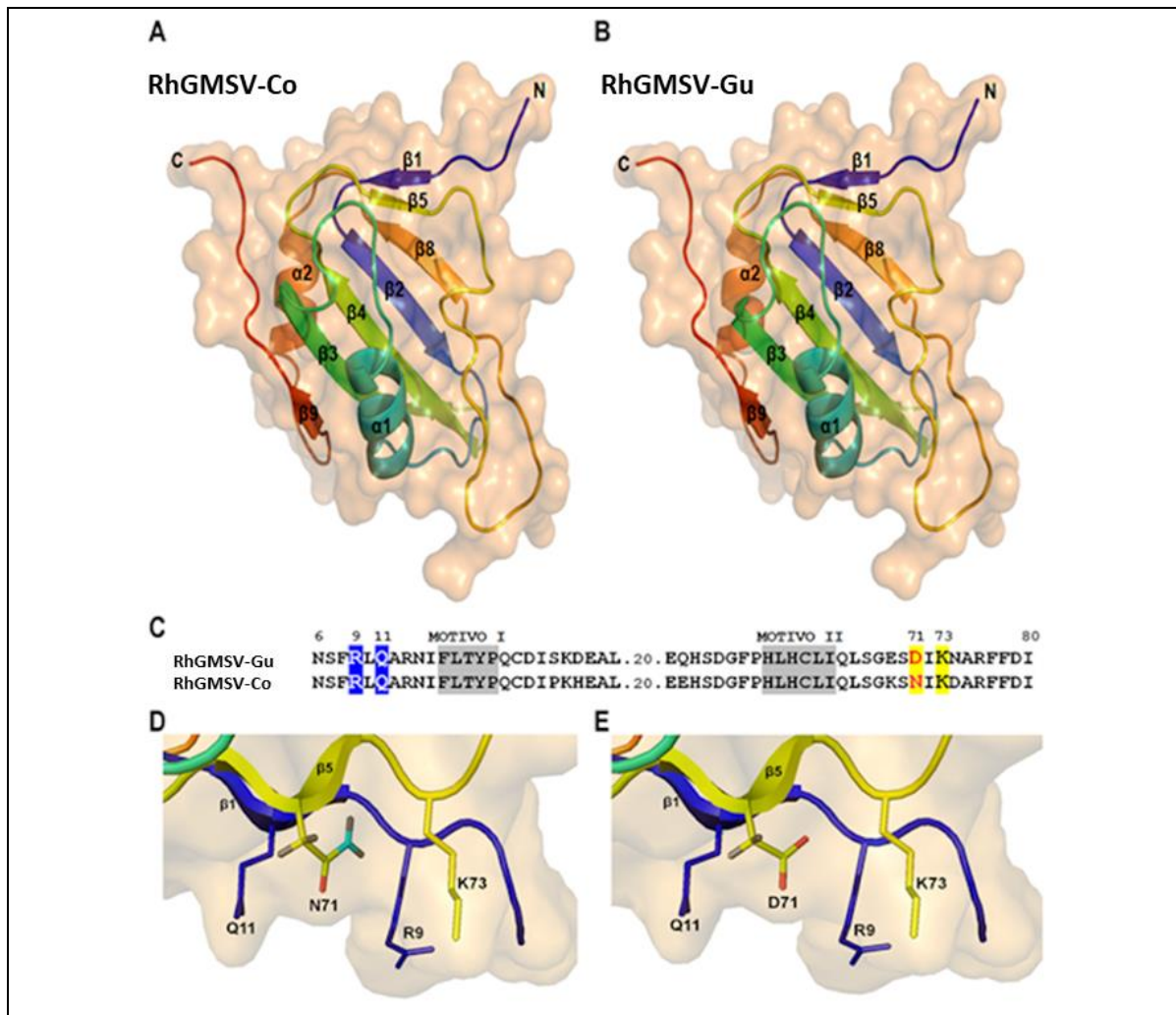
## **Análisis comparativo de proteínas Rep codificadas por cepas RhGMSV**

Los experimentos de pseudorecombinación confirmaron que las proteínas Rep codificadas por las dos cepas de RhGMSV reconocen diferentes secuencias de iterones en el *Ori* viral. Por lo tanto, estas proteínas deben tener uno o más diferentes residuos aa en el dominio de unión al DNA que determinan la unión preferencial a iterones específicos. En un estudio previo de la proteína Rep del virus del mosaico dorado del tomate (TGMV), un begomovirus modelo, se determinó que el dominio mínimo para el reconocimiento específico de su origen de replicación análogo comprendía los aa 1-130 [68]. En consecuencia, las comparaciones se restringieron a dicho dominio. Trece residuos diferenciales de aa fueron identificados entre las proteínas Rep de RhGMSV-Gu y RhGMSV-Co (Figura 7). Teniendo en cuenta que las cepas de RhGMSV tienen dos "variantes" con iterones similares en cada una (RhGMSV-LV15-Rm02 y RhGMSV-Co, RhGMSV-Gu y RhGMSV-GuCo), comparamos las secuencias de los dominios de unión al DNA de los cuatro aislados descritos de RhGMSV. Esto nos permitió definir con mayor precisión los posibles SPDs de la proteína, ya que los aminoácidos que difieren en la proteína Rep entre los grupos iso-específicos (esto es, con diferentes iterones cognados) son en principio los únicos que podrían ser responsables de los resultados experimentales observados. Se encontraron solo tres aminoácidos diferenciales entre las proteínas Rep de los pares iso-específicos, en las posiciones 40, 71 y 74 (Figura.7).

Los residuos diferentes en la posición 40 (V e I) son químicamente similares y, por lo tanto, es poco probable que estén involucrados en la determinación de la especificidad de las proteínas Rep de RhGMSV-Gu y RhGMSV-Co, en contraste con los residuos en las posiciones 71 y 74 (D71/N74 y N71 /D74, respectivamente) que no son similares. Una observación interesante es que el residuo aa en la posición 71 se encuentra dentro del segmento que es el homólogo a la cadena  $\beta$ 5 (aa 67-71) de la proteína TYLCV Rep (Figura 8)



**Figura 7 Alineamiento del dominio de unión al DNA (aa 1-130) de las proteínas Rep codificadas por los cuatro aislados conocidos de RhGMSV, ordenados según las similitudes de sus iterones afines.** Las proteínas 1 (RhGMSV-Gu) y 2 (RhGMSV-GuCo) tienen iterones homólogos con una secuencia central TGGAGGAY, mientras que las proteínas 3 (RhGMSV-Co) y 4 (RhGMSV-LV15-Rm02) presentan iterones afines con una secuencia TGGAGTCC. Los residuos de aa idénticos en al menos una proteína de cada grupo "isoespecífico" diferente se indican en verde y, en consecuencia, se descartaron como posibles determinantes de la especificidad de unión al DNA. Solo los residuos diferenciales de aa que son idénticos en cada grupo isoespecífico se seleccionaron como posibles determinantes de la especificidad de unión al DNA, que se indican con flechas rojas y letras con colores contrastantes. Se indican los segmentos equivalentes de proteínas RhGMSV Rep a las cadenas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 5 de TYLCV-Rep.



**Figura 8 Modelos estructurales de los dominios de unión al DNA de las proteínas Rep de RhGMSV-Co y RhGMSV-Gu.** (A y B) modelos estructurales en 3D de 1-120 aa de ambas proteínas. Las hebras  $\beta 1$  y  $\beta 5$  (violeta oscuro y amarillo, respectivamente), que están potencialmente implicadas en interacciones específicas con dsDNA, se ilustran en la parte superior. (C) Alineación de los primeros 80 aa de las proteínas Rep de RhGMSV-Gu y RhGMSV-Co, mostrando los motivos RCR I y II (sombreado gris) y los posibles SPD en las hebras  $\beta 1$  y  $\beta 5$  (sombreadas de azul y amarillo, respectivamente). (D y E) Una vista más cercana de la porción  $\beta 1$ - $\beta 5$  de las proteínas Rep de RhGMSV-Co y RhGMSV-GU que muestran las cadenas laterales de los residuos relevantes en las posiciones 9, 11, 71 y 73. Las cadenas  $\beta 1$  de ambas proteínas tienen residuos idénticos, pero sus cadenas  $\beta 5$  difieren en la posición 71, con Asn en la proteína RhGMSV-Co y el aminoácido Glu cargado negativamente en la proteína de RhGMSV-Gu. Figura modificada de Bolaños-Martínez [281].

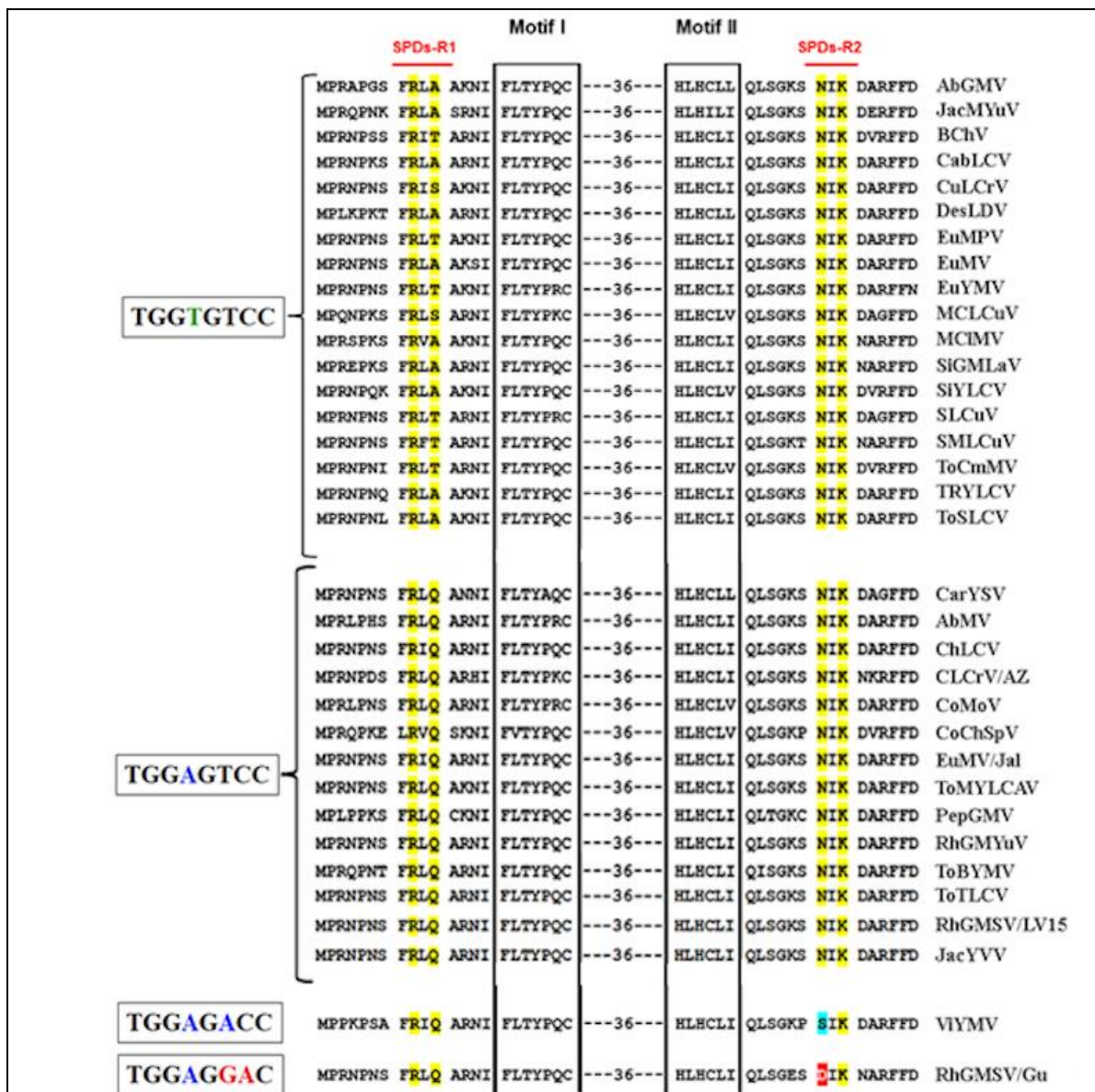
## **Identificación de potenciales SPD de Rep mediante un enfoque heurístico-comparativo.**

El método heurístico utilizado por Londoño et al., [17] para predecir posibles SPD en proteínas Rep de virus ssDNA no se había utilizado previamente para analizar sistemáticamente las proteínas Rep codificadas por los miembros del clado del SLCV, los cuales contienen un módulo de replicación con características únicas [62]. Como primer paso para realizar un análisis comparativo, las proteínas Rep se agruparon en función de las secuencias consenso de los iterones presentes en los dos componentes del genoma.

Se compararon las proteínas de virus que tienen iterones idénticos entre sí, y se identificaron los residuos aa que se conservan en todos ellos. A continuación, se compararon sistemáticamente con los residuos conservados en otros grupos de proteínas codificados por virus que albergan diferentes iterones y se buscaron residuos aa que se correlacionen consistentemente con las secuencias del núcleo del iterón. Se distinguieron cuatro grupos iso-específicos en el linaje del SLCV, como resultado del análisis comparativo, se demarcaron dos regiones de SPD potenciales en la vecindad de los motivos I y II de RCR conservados (Figura 9). El grupo iso-específico con iterones TGGAGTCC, como las proteínas Rep de RhGMSV-Co y PepGMV, mostraron un motivo RL \* Q (L \* = L, I, V) en el segmento equivalente de la hebra  $\beta$ 1 de TYLCV Rep y un motivo NIK conservado en el segmento comparable de la cadena  $\beta$ 5. El grupo de proteínas con iterones TGGTGTCC exhibió una secuencia central RL \* (A / T / S) en la región correspondiente de la hebra  $\beta$ 1 y un motivo NIK en la hebra  $\beta$ 5 putativa. Por el contrario, la proteína codificada por el virus del mosaico amarillo de vigna (ViYMV) [62], que tiene iterones TGGAGACC, exhibe un núcleo RIQ en la región de la cadena  $\beta$ 1 pero un motivo SIK en la putativa hebra  $\beta$ 5.

Finalmente, las proteínas RhGMSV-Gu y RhGMSV-GuCo Rep poseen un núcleo RLQ en su cadena  $\beta$ 1 pero un motivo DIK único, en el elemento de la putativa cadena  $\beta$ 5. Es importante enfatizar que la porción TGGAG del núcleo del iterón se correlacionó estrechamente con un motivo RL \* Q en la supuesta hebra

$\beta$ 1 Rep, mientras que las variaciones en los nucleótidos 6 a 8 de la secuencia del núcleo del iterón se relacionaron con diferencias en la hebra  $\beta$ 5 de Rep. Considerados en su conjunto, los resultados obtenidos mediante el enfoque heurístico-comparativo fueron congruentes con los datos obtenidos mediante el modelado estructural de proteínas Rep RhGMSV desarrollado por el Dr. Guillermo Palacios y presentado en la tesis de maestría de Omayra Bolaños. Esta convergencia en las conclusiones obtenidas mediante enfoques muy diferentes (el análisis heurístico-comparativo desarrollado por Londoño et al. [17] y el modelado *in silico* de la proteína Rep) es una observación que merece destacarse.



**Figura 9 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los dominios N-terminales de las proteínas Rep codificadas por begomovirus del linaje del SLCV, agrupadas de acuerdo con sus iterones cognados.** Dos segmentos discretos, marcados como SPD-R1 y SPD-R2 (i.e. "regiones" de SPD) en la parte superior del alineamiento, corresponden a grupos de residuos identificados como putativos SPDs en el análisis heurístico-comparativo. Los residuos sombreados en amarillo son los supuestos SPDs de unión al DNA en trans identificados en el análisis. Los residuos sombreados en azul y rojo en las proteínas codificadas por ViYMV y RhGMSV-Gu, respectivamente, son los únicos que difieren en la cadena β5. Se indican los motivos I y II de RCR. Los números entre guiones indican la longitud (en residuos de aa) de la región proteica omitida.



## Discusión

Los geminivirus se replican mediante dos mecanismos diferentes, RCR y por RDR, en el núcleo de las células vegetales [196–199]. El mecanismo de RCR es similar al de una gran variedad de replicones procarióticos y eucarióticos. En el caso de familias virales que infectan eucariotas, como *Geminiviridae*, *Nanoviridae* y *Circoviridae*, codifican una proteína de iniciación de la RCR con una estructura terciaria similar, a pesar de su baja identidad de secuencia en aa entre ellas [14,283,284]. En los últimos años se ha descubierto una gran cantidad de nuevos grupos virales relacionados con circovirus y geminivirus en una inmensa variedad de organismos y muestras ambientales, mediante el uso de tecnologías de secuenciación masiva [15,165,285–289]. Estas observaciones sugieren la existencia de un linaje de virus con genomas circulares de ssDNA con orígenes de replicación análogos a los de circovirus y geminivirus, es decir, que contienen sitios iterativos de unión a Rep asociados a una secuencia con el potencial de formar una estructura "tallo-asa", con un sitio de corte endonucleolítico para Rep en el "asa" de la horquilla. Algunos de esos nuevos grupos virales codifican proteínas de replicación que son homólogas a las de otros virus de ssDNA bien caracterizados [290], por lo que es razonable esperar que sus proteínas Rep reconozcan su origen de replicación cognado de forma análoga. De todas las familias de virus que se replican mediante RCR conocidas, la familia *Geminiviridae* es la más diversa y mejor estudiada, lo que la convierte en un excelente sistema modelo para estudiar la creciente diversidad de virus eucariotas que se replican mediante RCR [201,290]. Este trabajo está centrado en el reconocimiento de elementos específicos del DNA en el Ori por Rep. Existen varias decenas de diferentes iterones entre la gran variedad de geminivirus conocidos. Esta observación conduce a la pregunta, ¿qué residuos en la proteína Rep determinan su especificidad para un iterón o a un pequeño conjunto de iterones relacionados? Al contrario de lo que podría esperarse, considerando la importancia de esta pregunta, hasta la fecha solo se ha identificado experimentalmente un residuo aminoácido que funciona como determinante de especificidad en trans, que corresponde al aa residuo en la posición 10 de la proteína Rep de ToLCNDV [16].

Un avance importante en la identificación de los determinantes potenciales que actúan en trans de la especificidad de la replicación de los geminivirus fue la determinación de la estructura 3D de la proteína TYLCV Rep. (4-121) por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) [14]. Las comparaciones con la estructura de la proteína asociada a la replicación de SV40 (T-Ag) llevaron a la hipótesis de que la llamada mini-hoja- $\beta$ 1-5 ( $\beta$ 1,  $\beta$ 5) podría estar involucrada en el reconocimiento de secuencias de DNA específicas en el origen de replicación [14]. Sin embargo, no se realizó ninguna investigación adicional para verificar esa hipótesis. Es importante señalar que un estudio teórico previo predijo que un segmento corto de Rep que abarca la hebra  $\beta$ 1 está potencialmente involucrado en el reconocimiento específico de iterones [280]. Un estudio posterior que utilizó el mismo enfoque heurístico-comparativo para analizar las proteínas Rep de geminivirus mapeó los potenciales SPD de sus dominios de unión al DNA en segmentos homólogos a las cadenas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 5 de la proteína Rep de TYLCV, los cuales están estrechamente asociadas con los motivos I y II conservados en muchas familias de proteínas iniciadoras de la RCR [17]. Además, los datos derivados del análisis heurístico-comparativo sugirieron que no todos los residuos de aa en las hebras  $\beta$  son igualmente relevantes para el reconocimiento específico del DNA; en efecto solo dos residuos en cada hebra  $\beta$  se correlacionó consistentemente con la secuencia del iterón [17]. En total, se identificaron cuatro SPD potenciales principales en las proteínas Rep de geminivirus, que se encuentran en posiciones 8, 10, 69 y 71 de proteínas codificadas por begomovirus típicos como *Bean golden mosaic virus* BGMV [291].

Los miembros del linaje del SLCV poseen un módulo replicativo que es único entre los geminivirus, y su proteína Rep contiene un dominio de unión al DNA que es muy divergente al de las proteínas análogas de otros geminivirus [62]. En consecuencia, buscamos posibles SPDs en las proteínas Rep codificadas por los tres aislados de RhGMSV, aprovechando de la existencia de dos cepas con iterones claramente diferentes.

La cepa RhGMSV-Co, tiene iterones diferentes a los de RhGMSV-Gu, Nuestros experimentos demostraron que estas cepas no son compatibles en replicación. Sin embargo, fue necesario realizar experimentos de pseudorecombinación con otro virus begomovirus diferente (PepGMV) que tiene iterones idénticos a los de RhGMSV-Co, debido a que no logramos aislar el componente B de este último en la muestra de campo original. La formación de pseudorecombinantes viables entre RhGMSV-Co A y PepGMV B se demostró mediante la amplificación de DNA-A y DNA-B a partir de extractos de hojas recién emergidas en el 100% de las plantas agroinoculadas. Mediante secuenciación de los amplicones clonados en pGEM, se confirmó que el DNA-A pertenecía a RhGMSV-Co y el DNA-B a PepGMV. Estas observaciones indican que el DNA-A de RhGMSV-Co puede ser movilizado y transmitido por el DNA-B de PepGMV, que está lejanamente relacionado con RhGMSV. Los pseudorrecombinantes viables de RhGMSV-Co A y PepGMV B no indujeron síntomas notables excepto en las primeras etapas (11-13 dpi) de la infección. Esta ausencia de síntomas evidentes fue notable, ya que el componente B generalmente se considera el principal determinante de los síntomas en pseudorrecombinantes viables [292,293]. Sin embargo, es ventajoso que un virus se replique de manera eficiente incluso si no se inducen síntomas fuertes. Es claro que el DNA-A de RhGMSV-Co no es un sustituto óptimo del DNA-A de PepGMV para la inducción de síntomas en *N.benthamiana*, probablemente debido a una falta parcial de complementariedad entre los factores producidos por los componentes DNA-A y DNA-B de los pseudorecombinantes.

Por otra parte, lo más destacable es la incompatibilidad replicativa de RhGMSV-Gu y RhGMSV-Co que indicó que estos begomovirus codifican proteínas Rep con al menos un determinante de especificidad en *trans* (SPD) diferente. Al comparar el dominio de unión al DNA (aa 1-130) de las proteínas codificadas por las dos variantes de RhGMSV-Gu que tienen iterones 'TGGAGGAY' y las dos variantes de la cepa RhGMSV-Co con iterones TGGAGTCC llevaron a la conclusión de que solo una o dos diferencias de aminoácidos en el dominio de unión al DNA, de Rep (aa 1 a 130), esto es, D71/

N74 (RhGMSV-Gu) y N71/ D74 (RhGMSV-Co), podrían explicar los resultados de incompatibilidad en los experimentos de pseudorecombinación. Significativamente, el residuo 71 está dentro de la región correspondiente a la hebra  $\beta 5$  de la Rep de TYLCV (Figura 9). Además del análisis comparativo de las proteínas de replicación codificadas por los cuatro aislados de RhGMSV, se realizó un análisis heurístico-comparativo de las Rep codificadas por todos los miembros del clado del SLCV. Dado que con este análisis teórico no se hace predicciones basadas en la naturaleza química de los residuos de aa o en la estructura terciaria de las proteínas comparadas, es interesante que este análisis también apunta a residuos ubicados en las supuestas cadenas  $\beta 1$  y  $\beta 5$  de Rep, con una diferencia importante: mientras que las hebras  $\beta 1$  y  $\beta 5$  fueron descritas por Campos-Olivas *et al.*, 2002 [14] como elementos con cinco residuos de aa, las regiones de posibles SPD delimitadas mediante el enfoque heurístico-comparativo fueron sólo de tres aa de longitud [17]. Respecto a las diferencias en el motivo característico NIK en la putativa cadena  $\beta 5$  de Rep en los miembros del linaje del SLCV que tienen en su mayoría iterones 'TGGWGTCC', su variante SIK (i.e., en ViYMV) o DIK (i.e., en RhGMSV) claramente se correlaciona con variaciones en los últimos nucleótidos de la secuencia consenso del iterón octamérico. Esto indica que el núcleo de la secuencia de la putativa cadena  $\beta 5$  es probablemente crítica para reconocimiento del iterón cognado por Rep, esto fue sugerido en un estudio comparativo donde 34 proteínas Rep codificadas por virus nativos de varios continentes que contienen un motivo central "NCT" en la hebra  $\beta 5$  y un motivo "G5-(S8-K10)" en el núcleo de la cadena  $\beta 1$ , todas esas proteínas tienen iterones afines con la misma secuencia, GGGGGR [292]. El primer aminoácido del motivo DIK de la putativa cadena  $\beta 5$  de la proteína Rep de RhGMSV-Gu se encuentra en la posición 71. Proponemos que en realidad se trata de un SPD involucrado en unión al DNA, una noción que está en estrecha concordancia con el análisis comparativo de los dominios de unión al DNA de las proteínas Rep de las cepas de RhGMSV. El aa 74, que está fuera pero adyacente a la hebra  $\beta 5$ , probablemente también sea relevante para las interacciones específicas Rep-DNA, aunque su conservación se mantiene con menos rigor en las proteínas Rep

de los miembros del clado del SLCV comparadas. Nuestros datos apoyan la interpretación de que los residuos de aminoácidos en las posiciones 71 y 74 son probablemente los responsables de la incompatibilidad replicativa observada entre las cepas de RhGMSV. El presente trabajo es el primero en mostrar que los residuos aa cercanos al motivo II de RCR (HLHXLX) [15] de la proteína Rep del geminivirus probablemente actúan como determinantes de la especificidad de la replicación. Otros estudios han demostrado que los residuos cerca del extremo N (en proximidad al motivo RCR I conservado) son relevantes para la unión específica al DNA de los begomovirus [16,279]. En este trabajo, se demostró de manera inequívoca que al menos un residuo de aa distante del extremo N también está involucrado en la unión al DNA, una observación que apoya la hipótesis propuesta por Campos-Olivas *et al.*, [14] y Londoño *et al.*, [17], ubicando a los determinantes de la especificidad de unión al DNA adyacentes a los motivos I y II de RCR, que abarcan las hebras  $\beta 2$  y  $\beta 4$ , respectivamente.

La relación hipotética entre los motivos I y II de RCR en las proteínas Rep y los residuos aa que presumiblemente funcionan como SPDs de unión al DNA abre la posibilidad de identificar de una manera simple pero rigurosa los SPDs de las proteínas de Rep de una gran variedad de grupos virales que están relacionados evolutivamente a las principales familias de virus de ssDNA, que recientemente se clasificaron en el filo *Cressdnaviricota* [10].

## **Conclusiones**

Mediante ensayos de pseudorecombinación con las cepas de RhGMSV con iterones distintos, se demostró que son replicativamente incompatibles. Esta incompatibilidad no es efecto del SPD que se encuentra en la  $\beta 1$ , puesto que las proteínas Rep de las cepas son idénticas en los primeros 24 aminoácidos (esto es, tienen hebras  $\beta 1$  idénticas), sino en debe haber otros SPDs en un segmento distante en la proteína Rep, en la  $\beta 5$  adyacente al motivo II de RCR. Una implicación potencial es que dos hebras  $\beta$  adyacentes a los motivos conservados RCR I y II de las proteínas Rep podrían interactuar con el origen de replicación

viral cognado, es decir, que esa relación podría ser un mecanismo conservado en los miembros de filo *Cressdnaviricota*, como *Circoviridae* y *Nanoviridae*.

### **Perspectivas a futuro**

En trabajos futuros versiones mutantes con iterones modificados, así como cambios en los putativos SPDs en la Rep geminiviral podrían complementar este trabajo. Este mismo enfoque podría extenderse a otros virus del filo *Cressdnaviricota*, los miembros de la familia *Circoviridae* resultan candidatos atractivos para esto, pues esta familia cuenta con >90 especies reportadas y el tamaño de su genoma es similar al de los geminivirus [294].

### **Materiales y métodos**

#### **Condiciones de crecimiento de las plantas**

Semillas de *N.benthamiana* fueron sembradas en tierra previamente esterilizada y humedecida con agua estéril. Las semillas se germinaron a 25°C en condiciones de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Las plántulas fueron trasplantadas a macetas diez días después de ser sembradas, aproximadamente 3-4 días después de germinar. Las plantas fueron cubiertas con domos de plástico para su protección subsiguiente a su trasplanto, además de mantener la humedad durante 2 semanas. A la tercera semana se retiraron las cubiertas de plástico. A la cuarta semana hasta la quinta, las plantas estuvieron listas para ser usadas experimentalmente. Posterior a los tratamientos, las plantas fueron mantenidas en las mismas condiciones en la cámara bioclimática.

#### **Protocolo para preparación de células calcio-competentes de *E. coli* Top10.**

- 1.- Inocular una asada de la cepa TOP 10 (crio-preservada -80°C) en un tubo con 3 ml de medio LB sin antibiótico, e incubar toda la noche a 37°C, agitando a 200 rpm (pre-inóculo).
- 2.-Colocar 500µl del pre-inóculo en un matraz Erlenmeyer de 250ml, que contenga 50ml de medio LB sin antibiótico.

- 3.-Incubar durante 90-100 min a 37°C con agitación constante a 200 rpm.
- 4.-Colocar el cultivo del paso anterior en botella sorvall de 250ml, previamente enfriadas, y centrifugar durante 10 min a 8,000 rpm a 4°C, decantar el sobrenadante y colocar las botellas en hielo.
- 5.-Agregar a la botella sorvall 8 ml de solución CaCl<sub>2</sub> fría, resuspender las células agitando con el vórtex de 5 a 10s, colocar en hielo y repetir hasta resuspender totalmente.
- 6.-Centrifugar durante 10min a 8,000 rpm y descartar el sobrenadante y regresar a hielo.
- 7.-Agregar a cada botella 1.5 ml de solución CaCl<sub>2</sub> fría, resuspender las células agitando con el vórtex de 5 a 10s, colocar en hielo y repetir hasta resuspender.
- 8.-Alicuotar de 35 a 50µl de células en tubos de 1.5ml fríos y colocar en nitrógeno líquido y almacenar a -80°C

#### **Soluciones:**

Cloruro de calcio, CaCl<sub>2</sub> (0.1M)

Glicerol (15%)

\*Todos los materiales y soluciones a usar deberán enfriarse con anticipación\*

#### **Minipreps**

1. Picar la colonia de interés e inocular de 3 ml de medio LB con el antibiótico indicado según el plásmido.
2. Incubar durante 12-16 h a 37°C en agitación constante (200 rpm).
3. Colectar el cultivo anterior en un tubo de 1.5 ml. Centrifugar los tubos de 1.5 ml a 13,000 rpm. Desechar el sobrenadante y secar en toallas de papel.
4. Adicionar 100 µl de solución I y resuspender la pastilla con vórtex.

5. Adicionar 200  $\mu$ l de solución II, mezclar suavemente por inversión de 8-13 veces.
6. Adicionar 150  $\mu$  de solución III, mezclar suavemente por inversión de 8-13 veces.
7. Colocar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 5 min.
8. Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min,
9. Colectar el sobrenadante en tubo nuevo.
10. Adicionar 7 $\mu$ l RNAasa (2mg/ml, opcional) e incubar a T.A por 15 min.
11. Agregar 2 Vol. de etanol absoluto (900  $\mu$ l) y 1/10 (45  $\mu$ l) de acetato de sodio 3M. Mezclar por inversión y mantener a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 15 min.
12. Centrifugar a 13,000, eliminar el sobrenadante.
13. Lavar la pastilla con 500  $\mu$ l de etanol al 70% y nuevamente centrifugar a 13,000 por 10 min.
14. Descartar el sobrenadante, secar en toallas de papel y resuspender en 50  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril o Buffer TE.

### **Preparación de células electro componentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101**

Pre-inóculo.

1. Estriar una asada del glicerol en crio-preservación en una placa de medio LB con Rifampicina 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y Gentamicina 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , cubrir con aluminio e incubar a  $28^{\circ}\text{C}$  de 24 a 48 h.
2. Sembrar una colonia de la placa en 3 ml de medio LB con Rifampicina 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y Gentamicina 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$  e incubar toda la noche a  $28^{\circ}\text{C}$  en agitación constante.



inóculo:

1. Tomar 1 ml del pre-cultivo y colocar en 200 ml de medio LB con Rifampicina 25 µg/ml y Gentamicina 40µg/ml e incubar a 28 °C en agitación constante, hasta alcanzar una densidad óptica (O.D 600 nm) entre 0.8 a 1.0 (aproximadamente 30-40 h).
2. Al alcanzar la O.D deseada colocar en hielo por 15 min.
3. Transferir el cultivo a tubos sorvall estériles fríos.
4. Centrifugar a 5000 rpm por 15 min a 4 °C.
5. Eliminar el sobrenadante y colocar en hielo.
6. Lavar la pastilla con 20 ml de glicerol al 10% estéril frío y centrifugar a 5000 rpm por 10 min a 4°C, eliminar el sobrenadante.
7. Repetir el paso anterior dos veces más.
8. Después de eliminar el sobrenadante agregar 800 µl de glicerol 10% frío.
9. Resuspender con cuidado la pastilla en su totalidad y hacer alícuotas de 50-80 µl en tubos Eppendorf de 1.5 ml previamente fríos.
10. Almacenar a -80°C hasta el momento de usar o se pueden usar inmediatamente.

**Notas:**

\*Mantener en hielo siempre los tubos incluso al resuspender, se puede usar pipeta en este paso.

\*Los antibióticos (incluyendo la rifampicina) no afectan la densidad óptica, se puede usar LB sin antibióticos como blanco.

\* La rifampicina se debe diluir en DMSO.

## **Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* GV03101 a través de electroporación**

Es necesario tener preparado el material y el electroporador a usar:

A) Configura el electroporador Bio-Rad Gene Pulser MXcell con las siguientes condiciones:

Voltaje: 2500 V

Capacitancia: 25  $\mu$ F

Resistencia: 400  $\Omega$

Celda/cuvette: 2 mM

B) Celdas previamente frías (Dejar un par de horas a -20C).

C) Un tubo de medio LB (para recuperar las células).

D) Hielo.

E) DNA para electroporar previamente cuantificado, de ser posible, debe estar purificado. La sal puede provocar arcos eléctricos que afectan la eficiencia de transformación.

### **Procedimiento**

1. Sacar un tubo con células electro-competentes del ultracongelador y colocar el hielo. (Esperar a que se descongele, normalmente tarda de 5-7 min).
2. Agregar al tubo 1-5  $\mu$ l (0.2 a 5 $\mu$ g) de DNA y transferir la mezcla (células con DNA) a una celda fría. Colocar en hielo.
3. Llevar la celda al electroporador, sacar del hielo y limpiar la celda con papel Kimwipe. Colocarla correctamente la celda dentro de la cámara de electroporación.
4. Presionar el botón de pulso (botón rojo) y esperar a que se escuche un ligero ruido (similar a un click).
5. Inmediatamente después agregar 500  $\mu$ l de medio LB a la celda.
6. Usando una pipeta (puede ser la pipeta Pasteur estéril que viene incluida en algunos empaques de celdas) transferir el contenido de la celda a un tubo de 1.5 ml.
7. Incubar el tubo a 28 °C de 2 a 4 h en agitación constante (150-200 rpm).
8. Concentrar las células a 3000 rpm por 3 min(opcional).
9. Resuspender la pastilla en 500  $\mu$ l de medio LB (opcional) .

10. Sembrar 50 ó 100 µl en placas con el antibiótico de selección (Km 50µg/ml, Rf 25, Gn 40µg/ml, en caso de que la clona se encuentre en pbi121, pbi101, pCambia1300; En caso de usar el sistema pSoup/pGreen Km 50µg/ml Rf 25, Gn 40µg/ml y Tetraciclina 5-10 µg/ml. El último antibiótico permite seleccionar a las bacterias transformadas con el pSoup, este permite la replicación de pGreen que contiene la construcción y tiene un gen de resistencia a kanamicina).
11. Dejar incubando por 36 a 48 h a 28 C protegidas de la luz.
12. Sembrar una colonia en un tubo de 5 ml de medio LB con el antibiótico de selección, dejar incubando 24 a 36 h.
13. Almacenar en glicerol a -70 C y estriar en placa.

### **Protocolo de agroinfiltración**

1. Inocular 30 ml de medio LB con agrobacterium previamente transformada; agregar los antibióticos apropiados y crecer toda la noche a 28°C, 200 rpm.
2. Colectar las células centrifugando a 3500 g por 10min a temperatura ambiente.
3. Remover el sobrenadante y resuspender en 25 ml buffer de infiltración.
4. Medir la absorbancia a 600 nm. La concentración no debe ser mayor de 1.5; e idealmente debe ser de 0.7.
5. Diluir la concentración de células con buffer de infiltración si es necesario; usando la fórmula  $C_2 = (C_1 V_1) / V_2$ .
6. Seleccionar las hojas que serán infiltradas. En *N.benthamiana* las se deben seleccionar las hojas más grandes ya que es más fácil de agroinfiltrarlas.
7. Con una jeringa estéril sin aguja, tomar 1ml de células en suspensión.
8. 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.
9. Presionar suavemente el embolo; el líquido se difundirá en la hoja.

10. Agroinfiltrar las hojas deseadas, es recomendable que sea una sola hoja por rama y de 100-400  $\mu$ l por hoja para ensayos de expresión transitoria.

11. Llevar las plantas a cámara de crecimiento, regar periódicamente hasta su procesamiento.

## Notas

- Es importante que el buffer MES se tenga a un pH entre 5.7.
- Es recomendable esperar hasta 14 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 necrosis a los tejidos de las hojas inoculadas, en caso que esto ocurra, reducir la concentración de células en suspensión agroinfiltradas puede resolver el problema.

### Buffer de infiltración

Stock	100ml
MgCl <sub>2</sub> (2M)	500 $\mu$ l (10mM)
+Acetosiringona(1M)	10 $\mu$ l (100mM)
MES pH 5.7(100mM)	10ml (10mM)
+Diluir en DMSO.	

## Generación de clonas infectivas hemidiméricas

Las construcciones hemidiméricas se hicieron de la siguiente manera: En todos los casos, el DNA viral se amplificó a partir de muestras de plantas infectadas mediante RCA utilizando el kit Templi-phi® (GE Healthcare™). Para el DNA-A de

RhGMSV-Gu (NC\_038802.1), el componente completo se digirió con *ScaI* de la construcción monomérica original pBlueScript y se purificó en gel usando el Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Start-Up Kit (Promega™). Luego, el componente completo se religó usando la ligasa T4 (New England bioLabs™) para digerirlo y clonarlo en el sitio *XbaI* en pBlueScript para manipulaciones subsecuentes. Luego, la construcción se digirió con *ApaI* y *XbaI*, se clonó un fragmento de 1059 nt que contenía el Ori en los mismos sitios en pBlueScript (pBS :: RhGU0.4), luego se clonó el genoma completo en el sitio *XbaI*. Se verificó la orientación del componente completo mediante patrón de digestión y se obtuvo la construcción hemidimérica pBS :: RhGUA1.4. Esta construcción se digirió con *PvuII* y se clonó en el sitio *SmaI* en pBI121, generando la construcción pBI :: RhGUA1.4.

El componente A completo de RhGMSV-Co (MT161671.1) se clonó originalmente en pBlueScript en el sitio *KpnI*. El Ori (1313nt) se obtuvo al digerir esta construcción con *KpnI/HindIII*, y enseguida clonándolo en los mismos sitios en pCambia1300 (pC1300 :: RhCO0.5). Se clonó el DNA-A completo (2575 nt) en el sitio *KpnI*, y se comprobó la orientación del DNA mediante el patrón de digestión, generándose la construcción final pC1300 :: RhCOA1.5.

El constructo Ori de PepGMV A (NC\_001359.1) se obtuvo a partir del constructo pPep1.35A [295] digiriéndolo con *KpnI/XbaI* y clonándolo en los mismos sitios en pCambia1300, luego se clonó el componente completo en el sitio *XbaI*. Esta clona se le denominó pC1300::Pep1.22A.

Para la construcción hemidimérica de DNA-B de RhGMSinV-Gu (MT161670.1), se realizó un procedimiento similar. El fragmento que contiene el Ori (2130nt) se obtuvo de la digestión de la construcción monomérica con *BamHI* y *ApaI*, y se clonó en pBlueScript, luego se clonó el componente completo del genoma en el sitio *BamHI*. Se comprobó a la orientación del componente de DNA-B completo mediante un patrón de restricción, se obtuvo la construcción hemidimérica. La construcción hemidimérica en pBlueScript se digirió con *KpnI* y *XbaI*, la

construcción hemidimérica completa se clonó en los mismos sitios en pCambia1300, produciendo la construcción pC1300 :: RhGUB1.8.

La construcción hemidimérica del DNA-B de PepGMV (NC\_004096.1) se generó de la siguiente manera: el Ori se obtuvo digiriendo el constructo monomérico originalmente clonado en pBS en el sitio HindIII, con SpeI/HindIII, dicho fragmento fue clonado en el sitio XbaI y HindIII en pCambia1300, y ulteriormente se clonó el genoma completo en el sitio HindIII. Esta clona se le denominó pC1300::Pep1.32B.

Todas las construcciones fueron confirmadas por patrón de restricción, PCR y secuenciación. Los mapas de estas construcciones pueden encontrarse en el apartado de anexos.

### **Generación de sondas marcadas con biotina para bioluminiscencia**

Para generar la sonda se debe obtener mediante la amplificación de un fragmento de interés (preferentemente entre 500-1000 nt). En este trabajo se realizó usando los primers BC1-1840F y BC1-80 Rev, que permiten amplificar un fragmento de ~584 pb pertenecientes al gen BC1 de PepGMV/ RhGMSV. El amplicón fue tratado para su marcaje usando el kit Pierce™ Biotin 3' End DNA Labeling Kit de la siguiente forma.

- 1.- El amplicón es purificado de banda de gel de agarosa.
- 2.- El amplicón purificado es desnaturalizado a 95°C por 10 min y acto seguido se incuba en hielo.
- 3.- Se prepara la enzima TdT (para dos reacciones)
  - 2 µl 5X TdT reaction buffer
  - 7 µl H<sub>2</sub>O
  - 1 µl TdT
- 4.- Enseguida se genera la reacción de marcaje.

- 25 µl H<sub>2</sub>O
- 5 µl de amplicón desnaturalizado
- 10 µl 5X TdT reaction buffer
- 5 µl Biotin II UTP
- 5 µl de enzima TdT (previamente diluida)

5.- incubar a 30°C por 30 min e inactivar con 2.5 µl de EDTA 0.2 M.

6.- Purificar con 50 µl de Cloroformo:Alcohol isoamílico. Vórtex antes de centrifugar por 2 min a 1300 rpm.

7.- tomar la fase acuosa y cuantificar en nanodrop.

8.- Conservar la sonda hasta su uso a -20°C.

### **Southern blot**

1.- En un gel de agarosa (TAE, 1%) cargar en cada pozo la misma cantidad en ng de DNA por muestra.

2.- Correr el gel el tiempo necesario para tener una buena separación de bandas, con la precaución de no perder el fragmento de interés.

3.- Al finalizar la corrida, colocar en el gel en solución desnaturalizante en agitación (70 rpm) por 10 min.

4.- Desechar la solución desnaturalizante y lavar rápidamente con agua destilada estéril.

5.- Pasar el gel a otro recipiente con buffer SSC 20X mientras se arma la cámara de transferencia.

6.- La cámara de transferencia se debe de armar de la siguiente manera:

- Papel filtro, debe sumergirse en ambos lados con el buffer SSC 20X.
- Algunas capas de papel filtro del tamaño del gel (eliminar burbujas).
- El gel a transferirse con la cara hacia arriba.

- Membrana de nylon cargada (del tamaño del gel). Es recomendable hacer un corte a esta membrana para recordar su orientación.
- Más capas de papel filtro.
- Colocar una torre de servilletas que abarque todo el gel (la cantidad varía dependiendo del tamaño del gel).
- Poner un soporte liso donde colocar 1 kg de peso. Este debe estar distribuido para tener mejor equilibrio y evitar que caiga durante la noche.
- Esperar al menos unas 2-3 horas para observar si es necesario agregar más servilletas si las anteriores ya se han humedecido.

7.- Al día siguiente se toma la membrana desde las orillas con pinzas, con cuidado de no plegarla completamente, ni tocar la zona donde se encuentran las muestras y se coloca en buffer SSC 20X.

8.- Colocar la membrana en el crosslinker por 3 min en cross-linking óptimo.

9.- Colocar la membrana en un tubo de hibridación con 10 ml de solución de pre-hibridación por 20 min a 55 °C en el horno de hibridación.

10.- Eliminar la solución de hibridación y agregar la solución de hibridación (sonda suspendida en solución de pre-hibridación) y dejar O/N (12-16 horas).

11.- Eliminar la solución anterior y en el mismo tubo lavar dos veces la membrana con solución 0.1% SDS/SSC 2X por 15 min. A continuación, otro lavado con solución 0.1% SDS/ SSC 1X por 15 min, ambos a 55°C y un tercer lavado en solución 0.1% SDS/ SSC 0.1X a temperatura ambiente por 10 min.

12.- Después de la hibridación, mediante baño maría, calentar la solución de bloqueo y el buffer de lavado 4X. El buffer de equilibrio se puede dejar a TA. Todas las soluciones pertenecen al kit chemiluminescent nucleic acid detection module de Thermo Fisher Scientific™.

13.- Bloquear la membrana, sumergiéndola en solución de bloqueo por 15 min en agitación ligera. Mientras tanto preparar el buffer de bloqueo/conjugación: 50 µl de streptavidin-horseradish peroxidase conjugate a 16 ml de buffer de bloqueo.



14.-Eliminar el buffer de bloqueo y agregar el buffer de bloqueo/conjugación e incubar por 15 min en agitación. Mientras tanto preparar la solución de lavado 1X (40 ml de buffer de lavado y 120 ml de H<sub>2</sub>O estéril).

15.-Eliminar el buffer de bloqueo/conjugación y limpiar rápidamente la membrana con 20 ml de solución de lavado 1X.

16.- Hacer 4 lavados de 5 min, cada uno con 20 ml de solución de lavado 1X en agitación. Eliminar la solución entre cada lavado.

17.-Remover el buffer de lavado y agregar 30 ml de solución de equilibrio.

18.-Desde este punto, todo debe hacerse en cuarto oscuro. Preparar una solución 1:1 de peroxidase solution y luminol/enhancer solution y con esta humedecer con pipeta la membrana el lado donde el DNA fue transferido.

19.- Eliminar el exceso de solución de la membrana con una toalla de papel sin tocar la membrana.

20.- Realizar la autorradiografía exponiendo la membrana seca a una película con una pantalla intensificadora. Usar las soluciones de revelado para obtener la imagen deseada, una vez revelada la película puede exponerse a la luz. El tiempo de exposición puede variar dependiendo de la intensidad de la señal.

## Capítulo II

### **La comparación de los promotores bidireccionales de dos variantes de TYLCV revela una secuencia compleja conservada en los begomovirus del Viejo Mundo**

La IR de los begomovirus es una de las partes más variables del genoma de estos virus [104–106,296,297]. Sin embargo, esta región contiene elementos posicionalmente conservados [111]. Dentro de esta región se encuentra el origen de replicación viral, que incluye los iterones, sitios donde la proteína Rep se une de forma específica para iniciar la replicación viral [110–112] y también para reprimir su propia expresión [298]. En la proximidad de los iterones, se encuentra la estructura tipo tallo-asa conservada y la secuencia invariable donde Rep realiza corte para iniciar la RCR en begomovirus “TAATATTAC” [13,64–66]. Este origen de replicación se encuentra flanqueado por promotores bidireccionales, especialmente los de los genes *Rep* y *CP* [24,299], cada uno con su respectiva TATA-BOX [26,107–109]. En los promotores de genes en el sentido del virión se encuentran elementos conservados como el CLE “GTGGTCCCC”, el cual es un elemento regulador positivo [300] en los begomovirus, que responde a la expresión de la proteína transactivadora (TrAP) para la activación de los genes tardíos [301,302]; estrechamente asociado a algunos CLEs se encuentra un elemento compuesto asociado a la TATA-BOX (TACE) recientemente reportado “ACTT-(N7)-AAGT”, el cual posiblemente tiene función reguladora en la expresión de los genes del sentido del virión [26]. En toda la IR se pueden encontrar otros elementos putativos no conservados, algunas veces presentes en ambos promotores como el elemento de respuesta al etileno, elemento de respuesta a ácido abscísico, la CAAT-BOX, I-BOX, W-BOX, y otros más [73,109,303].

La transcripción en begomovirus es un proceso regulado de manera temporal durante la infección, dividiendo la expresión de los genes en etapas tempranas y tardías [72,304]. Primero se expresan los genes codificados en el sentido complementario como AC1/C1, AC4/C4, AC2/C2 y después AC3/C3, denominados por ello como genes “tempranos” [72]. Eventualmente los genes

AV1/V1, AV2/V2 y los codificados en el componente B, BC1 y BV1 se expresarían subsiguientemente, siendo denominados “genes tardíos” [72]. si bien algunos datos sugieren que el gen BC1 podría ser en realidad un gen más bien temprano [72].

Diversos estudios con promotores CP fusionados a genes reporteros, han mostrado que estos promotores funcionan por un mecanismo dual: por desrepresión en tejidos vasculares y por transactivación en mesófilo. La desrepresión de los genes tardíos dependen de la transactivación por la proteína TrAP, codificada en el gen temprano AC2/C2 [26,72,73,305].

Eagle *et al.*, [306], mediante deleciones progresivas dentro de la región promotora de AC1 de TGMV, encontraron que existe un elemento presente en la mayoría de los begomovirus NW, denominado como G-BOX "CACGTG". El promotor Rep de este virus sin dicho elemento, mostró una actividad transcripcional reducida ocho veces con respecto a su versión WT en protoplastos del tabaco.

Por otra parte, en experimentos de transfección de células de tabaco, plásmidos con el origen de replicación mutante (G-BOX, o TATA-BOX mutante) complementados con un plásmido que codifica a Rep, pueden replicarse eficientemente, siendo detectados sus replicones mediante Southern blot. No obstante cuando se agregó un plásmido con el origen de replicación WT como competidor, las versiones mutantes ya no fueron detectadas mediante southern blot. Indicando que la G-BOX tiene una función crítica dentro de la replicación, al hacer que el virus correspondiente exprese una mayor aptitud (“fitness”) que los mutantes [306].

Ramos *et al.*, 2004 se demostró que al menos para el begomovirus *Tomato mottle taino virus* (ToMoTV), el promotor mínimo de Rep se encuentra entre la estructura tallo-asa y el codón de inicio del gen *Rep* [307]. Al eliminar la región que contiene la G-BOX, la actividad de dicho promotor fue indetectable [307]. El promotor de la proteína  $\beta$ C1 del betasatélite asociado con el begomovirus del

Viejo Mundo, CoLCuMV, tiene también un motivo G-BOX. La mutación en este elemento provoca una reducción de ~ 40% en la actividad del promotor y una disminución en su replicación mediada por el virus anfitrión (helper), en comparación con el satélite silvestre [296,308]. De manera similar, se observó que al mutar dicho elemento en el promotor homólogo del betasatélite asociado a MYVV, la actividad de este era prácticamente abolida [309]. Estos resultados indican que la G-Box es un elemento activador de la transcripción. La G-Box no se encuentra en los begomovirus del Viejo Mundo precediendo a la estructura tallo-asa, ni en los virus del linaje del SLCV [310]. Hasta la fecha, no se ha reportado ningún elemento con función similar a la G-BOX en los begomovirus OW.

En el sentido del virión, además de la caja TATA y el TACE, el CLE es un elemento en *cis* conservado en la parte de la IR asociada con los genes tardíos [111,302]. Distintos trabajos han demostrado que el CLE es un regulador positivo y promueve la transcripción de manera aditiva dependiendo del número de copias de este [26,301,302]. Como se mencionó previamente el promotor CP es activado en presencia de TrAP, pero en plantas transgénicas con versiones truncadas de ese promotor el gen reportero se expresa a niveles elevados en tejido vascular, en ausencia de factores virales. El mecanismo por el cual los genes tardíos son transactivados por TrAP en el mesófilo y desreprimidos en el tejido vascular en las plantas transgénicas aún no es comprendido completamente [73,302,311].

TYLCV es un begomovirus monopartita que probablemente surgió en algún lugar del Cercano Oriente a mediados del siglo XX [273]. El virus se identificó por primera vez en el valle del Jordán, Israel, en 1929-1930 [273,312] y como patógeno viral a principios de la década de 1960 [312]. TYLCV es el principal agente causal de TYLCD (la enfermedad del rizado amarillo del tomate), representando una gran amenaza para la producción de tomate en todo el mundo ya que ha sido introducido accidentalmente a la mayor parte de los continentes [80,89,270,273,313]. TYLCV tiene una alta tasa de mutación [105], como otros virus de ssDNA [314]. La alta de mutación (de  $2.88 \times 10^{-4}$  a  $8.89 \times 10^{-4}$  sustituciones/sitio/año en el caso específico de TYLCV [315,316]) y los eventos

de recombinación con otros virus coinfectantes, dan lugar a nuevas cepas adaptadas a diferentes entornos [317–319]. La cepa de Israel de este virus (TYLCV-IL) se ha introducido en las Américas al menos en nueve ocasiones independientes [315]. Dos en México, primero en la región del Golfo de México alrededor de 1996, y en la costa del Pacífico alrededor de 2004 [314]. Una variante de este virus fue aislado en nuestro grupo [320] la cual presenta dos mutaciones importantes en la IR: La primera, en el promotor Rep, una delección de 29nt. Esta mutación en el promotor de Rep se ha identificado antes en otros aislados de TYLCV de Texas (EF110890.1), Arizona (EF210554.1), Florida (KY971337.1), Georgia (KY971345.1) isla de Granada (FR851297.1), Trinidad y Tobago (KU981044.1). La segunda mutación, única entre los aislados descritos, es una duplicación de 42 nucleótidos en el promotor de CP. Dicha duplicación contiene un CLE asociado a una G-BOX [320] estas dos mutaciones, no habían sido reportadas juntas con anterioridad.

En este trabajo examinamos la actividad funcional del promotor Rep y CP de la mutante natural TYLCV-IL aislada en SLP, que denominamos TYLCV-IL[SLP]. Posteriormente, comparamos dicha actividad con las propias de la versión del virus silvestre, representado en este trabajo por un aislado de TYLCV-IL obtenido en Sinaloa, TYLCV-IL[Sin]. Por último, mediante PCR en tiempo real determinamos si existe diferencia en la carga de este virus mutante en comparación de la versión silvestre.

Nuestros hallazgos revelaron que la duplicación de la región de 42 nucleótidos no parece haber causado ningún cambio significativo en la actividad del promotor CP en comparación de la versión WT; en cambio la delección de 29 nt tuvo un impacto negativo en la actividad del promotor Rep de TYLCV-IL[SLP]. Esta observación sugiere que el segmento de 29 pb que se eliminó contiene uno o más elementos *cis* reguladores que promueven la transcripción del gen Rep. Un análisis de footprinting filogenético reveló que la región deletada eliminada forma parte de un elemento de 18 pb asociado al iterón ubicado río abajo de la caja TATA. Este elemento se encuentra conservado en la mayor parte de los

begomovirus nativos del OW, pero está ausente en todos los begomovirus NW. Esta secuencia conservada, que denominamos “secuencia activante adyacente al iterón” (ASAI, por sus siglas en inglés), podría ser un elemento regulador complejo de la expresión del gen Rep. El ASAI podría ser un elemento parcialmente similar en función a la G-Box que se encuentra en los begomovirus del NW.

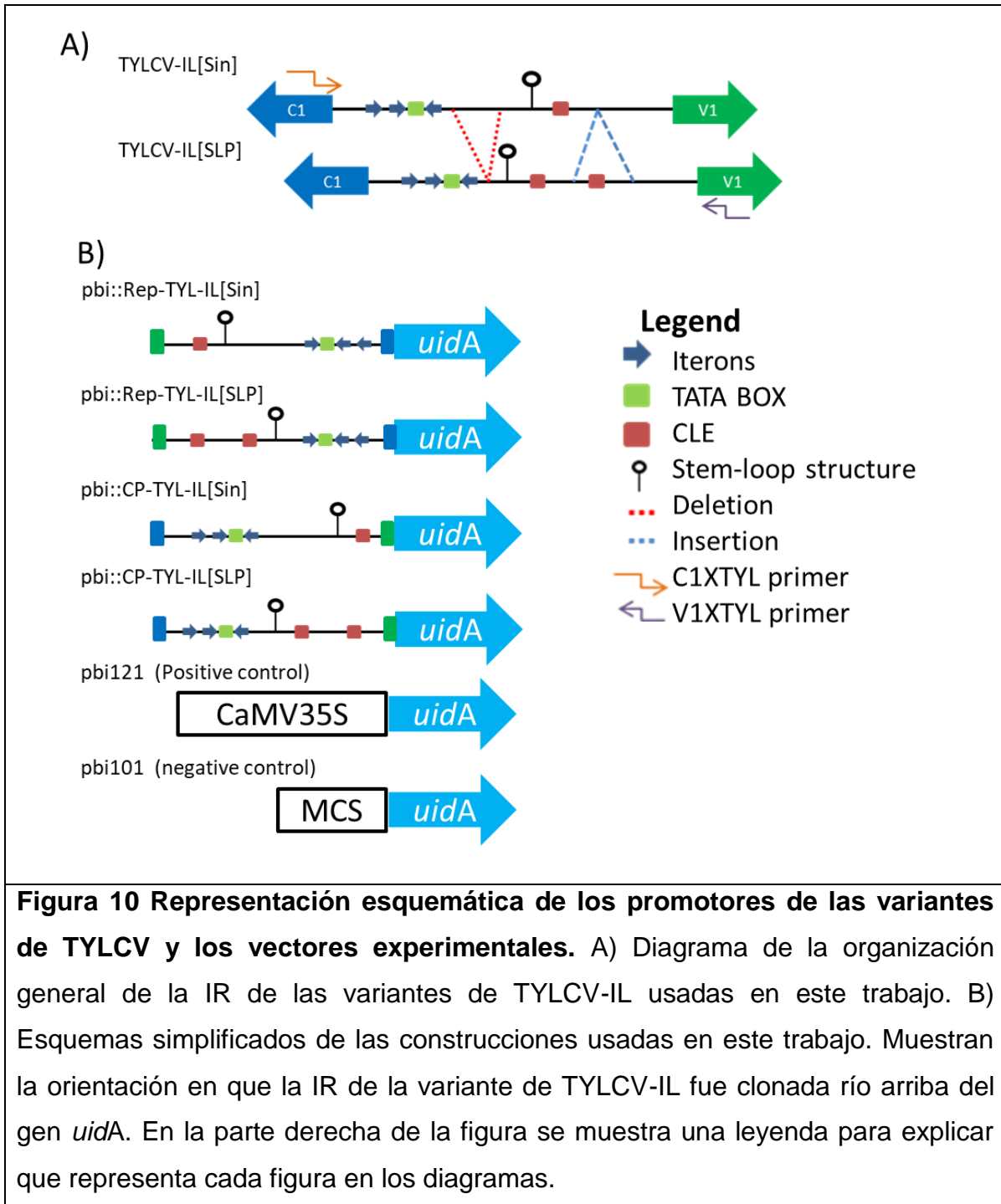
## **Objetivos**

Comparar los promotores bidireccionales de las variantes de TYLCV-IL en ensayos transitorios de fluorescencia *in planta* así como cuantificar la carga viral mediante qPCR y los fenotipos de infección generados en experimentos de agroinoculación *N.benthamiana*.

## **Resultados**

**La actividad del promotor de Rep de TYLCV-IL[SLP] es afectada por la delección de 29 nt**

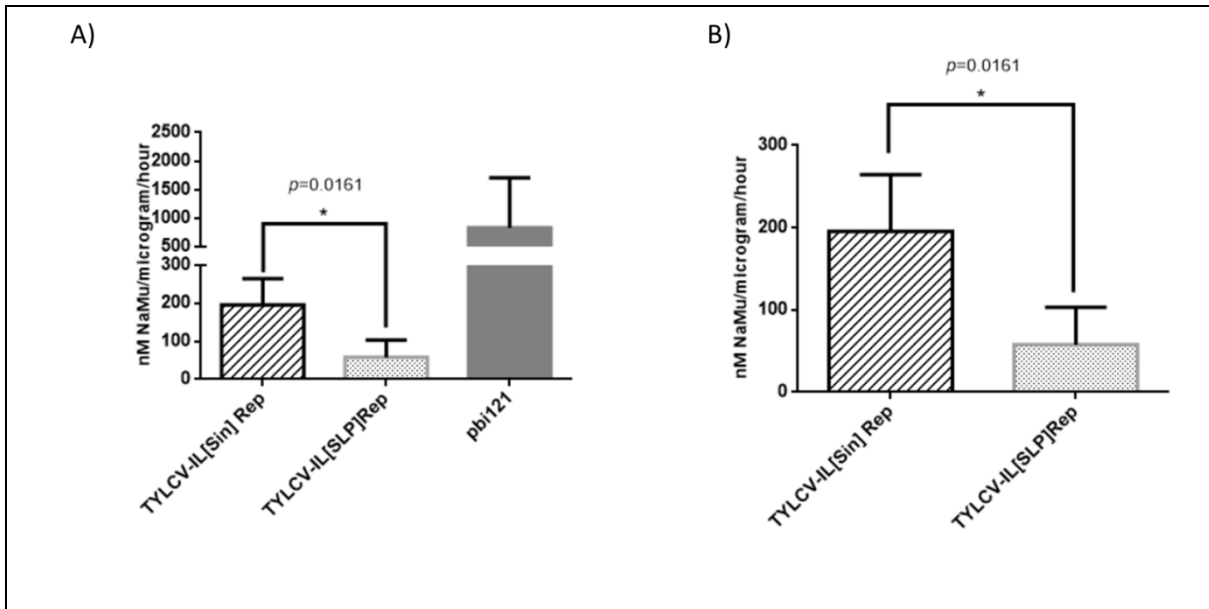
Mediante PCR se amplificó la IR de TYLCV-IL[*Sin*] y la de TYLCV-IL[*SLP*] con los primers C1XTYL y V1XTYL (Figura 10 A). Ambos primers cuentan con sitios de restricción *Xba*I. Este mismo sitio fue usado para clonar la IR de cada virus, generando una fusión transcripcional con el gen *C1* o *V1* de TYLCV con el gen *UidA* que codifica para la proteína Gus (beta-glucuronidasa). El promotor presente en la IR que regula la expresión *UidA*, depende de la orientación (Figura 10 B). Las clonas experimentales generadas fueron las siguientes, pBI::Rep-TYL-IL[*Sin*], pBI::CP-TYL-IL[*Sin*], pBI::Rep-TYL-IL[*SLP*] y pBI::CP-TYL-IL[*SLP*]. Con estas construcciones se transformaron células de *A. tumefaciens* GV310, las cuales fueron usadas en experimentos de agroinfiltración de plantas de *N.benthamiana*.



El estudio se inició analizando funcionalmente el promotor Rep de las variantes de TYLCV-IL. Con la finalidad de reducir la variabilidad entre individuos, cada planta de *N.benthamiana* (n=4) fue infiltrada con las construcciones experimentales, pBI::Rep-TYL-IL[*Sin*] o pBI::Rep-TYL-IL[*SLP*], en hojas diferentes, pero de edad –altura- y tamaño equivalente. Cuarenta y ocho horas posteriores a la agroinfiltración se cosecharon las hojas agroinfiltradas y se hicieron extractos de proteína de éstas. El día en que los extractos de proteína fueron obtenidos, usando las curvas realizadas de BSA y NaMU se cuantificó la cantidad de proteína así como la fluorescencia generada en cada extracto, respectivamente. Los datos de fluorescencia fueron normalizados a 1 µg de proteína total. La fluorescencia observada en el grupo control negativo (platas agroinfiltradas con el vector pBI101, el cual tiene el gen reportero *uidA* sin promotor) fue cercana a 0 nM de NaMu/µg/hora, mientras que el grupo control positivo (pBI-121) fue en promedio de 828 nM de NaMu/µg/h. Todas las lecturas fueron normalizadas restando la fluorescencia promedio observada en el control negativo.

Para evitar sesgos durante en análisis estadístico, los datos obtenidos fueron analizados mediante la prueba de "t de student" de dos caras, obteniendo un valor de  $p= 0.01$  (Figura 11). La delección en el promotor de Rep de TYLCV-IL[*SLP*] produjo una reducción en la actividad de ~70% comparado con el promotor homólogo de la variante WT de TYLCV colectada en Sinaloa (con un promedio de 195.25 y 54.95 nM de NaMu/ µg/ hora, en TYLCV-IL[*Sin*] y TYLCV-IL[*SLP*], respectivamente).

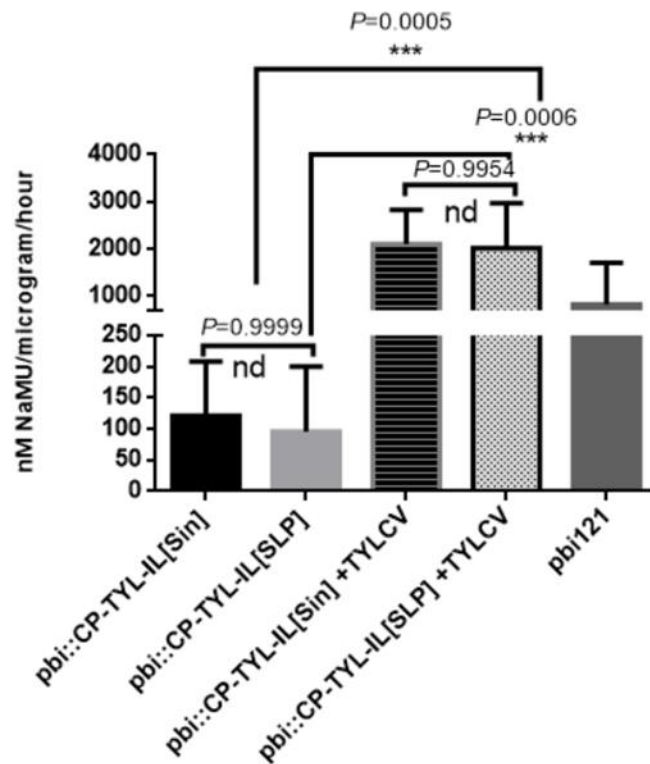




**Figura 11 Actividad de Gus de los promotores Rep de TYLCV-IL[Sin] y TYLCV-IL[SLP].** A) La gráfica muestra la actividad de Gus promedio por hora  $\mu$ g de extracto de proteína total de 4 plantas agroinfiltradas con las construcciones de fusión transcripcional del gen *UidA* los promotores Rep de las variantes de TYLCV-IL. Los datos de ambos promotores de las variantes de TYLCV-IL fueron analizados mediante t-student de dos caras, con un CI de 95%. B) Acercamiento de la gráfica acentuando las diferencias entre ambos promotores. El asterisco muestra que existe diferencia estadística entre ambos grupos.

## **La duplicación de 42 nt no afectó la actividad del promotor de CP de TYLCV-IL[SLP] en coinfección con el componente viral**

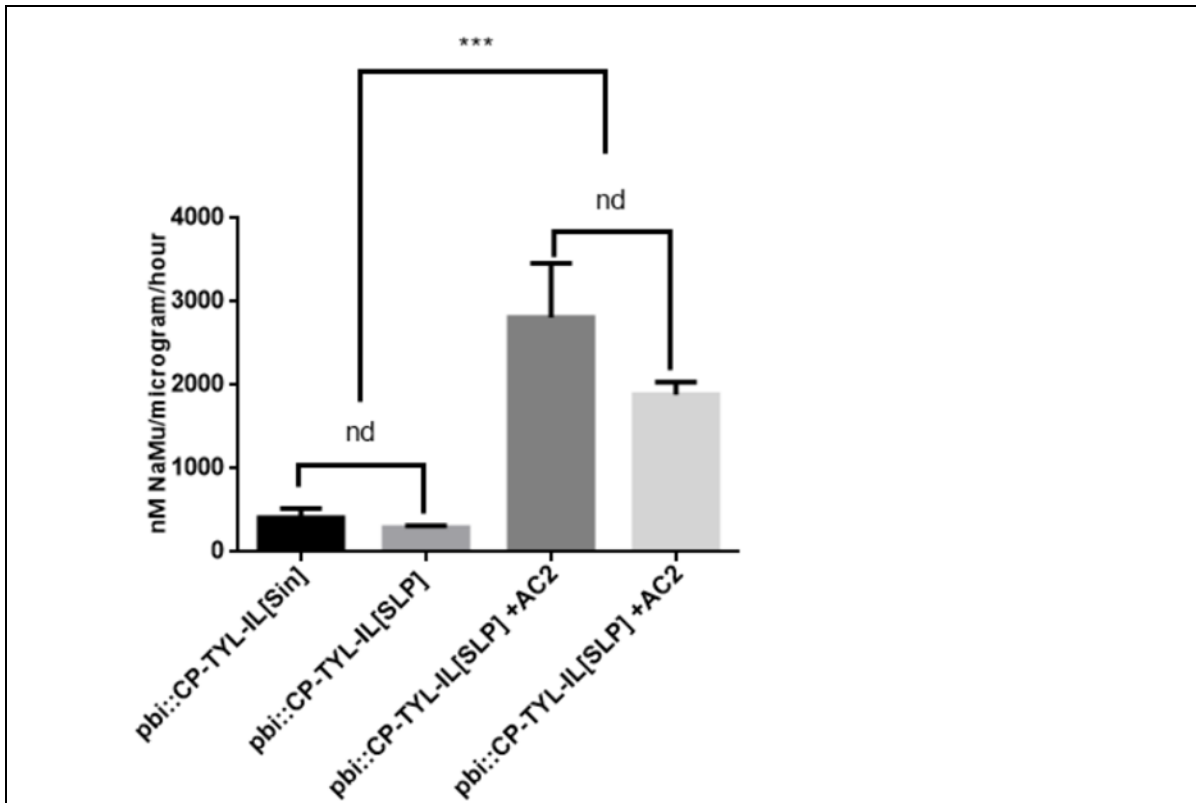
Del mismo modo se comparó la actividad del promotor de CP de TYLCV-IL[SLP] y TYLCV-IL[*Sin*]. Como con los promotores de Rep, células de *A. tumefaciens* GV3101 transformadas con las construcciones experimentales pbi::CP-TYL-IL[SLP] y pbi::CP-TYL-IL[*Sin*] fueron agroinfiltradas en plantas de *N.benthamiana*. Ambos promotores mostraron una actividad de fluorescencia relativamente baja, similar a la vista en los promotores del gen Rep de ambas variantes (con un promedio de 121 y 96.18 nM de NaMu/ µg/ hora para TYLCV-IL[*Sin*] y TYLCV-IL[SLP], respectivamente). Para determinar si la expresión de algún gen de TYLCV potenciaba la actividad del promotor de CP de ambas variantes, en otro experimento la construcción pBI121::TYLCV-SLP1.75 fue co-inoculada con pbi::CP-TYL-IL[SLP] o pbi::CP-TYL-IL[*Sin*]. La medición de la actividad de estos promotores bajo dicha condición aumentó drásticamente (de 121 a 2108 y de 96.18 a 2019 nM de NaMu/ µg/ hora para TYLCV-IL[*Sin*] y TYLCV-IL[SLP], respectivamente), aunque mediante múltiples comparaciones con ANOVA de una vía se encontraron diferencias entre las muestras coinfectadas con TYLCV con las no coinfectadas, no hubo diferencias entre los grupos homólogos. Pero es digno de mención que los de promotores de CP de ambas variantes, en presencia del begomovirus TYLCV, aumentaron su expresión a niveles comparables con el 35S presente en pBI121 (Figura 12). Este resultado indica que el promotor de CP de ambas variantes de TYLCV es potenciado durante la infección con dicho virus. Al contrario de lo esperado, el promotor de TYLCV-IL[SLP] que cuenta con un CLE duplicado, no tuvo una potenciación adicional en su actividad. Una posible explicación, es que la regulación del promotor de CP es más compleja de lo esperado y además de TrAP otras proteínas están involucradas de forma directa o indirecta en la actividad de dicho promotor.



**Figura 12 Actividad de Gus de los promotores CP de las variantes de TYLCV y la transactivación de estos en presencia TYLCV.** La gráfica muestra la actividad de GUS de los promotores de CP de las variantes de TYLCV. En la parte izquierda se encuentran la actividad de los promotores en ausencia del virus. En la parte derecha los mismos promotores en coinfección con TYLCV. Mediante ANOVA de comparaciones múltiples con un CI=95%, no se encontraron diferencias dentro de cada grupo pero si entre grupos (es decir los promotores solos contra sus versiones en coinfección con TYLCV). Los asteriscos muestran la proporción de la diferencia entre los grupos experimentales y los “\*” indican los valores de  $p$ : nd= no significativo, \* $<.05$ , \*\* $<.001$  y \*\*\* $<.0001$ .

### **La duplicación de 42 nt no afectó la actividad del promotor de CP de TYLCV-IL[SLP] en co-inoculación con la proteína TrAP de PepGMV.**

Los resultados anteriores demostraron que los promotores de CP de ambas variantes eran potenciados durante la infección por TYLCV. Para demostrar que la infección no causaba ningún efecto diferencial causado por otras proteínas virales, se optó co-inocular hojas de *N.benthamiana* con la construcción pCambia::35s-TrAP (la cual contiene al gen AC2 de PepGMV bajo el promotor 35S) junto con la construcción pbi::CP-TYL-IL[SLP] o pbi::CP-TYL-IL[SLP]. Posteriormente, se obtuvo el extracto total de proteína 48 h posteriores a la inoculación. Se cuantificó la proteína obtenida mediante ensayo de Bradford y se midió la fluorescencia generada. Los resultados obtenidos son equiparables a los observados en las plantas co-inoculadas con TYLCV. Esto podría indicar que bajo nuestras condiciones experimentales, la infección con TYLCV solo C2 afecta positivamente la actividad del promotor de CP y no existe interferencia perceptible por otras proteínas virales (Figura 13).



**Figura 13 Co-inoculación de los promotores virales de CP con la proteína AC2**

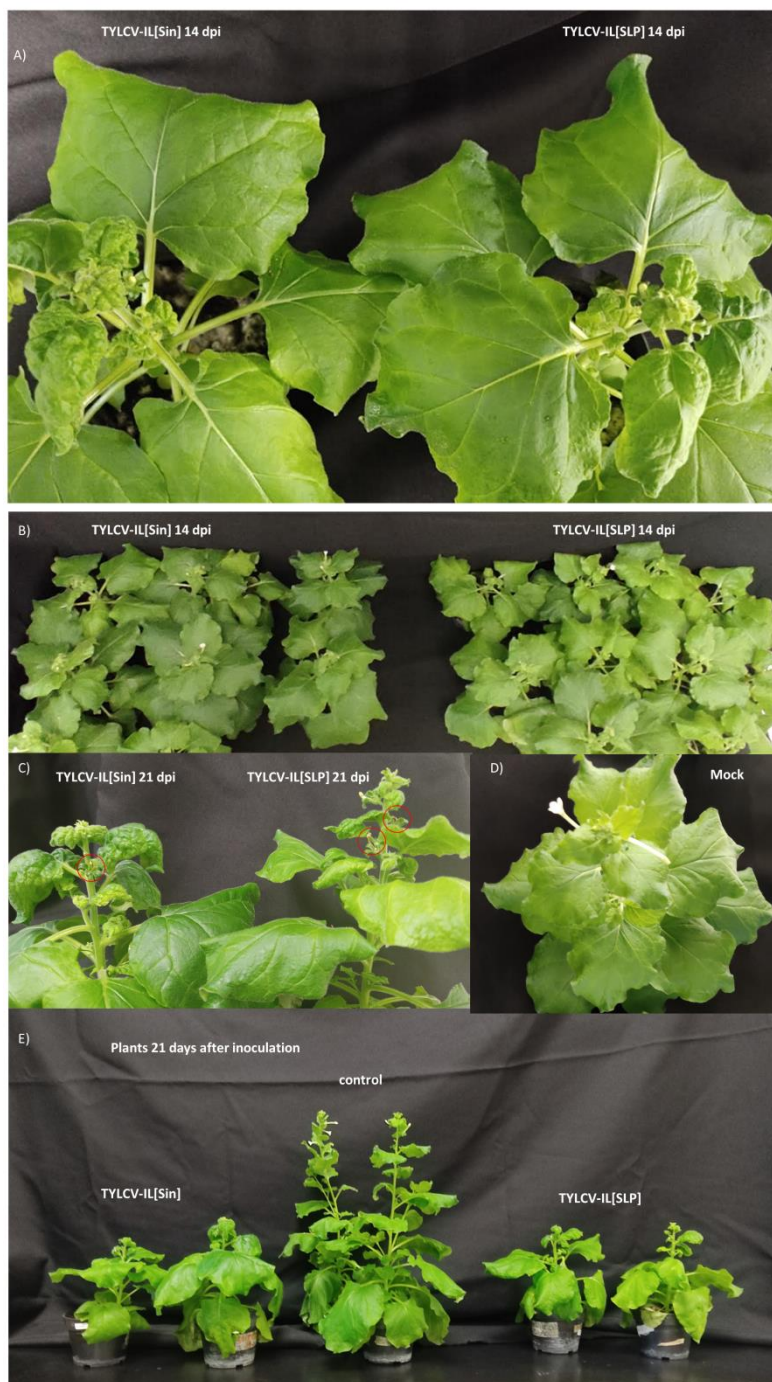
La gráfica muestra la actividad de GUS de los promotores de CP de las variantes de TYLCV. En la parte derecha se encuentran la actividad de los promotores en presencia de la proteína AC2 de PepGMV. En la parte izquierda los mismos promotores en ausencia de esta proteína. Mediante ANOVA de comparaciones múltiples con un CI=95%, no se encontraron diferencias dentro de cada grupo pero si entre grupos (es decir los promotores solos contra sus versiones en co-inoculación con AC2). Los asteriscos muestran la proporción de la diferencia entre los grupos experimentales y los “\*” indican los valores de  $p$ : nd= no significativo, \*<.05, \*\*<.001 y \*\*\*<.0001.

## **Comparación de los fenotipos generados por ambas variantes de TYLCV**

Plantas de *N.benthamiana* de 4 semanas de edad fueron agroinfiltradas con células de *A. tumefaciens* GV3101 con las construcciones pBI121::TYLCV-SLP1.75 o con pG::TYLCV SA-Dímero (Un dímero de la variante TYLCV-IL[*Sin*] KU836749.1 amablemente proporcionado por el Dr. Jesús Méndez-Lozano). Dichas células suspendidas en buffer de agroinfiltración con una O.D. 0.5-0.7, fueron agroinfiltradas usando una jeringa de 1 ml sin aguja, inoculando de 400 a 500 microlitros en 4 hojas de cada planta (10 por construcción). Las plantas se mantuvieron en observación durante 21 dpi. La evidencia fotográfica de los fenotipos de infección se muestran en la Figura 14.

Al décimo día, las plantas inoculadas con pGreen::TYLCV-SIN 2.0 empezaron a mostrar síntomas en 8 de las diez plantas inoculadas. Por otra parte, las plantas inoculadas con pBI121::TYLCV-SLP1.75 empezaron a mostrar síntomas al mismo tiempo en 6 de las 10 plantas inoculadas. A los 14 dpi, las 10 plantas con pGreen::TYLCV-SIN 2.0 mostraron los síntomas característicos de infección por TYLCV ( enrollamiento foliar y deformación en las hojas apicales) en cambio en aquellas inoculadas con pBI121::TYLCV-SLP1.75, 8 de las 10 plantas mostraban dichos síntomas, aunque menos severos (Figura 14 A). Las plantas infectadas con TYLCV-IL[*Sin*] desarrollaron hojas más pequeñas en comparación con plantas inoculadas con TYLCV-IL[*SLP*] (Figura 14 B y C).

A los 21 dpi todas las plantas de ambos grupos mostraron síntomas notorios (Figura 14 C) en comparación con las plantas control (Figura 14 D). En ambos grupos infectados con las variantes de TYLCV-IL, los botones de flor resultaron abortivos y presentaron desarrollo anormal y deformaciones. En todas las plantas infectadas tuvieron una reducción considerable con respecto a las plantas control. Teniendo en promedio 12.5 cm y 30 cm, respectivamente (Figura 14 E). Mediante PCR se determinó que todas las plantas inoculadas con cualquiera de las variantes de TYLCV-IL resultaron positivas.



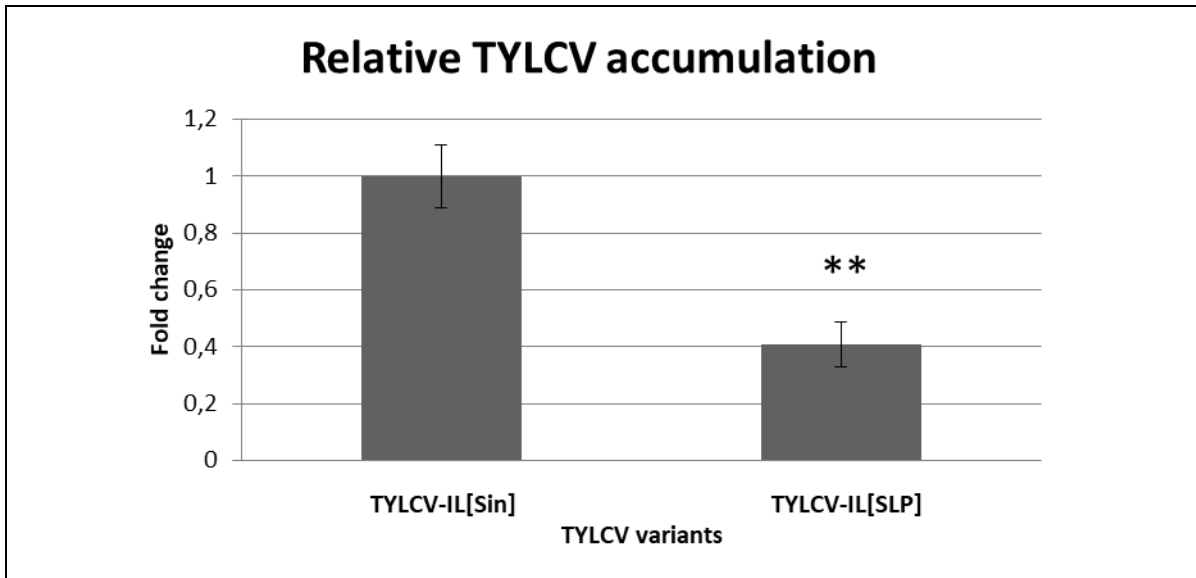
**Figura 14 Fenotipos de infección de *N.benthamiana* con las variantes de TYLCV-IL.** A) vista apical de los síntomas producidos por TYLCV-Sin (izquierda) y TYLCV-SLP (derecha) a los 14 dpi. B) Vista apical de dos grupos de plantas los síntomas producidos por TYLCV-Sin (izquierda) y TYLCV-SLP (derecha) a los 14 dpi. C) y D) Comparación de las plantas infectadas por TYLCV-Sin y TYLCV-SLP, respectivamente, a los 21 dpi con respecto al control negativo. E) Comparación de la estatura de las plantas infectadas con TYLCV-Sin (izquierda), TYLCV-SLP (derecha) y el control negativo (en medio).

### **Comparación de la replicación de TYLCV-IL[SLP] Vs. TYLCV-IL[Sin].**

Debido a que la actividad del promotor de Rep en TYLCV-IL[SLP] fue menor a la vista en la variante TYLCV-IL[Sin], la siguiente pregunta a responder fue si la carga viral también se veía afectada en la mutante natural. Los extractos de DNA total cosechados a los 14 dpi fueron cuantificados y diluidos a 40 ng/ $\mu$ l. Estos extractos fueron usados para cuantificar la carga viral relativa de cada variante. Como gen de referencia se usó el de la F-BOX de *N.benthamiana*.

Comparada con la variante de TYLCV-IL[Sin] la acumulación viral de las plantas inoculadas con la variante TYLCV-IL[SLP] es considerablemente menor (Figura 15). La proporción de TYLCV-SLP con respecto a la variante de TYLCV-IL[Sin] es de poco menos de la mitad (~40%). Los datos fueron analizados mediante t de student de dos caras no pareado. Se obtuvo un valor de  $p=0.0059$ . Este resultado correlaciona con lo observado en la actividad del promotor y los síntomas observados, siendo ligeramente menos severos en TYLCV-IL[SLP]. El experimento se repitió con extractos obtenidos a los 21 dpi, en este caso no hubo diferencia estadística en la carga viral entre ambos grupos mediante el mismo análisis estadístico (Ver anexos).

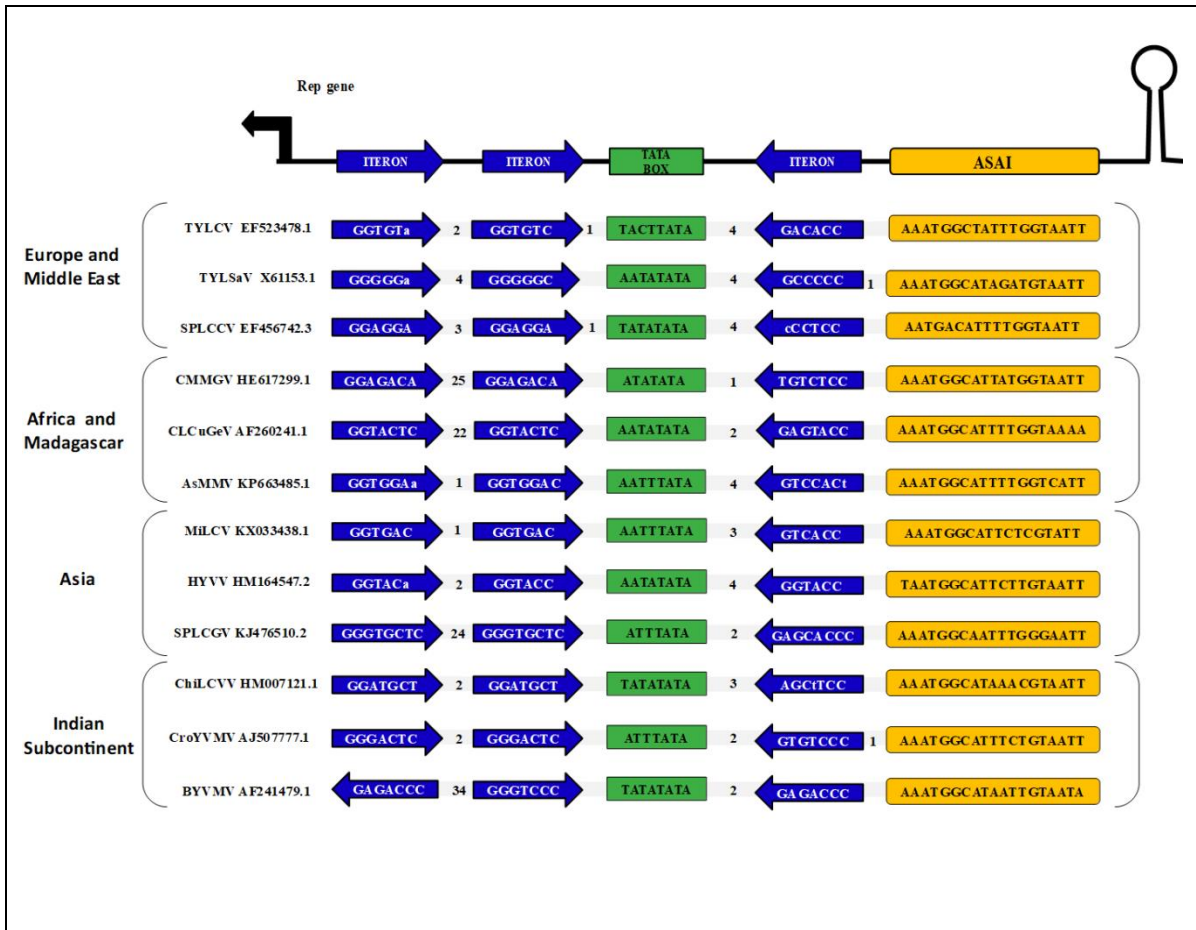




**Figura 15 Comparación de la carga viral relativa de TYLCV-IL[Sin] vs. TYLCV-IL[SLP] en plantas de *N.benthamiana*.** Se muestra la media geométrica de la carga viral relativa de ambas variantes. Las barras representan el error estándar. Los cálculos se realizaron mediante el método de  $\Delta\Delta Ct$ . Los datos fueron analizados mediante t de student de dos caras. Se obtuvo un  $p=0.0059$ .

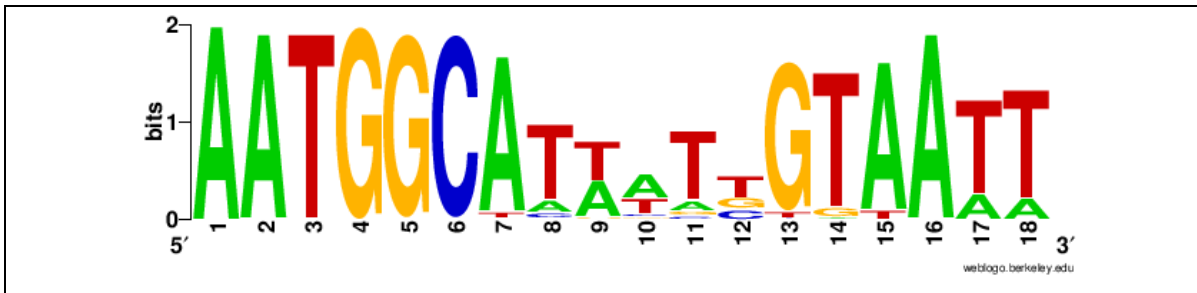
**Dentro de los 29 nt ausentes en el promotor Rep de TYLCV-IL[SLP] se encuentra un putativo elemento conservado.**

Al observar que la actividad del promotor Rep y la acumulación viral de TYLCV-IL[SLP] era menor que la observada en la versión WT de la variante de TYLCV-IL[SIN], la pregunta natural fue: ¿qué podría encontrarse dentro de la secuencia de 29 nt ausente en la mutante natural? En las distintas bases de datos de elementos reguladores en *cis* de plantas no encontramos ningún motivo relevante o elemento regulador que pudiera explicar este cambio en la actividad transcripcional del promotor Rep de TYLCV-IL[SLP], salvo por el elemento GT1CONSENSUS (GRWAAW). Al comparar la región donde ocurrió la delección de 29 nt en el Promotor de Rep de TYLCV-IL[SLP] con otros begomovirus del OW, encontramos un segmento de 18 nt posicionalmente conservado en aproximadamente el 70 % de los begomovirus del Viejo Mundo reportados hasta ahora. Mediante foot-printing filogenético, encontramos que este elemento está siempre a 1 nt de distancia o directamente adyacente al iterón que se encuentra río abajo de la caja TATA (Figura 16). Al analizar más de 150 secuencias de begomovirus del Viejo Mundo, generamos un logo [321], que representa la secuencia de consenso de este elemento (Figura 17). Este elemento puede dividirse en tres secciones de seis nucleótidos cada uno. El primer segmento tiene poca variación y por lo tanto, la secuencia AATGCC sería el consenso estricto de este fragmento. Los seis nucleótidos posteriores que forman el segundo segmento tienen mayor variación, pero suele ser rico en TA. Dicha variación en los 6 nucleótidos medios no parece tener una relación directa aparente con la secuencia del iterón. Incluso entre especies con el mismo uso de iterón, la parte media de ASAI no es idéntica. Por último, el tercer segmento es más variable que el primero, pero menos que el segundo, y podría tenerse como consenso estricto GTAATT o a GTAAWW como consenso flexible.



**Figura 16 La ASAI se encuentra conservada en distintos begomovirus del viejo mundo en arreglo conservado.**

En la parte superior se muestra un diagrama simplificado de algunos de los elementos dentro de la IR de los begomovirus OW. En la parte inferior, distintos ejemplos de begomovirus OW marcando de forma explícita los iterones, la caja TATA y la ASAI. Cada ejemplo se encuentra agrupado según su origen geográfico.



**FIGURA 17 Secuencia consenso del ASAI.**

La secuencia consenso se generó usando 197 ASAI de distintos genomas de begomovirus del viejo mundo. El logo aquí mostrado fue generado alineando estas secuencias en WebLogo [321]. Los números de las abscisas representan la posición del nucleótido mientras que las ordenadas la conservación de 0 (no conservada) a 2 (conservada).

## Discusión

TYLCV es un begomovirus que se encuentra diseminado prácticamente en todo el mundo [270,315,322] siendo un factor limitante en la producción de distintas plantas de interés comercial, principalmente tomate [80,89,243,270,273,313,322]. De las 7 cepas de TYLCV reconocidas, la más diseminada es TYLCV-IL, además de ser la única con presencia en el continente americano [314,315]. Las variantes de TYLCV-IL encontradas en el continente parecen ser producto de 9 introducciones independientes [315]. Al menos dos de estas introducciones ocurrieron en México, la primera entre 1996-1997 en la península de Yucatán [323], y la segunda en el 2006 en Sinaloa [324]. [324]. Una variante de TYLCV-IL fue aislada por Bañuelos-Hernández *et al.*, 2012 en coinfección con otros begomovirus del NW en una localidad de SLP [320]. La variante aislada de TYLCV-IL contenía dos mutaciones notorias dentro de la IR [320]. La primera es una delección de 29 nt dentro del promotor de C1 y la segunda una duplicación de 42 nt que incluye una copia del CLE [320], presente en el promotor de los genes tardíos [111,302]. Solo la primera mutación se ha reportado en otros aislados de TYLCV-IL en el continente americano. Estos cambios dentro de la IR podrían cambiar la actividad de los promotores que gobiernan la expresión del gen C1 y V1/V2. Construcciones que contenían la IR de TYLCV-IL[SLP] en las dos orientaciones posibles fusionadas con el gen reportero *UidA* fueron generadas para analizar esta posibilidad. Como control, se realizaron las mismas construcciones con la IR de TYLCV-IL[Sin], una variante WT de TYLCV-IL que no presenta las mutaciones vistas en la variante de SLP.

Nuestros experimentos mostraron que la delección de 29 nt en el promotor de C1 de TYLCV-IL[SLP] tuvo un efecto negativo en su actividad al compararlo con la versión WT; por otra parte, los resultados muestran un comportamiento no esperado en el promotor de V1/V2 de esta mutante natural. Trabajos previos en begomovirus bipartitas han mostrado que las copias de dicho elemento promueven una expresión potenciada de manera aditiva [301,302,325]. En este trabajo, de forma similar a la observada en el BCTV/Svr, la duplicación natural de 42nt que incluye una copia del CLE en el promotor de V1 no potenció su actividad

[300], siendo esta última, similar en ambas variantes. Este es el primer trabajo que muestra la actividad del promotor de V1 de TYLCV-IL, en presencia y ausencia de AC2/C2. De forma similar a lo que reportaron Cazzonelli *et al.*, [301], la adición de AC2/C2 aumenta la fuerza del promotor de V1, pero esta es independiente de las copias de CLE. Los mismos resultados se observaron cuando las bacterias que contenían las construcciones fueron co-inoculadas junto con las que portaban al hemidímero del virus de TYLCV-IL.

El promotor de V1 de ambas variantes generó actividad en ausencia de AC2/C2, contrario a lo observado por Abu El-Heba *et al.*, 2015, donde dicho promotor de un aislado de Egipto de TYLCV no tuvo actividad en ninguna de las plantas donde fue probado, aunque ninguna de estas fue *N.benthamiana* [303].

En begomovirus monopartitas, C1 codifica para la proteína Rep; indispensable para el inicio de la RCR [64–66]. Al observar la diferencia en la actividad del promotor de C1 de TYLCV-IL[SLP] en comparación con la variante WT TYLCV-IL[*Sin*], la pregunta razonable fue si esta mutación afectaría los síntomas generados, y a su vez la acumulación viral durante la infección. Al infectar plantas de *N.benthamiana*, observamos que los síntomas de infección con TYLCV-IL[SLP] fueron retrasados con respecto a TYLCV-IL[*Sin*], siendo este último más agresivo que el primero en las etapas tempranas de la infección (10-14 dpi). Aunque después fueron prácticamente indistinguibles a los 21 dpi. Extractos de DNA a obtenidos los 14 dpi fueron usados para cuantificar la acumulación viral de ambas variantes, mediante qPCR. Los primers usados para detectar el genoma viral fueron los mismos para ambas variantes y como gen de referencia usamos el de la proteína F-BOX con los primers diseñados por Liu *et al.*, 2012 [326]. La acumulación viral en las plantas infectadas con TYLCV-IL[*Sin*] fue mayor que aquellas infectadas con TYLCV-IL[SLP], el análisis estadístico demostró que existe diferencia entre ambos grupos a los 14 dpi, pero no a los 21 dpi. Posiblemente, las diferencias en la carga viral son más notorias en las etapas más tempranas, al comienzo de la infección; es decir días previos a la aparición de los primeros síntomas.

La G-Box es un elemento presente en la mayoría de los begomovirus del Nuevo Mundo [306,310]. Este elemento conservado está ausente en la región que precede al elemento tallo-asa en los begomovirus del Viejo Mundo [310] aunque existe un elemento similar en el promotor de BV1 en begomovirus bipartitas del Viejo Mundo [73].

Al analizar la región perdida en TYLCV-IL[SLP] encontramos un arreglo conservado de 18 nt, en la mayoría (>190) de los begomovirus del OW. La secuencia consenso estricta sería “AATGGCATTATTGTAATT”.

Las bases de datos no mostraron ningún elemento relevante dentro de la región homóloga en TYLCV-IL[*Sin*], salvo por el putativo GT1CONSENSUS con la secuencia consenso “GRWAAW” en la parte final del putativo elemento AATGGCTATTTGGTAATT. GT1CONSENSUS es un elemento en cis que parece estar involucrado en la expresión de algunos genes inducidos por luz.

Aleem Ashraf *et al.*, 2014 y Zainul Khan *et al.*, 2015 identificaron dentro de la región homóloga que perdió TYLCV-IL[SLP] elementos reguladores: Aleem Ashraf *et al.*, 2014 encontraron una putativa G-C BOX [109] y Zainul Khan *et al.*, 2015 una putativa G-BOX degenerada sobrepuesta a una E-BOX y el motivo ATATT [327]. Ambos trabajos caracterizaron promotores fuertes de la IR de begomovirus asociados al CLCuD. Es importante aclarar que algunos de los elementos reguladores putativos que se reportan en ambos trabajos solo se completan al agregar la secuencia del iterón.

Al analizar las secuencias de los begomovirus OW encontramos que dicha región perdida en TYLCV-IL[SLP] esta posicionalmente conservada en la mayoría de los begomovirus OW, siempre asociado al iterón más próximo a la estructura tallo-asa que se encuentra adyacente a la caja TATA. Por lo que en conjunto lo hemos nombrado como ASAI (Activator Sequence Associated to the Iteron).

Debido a su longitud, podemos especular que posiblemente es un elemento compuesto, esto es, que es reconocido por dos o más factores transcripcionales. Es posible que su actividad y función pueda variar dependiendo del contexto del

promotor. Sin embargo, los resultados mostrados en este trabajo parecen indicar que el ASAI es importante para la actividad del promotor C1, similar pero no idéntica a la G-BOX en los begomovirus NW. Aunque no es necesario para la replicación ni generación de síntomas en el caso de TYLCV-IL.

## **Conclusiones**

El ASAI es un elemento posiblemente compuesto de 18 nt conservado en la mayoría de los begomovirus OW pero no está presente en ninguno del NW. Esta secuencia de 18 nt se encuentra localizada río arriba del iterón más próximo a la estructura tallo-asa asociado a la TATA Box. En TYLCV, es un elemento regulador positivo para el promotor Rep, que alberga tres segmentos de 6 nt de longitud, siendo el primero el más conservado. El promotor de V1 TYLCV-IL[SLP], en comparación con su homólogo de TYLCV-IL[*Sin*] no se vio afectado por la duplicación del segmento de 42 nt que incluye un CLE asociado a una G-BOX. Al igual que otros begomovirus, la presencia de TrAP (durante la infección por un begomovirus o expresada desde un vector) potencio la actividad de dicho promotor. El número de copias de CLE no tuvo repercusión en esta actividad.

## **Perspectivas a futuro**

Podría analizarse si TYLCV-IL[SLP] puede mantenerse en co-infección con TYLCV-IL[*Sin*], o si TYLCV-IL[SLP] revierte su delección en presencia de la versión WT. Podría analizarse si esta región permite mutaciones en las partes más conservadas y analizar en mutantes donde se elimine la región rica en TA.

## **Materiales y métodos**

### **Cuantificación de proteínas totales mediante Bradford**

Para generar la curva de estándar se hizo lo siguiente:

1. Al menos cuatro diluciones de BSA en el buffer de extracción de proteínas en concentraciones de 1.4-0.1mg. Estas diluciones serán nuestros puntos para la curva estándar.
2. Para preparar los estándares para su lectura en placa, se colocaron 5 µl de dilución en 250 µl de reactivo de Bradford (Sigma aldrich <sup>TM</sup>).



3. Posteriormente, se colocó la placa en el fluorómetro/espectrofotómetro Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader de BioTek™, se usó el filtro de 595 nm para la lectura de absorbancia para cada muestra estándar.
4. Las mediciones se hicieron por triplicado, la curva se repitió cada vez que se hiciera una lectura para un nuevo lote de extractos.
5. Para la medición de la concentración de proteínas, se hizo exactamente lo mismo que lo hecho con las diluciones estándar, con la excepción de que estas, de ser necesario se diluían si existía una sobresaturación en el lector. El resultado obtenido fue corregido con el factor de dilución

### **Cuantificación de la actividad enzimática de Gus mediante fluorimetría**

Para cuantificar la actividad enzimática de Gus (beta-glucuronidas, se realizó una curva estándar

1. Se hicieron diluciones seriadas del compuesto fluorescente 4-metilumbeliferona de sodio en concentraciones desde 100 nM a 0.006 nM.
2. Para preparar los estándares para su lectura en placa, se colocaron 20µl en 180µl de buffer stop (Carbonato de sodio 2M).
3. Posteriormente, se colocó la placa en el fluorómetro/espectrofotómetro Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader de BioTek™ para la medición de cada muestra estándar se usó el filtro de 360 nm para excitación y 450 nm para emisión.
4. Las mediciones se hicieron por triplicado, la curva se repitió cada vez que se hiciera una lectura para un nuevo lote de extractos.

Solo se aceptaron las curvas generadas con una  $R^2 > 95$ . La Figura X muestra una de las curvas estándar realizadas.

5. Para la medición de fluorescencia de extractos de proteínas, se hizo exactamente lo mismo que lo hecho con las diluciones estándar, con la excepción

de que estas, de ser necesario se diluían si existía una sobresaturación en el lector. Se corrige el resultado obtenido con el factor de dilución

### **Validación de primers**

Para validar los primers F-BoxFw/F-BoxRv se hicieron diluciones de DNA de *N.benthamiana* de 289 ng a 16 ng, mientras que para los primers TYL-120Fw/TYL-120Rv se hicieron diluciones logarítmicas desde  $10^6$ - $10^4$  copias de DNA viral de TYLCV. Las secuencias de los primers mencionados pueden encontrarse en el apartado de anexos.

Las reacciones se hicieron de la siguiente manera:

Fast SYBR™ Green Master Mix Thermo Fisher Scientific™ Buffer: 5µl (2X),

Primer Fw: 0.3 µl (10pmol)

Primer Rv: 0.3 µl (10pmol)

H<sub>2</sub>O:3.4 µl.

DNA:1µl.

Volumen final 10 µl.

El programa de qPCR fue: 95°C/20 s, 40X(95°C/3s, 60°C/30s -hibridación y amplificación-).

Los puntos de cada curva se hicieron por tetraplicado, y se aceptaron las  $R^2 \geq 0.95$ , y eficiencias entre 90-110%

Las reacciones se hicieron en las mismas condiciones que en las reacciones usadas para las curvas, pero usando 40 ng de extracto total de DNA de planta.

## **Construcciones virales y promotores de TYLCV**

La clona pGTYLCV SA-Dímero fue amablemente proporcionada por el Doctor Méndez Lozano, dicha clona es un repetido en tándem del virus TYLCV-IL (No. de acceso: KU836749.1) clonado en *Bam*HI. Las clonas de los promotores fueron generadas amplificando las IR de cada variante de TYLCV con los primers V1XTYL y C1XTYL. El amplicón se clono en el sitio *Xba*I en pBI101. Las clonas se comprobaron por PCR y patrón de digestión.

### Capítulo III

#### **Desarrollo de un sistema de resistencia de amplio espectro contra begomovirus mediante CRISPR/Cas9.**

El género *Begomovirus* es el más extendido y numeroso dentro de la familia *Geminiviridae*. Las infecciones causadas por estos virus son una amenaza para la seguridad alimentaria, afectando cultivos en todo el mundo [27–29,52,55]. Diversos esfuerzos se han realizado para generar plantas resistentes a estos virus, desde los métodos convencionales, como la generación de híbridos mediante cruces, hasta el uso de las tecnologías del DNA recombinante como RNAi sintéticos con blanco a regiones del genoma viral o los sistemas de endonucleasas programables.

Los programas de cruzamiento han permitido encontrar genes para desarrollar plantas resistentes a TYLCD [229,242,244–246,249] y ACMD [328,329]. Aunque estas plantas pueden mostrar el fenotipo de resistencia en infecciones causadas por algunos begomovirus [330], la resistencia puede ser superada por la infección con otros begomovirus relacionados [331] o en infecciones mixtas [332].

Las plantas transgénicas resultan una opción prometedora para enfrentar las enfermedades causadas por begomovirus. Plantas que expresan RNAi con blanco a regiones del genoma de begomovirus han resultado exitosas contra infecciones producidas por los virus blanco [333–337]; no obstante debido a la alta tasa de mutación y capacidad de recombinación [104,277,338] aunada a la actividad de supresión de silenciamiento de algunas de las proteínas que los begomovirus codifican [77–80,85–87,99–101,114–116], la resistencia puede disminuir con el tiempo, lo cual disminuye el valor global de esta estrategia de control.

Por otra parte, se han desarrollado sistemas de endonucleasas programables. Al menos dos de estos sistemas se han usado para generar resistencia contra begomovirus, TALEN, ZFN y el sistema CRISPR/Cas9.

Las Transcription activator-like effector nucleases (TALEN) reconocen la secuencia blanco con un par de 16-18 módulos compuestos por 33-35 aa fusionados a una parte del dominio de endonucleasa de *FokI*. Dentro de cada módulo existen dos aa variables denominados Repeat-variable di-residues (RVD), que le permiten reconocer a un solo nucleótido [339,340].

En cambio para reconocer su secuencia blanco, las Zinc finger nucleases (ZFN) requieren de al menos un par de 3 módulos fusionados (9 nt) con una mitad del dominio de endonucleasa de *FokI*, cada módulo reconoce a tres nucleótidos [333].

En ambas endonucleasas programables, cada par debe flanquear el sitio de corte con una distancia de 12-20 pb, esto para permitir que el dominio de endonucleasa de *FokI* se regenere y pueda efectuar el corte en doble cadena [333,341].

Plantas transgénicas de *N.benthamiana* que expresan Transcription activator-like effectors (TALEs) artificiales con blanco a la IR y al gen AC1/C1 confirieron resistencia contra el begomovirus monopartita *Tobacco curly shoot virus* (TbCSV), incluso en presencia de su betasatélite [342]. Por otra parte ZFN dirigida contra una región conservada dentro del gen AC1/C1 logró reducir la carga viral de los begomovirus TbCSV y TYLCCnV en experimentos transitorios en *N.benthamiana* [343].

A diferencia de los sistemas anteriores, los cuales son dominios de unión fusionados a una endonucleasa modificada para generar un corte al DNA de manera independiente de secuencia; el sistema CRISPR/Cas es un conjunto de sistemas de inmunidad adaptativa molecular de procariontes contra virus y plásmidos invasores [344,345]. Actualmente, se reconocen 2 clases y 6 tipos de

CRISPR/Cas, dependiendo de su organización y la función de las proteínas Cas[345].

El sistema CRISPR/Cas9 de *Streptococcus pyogenes* se compone de solo dos elementos, la proteína Cas9 de esta bacteria (spCas9) y un RNA dual compuesto por dos RNAs, denominados CRISPR-RNA (crRNA) y Trans-activating CRISPR-RNA (tracrRNA). El primer transcrito, el cual es variable en su secuencia, es necesario para que spCas9 pueda identificar la secuencia blanco mediante complementariedad, mientras que el segundo tiene una función estructural que permite ser reconocido por spCas9 y activar su función de endonucleasa. En la naturaleza los crRNAs son sintetizados en un solo RNA, denominado precr-RNA, al cual se le unen copias del tracrRNA y luego son procesados por la RNAasa III generando el RNA dual funcional crRNA::tracrRNA. Por otro lado, de manera sintética se diseñó un RNA que cumple la función del RNA dual funcional, denominado single guide RNA (sgRNA). Para la edición de genomas solo se requiere uno o varios sgRNA(s) con blanco a una o varias secuencias que le darán especificidad a la nucleasa spCas9 [333,346]. El diseño de los sgRNAs requiere seleccionar una secuencia de 20 nucleótidos que se encuentre adyacente al Potospacer adjacent motif (PAM) [346], el cual varía dependiendo de la Cas usada [347]. Este requerimiento es la mayor limitante que tiene este sistema. El PAM reconocido por la spCas9 es “NGG” [333,346,348], es decir que la secuencia blanco debe tener en el 3' próximo un nucleótido seguido de dos guaninas. spCas9 se mantiene inactiva hasta que el sgRNA se incorpora y la estructura similar al tracr-RNA, es reconocida por la proteína, cambiando la conformación de esta última, formando y activando el sitio catalítico [349,350]. Una vez formado el complejo spCas9:sgRNA, este buscará en el DNA y en caso de existir un PAM, el sgRNA intentara formar un heterodúplex con el DNA y si tiene una secuencia complementaria de 20 nt, la Cas9 generará un corte en la doble cadena del DNA mediante los dominios HNH y RuvC [344,345,351], el primero cortando la cadena complementaria al sgRNA y el segundo a la cadena no complementaria [351]. El corte generado puede ser reparado por recombinación homóloga o recombinación

no homóloga, Este último puede usarse para generar inserciones, deleciones, inversiones e incluso codones de stop prematuros [333].

Esta capacidad de generar inserciones o deleciones (indels) en el DNA blanco ha sido aprovechada para intentar promover resistencia contra GVs, usando como secuencia blanco principalmente la IR y regiones conservadas del gen *AC1/C1*.

Los primeros trabajos mostraron que el sistema era capaz de reducir considerablemente la carga viral. Baltes *et al*; probaron 11 sgRNAs distintos con blanco a la IR y a C1 del mastrevirus *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV), seleccionando dos de esos sgRNAs como los más activos. Plantas transgénicas que expresaban Cas9 y un solo sgRNA fueron generadas y lograron reducir hasta 4 veces la carga viral [352]. En otro trabajo, publicado por Xiang Ji *et al*; diseñaron 43 sgRNAs seleccionados al azar dentro de tres regiones limitadas a 300 nt, dentro de la IR, y las regiones N-terminal de Rep y CP del genoma del curtovirus BCTV(Svr) [353]. Los sgRNAs se probaron mediante expresión transitoria en *N.benthamiana*, siendo agroinfiltrados (junto con Cas9 en el vector pHSN401) en hojas de distinta edad y dos días después inoculando a BCTV(Svr). En este experimento se redujo más del 90% de la carga viral a comparación del control. Al realizar el mismo experimento, pero en parches, es decir separando la ubicación donde se agroinfiltran el vector pHSN401:sgRNA del que contiene la construcción infectiva de BCTV(Svr), se observó una reducción de hasta un 70% de la carga viral en el área inoculada con pHSN401:sgRNA en comparación con pHSN401(solo Cas9). Se generaron transgénicas de *N.benthamiana* y *Arabidopsis thaliana*, la carga viral fue evaluada por Southern blot, con señal indetectable del genoma viral en algunas de estas plantas [353]. Zahir ali *et al.*; demostró mediante T7EI que un sgRNA contra la IR y otro contra una región conservada de Rep podría ser usado por Cas9 y generar cortes en el genoma de BCTV y TYLCV [354]. Esto permitió hipotetizar a Iqbal Z. *et al.*, la posibilidad de generar sgRNAs contra regiones conservadas de los begomovirus que causan la enfermedad del rizado del algodón (CLCuD) [272]. Mehta *et al.*, 2019 generaron plantas

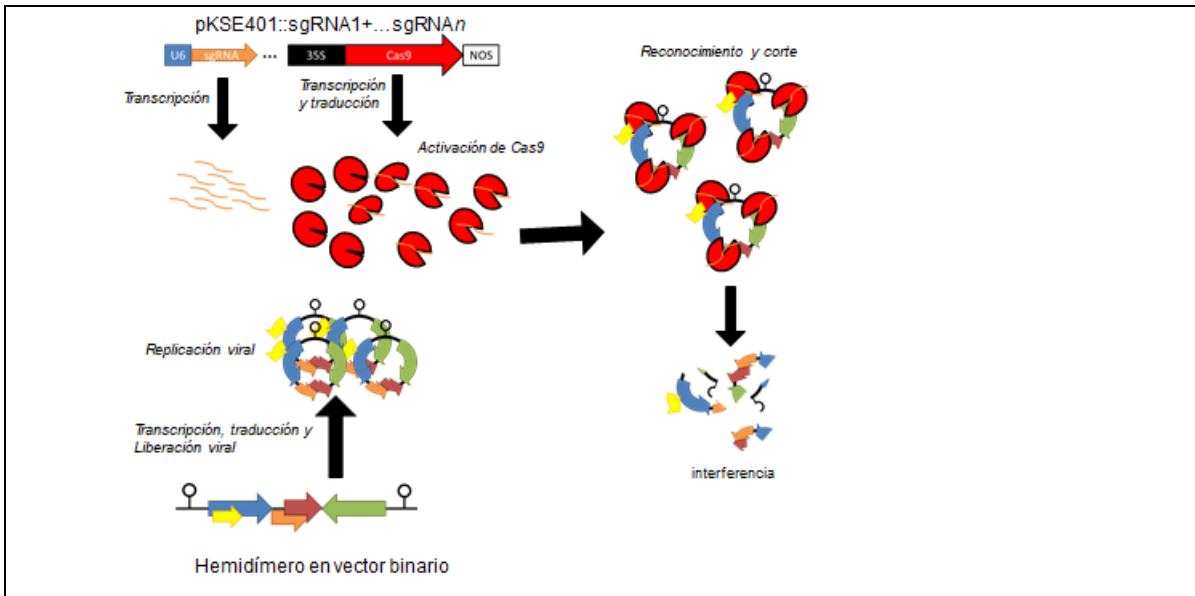
transgénicas que expresaban spCas9 y sgRNAs contra ACMV. Estos sgRNAs fueron seleccionados mediante un algoritmo y su actividad fue probada mediante T7EI. Sin embargo, al infectar estas plantas transgénicas con ACMV durante 3 y 8 semanas, variantes mutantes resistentes al corte generado por el complejo spCas9:sgRNA aparecieron en los tejidos nuevos, lo que provocó preocupación de que el sistema no fuera lo suficientemente efectivo para conferir resistencia y en el peor escenario generar variantes más patogénicas [355].

En una carta publicada en Nature Biotechnology por Edward P. Rybicki [356], se menciona que los resultados de ACMV en yuca reportados por Mehta *et al.*, [355], no pueden generalizarse a todos los begomovirus. Propuso para mejorar la estrategia de interferencia el uso de varios sgRNAs y probarlos de una manera rápida en experimentos transitorios, variando la proporción de *agrobacterium* a agroinfiltrar, pues quizás debido a la baja expresión de alguno de los componentes del sistema CRISPR/Cas9 no se logró la resistencia buscada [356]. Los últimos trabajos han demostrado obtener resistencia contra un solo geminivirus [357]. Roy *et al.*, 2019 mediante ensayos transitorios usando construcciones dúplex lograron la reducción casi completa de los síntomas en la combinación con blanco a las regiones superpuestas en C4/C1 y V1/V2, mientras que notaron síntomas menores en las combinaciones C4/C1 e IR y otro con dos sgRNAs con blanco a dos sitios dentro de la IR. Mediante el programa Tracking of Indels by Decomposition (TIDE) [358] no fueron capaces de encontrar versiones mutantes resistentes de *Chili leaf curl virus* (ChiLCV) [359].

En este trabajo se diseñaron 6 sgRNAs funcionales contra diversas regiones conservadas en el genoma de distintos begomovirus (Figura 18). Mediante T7EI se demostró que los sgRNAs son capaces de generar mutaciones en TYLCV, RhGMSV y PepGMV. Por último se realizaron retos de expresión transitoria en parche contra PepGMV. Los retos se hicieron en dos grupos: los sgRNAs con blanco al componente A y otro contra el componente B. En el primer grupo se obtuvo una reducción del 97% de la carga viral a comparación del



control. En el segundo aunque existe una tendencia de reducción en comparación del control, el análisis estadístico no mostró diferencia significativa.



**Figura 18 Estrategia general para conferir resistencia de amplio espectro a begomovirus en plantas.**

Construcciones generadas en el vector pKSE401 con secuencias que al ser transcritas se generan sgRNAs (flechas y líneas naranja, respectivamente) con blanco a distintas secuencias conservadas en el genoma del begomovirus. La proteína Cas9 (en rojo, codificada dentro del mismo vector bajo el promotor 35S) será activada y al interactuar con el sgRNA generará un corte en distintos sitios del componente viral, impidiendo su replicación y por lo tanto interfiriendo con la replicación y la infección resultante de ésta.

## **Objetivo**

Desarrollar un sistema de interferencia de la replicación de begomovirus mediante la herramienta CRISPR/Cas9. Usando como diana, las secuencias conservadas en distintos begomovirus. La capacidad de este sistema se evaluará mediante ensayo T7 y qPCR.

## **Resultados**

### **Diseño de los sgRNAs contra regiones conservadas de begomovirus.**

Con el propósito de redirigir el sistema CRISPR/Cas9 para desarrollar una estrategia de amplio espectro contra begomovirus (incluyendo en lo posible, a los del Viejo Mundo, pero priorizando a los del Nuevo Mundo), se alinearon los componentes completos de diversos begomovirus (Figura 19). Esto último con la intención de encontrar secuencias conservadas dentro de los ORFs de estos virus y en sus IRs.

Una vez localizadas las secuencias conservadas, se verificó que se encontraran adyacentes al triplete “NGG”, es decir el PAM reconocido por spCas9. Además, se consideró que al menos 12-17 nt se encontraran conservados a partir del PAM, pues es el número de nucleótidos mínimos que requiere el complejo spCas9:sgRNA para generar corte en doble cadena.

Con esta estrategia se redujo considerablemente el número de secuencias potenciales ser utilizadas como blanco para el sistema CRISPR/Cas9.

A diferencia de otros trabajos, el componente B fue analizado para encontrar secuencias conservadas. Lamentablemente, el componente B tiene menos regiones conservadas que cubrieran los criterios previamente establecidos en comparación al componente A.

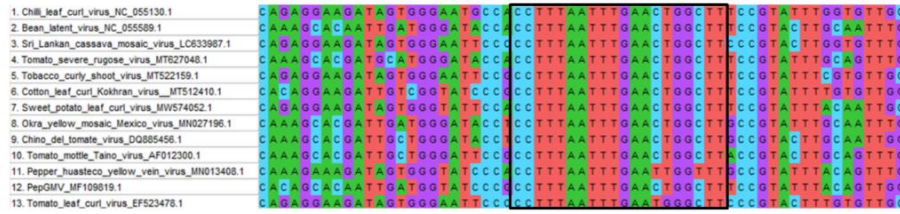
Las secuencias que cubrieron todos los criterios fueron analizadas usando diversos programas (ver materiales y métodos) que analizan la eficiencia putativa del sgRNA y la posibilidad de generar off-targets en contra del genoma de la planta (es decir, *N.benthamiana* y *S. lycopersicum*). Solo aquellos que representaran baja probabilidad de off-target (excluyendo aquellos con mismatch

en los nucleótidos adyacentes al PAM, o menos de 10 nt que hibridaran en dicha región) y tuvieran un score total  $\geq 90$  fueron seleccionados como secuencias para codificar sgRNAs en este trabajo.

Las secuencias elegidas se sintetizaron con adaptadores a los extremos para poder clonarlos en pKSE401 mediante el método Golden Gate (tabla 2) y generar las construcciones pKSE401::sgRNA.

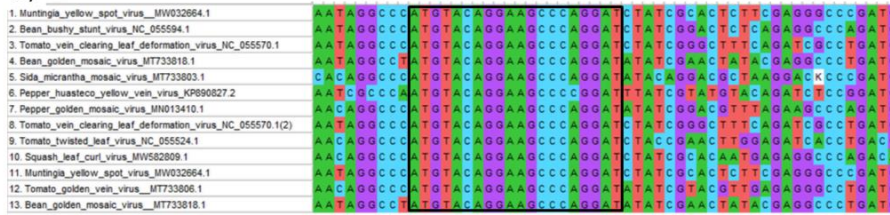
A)

CCNCCTTAATTGAAGTGCT



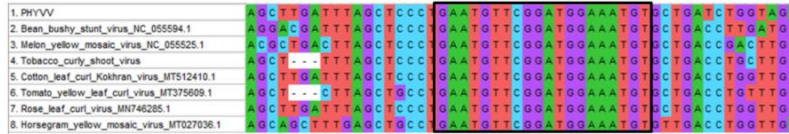
B)

CCNATGTACAGGAAGCCAGGAT



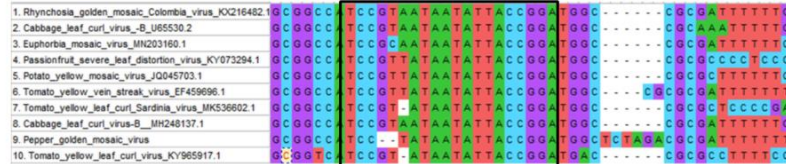
C)

CCNGAATGTTGGATGAAATGT



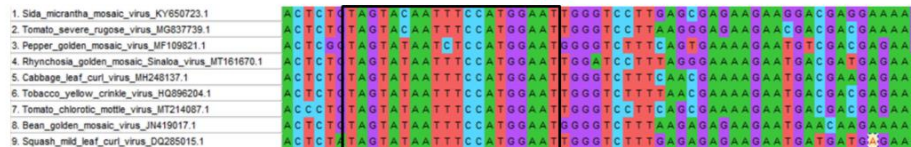
D)

TCCGTAATAATACC GGA NGG



E)

TAGTATAATCTCCATGGAAT NGG



F)

ATGCTGACGTGAACATGGAC NGG

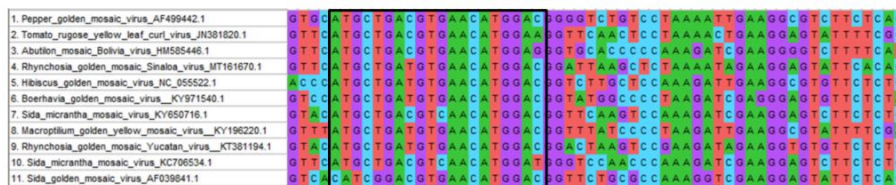


Figura 19 Alineamientos de distintos begomovirus y los sgRNAs diseñados con blanco a esas secuencias conservadas.

Las secuencias pertenecen a distintos begomovirus, los nombres de éstos, así como como sus números de acceso en el Genbank se encuentran en la columna de la izquierda. La secuencia blanco se muestra en negrita en la parte superior de cada alineamiento. A) Secuencia con blanco al gen Rep. B) Secuencia con blanco al gen AV1/V1. C) Secuencia con blanco al gen AC4/C4. D) Secuencia con blanco a la IR. E) Secuencia con blanco al gen BC1. F) Secuencia con blanco al gen BV1.

Todas las secuencias fueron analizadas *in silico* con el software CRISPOR. En todos los casos, el score fue mayor o igual a 90/100, indicando baja probabilidad de producir “off-targets”.

**Tabla 2 oligos usados para generar los casetes de sgRNA**

<b>Upper</b>	<b>Down</b>	<b>Blanco</b>
5'-attgTCCGTAATAATATTACCGGA-3'	5'-aaacTCCGGTAATATTATTACCGGA-3'	<b>IR</b>
5'-attgAAGCCAGTTCAAATTAAGG-3'	5'-aaacCCTTTAATTTGAACTGGCTT-3'	<b>Rep</b>
5'-attgATCCTGGGCTTCCTGTACAT-3'	5'-aaacATGTACAGGAAGCCCAGGAT-3'	<b>V1</b>
5'-attgACATTTCCATCCGAACATTC-3'	5'-aaacGAATGTTCCGGATGGAAATGT-3'	<b>C4</b>
5'-attgATGCTGACGTGAACATGGAC-3	5'-aaacGTCCATGTTACGTCAGCAT-3	<b>BV1</b>
5'-attgTAGTATAATCTCCATGGAAT-3	5'-aaacATTCCATGGAGATTATACTA-3	<b>BC1</b>

**Los ensayos de endonucleasa T7 demostraron que los sgRNAs diseñados pueden funcionar con distintos begomovirus.**

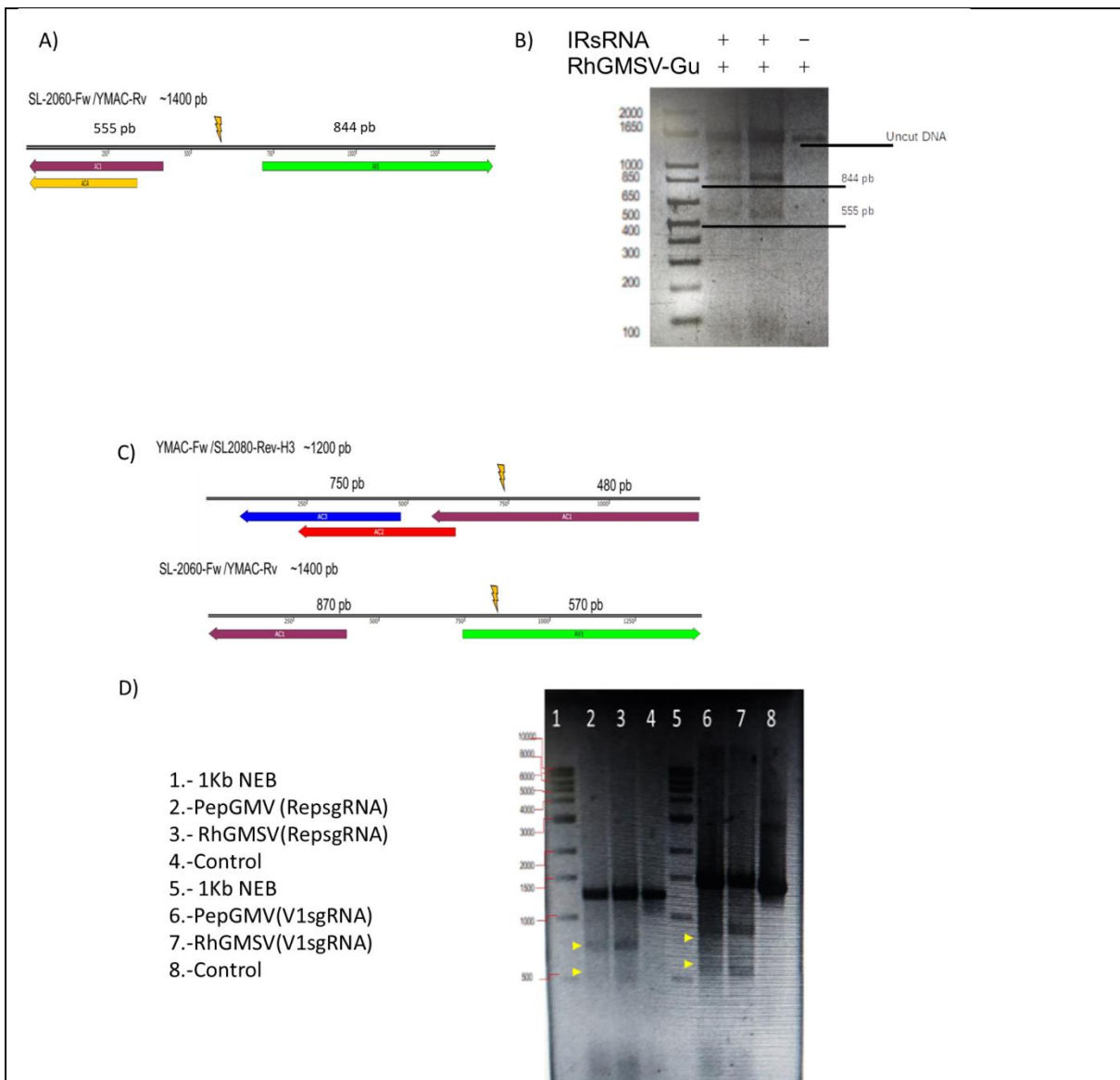
Para determinar si los sgRNAs diseñados eran capaces de generar mutaciones (indels) en el genoma de distintos begomovirus en los sitios blanco utilizamos el ensayo de T7EI.

Para este ensayo se co-inocularon mediante agroinfiltración plantas de *N.benthamiana* con las combinaciones de construcciones pBI::RhGUA1.4/pC1300::RhGUB1.8 o pC1300::Pep1.22A/pC1300::Pep1.32B, con pKSE401::V1sgRNA, pKSE401::IRsgRNA o pKSE401::RepsgRNA. Cuatro días posteriores a la agroinfiltración, se extrajo DNA total mediante el método de Dellaporta. Estos extractos fueron usados para el T7EI.

En el ensayo se amplifica una región donde se encuentre el sitio blanco de los sgRNAs experimentales. Posteriormente, el amplicón es desnaturalizado y re-hibridado (Figura 20A). En caso de existir mutantes en los sitios diana, se formarían regiones parcialmente hibridadas donde T7EI es capaz de generar el corte en cadena doble.

Utilizamos los primers SL-2060-Fw/YMAC-Rv para probar a V1sgRNA y YMAC-Fw/ SL2080-Rev-H3 para RepsgRNA. Ambos sgRNA fueron diseñados para generar cortes en distintos begomovirus (incluyendo los del Nuevo y Viejo Mundo), como se puede observar para RhGMSV-Guasave (Figura 20 A,B) y a PepGMV (Figura 20 C,D)



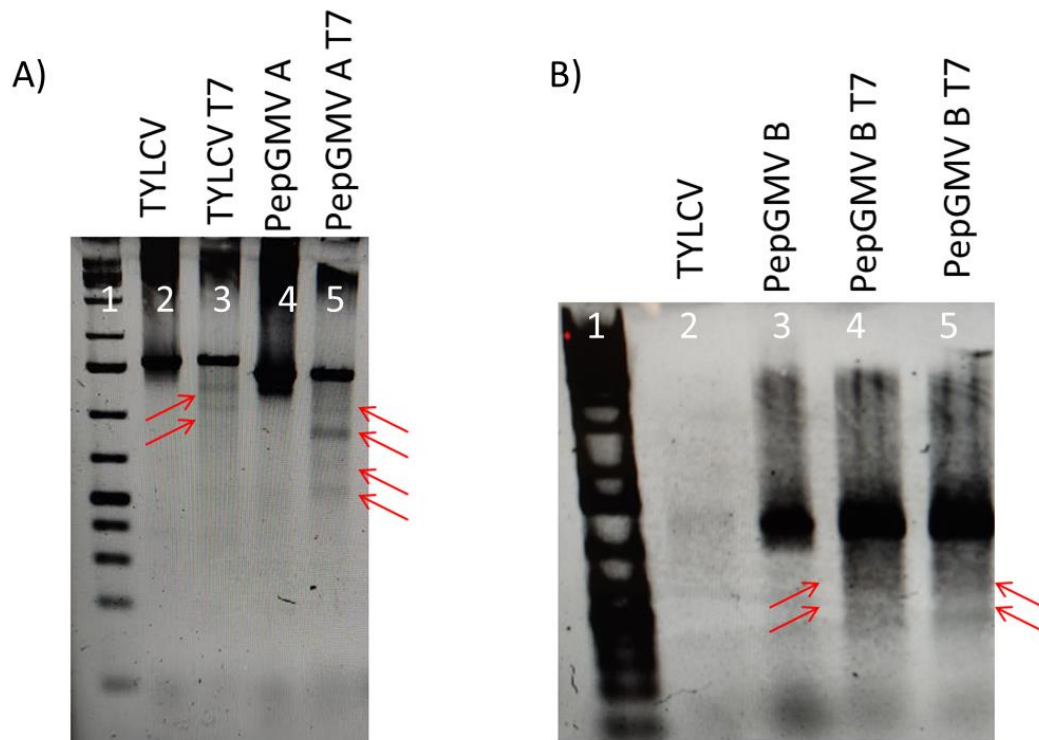


**Figura 20 Validación funcional de los sgRNAs contra distintos begomovirus mediante el ensayo de endonucleasa T7.** A) Diagrama del amplicón, se muestra el sitio donde el IRsgRNA hibridaría y el corte producido por spCas9 en RhGMSV-A. B) Ensayo de endonucleasa T7 con el IRsgRNA, gel de agarosa al 1.5% con las muestras tratadas con la endonucleasa T7 con el virus RhGMSV-A. “+” indica presencia y “-” ausencia. C) Diagramas de los amplicones generados de PepGMV y RhGMSV. (RepsgRNA superior y V1sgRNA inferior). D) Gel de agarosa al 1.5% con las muestras tratadas con la endonucleasa T7. Las flechas amarillas indican los fragmentos generados por la digestión. En la parte superior de cada diagrama se muestra la combinación de primers utilizada para cada amplicón, así como su tamaño y el tamaño aproximado de los fragmentos esperados. El rayo amarillo representa el sitio donde el sgRNA hibrida y Cas9 generaría el corte

Los sgRNAs que no generaban indels que pudieran ser detectados mediante este ensayo fueron descartados para posteriores experimentos (Ver anexos).

Posteriormente, se realizó un experimento similar usando una combinación de pKSE401::V1sgRNA y pKSE401::IR2sgRNA, todas estas con blanco al componente A de PepGMV y pKSE401::C4CsgRNA para el genoma de TYLCV-IL[SLP] (Figura 21 A), así como pKSE401::BV1sgRNA y pKSE401::BC1sgRNA contra el componente B de PepGMV (Figura 21 B). En cada caso se co-inocularon las plantas de *N.benthamiana* con las construcciones pC1300::Pep1.22A/pC1300::Pep1.32B y con pBI121::TYLCV-SLP1.75 para los experimentos contra el genoma de PepGMV y TYLCV, respectivamente. Cuatro días posteriores a la agroinfiltración, se extrajo DNA total mediante el método de Dellaporta. Los amplicones se obtuvieron usando las combinaciones Dgr-FW/YMAC-Rv, para TYLCV, SL-2060-Fw/YMAC-Rv, para el componente A de PepGMV, mientras que para el componente B se usaron los primers BV1-310For/BC1-80Rev.

La digestión se resolvió en un gel de agarosa al 1.5%, en ambos casos se generaron bandas de tamaño menor que el amplicón original, indicando que el complejo spCas9 y los distintos sgRNA generaron indels en los componentes virales.



**Figura 21 Validación de los sgRNAs contra TYLCV y el componente A y B de PepGMV mediante el ensayo de endonucleasa T7.**A) Gel de agarosa al 1.5% con las muestras tratadas y sin tratar con la endonucleasa T7. Se usó una mezcla de todos los sgRNAs con blanco al componente A (o al genoma de un begomovirus monopartita). Carriles: 1) Marcador de peso molecular. 2) Amplicón de TYLCV 3) Amplicón de TYLCV obtenido de un extracto de una planta experimental (todos los sgRNAs contra el genoma de TYLCV/DNA-A). 4) Amplicón de PepGMV 5) Amplicón de PepGMV obtenido de un extracto de una planta experimental (todos los sgRNAs contra el genoma de TYLCV/DNA-A). Los amplicones contiene el gen C4,V2 (solo en TYLCV), la IR y los genes incompletos de C1 y V1. B) Gel de agarosa al 1.5% con las muestras tratadas y sin tratar con la endonucleasa T7. Se usó una mezcla de todos los sgRNAs con blanco al componente B. Carriles: 1) Marcador de peso molecular. 2) Amplicón de TYLCV (igual que el gel A) 3) Amplicón de PepGMV 4) y 5) Amplicón de PepGMV obtenido de un extracto de una planta experimental (todos los sgRNAs contra el genoma de TYLCV/DNA-A). Los amplicones de PepGMV contienen la IR, y los genes parciales de BC1 y BV1. En ambos geles se usó el marcador de peso molecular Generuler™ 1kb plus DNA ladder, Thermo Fisher Scientific™.

## **Retos de PepGMV vs. sgRNAs con blanco a los componentes genómicos *in planta*.**

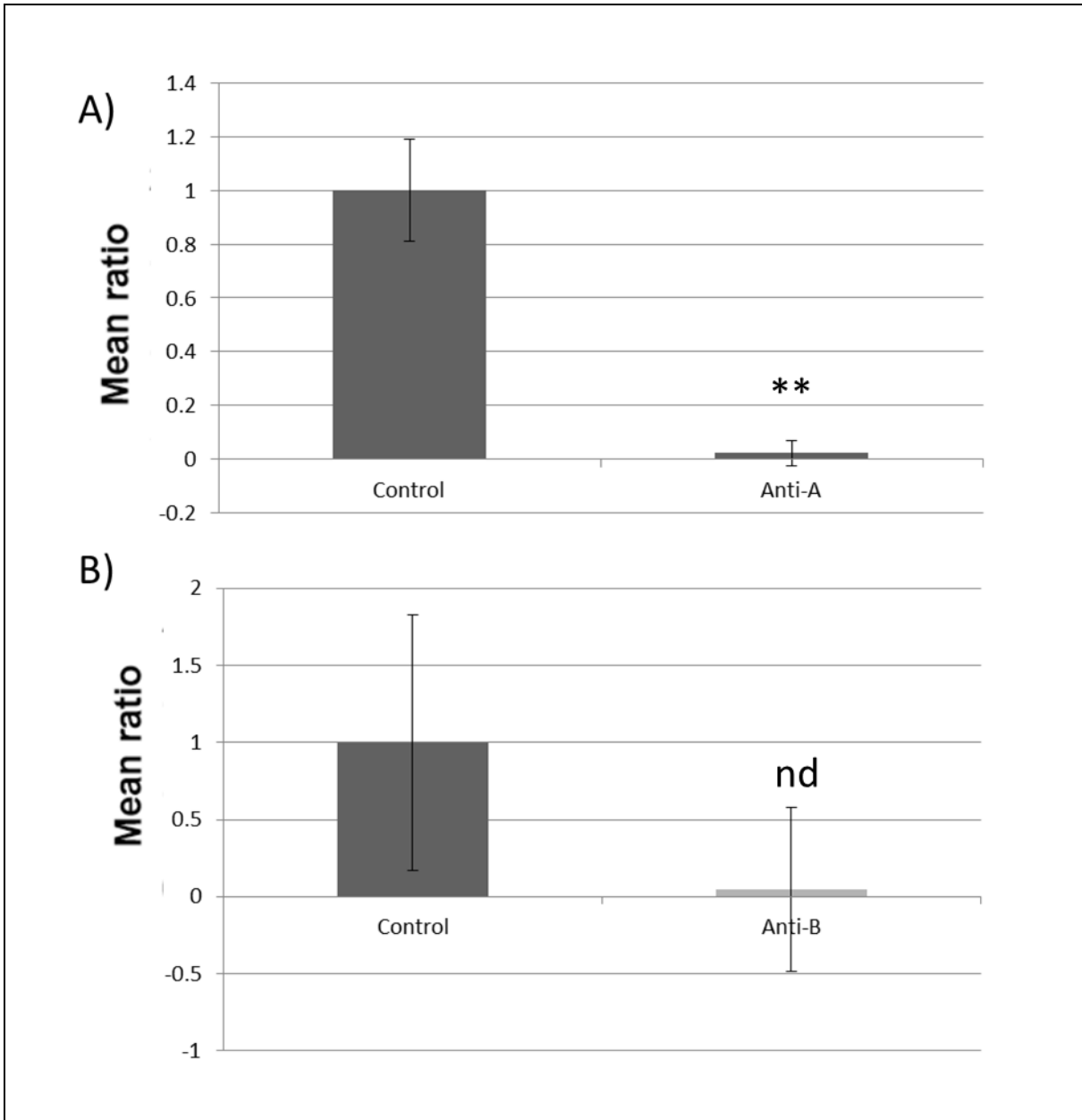
Para determinar la eficiencia de los sgRNAs en conjunto, es decir como multiplex, se mezclaron las células de *A. tumefaciens* transformadas que contenían las construcciones con spCas9 y los sgRNAs contra el componente A o el componente B.

Para determinar si los sgRNAs podían disminuir la carga viral *in planta* se inocularon hojas de plantas de *N.benthamiana* de 4 semanas de edad. La inoculación se hizo en parches como se describe en materiales y métodos. El DNA total de cada parche de hoja se extrajo 6 dpi usando el método Dellaporta, previamente mencionado. Es importante destacar que todas las plantas inoculadas generaron síntomas entre los 7-10 dpi.

El DNA total fue cuantificado usando el espectrofotómetro Nandodrop 2000. Todas las muestras fueron ajustadas a 40 ng/  $\mu$ l. Usando los primers qPGF y qPGR se cuantificó el DNA viral relativo en cada muestra mediante qPCR. La F-BOX se usó como gen de referencia de la planta.

En el caso de los sgRNAs contra el componente A, en conjunto lograron reducir ~9 veces la carga viral relativa en comparación con el control negativo, vector pKSE401 vacío (Figura 22 A). El análisis estadístico mediante t de student no pareada de dos caras resultó en un  $p=0.006$ .

Al contrario del resultado previamente mencionado, los sgRNAs contra el componente B, en conjunto no lograron reducir la carga viral relativa en comparación con el control (Figura 22 B)El análisis estadístico mediante t de student no pareada de dos caras resultó en un  $p=>0.5$ .



**Figura 22 Interferencia generada por los sgRNAs contra distintas regiones del genoma de PepGMV** A) Se muestra la media geométrica de la carga viral relativa de PepGMV en condiciones control (sin sgRNAs) y la experimental con sgRNAs con blanco al componente A. El análisis estadístico resultó con una  $p=0.006$ . B) Se muestra la media geométrica de la carga viral relativa de PepGMV en condiciones control (sin sgRNAs) y la experimental con sgRNAs con blanco al componente B, el análisis resultó no significativo  $p=\geq 0.5$ .

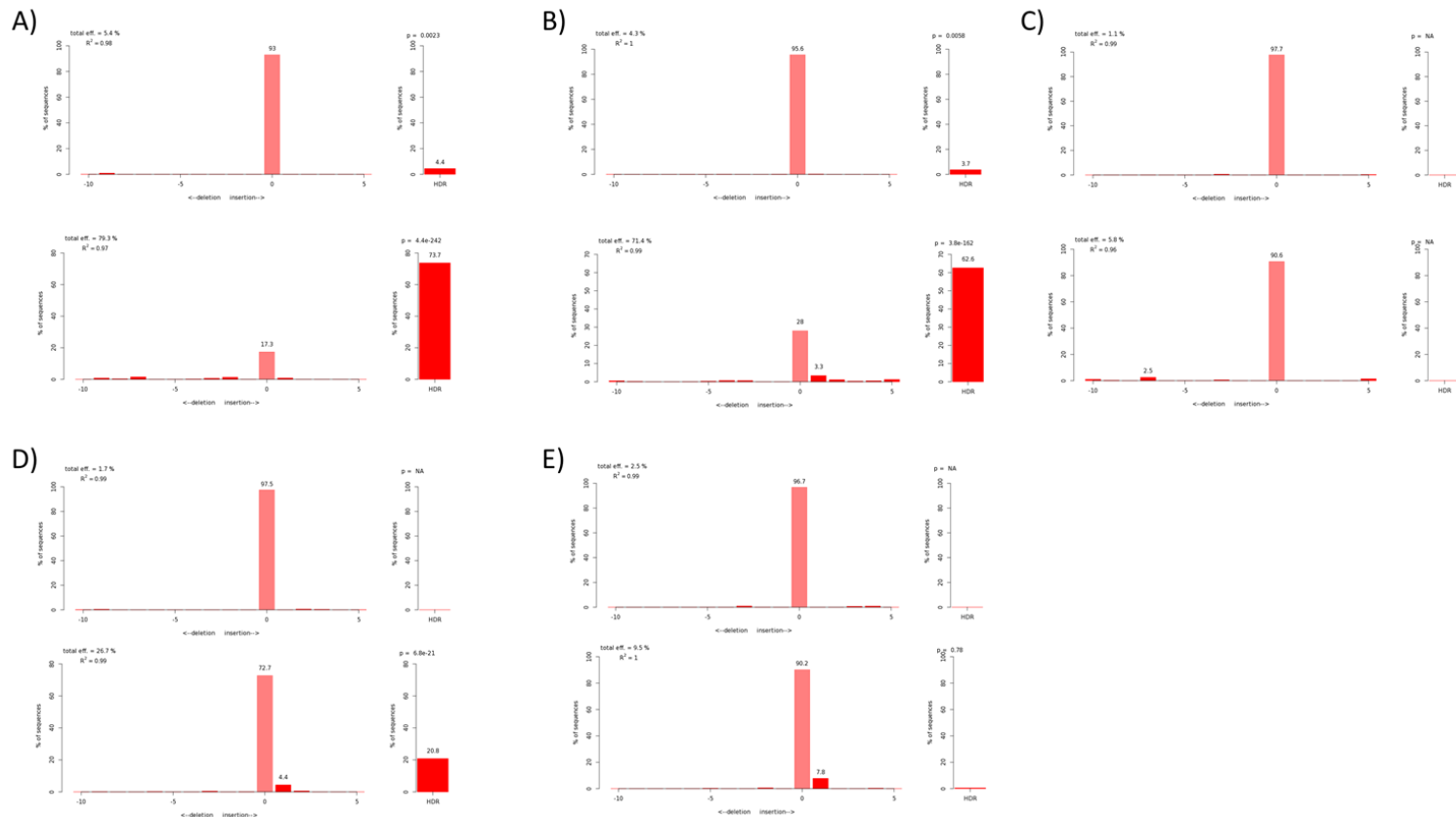
En ambos casos se realizó un análisis estadístico t-student no pareado de dos caras.

Las barras representan el error estándar.

Los cálculos se realizaron mediante el método de  $\Delta\Delta Ct$ .

## **Análisis TIDER (Tracking of Insertions, DEletions and Recombination events) demostró que los sgRNAs contra la IR y Rep son los más eficientes contra PepGMV**

Para determinar la eficiencia de edición por Cas9 y los sgRNAs diseñados contra PepGMV *in planta*, se optó por usar el software TIDER. TIDER es una versión modificada del programa TIDE, que permite usar los archivos .ab1 para analizar los posibles indels en la secuencia molde. El programa requiere estos archivos generados por secuenciación de Sanger de una muestra control, de referencia y experimental; además de la secuencia blanco del sgRNA. El programa analiza mediante una ventana de 20 nt alinea las secuencias en busca de indels dentro de dicha región. En seguida, se genera un histograma que muestra la frecuencia en porcentaje de cada secuencia analizada. Los extractos de DNA de los experimentos de qPCR fueron usados para amplificar mediante PCR convencional las regiones donde el complejo Cas9/sgRNA potencialmente generó cortes de doble cadena en el genoma viral. Los archivos .ab1 fueron cargados al programa TIDER con la respectiva secuencia blanco del sgRNA. Los resultados del análisis se muestran en la Figura 21. Los sgRNAs contra el componente A: IRsgRNA y RepsgRNA provocaron indels en >70% (Figura 23 A) y 60% (Figura 23 B) de las secuencias analizadas por TIDER, respectivamente. Por otra parte V1sgRNA no resultó tan eficiente para generar indels (Figura 23 C). La eficiencia de los sgRNAs contra el componente B: para BV1sgRNA >20% (Figura 23 D) pero para BC1sgRNA fue <10% (Figura 23 E), es decir menos eficientes para generar indels en comparación de IRsgRNA y RepsgRNA.



**Figura 23 Análisis TIDER para detectar la proporción de indels generados al genoma de PepGMV por el complejo Cas9/sgRNA.** Se muestran los resultados del espectro de indels obtenidos mediante el análisis por TIDER. En todos los casos en la parte superior se muestra el análisis de la muestra mock (solo pKSE401) y en la inferior el vector experimental que contiene el sgRNA. A) IRsgRNA eficiencia del 79.3%. B) RepsgRNA eficiencia del 71.4%. C) V1sgRNA eficiencia del 1.1%. D) BV1sgRNA eficiencia del 26.7% E) BC1sgRNA eficiencia del 9.5%. En todos los casos la R2 fue mayor a 0.95 y los valores de  $p$  significativos en donde se probaron las muestras experimentales.

## Discusión

En los últimos años desde su descubrimiento como sistema inmune adaptativo de procariontes y arqueas contra material genético exógeno, CRISPR/Cas ha sido adaptado para distintos propósitos. El más notorio es el de edición genética [350,354,360]. Debido a su simpleza en diseño, se volvió más popular que otras herramientas de edición genética, como las TALEN y las ZFN. El sistema CRISPR/Cas9, es a la fecha el más usado [361].

Entre los años 2015-2020, aprovechando la capacidad de endonucleasa programable de Cas9, Baltés *et al*; 2015 [352], Xiang Ji *et al*; 2015 [353], Zahir ali *et al*; 2015[354], Mehta *et al*; 2019 [355] y Roy *et al*; 2019 [359], desarrollaron trabajos donde se buscaba el uso de esta tecnología para conferir resistencia a GV's en plantas mediante la interferencia de la replicación de estos últimos. En todos ellos, los sgRNAs fueron diseñados contra un solo GV's o especies relacionadas, sin considerar lo conservada de la secuencia blanco entre otras especies de GV's. Un trabajo teórico propuso alinear las secuencias de los begomovirus y los satélites causantes del rizado foliar del algodón y recientemente se probó un sistema multiplex capaz de reducir la carga viral en plantas transgénicas de algodón. Experimentalmente solo dos trabajos a la fecha, Roy *et al*; 2019 [359] y Mubarik *et al*; 2021 [357] han usado un sistema multiplex, igualmente con buenos resultados en la reducción de carga viral, aunque enfocado a una sola especie o especies relacionadas como los CLCuV [357].

En este trabajo, se diseñaron sgRNAs con blanco a secuencias conservadas contra distintos begomovirus. Al igual que, Zahir ali *et al*; 2015[354], probamos mediante T7EI que los sgRNAs diseñados en este trabajo pueden hibridar en secuencias de distintos virus y propiciar indels mediante spCas9.

Los sgRNAs contra el componente A en conjunto lograron reducir la carga viral relativa ~9 veces en comparación con el control, un resultado similar al observado por Xiang Ji *et al*., 2015 en los experimentos de expresión transitoria de sgRNAs contra BCTV(Svr) [353]. Lo que indica que existe una reducción considerable del DNA-A. Lo contrario ocurrió con los sgRNAs contra el



componente B. No hubo diferencia en la carga viral en la región que contenía las construcciones experimentales con respecto al control. Este resultado podría explicarse por el hecho de que el componente B no codifica para proteínas necesarias para la replicación [13], por lo que si algunas moléculas logran escapar del complejo spCas9::sgRNA, estas aún podrían facilitar la infección sistémica.

A diferencia de Mubarik *et al*; 2021 [357], en este trabajo diseñamos los sgRNAs buscando secuencias conservadas mediante alineamientos de distintos genomas de begomovirus, tanto del NW como OW. Es destacable que los sgRNAs diseñados en el trabajo de Mubarik *et al*; 2021, son específicos para diversas variantes de especies de begomovirus causantes de la CLCD [357], e incluso potencialmente contra otros begomovirus presentes en india y china. Sin embargo, ninguno de estos sgRNAs parece hibridar con begomovirus del NW, aunque si con algunos aislados de TYLCV o *Watermelon chlorotic stunt virus* (WCSV), los dos únicos begomovirus del OW reportados en las américas [271]. Algunos de los sgRNAs presentados en este trabajo, potencialmente podrían hibridar y seguidamente junto con spCas9 interferir la replicación de *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMuV) y *Cotton leaf curl Burewala virus* (CLCuBuV) aunque no en CLCuKoV (ver anexos). Si bien es ampliamente aceptado que los begomovirus tienen un rango de hospederos limitado [23], existen reservorios virales en plantas silvestres [362–364] que pueden ser una fuente de variabilidad que den lugar a virus recombinantes resistentes a estos sgRNAs. Aunque los virus causantes CLCuD no han sido reportados en el continente americano, la capacidad de los sgRNAs desarrollados en este trabajo para conferir resistencia a infecciones causadas por estos begomovirus tendría que evaluarse experimentalmente.

Una de las preocupaciones que se han generado con esta tecnología es la aparición de variantes nuevas capaces de infectar a la planta hospedera pero resistentes mediante mutaciones que impiden la hibridación del sgRNA.

Los resultados generados por TIDER [365], demuestran que los sgRNAs contra la IR y la parte en la vecindad del promotor de AC2/C2 dentro de del gen

AC1/C1 son los más eficientes para generar indels en el DNA de PepGMV, ambos teniendo una eficiencia mayor al 70%. Según Brinkman *et al.*, 2017, TIDER logra detectar los efectos de indels generados por recombinación posteriores a la actividad de CRISPR/Cas9 de una manera similar a lo que podría detectarse mediante secuenciación masiva en líneas de células RPE y ES de humano y ratón, respectivamente [365]. Por lo que resulta confiable para nuestros propósitos.

## **Conclusiones**

En este trabajo se diseñaron 11 sgRNAs (ver anexos), de los cuales solo 6 mostraron actividad mediante el ensayo de endonucleasa T7.

La capacidad de los sgRNAs diseñados en este trabajo para guiar a spCas9 para cortar en doble cadena secuencias conservadas en begomovirus quedó demostrado en los ensayos de T7EI, que mostraron que se generaron indels en tres begomovirus distintos, TYLCV, RhGMSV y PepGMV.

Estos seis sgRNAs fueron usados en los experimentos posteriores y en el caso de tres de estos sgRNAs (aunque el análisis TIDER, indicaría que potencialmente solo los que tienen como blanco a la IR y una región dentro del gen *AC1*), diseñados contra el componente A, lograron reducir la carga viral de PepGMV en un 97% en comparación del control; no obstante, en el caso de la mezcla contra el componente B, dicho fenómeno no ocurre, y aunque se puede percibir una disminución en algunas plantas, el análisis estadístico demostró que esto no es significativo.

## **Perspectivas a futuro**

En un trabajo a futuro se podría analizar la capacidad de reducir la carga viral de cada sgRNA por separado, además de mezclar todos los sgRNAs contra el componente A y B, para corroborar si esto último podría generar sinergia para interferir con la replicación viral en coinfecciones de begomovirus. Softwares como CRISPR multitargeter puede ser usado para encontrar de manera más rápida regiones conservadas de ser potencialmente usadas como blanco para el

complejo spCas9:sgRNA entre distintos begomovirus. Sin embargo secuencias que pueden estar conservadas en ciertos subclados de este género podrían ser ignorados por el algoritmo durante el análisis, debido a que su conservación no se encuentra generalizada.

Una mejora que podría realizarse al sistema es generar una construcción que permitiera sintetizar en un solo RNA todos los sgRNAs separados por secuencias que codifiquen para tRNAs, estos serían procesados por la RNAasa III, evitando que los sgRNAs se expresen en distintas proporciones al encontrarse bajo un solo promotor.

Como se mencionó previamente, los resultados observados señalan una reducción considerable en los parches (zonas) de la hoja donde se agroinocularon las construcciones pKSE401::sgRNA contra el componente A; no obstante, estos datos no pueden demostrar que las plantas que expresan transitoriamente dichas construcciones sean resistentes a una infección con PepGMV. Aunque la generación de plantas transgénicas darían una evidencia sólida de la capacidad de estos sgRNAs, un ensayo agroinoculando en la base de la hoja las construcciones experimentales y posteriormente en el ápice las construcciones virales podrían darnos evidencia valiosa de la capacidad de generar resistencia.

Por último, puede usarse el programa TIDER como una opción más barata a la secuenciación masiva, tanto para verificar la eficiencia que el complejo spCas9 con los sgRNAs diseñados para generar indels como para detectar variantes mutantes que escapen al sistema CRISPR/Cas9 en hojas nuevas en plantas transgénicas.

## **Materiales y métodos**

### **Diseño de sgRNAs**

Para diseñar los sgRNAs se seleccionaron las secuencias de distintos begomovirus monopartitas y bipartitas. Cada marco abierto de lectura o región intergénica fueron alineadas usando Muscle. Se seleccionaron las secuencias conservadas de 17-20 nt que mantuvieran el motivo adyacente al protoespaciador “NGG”. Para reducir la probabilidad de que los sgRNAs preseleccionados promovieran la actividad de off-target las regiones con las secuencia blanco fueron introducidas en el programa CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>), usando los genes de referencia de *N.benthamiana* SolGenomics.net V1.01 (<https://solgenomics.net/>) y *S. lycopersicum* de Phytozome V9 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>). Solo se aceptaron los sgRNAs con un score mayor a 90 en los modelos de MIT [366] y CFD [367].

### **Generación de las clonas**

Para generar las construcciones para el sistema CRISPR fueron realizadas en el vector pKSE401 (Amablemente otorgado por el Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís). Todas las construcciones se realizaron generando casetes de 20 nt con 4nt salientes en cada extremo que son compatibles con los extremos cohesivos generados en el vector pKSE401 por la digestión con *Bsa*I. Se clonaron estos casetes mediante la técnica Golden Gate de la siguiente manera:

**1.-** Para generar los casetes se colocó una proporción igual de cada oligo (mínimo 0.5  $\mu$ M) en buffer de hibridación (tris-acetato 20 mM, acetato de potasio 50 mM, acetato de magnesio 10 mM) e incubados en un tubo para PCR. Posteriormente, estos se colocaron a 95°C durante 5 min en termociclador y se dejó a temperatura ambiente por al menos una hora.

**2.-** La reacción fue la Golden Gate siguiente en todos los casos: Cinco unidades de T4 ligasa (Thermo Fisher Scientific™). Cinco unidades de *Bsa*I (New England BioLabs™), 200 ng del vector pKSE401, y 20 ng de inserto. El buffer de ligasa de

(Thermo Fisher scientific™) se suplementó con ATP a una concentración final de 10 mM.

3.-La mezcla anterior se colocó en tubos de PCR de 200 µl. El programa del ensamblado por Golden Gate en termociclador fue el siguiente:

\*10 X (37°C X 5 min, seguido de 16°C X 5 min)

\*55°C X 10 min, 80°C X 10 min.

4.-Se utilizaron 5µl de reacción para transformar células competentes de *E. coli* Top10. Las células se distribuyeron en agar LB con Kanamicina a 50 µg/ml y se crecieron a 37°C por 16 h.

5.-Se hicieron minipreps de 5 colonias por caja. Mediante digestiones con HindIII se seleccionaron las transformantes.

En todos los casos al menos 9 colonias de 10 contenían el inserto.

El mapa general de las construcciones en pKSE401 se puede encontrar en el apartado de anexos.

### **Agroinfiltración en parche**

Se agroinfiltra el ápice de la cara abaxial la hoja con GV3101 transformadas con las clonas infectivas virales, mientras que en la base de la hoja se agroinfiltran las construcciones experimentales (pKSE401, conteniendo a spCas9::sgRNA) y el control (pKSE401, sólo con spCas9) separados por la nervadura central. Se colecto, por separado solo el tejido agroinfiltrado con las construcciones experimentales y el control, para su posterior procesamiento.

### **Ensayo de endonucleasa T7**

Se inocularon 3 plantas de *N.benthamiana* con una de las siguientes combinaciones de construcciones pC1300::Pep1.22A/pC1300::Pep1.32B, pBI::RhGUA1.4/ pC1300::RhGUB1.8 o pBI121::TYLCV-SLP1.75 mezcladas con las clonas de *Agrobacterium* con las construcciones experimentales

(pKSE401::sgRNA). Después de 96 horas se extrajo DNA total de las hojas inoculadas.

Para analizar la actividad de las construcciones experimentales: Usando los extractos mencionados anteriormente, se amplificó una región de aproximadamente ~1500 pb usando los primers SL-2060-Fw y YMAC-Rv conteniendo la región intergénica del virus y los ORF's parciales de AC1, AC4 y AV1, y PepGMV A. Para TYLCV-SLP, la misma región se utilizó Dgr-Fw y YMAC-Rv.

Se amplificó una región de aproximadamente 1400 pb. Dicho amplicón contiene los ORF's de AC2, AC3 y los ORFs parciales de AC1 y AV1. Los primers YMAC-Fw y SL2080-Rev-H3, para PepGMV. Para TYLCV-SLP se usó YMAC-Fw y RepDGR-Rv.

En ambos casos, para amplificar dichas regiones se utilizó la DNA polimerasa Phusion® High-Fidelity en el buffer Phusion HF buffer, siguiendo las instrucciones del fabricante en reacciones de 20 µl con una concentración de DNA de 80-100 ng por µl.

Se tomaron aproximadamente 400 ng de producto de PCR a un volumen final de 8.5 µl y fue sometido a un tratamiento de desnaturalización y se re-híbrido mediante el siguiente programa en termociclador:

- Desnaturalizado a 95°C por 5 min.
- Rampeo en decremento de 95°C a 85°C a una tasa de -2°C por s.
- Rampeo en decremento fue de 85°C a 25°C a una tasa de -0.1°C.
- (Hold) final a 4°C.

Se adiciono 1 µl de buffer 2 10X (New England biolabs™) y 5 unidades de T7 endonucleasa (New England biolabs™).

Se incubo durante 15 min a 37°C y se inactivo agregando 1 µl de EDTA a 0.5M pH 8.

Toda la reacción (10µl) se corrió en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE.

### **Análisis con el programa TIDER**

Para cuantificar la eficiencia de los sgRNAs probados *in planta*, se amplificaron las regiones blanco en el genoma de PepGMV. Para esto se amplificó la IR y parte de AV1 con TPEPIR/AV1FW y TPEPIR/AV1RV; parte de AC1 y AC2 con TPepAC1/AC2FW y TPepAC1/AC2RV; BC1 parcialmente con TPepBC1FW y TPepBC1RV; por último, el gen BV1 parcial con TPepBV1FW y TPepBV1RV. Esto se hizo con la construcción hemidimérica de PepGMV A y B (referencia) los extractos control (PepGMV Vs. pKSE401 vacío) y los extractos experimentales (PepGMV Vs. pKSE401::sgRNAs). Posteriormente, las reacciones de PCR fueron purificadas usando Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Start-Up Kit (Promega™) y secuenciadas en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA). Camino a la Presa San José 2055. Col. Lomas 4 sección CP. 78216. San Luis Potosí S.L.P. Los archivos .ab1 fueron cargados, junto con la secuencia blanco en el programa TIDER (<http://shinyapps.datacurators.nl/tider/>), usando los parámetros por default. Las secuencias de los primers pueden encontrarse en anexos.

### **Referencias**

1. Malathi, V.G.; Renuka Devi, P. ssDNA viruses: key players in global virome. *VirusDisease* **2019**, *30*, 3–12.
2. Bellas, C.M.; Sommaruga, R. Polinton-like viruses are abundant in aquatic ecosystems. *Microbiome* **2021**, *9*, 13.
3. Kraberger, S.; Cook, C.N.; Schmidlin, K.; Fontenele, R.S.; Bautista, J.; Smith, B.; Varsani, A. Diverse single-stranded DNA viruses associated with honey bees (*Apis mellifera*). *Infect. Genet. Evol.* **2019**, *71*, 179–188.
4. Zhao, L.; Rosario, K.; Breitbart, M.; Duffy, S. Eukaryotic Circular Rep-Encoding Single-Stranded DNA (CRESS DNA) Viruses: Ubiquitous Viruses With Small Genomes and a Diverse Host Range. In *Advances in Virus Research*; 2019; pp. 71–133 ISBN 9780128177228.
5. Paim, W.P.; Maggioli, M.F.; Weber, M.N.; Rezabek, G.; Narayanan, S.; Ramachandran, A.;

- Canal, C.W.; Bauermann, F. V. Virome characterization in serum of healthy show pigs raised in Oklahoma demonstrated great diversity of ssDNA viruses. *Virology* **2021**, *556*, 87–95.
6. Labonté, J.M.; Suttle, C.A. Previously unknown and highly divergent ssDNA viruses populate the oceans. *ISME J.* **2013**, *7*, 2169–2177.
  7. Ng, T.F.F.; Wheeler, E.; Greig, D.; Waltzek, T.B.; Gulland, F.; Breitbart, M. Metagenomic identification of a novel anellovirus in Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsii*) lung samples and its detection in samples from multiple years. *J. Gen. Virol.* **2011**, *92*, 1318–1323.
  8. Rosario, K.; Duffy, S.; Breitbart, M. Diverse circovirus-like genome architectures revealed by environmental metagenomics. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 2418–2424.
  9. Saunders, K.; Bedford, I.D.; Yahara, T.; Stanley, J. The earliest recorded plant virus disease. *Nature* **2003**, *422*, 831–831.
  10. Krupovic, M.; Varsani, A.; Kazlauskas, D.; Breitbart, M.; Delwart, E.; Rosario, K.; Yutin, N.; Wolf, Y.I.; Harrach, B.; Zerbini, F.M.; et al. Cressdnaviricota : a Virus Phylum Unifying Seven Families of Rep-Encoding Viruses with Single-Stranded, Circular DNA Genomes. *J. Virol.* **2020**, *94*.
  11. Gallet, R.; Kraberger, S.; Filloux, D.; Galzi, S.; Fontes, H.; Martin, D.P.; Varsani, A.; Roumagnac, P. Nanovirus-alphasatellite complex identified in *Vicia cracca* in the Rhône delta region of France. *Arch. Virol.* **2018**, *163*, 695–700.
  12. Krupovic, M.; Koonin, E. V. Evolution of eukaryotic single-stranded DNA viruses of the Bidnaviridae family from genes of four other groups of widely different viruses. *Sci. Rep.* **2015**, *4*, 5347.
  13. Zerbini, F.M.; Briddon, R.W.; Idris, A.; Martin, D.P.; Moriones, E.; Navas-Castillo, J.; Rivera-Bustamante, R.; Roumagnac, P.; Varsani, A. ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98*, 131–133.
  14. Campos-Olivas, R.; Louis, J.M.; Clerot, D.; Gronenborn, B.; Gronenborn, A.M.; Clérot, D.; Gronenborn, B.; Gronenborn, A.M. The structure of a replication initiator unites diverse aspects of nucleic acid metabolism. **2002**, *99*, 10310–10315.
  15. Dayaram, A.; Goldstien, S.; Argüello-Astorga, G.R.; Zawar-Reza, P.; Gomez, C.; Harding, J.S.; Varsani, A. Diverse small circular DNA viruses circulating amongst estuarine molluscs. *Infect. Genet. Evol.* **2015**, *31*, 284–295.
  16. Chatterji, A.; Padidam, M.; Beachy, R.N.; Fauquet, C.M. Identification of Replication Specificity Determinants in Two Strains of Tomato Leaf Curl Virus from New Delhi. *J. Virol.* **1999**, *73*, 5481–5489.
  17. Londoño, A.; Riego-Ruiz, L.; Argüello-Astorga, G.R. DNA-binding specificity determinants of replication proteins encoded by eukaryotic ssDNA viruses are adjacent to widely separated RCR conserved motifs. *Arch. Virol.* **2010**, *155*, 1033–1046.
  18. Kazlauskas, D.; Varsani, A.; Koonin, E. V.; Krupovic, M. Multiple origins of prokaryotic and



- eukaryotic single-stranded DNA viruses from bacterial and archaeal plasmids. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3425.
19. Navas-Castillo, J.; Fiallo-Olivé, E. Geminiviruses (Geminiviridae). In *Encyclopedia of Virology*; Elsevier, 2021; pp. 411–419 ISBN 9780128096338.
  20. Malik, P.S.; Kumar, V.; Bagewadi, B.; Mukherjee, S.K. Interaction between coat protein and replication initiation protein of Mung bean yellow mosaic India virus might lead to control of viral DNA replication. *Virology* **2005**, *337*, 273–283.
  21. Wang, L.; Tan, H.; Wu, M.; Jimenez-Gongora, T.; Tan, L.; Lozano-Duran, R. Dynamic Virus-Dependent Subnuclear Localization of the Capsid Protein from a Geminivirus. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*.
  22. Hesketh, E.L.; Saunders, K.; Fisher, C.; Potze, J.; Stanley, J.; Lomonossoff, G.P.; Ranson, N.A. The 3.3 Å structure of a plant geminivirus using cryo-EM. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2369.
  23. Rojas, M.R.; Hagen, C.; Lucas, W.J.; Gilbertson, R.L. Exploiting Chinks in the Plant's Armor: Evolution and Emergence of Geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2005**, *43*, 361–394.
  24. Guerrero, J.; Regedanz, E.; Lu, L.; Ruan, J.; Bisaro, D.M.; Sunter, G. Manipulation of the Plant Host by the Geminivirus AC2/C2 Protein, a Central Player in the Infection Cycle. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*.
  25. Dietzgen, R.; Mann, K.; Johnson, K. Plant Virus–Insect Vector Interactions: Current and Potential Future Research Directions. *Viruses* **2016**, *8*, 303.
  26. Cantú-Iris, M.; Pastor-Palacios, G.; Mauricio-Castillo, J.A.; Bañuelos-Hernández, B.; Avalos-Calleros, J.A.; Juárez-Reyes, A.; Rivera-Bustamante, R.; Argüello-Astorga, G.R. Analysis of a new begomovirus unveils a composite element conserved in the CP gene promoters of several Geminiviridae genera: Clues to comprehend the complex regulation of late genes. *PLoS One* **2019**, *14*, e0210485.
  27. Inoue-Nagata, A.K.; Lima, M.F.; Gilbertson, R.L. A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Hortic. Bras.* **2016**, *34*, 8–18.
  28. Rojas, M.R.; Macedo, M.A.; Maliano, M.R.; Soto-Aguilar, M.; Souza, J.O.; Briddon, R.W.; Kenyon, L.; Rivera Bustamante, R.F.; Zerbini, F.M.; Adkins, S.; et al. World Management of Geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2018**, *56*, 637–677.
  29. Legg, J.P.; Owor, B.; Sseruwagi, P.; Ndunguru, J. Cassava Mosaic Virus Disease in East and Central Africa: Epidemiology and Management of A Regional Pandemic. In *Advances in Virus Research*; 2006; pp. 355–418 ISBN 0120398664.
  30. Senanayake, D.M.J.B.; Varma, A.; Mandal, B. Virus-vector Relationships, Host Range, Detection and Sequence Comparison of Chilli leaf curl virus Associated with an Epidemic of Leaf Curl Disease of Chilli in Jodhpur, India. *J. Phytopathol.* **2012**, *160*, 146–155.
  31. Martin, D.P.; Briddon, R.W.; Varsani, A. Recombination patterns in dicot-infecting mastreviruses mirror those found in monocot-infecting mastreviruses. *Arch. Virol.* **2011**,

156, 1463–1469.

32. Halley-Stott, R.P.; Tanzer, F.; Martin, D.P.; Rybicki, E.P. The complete nucleotide sequence of a mild strain of Bean yellow dwarf virus. *Arch. Virol.* **2007**, *152*, 1237–1240.
33. Nahid, N.; Amin, I.; Mansoor, S.; Rybicki, E.P.; van der Walt, E.; Briddon, R.W. Two dicot-infecting mastreviruses (family Geminiviridae) occur in Pakistan. *Arch. Virol.* **2008**, *153*, 1441–1451.
34. Pande, D.; Kraberger, S.; Lefeuvre, P.; Lett, J.-M.; Shepherd, D.N.; Varsani, A.; Martin, D.P. A novel maize-infecting mastrevirus from La Réunion Island. *Arch. Virol.* **2012**, *157*, 1617–1621.
35. Briddon, R.W.; Martin, D.P.; Owor, B.E.; Donaldson, L.; Markham, P.G.; Greber, R.S.; Varsani, A. A novel species of mastrevirus (family Geminiviridae) isolated from *Digitaria didactyla* grass from Australia. *Arch. Virol.* **2010**, *155*, 1529–1534.
36. Zhang, X.; Zhou, G.; Wang, X. Detection of wheat dwarf virus (WDV) in wheat and vector leafhopper (*Psammotettix alienus* Dahlb.) by real-time PCR. *J. Virol. Methods* **2010**, *169*, 416–419.
37. Kanakala, S.; Kuria, P. Chickpea chlorotic dwarf virus: An Emerging Monopartite Dicot Infecting Mastrevirus. *Viruses* **2018**, *11*, 5.
38. Boulton, M.I. Functions and interactions of mastrevirus gene products. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2002**, *60*, 243–255.
39. Liu, L.; Saunders, K.; Thomas, C.L.; Davies, J.W.; Stanley, J. Bean Yellow Dwarf Virus RepA, but Not Rep, Binds to Maize Retinoblastoma Protein, and the Virus Tolerates Mutations in the Consensus Binding Motif. *Virology* **1999**, *256*, 270–279.
40. Heyraud-Nitschke, F.; Schumacher, S.; Laufs, J.; Schaefer, S.; Schell, J.; Gronenborn, B. Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 910–916.
41. Luque, A.; Sanz-Burgos, A.P.; Ramirez-Parra, E.; Castellano, M.M.; Gutierrez, C. Interaction of Geminivirus Rep Protein with Replication Factor C and Its Potential Role during Geminivirus DNA Replication. *Virology* **2002**, *302*, 83–94.
42. Davies, J.W.; Boulton, M.I.; Liu, H. Maize streak virus coat protein binds single- and double-stranded DNA in vitro. *J. Gen. Virol.* **1997**, *78*, 1265–1270.
43. Liu, H.; Boulton, M.I.; Thomas, C.L.; Prior, D.A.M.; Oparka, K.J.; Davies, J.W. Maize Streak Virus Coat Protein Is Karyophyllic and Facilitates Nuclear Transport of Viral DNA. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1999**, *12*, 894–900.
44. Mullineaux, P.M.; Donson, J.; Morris-Krsinich, B.A.; Boulton, M.I.; Davies, J.W. The nucleotide sequence of maize streak virus DNA. *EMBO J.* **1984**, *3*, 3063–3068.
45. Liu, H.; Boulton, M.I.; Oparka, K.J.; Davies, J.W. Interaction of the movement and coat proteins of Maize streak virus: implications for the transport of viral DNA. *J. Gen. Virol.*

**2001**, 82, 35–44.

46. Oyeniran, K.A.; Hartnady, P.; Claverie, S.; Lefeuvre, P.; Monjane, A.L.; Donaldson, L.; Lett, J.-M.; Varsani, A.; Martin, D.P. How virulent are emerging maize-infecting mastreviruses? *Arch. Virol.* **2021**, *166*, 955–959.
47. CHAPTER 16: Mastreviruses: Tropical and Temperate Leafhopper-Borne Geminiviruses. In *Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens*; Kvarnheden, A., Lett, J.-M., Peterschmitt, M., Eds.; The American Phytopathological Society, 2016; pp. 231–241.
48. Kraberger, S.; Thomas, J.E.; Geering, A.D.W.; Dayaram, A.; Stainton, D.; Hadfield, J.; Walters, M.; Parmenter, K.S.; van Brunschot, S.; Collings, D.A.; et al. Australian monocot-infecting mastrevirus diversity rivals that in Africa. *Virus Res.* **2012**, *169*, 127–136.
49. Fiallo-Olivé, E.; Navas-Castillo, J. Molecular and Biological Characterization of a New World Mono-/Bipartite Begomovirus/Deltasatellite Complex Infecting *Corchorus siliquosus*. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*.
50. Mugerwa, H.; Seal, S.; Wang, H.-L.; Patel, M. V.; Kabaalu, R.; Omongo, C.A.; Alicai, T.; Tairo, F.; Ndunguru, J.; Sseruwagi, P.; et al. African ancestry of New World, *Bemisia tabaci*-whitefly species. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2734.
51. Elfekih, S.; Etter, P.; Tay, W.T.; Fumagalli, M.; Gordon, K.; Johnson, E.; De Barro, P. Genome-wide analyses of the *Bemisia tabaci* species complex reveal contrasting patterns of admixture and complex demographic histories. *PLoS One* **2018**, *13*, e0190555.
52. Morales, F.J. Distribution and Dissemination of Begomoviruses in Latin America and the Caribbean. In *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*; Springer Netherlands: Dordrecht, 2009; pp. 283–318 ISBN 9789048124596.
53. Navas-Castillo, J.; Fiallo-Olivé, E.; Sánchez-Campos, S. Emerging Virus Diseases Transmitted by Whiteflies. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2011**, *49*, 219–248.
54. Kriticos, D.J.; De Barro, P.J.; Yonow, T.; Ota, N.; Sutherst, R.W. The potential geographical distribution and phenology of *Bemisia tabaci* Middle East/Asia Minor 1, considering irrigation and glasshouse production. *Bull. Entomol. Res.* **2020**, *110*, 567–576.
55. Melgarejo, T.A.; Kon, T.; Rojas, M.R.; Paz-Carrasco, L.; Zerbini, F.M.; Gilbertson, R.L. Characterization of a New World Monopartite Begomovirus Causing Leaf Curl Disease of Tomato in Ecuador and Peru Reveals a New Direction in Geminivirus Evolution. *J. Virol.* **2013**, *87*, 5397–5413.
56. Romay, G.; Geraud-Pouey, F.; Chirinos, D.T.; Mahillon, M.; Gillis, A.; Mahillon, J.; Bragard, C.; Romay, G.; Geraud-Pouey, F.; Chirinos, D.T.; et al. Tomato Twisted Leaf Virus: A Novel Indigenous New World Monopartite Begomovirus Infecting Tomato in Venezuela. *Viruses* **2019**, *11*, 327.
57. Nawaz-ul-Rehman, M.S.; Mansoor, S.; Briddon, R.W.; Fauquet, C.M. Maintenance of an Old World Betasatellite by a New World Helper Begomovirus and Possible Rapid Adaptation of the Betasatellite. *J. Virol.* **2009**, *83*, 9347–9355.

58. Briddon, R.W.; Stanley, J. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology* **2006**, *344*, 198–210.
59. Wasswa, P.; Otto, B.; Maruthi, M.N.; Mukasa, S.B.; Monger, W.; Gibson, R.W. First identification of a sweet potato begomovirus (sweepovirus) in Uganda: characterization, detection and distribution. *Plant Pathol.* **2011**, *60*, 1030–1039.
60. Trenado, H.P.; Orílio, A.F.; Márquez-Martín, B.; Moriones, E.; Navas-Castillo, J. Sweepviruses Cause Disease in Sweet Potato and Related Ipomoea spp.: Fulfilling Koch's Postulates for a Divergent Group in the Genus Begomovirus. *PLoS One* **2011**, *6*, e27329.
61. Ilyas, M.; Qazi, J.; Mansoor, S.; Briddon, R.W. Molecular characterisation and infectivity of a "Legumovirus" (genus Begomovirus: family Geminiviridae) infecting the leguminous weed *Rhynchosia minima* in Pakistan. *Virus Res.* **2009**.
62. Torres-Herrera, S.I.; Romero-Osorio, A.; Moreno-Valenzuela, O.; Pastor-Palacios, G.; Cardenas-Conejo, Y.; Ramírez-Prado, J.H.; Riego-Ruiz, L.; Minero-García, Y.; Ambriz-Granados, S.; Argüello-Astorga, G.R. A Lineage of Begomoviruses Encode Rep and AC4 Proteins of Enigmatic Ancestry: Hints on the Evolution of Geminiviruses in the New World. *Viruses* **2019**, *11*, 644.
63. Luna, A.P.; Romero-Rodríguez, B.; Rosas-Díaz, T.; Cerero, L.; Rodríguez-Negrete, E.A.; Castillo, A.G.; Bejarano, E.R. Characterization of Curtovirus V2 Protein, a Functional Homolog of Begomovirus V2. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*.
64. Laufs, J.; Traut, W.; Heyraud, F.; Matzeit, V.; Rogers, S.G.; Schell, J.; Gronenborn, B. In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 3879–3883.
65. Laufs, J.; Schumacher, S.; Geisler, N.; Jupin, I.; Gronenborn, B. Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. *FEBS Lett.* **1995**, *377*, 258–262.
66. Saunders, K.; Bedford, I.D.; Briddon, R.W.; Markham, P.G.; Wong, S.M.; Stanley, J. A unique virus complex causes *Ageratum* yellow vein disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 6890–6895.
67. Sanchez-Duran, M.A.; Dallas, M.B.; Ascencio-Ibanez, J.T.; Reyes, M.I.; Arroyo-Mateos, M.; Ruiz-Albert, J.; Hanley-Bowdoin, L.; Bejarano, E.R. Interaction between Geminivirus Replication Protein and the SUMO-Conjugating Enzyme Is Required for Viral Infection. *J. Virol.* **2011**, *85*, 9789–9800.
68. Orozco, B.M.; Hanley-Bowdoin, L. Conserved Sequence and Structural Motifs Contribute to the DNA Binding and Cleavage Activities of a Geminivirus Replication Protein. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 24448–24456.
69. Fondong, V.N. Geminivirus protein structure and function. *Mol. Plant Pathol.* **2013**, *14*, 635–649.
70. Arguello-Astorga, G.; Lopez-Ochoa, L.; Kong, L.-J.; Orozco, B.M.; Settlage, S.B.; Hanley-Bowdoin, L. A Novel Motif in Geminivirus Replication Proteins Interacts with the Plant Retinoblastoma-Related Protein. *J. Virol.* **2004**, *78*, 4817–4826.

71. Nash, T.E.; Dallas, M.B.; Reyes, M.I.; Buhrman, G.K.; Ascencio-Ibañez, J.T.; Hanley-Bowdoin, L. Functional Analysis of a Novel Motif Conserved across Geminivirus Rep Proteins. *J. Virol.* **2011**, *85*, 1182–1192.
72. Shimada-Beltrán, H.; Rivera-Bustamante, R.F. Early and late gene expression in pepper huasteco yellow vein virus. *J. Gen. Virol.* **2007**, *88*, 3145–3153.
73. Sun, R.; Han, J.; Zheng, L.; Qu, F. The AC2 Protein of a Bipartite Geminivirus Stimulates the Transcription of the BV1 Gene through Abscisic Acid Responsive Promoter Elements. *Viruses* **2020**, *12*, 1403.
74. MUBIN, M.; AMIN, I.; AMRAO, L.; BRIDDON, R.W.; MANSOOR, S. The hypersensitive response induced by the V2 protein of a monopartite begomovirus is countered by the C2 protein. *Mol. Plant Pathol.* **2010**, *11*, 245–254.
75. Rosas-Díaz, T.; Macho, A.; Beuzón, C.; Lozano-Durán, R.; Bejarano, E. The C2 Protein from the Geminivirus Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus Decreases Sensitivity to Jasmonates and Suppresses Jasmonate-Mediated Defences. *Plants* **2016**, *5*, 8.
76. Matic, S.; Pegoraro, M.; Noris, E. The C2 protein of tomato yellow leaf curl Sardinia virus acts as a pathogenicity determinant and a 16-amino acid domain is responsible for inducing a hypersensitive response in plants. *Virus Res.* **2016**, *215*, 12–19.
77. Castillo-González, C.; Liu, X.; Huang, C.; Zhao, C.; Ma, Z.; Hu, T.; Sun, F.; Zhou, Y.; Zhou, X.; Wang, X.-J.; et al. Geminivirus-encoded TrAP suppressor inhibits the histone methyltransferase SUVH4/KYP to counter host defense. *Elife* **2015**, *4*.
78. Dong, X.; van Wezel, R.; Stanley, J.; Hong, Y. Functional Characterization of the Nuclear Localization Signal for a Suppressor of Posttranscriptional Gene Silencing. *J. Virol.* **2003**, *77*, 7026–7033.
79. Buchmann, R.C.; Asad, S.; Wolf, J.N.; Mohannath, G.; Bisaro, D.M. Geminivirus AL2 and L2 Proteins Suppress Transcriptional Gene Silencing and Cause Genome-Wide Reductions in Cytosine Methylation. *J. Virol.* **2009**, *83*, 5005–5013.
80. Zrachya, A.; Glick, E.; Levy, Y.; Arazi, T.; Citovsky, V.; Gafni, Y. Suppressor of RNA silencing encoded by Tomato yellow leaf curl virus-Israel. *Virology* **2007**, *358*, 159–165.
81. Settlege, S.B.; See, R.G.; Hanley-Bowdoin, L. Geminivirus C3 Protein: Replication Enhancement and Protein Interactions. *J. Virol.* **2005**, *79*, 9885–9895.
82. Settlege, S.B.; Miller, A.B.; Hanley-Bowdoin, L. Interactions between geminivirus replication proteins. *J. Virol.* **1996**, *70*, 6790–5.
83. Luna, A.P.; Lozano-Durán, R. Geminivirus-Encoded Proteins: Not All Positional Homologs Are Made Equal. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*.
84. Deom, C.M.; Brewer, M.T.; Severns, P.M. Positive selection and intrinsic disorder are associated with multifunctional C4(AC4) proteins and geminivirus diversification. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 11150.

85. Dogra, S.C.; Eini, O.; Rezaian, M.A.; Randles, J.W. A novel shaggy-like kinase interacts with the tomato leaf curl virus pathogenicity determinant C4 protein. *Plant Mol. Biol.* **2009**.
86. Fondong, V.N.; Reddy, R.V.C.; Lu, C.; Hankoua, B.; Felton, C.; Czymmek, K.; Achenjang, F. The Consensus N -Myristoylation Motif of a Geminivirus AC4 Protein Is Required for Membrane Binding and Pathogenicity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2007**, *20*, 380–391.
87. Mei, Y.; Wang, Y.; Hu, T.; Yang, X.; Lozano-Duran, R.; Sunter, G.; Zhou, X. Nucleocytoplasmic Shuttling of Geminivirus C4 Protein Mediated by Phosphorylation and Myristoylation Is Critical for Viral Pathogenicity. *Mol. Plant* **2018**, *11*, 1466–1481.
88. Rojas, M.R.; Jiang, H.; Salati, R.; Xoconostle-Cázares, B.; Sudarshana, M.R.; Lucas, W.J.; Gilbertson, R.L. Functional Analysis of Proteins Involved in Movement of the Monopartite Begomovirus, Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *Virology* **2001**, *291*, 110–125.
89. Hak, H.; Levy, Y.; Chandran, S.A.; Belausov, E.; Loyter, A.; Lapidot, M.; Gafni, Y. TYLCV-Is movement in planta does not require V2 protein. *Virology* **2015**, *477*, 56–60.
90. Mei, Y.; Zhang, F.; Wang, M.; Li, F.; Wang, Y.; Zhou, X. Divergent Symptoms Caused by Geminivirus-Encoded C4 Proteins Correlate with Their Ability To Bind NbSK $\eta$ . *J. Virol.* **2020**, *94*.
91. Elmer, J.S.; Brand, L.; Sunter, G.; Gardiner, W.E.; Bisaro, D.M.; Rogers, S.G. Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 7043–7060.
92. Hoogstraten, R.A. Mutational Analysis of the Putative Nicking Motif in the Replication-Associated Protein (AC1) of Bean Golden Mosaic Geminivirus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1996**, *9*, 594.
93. Carrillo-Tripp, J.; Lozoya-Gloria, E.; Rivera-Bustamante, R.F. Symptom Remission and Specific Resistance of Pepper Plants After Infection by Pepper golden mosaic virus. *Phytopathology*® **2007**, *97*, 51–59.
94. Kunik, T.; Palanichelvam, K.; Czosnek, H.; Citovsky, V.; Gafni, Y. Nuclear import of the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in plant and insect cells. *Plant J.* **1998**, *13*, 393–399.
95. Qin, S.; Ward, B.M.; Lazarowitz, S.G. The Bipartite Geminivirus Coat Protein Aids BR1 Function in Viral Movement by Affecting the Accumulation of Viral Single-Stranded DNA. *J. Virol.* **1998**, *72*, 9247–9256.
96. Kunik, T.; Mizrachy, L.; Citovsky, V.; Gafni, Y. Characterization of a tomato karyopherin that interacts with the Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) capsid protein. *J. Exp. Bot.* **1999**, *50*, 731–732.
97. Kumar P., P.; Usha, R.; Zrachya, A.; Levy, Y.; Spanov, H.; Gafni, Y. Protein–protein interactions and nuclear trafficking of coat protein and  $\beta$ C1 protein associated with Bhendi yellow vein mosaic disease. *Virus Res.* **2006**, *122*, 127–136.
98. Guerra-Peraza, O.; Kirk, D.; Seltzer, V.; Veluthambi, K.; Schmit, A.C.; Hohn, T.; Herzog, E.

Coat proteins of Rice tungro bacilliform virus and Mungbean yellow mosaic virus contain multiple nuclear-localization signals and interact with importin  $\alpha$ . *J. Gen. Virol.* **2005**, *86*, 1815–1826.

99. Wang, B.; Yang, X.; Wang, Y.; Xie, Y.; Zhou, X. Tomato Yellow Leaf Curl Virus V2 Interacts with Host Histone Deacetylase 6 To Suppress Methylation-Mediated Transcriptional Gene Silencing in Plants. *J. Virol.* **2018**, *92*.
100. Sharma, P.; Ikegami, M. Tomato leaf curl Java virus V2 protein is a determinant of virulence, hypersensitive response and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Virology* **2010**, *396*, 85–93.
101. Sharma, P.; Ikegami, M.; Kon, T. Identification of the virulence factors and suppressors of posttranscriptional gene silencing encoded by Ageratum yellow vein virus, a monopartite begomovirus. *Virus Res.* **2010**, *149*, 19–27.
102. Zhang, S.C.; Wege, C.; Jeske, H. Movement Proteins (BC1 and BV1) of Abutilon Mosaic Geminivirus Are Cotransported in and between Cells of Sink but Not of Source Leaves as Detected by Green Fluorescent Protein Tagging. *Virology* **2001**, *290*, 249–260.
103. Briddon, R.W.; Patil, B.L.; Bagewadi, B.; Nawaz-ul-Rehman, M.; Fauquet, C.M. Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evol. Biol.* **2010**, *10*, 97.
104. Lima, A.T.M.; Silva, J.C.F.; Silva, F.N.; Castillo-Urquiza, G.P.; Silva, F.F.; Seah, Y.M.; Mizubuti, E.S.G.; Duffy, S.; Zerbini, F.M. The diversification of begomovirus populations is predominantly driven by mutational dynamics. *Virus Evol.* **2017**, *3*.
105. Yang, X.; Zhou, M.; Qian, Y.; Xie, Y.; Zhou, X. Molecular variability and evolution of a natural population of tomato yellow leaf curl virus in Shanghai, China. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2014**, *15*, 133–142.
106. Lefevre, P.; Lett, J.-M.; Varsani, A.; Martin, D.P. Widely Conserved Recombination Patterns among Single-Stranded DNA Viruses. *J. Virol.* **2009**, *83*, 2697–2707.
107. Borah, B.K.; Zarreen, F.; Baruah, G.; Dasgupta, I. Insights into the control of geminiviral promoters. *Virology* **2016**, *495*, 101–111.
108. Sunitha, S.; Mahajan, N.; Veluthambi, K. The TrAP/REn monodirectional promoter of Mungbean yellow mosaic geminivirus (MYMV) displays root-specific expression in transgenic tobacco. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **2012**, *109*, 535–545.
109. Ashraf, M.; Shahid, A.; Rao, A.; Bajwa, K.; Husnain, T. Functional Characterization of a Bidirectional Plant Promoter from Cotton Leaf Curl Burewala Virus Using an Agrobacterium-Mediated Transient Assay. *Viruses* **2014**, *6*, 223–242.
110. Ferro, C.G.; Zerbini, F.M.; Navas-Castillo, J.; Fiallo-Olivé, E. Revealing the Complexity of Sweepovirus-Deltasatellite-Plant Host Interactions: Expanded Natural and Experimental Helper Virus Range and Effect Dependence on Virus-Host Combination. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1018.

111. Argüello-Astorga, G.R.; Guevara-González, R.G.; Herrera-Estrella, L.R.; Rivera-Bustamante, R.F. Geminivirus Replication Origins Have a Group-Specific Organization of Iterative Elements: A Model for Replication. *Virology* **1994**, *203*, 90–100.
112. Xu, X.; Qian, Y.; Wang, Y.; Li, Z.; Zhou, X. Iterons Homologous to Helper Geminiviruses Are Essential for Efficient Replication of Betasatellites. *J. Virol.* **2018**, *93*.
113. Kumar, R.; Palicherla, S.R.; Mandal, B.; Kadiri, S. PCR based detection of betasatellite associated with the begomoviruses using improved universal primers. *Australas. Plant Pathol.* **2018**, *47*, 115–118.
114. Yang, X.; Xie, Y.; Raja, P.; Li, S.; Wolf, J.N.; Shen, Q.; Bisaro, D.M.; Zhou, X. Suppression of Methylation-Mediated Transcriptional Gene Silencing by  $\beta$ C1-SAHH Protein Interaction during Geminivirus-Betasatellite Infection. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002329.
115. Voorburg, C.M.; Yan, Z.; Bergua-Vidal, M.; Wolters, A.A.; Bai, Y.; Kormelink, R. Ty-1 , a universal resistance gene against geminiviruses that is compromised by co-replication of a betasatellite. *Mol. Plant Pathol.* **2020**, *21*, 160–172.
116. Saunders, K.; Norman, A.; Gucciardo, S.; Stanley, J. The DNA  $\beta$  satellite component associated with ageratum yellow vein disease encodes an essential pathogenicity protein ( $\beta$ C1). *Virology* **2004**, *324*, 37–47.
117. Fiallo-Olivé, E.; Tovar, R.; Navas-Castillo, J. Deciphering the biology of deltasatellites from the New World: maintenance by New World begomoviruses and whitefly transmission. *New Phytol.* **2016**.
118. Robles-Hernandez, L.; Gonzalez-Franco, A.C.; Gill-Langarica, E.M.; Sago, C.; Nikolaeva, O. V.; Karasev, A. V. First Report of Beet severe curly top virus in Jalapeño Pepper in Chihuahua, Mexico. *Plant Dis.* **2011**, *95*, 778–778.
119. Strausbaugh, C.A.; Wintermantel, W.M.; Gillen, A.M.; Eujayl, I.A. Curly Top Survey in the Western United States. *Phytopathology*® **2008**, *98*, 1212–1217.
120. Giladi, Y.; Hadad, L.; Luria, N.; Cranshaw, W.; Lachman, O.; Dombrovsky, A. First Report of Beet Curly Top Virus Infecting Cannabis sativa in Western Colorado. *Plant Dis.* **2020**, *104*, 999–999.
121. Rondon, S.I.; Roster, M.S.; Hamlin, L.L.; Green, K.J.; Karasev, A. V.; Crosslin, J.M. Characterization of Beet curly top virus Strains Circulating in Beet Leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae) in Northeastern Oregon. *Plant Dis.* **2016**, *100*, 1586–1590.
122. Swisher Grimm, K.D.; Crosslin, J.; Cooper, R.; Frost, K.; du Toit, L.J.; Wohleb, C.H. First Report of Curly Top of Coriandrum sativum Caused by Beet curly top virus in the Columbia Basin of Washington State. *Plant Dis.* **2021**, PDIS-01-21-0041-PDN.
123. CHAPTER 17: Transmission of Curtoviruses ( Beet curly top virus ) by the Beet Leafhopper ( Circulifer tenellus ). In *Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens*; Chen, L.-F., Gilbertson, R.L., Eds.; The American Phytopathological Society, 2016; pp. 243–262.
124. Creamer, R.; Hubble, H.; Lewis, A. Curtovirus Infection of Chile Pepper in New Mexico. *Plant*



*Dis.* **2005**, *89*, 480–486.

125. Luna, A.P.; Rodríguez-Negrete, E.A.; Morilla, G.; Wang, L.; Lozano-Durán, R.; Castillo, A.G.; Bejarano, E.R. V2 from a curtovirus is a suppressor of post-transcriptional gene silencing. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98*, 2607–2614.
126. Hormuzdi, S.G.; Bisaro, D.M. Genetic Analysis of Beet Curly Top Virus: Evidence for Three Virion Sense Genes Involved in Movement and Regulation of Single- and Double-Stranded DNA Levels. *Virology* **1993**, *193*, 900–909.
127. Sunter, G.; Sunter, J.L.; Bisaro, D.M. 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* **2001**, *285*, 59–70.
128. Raja, P.; Wolf, J.N.; Bisaro, D.M. RNA silencing directed against geminiviruses: Post-transcriptional and epigenetic components. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **2010**, *1799*, 337–351.
129. Caracuel, Z.; Lozano-Durán, R.; Huguet, S.; Arroyo-Mateos, M.; Rodríguez-Negrete, E.A.; Bejarano, E.R. C2 from Beet curly top virus promotes a cell environment suitable for efficient replication of geminiviruses, providing a novel mechanism of viral synergism. *New Phytol.* **2012**, *194*, 846–858.
130. Lam, N.; Creamer, R.; Rascon, J.; Belfon, R. Characterization of a new curtovirus, pepper yellow dwarf virus, from chile pepper and distribution in weed hosts in New Mexico. *Arch. Virol.* **2009**, *154*, 429–436.
131. Hormuzdi, S.G.; Bisaro, D.M. Genetic Analysis of Beet Curly Top Virus: Examination of the Roles of L2 and L3 Genes in Viral Pathogenesis. *Virology* **1995**, *206*, 1044–1054.
132. Hernandez, C.; Brown, J.K. First Report of a New Curtovirus Species, Spinach severe curly top virus, in Commercial Spinach Plants ( *Spinacia oleracea* ) from South-Central Arizona. *Plant Dis.* **2010**, *94*, 917–917.
133. Hernández-Zepeda, C.; Varsani, A.; Brown, J.K. Intergeneric recombination between a new, spinach-infecting curtovirus and a new geminivirus belonging to the genus Becurtovirus: first New World exemplar. *Arch. Virol.* **2013**, *158*, 2245–2254.
134. Varsani, A.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E.; Hernández-Zepeda, C.; Idris, A.; Brown, J.K.; Murilo Zerbini, F.; Martin, D.P. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. *Arch. Virol.* **2014**, *159*, 2193–2203.
135. Heydarnejad, J.; Keyvani, N.; Razavinejad, S.; Massumi, H.; Varsani, A. Fulfilling Koch's postulates for beet curly top Iran virus and proposal for consideration of new genus in the family Geminiviridae. *Arch. Virol.* **2013**, *158*, 435–443.
136. Claverie, S.; Bernardo, P.; Kraberger, S.; Hartnady, P.; Lefeuvre, P.; Lett, J.-M.; Galzi, S.; Filloux, D.; Harkins, G.W.; Varsani, A.; et al. From Spatial Metagenomics to Molecular Characterization of Plant Viruses: A Geminivirus Case Study. In *Advances in Virus Research*; 2018; pp. 55–83 ISBN 9780128144152.

137. Razavinejad, S.; Heydarnejad, J.; Kamali, M.; Massumi, H.; Kraberger, S.; Varsani, A. Genetic diversity and host range studies of turnip curly top virus. *Virus Genes* **2013**, *46*, 345–353.
138. Briddon, R.W.; Heydarnejad, J.; Khosrowfar, F.; Massumi, H.; Martin, D.P.; Varsani, A. Turnip curly top virus, a highly divergent geminivirus infecting turnip in Iran. *Virus Res.* **2010**, *152*, 169–175.
139. Hasanvand, V.; Kamali, M.; Heydarnejad, J.; Massumi, H.; Kvarnheden, A.; Varsani, A. Identification of a new turnicurtovirus in the leafhopper *Circulifer haematiceps* and the host plant species *Sesamum indicum*. *Virus Genes* **2018**, *54*, 840–845.
140. Varsani, A.; Roumagnac, P.; Fuchs, M.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E.; Idris, A.; Briddon, R.W.; Rivera-Bustamante, R.; Murilo Zerbini, F.; Martin, D.P. Capulavirus and Grablovirus: two new genera in the family Geminiviridae. *Arch. Virol.* **2017**, *162*, 1819–1831.
141. Bernardo, P.; Golden, M.; Akram, M.; Naimuddin; Nadarajan, N.; Fernandez, E.; Granier, M.; Rebelo, A.G.; Peterschmitt, M.; Martin, D.P.; et al. Identification and characterisation of a highly divergent geminivirus: Evolutionary and taxonomic implications. *Virus Res.* **2013**, *177*, 35–45.
142. Roumagnac, P.; Granier, M.; Bernardo, P.; Deshoux, M.; Ferdinand, R.; Galzi, S.; Fernandez, E.; Julian, C.; Abt, I.; Filloux, D.; et al. Alfalfa Leaf Curl Virus: an Aphid-Transmitted Geminivirus. *J. Virol.* **2015**, *89*, 9683–9688.
143. Ryckebusch, F.; Peterschmitt, M.; Granier, M.; Sauvion, N. Alfalfa leaf curl virus is efficiently acquired by its aphid vector *Aphis craccivora* but inefficiently transmitted. *J. Gen. Virol.* **2021**, *102*.
144. Susi, H.; Filloux, D.; Frilander, M.J.; Roumagnac, P.; Laine, A.-L. Diverse and variable virus communities in wild plant populations revealed by metagenomic tools. *PeerJ* **2019**, *7*, e6140.
145. Pereira, G.E.; Padhi, E.M.T.; Sudarshana, M.R.; Fialho, F.B.; Medina-Plaza, C.; Girardello, R.C.; Tseng, D.; Bruce, R.C.; Erdmann, J.N.; Slupsky, C.M.; et al. Impact of grapevine red blotch disease on primary and secondary metabolites in ‘Cabernet Sauvignon’ grape tissues. *Food Chem.* **2021**, *342*, 128312.
146. Vargas-Asencio, J.; Liou, H.; Perry, K.L.; Thompson, J.R. Evidence for the splicing of grablovirus transcripts reveals a putative novel open reading frame. *J. Gen. Virol.* **2019**, *100*, 709–720.
147. Al Rwahnih, M.; Alabi, O.J.; Westrick, N.M.; Golino, D. Prunus geminivirus A: A Novel Grablovirus Infecting Prunus spp. *Plant Dis.* **2018**, *102*, 1246–1253.
148. Perry, K.L.; McLane, H.; Thompson, J.R.; Fuchs, M. A novel grablovirus from non-cultivated grapevine (*Vitis* sp.) in North America. *Arch. Virol.* **2018**, *163*, 259–262.
149. Flasco, M.; Hoyle, V.; Cieniewicz, E.J.; Roy, B.G.; McLane, H.L.; Perry, K.L.; Loeb, G.; Nault, B.; Heck, M.; Fuchs, M. Grapevine Red Blotch Virus Is Transmitted by the Three-Cornered Alfalfa Hopper in a Circulative, Nonpropagative Mode with Unique Attributes. *Phytopathology*® **2021**, PHYTO-02-21-0061-R.

150. Briddon, R.W.; Bedford, I.D.; Tsai, J.H.; Markham, P.G. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. *Virology* **1996**, *219*, 387–94.
151. Briddon, R.W.; Markham, P.G. Complementation of bipartite begomovirus movement functions by topocuviruses and curtoviruses. *Arch. Virol.* **2001**, *146*, 1811–1819.
152. Sun, K.; Liang, Y.; Zhong, X.; Hu, X.; Zhang, P.; Yu, X. Nightshade Curly Top Virus: A Possible New Virus of the Genus Topocuvirus Infecting *Solanum nigrum* in China. *Plant Dis.* **2021**, *105*, 1006–1012.
153. Varsani, A.; Shepherd, D.N.; Dent, K.; Monjane, A.L.; Rybicki, E.P.; Martin, D.P. A highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. *Viol. J.* **2009**, *6*, 36.
154. Zhang, S.; Shen, P.; Li, M.; Tian, X.; Zhou, C.; Cao, M. Discovery of a novel geminivirus associated with camellia chlorotic dwarf disease. *Arch. Virol.* **2018**, *163*, 1709–1712.
155. Loconsole, G.; Saldarelli, P.; Doddapaneni, H.; Savino, V.; Martelli, G.P.; Saponari, M. Identification of a single-stranded DNA virus associated with citrus chlorotic dwarf disease, a new member in the family Geminiviridae. *Virology* **2012**, *432*, 162–172.
156. Qiu, Y.; Zhang, S.; Yu, H.; Xuan, Z.; Yang, L.; Zhan, B.; Murilo Zerbini, F.; Cao, M. Identification and Characterization of Two Novel Geminiviruses Associated with Paper Mulberry (*Broussonetia papyrifera*) Leaf Curl Disease. *Plant Dis.* **2020**, *104*, 3010–3018.
157. Fontenele, R.; Abreu, R.; Lamas, N.; Alves-Freitas, D.; Vidal, A.; Poppiel, R.; Melo, F.; Lacorte, C.; Martin, D.; Campos, M.; et al. Passion Fruit Chlorotic Mottle Virus: Molecular Characterization of a New Divergent Geminivirus in Brazil. *Viruses* **2018**, *10*, 169.
158. Lu, Q.-Y.; Yu, J.; Cheng, Y.-Y.; Sun, X.; Yang, L. V3 protein encoded by mulberry crinkle leaf virus acts as a pathogenicity determinant in *Nicotiana benthamiana*. *Eur. J. Plant Pathol.* **2020**, *157*, 141–149.
159. Lu, Q.-Y.; Ma, Y.; Smith, W.K.; Yu, J.; Cheng, Y.Y.; Zhang, P.; Han, T.T. The identification of *Tautoneura mori* as the vector of mulberry crinkle leaf virus and the infectivity of infectious clones in mulberry. *Phytopathology*® **2021**.
160. Zhan, B.; Zhao, W.; Li, S.; Yang, X.; Zhou, X. Functional Scanning of Apple Geminivirus Proteins as Symptom Determinants and Suppressors of Posttranscriptional Gene Silencing. *Viruses* **2018**, *10*, 488.
161. Sun, S.; Hu, Y.; Jiang, G.; Tian, Y.; Ding, M.; Yu, C.; Zhou, X.; Qian, Y. Molecular Characterization and Genomic Function of Grapevine Geminivirus A. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*.
162. Medina-Puche, L.; Tan, H.; Dogra, V.; Wu, M.; Rosas-Diaz, T.; Wang, L.; Ding, X.; Zhang, D.; Fu, X.; Kim, C.; et al. A Defense Pathway Linking Plasma Membrane and Chloroplasts and Co-opted by Pathogens. *Cell* **2020**, *182*, 1109-1124.e25.
163. Vaghi Medina, C.G.; Teppa, E.; Bornancini, V.A.; Flores, C.R.; Marino-Buslje, C.; Lambertini,

- P.M.L. Tomato apical leaf curl virus: A novel, monopartite geminivirus detected in tomatoes in Argentina. *Front. Microbiol.* **2018**.
164. Fontenele, R.S.; Lamas, N.S.; Lacorte, C.; Lacerda, A.L.M.; Varsani, A.; Ribeiro, S.G. A novel geminivirus identified in tomato and cleome plants sampled in Brazil. *Virus Res.* **2017**, *240*, 175–179.
  165. Fontenele, R.S.; Salywon, A.M.; Majure, L.C.; Cobb, I.N.; Bhaskara, A.; Avalos-Calleros, J.A.; Argüello-Astorga, G.R.; Schmidlin, K.; Khalifeh, A.; Smith, K.; et al. A Novel Divergent Geminivirus Identified in Asymptomatic New World Cactaceae Plants. *Viruses* **2020**, *12*, 398.
  166. Fontenele, R.S.; Salywon, A.M.; Majure, L.C.; Cobb, I.N.; Bhaskara, A.; Avalos-Calleros, J.A.; Argüello-Astorga, G.R.; Schmidlin, K.; Khalifeh, A.; Smith, K.; et al. New World Cactaceae Plants Harbor Diverse Geminiviruses. *Viruses* **2021**, *13*, 694.
  167. Pan, L.; Chen, Q.; Guo, T.; Wang, X.; Li, P.; Wang, X.; Liu, S. Differential efficiency of a begomovirus to cross the midgut of different species of whiteflies results in variation of virus transmission by the vectors. *Sci. China Life Sci.* **2018**, *61*, 1254–1265.
  168. Ghanim, M.; Rosell, R.C.; Campbell, L.R.; Czosnek, H.; Brown, J.K.; Ullman, D.E. Digestive, salivary, and reproductive organs of Bemisia tabaci (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) B type. *J. Morphol.* **2001**, *248*, 22–40.
  169. Wei, J.; Zhao, J.-J.; Zhang, T.; Li, F.-F.; Ghanim, M.; Zhou, X.-P.; Ye, G.-Y.; Liu, S.-S.; Wang, X.-W. Specific Cells in the Primary Salivary Glands of the Whitefly Bemisia tabaci Control Retention and Transmission of Begomoviruses. *J. Virol.* **2014**, *88*, 13460–13468.
  170. Unseld, S.; Höhnle, M.; Ringel, M.; Frischmuth, T. Subcellular Targeting of the Coat Protein of African Cassava Mosaic Geminivirus. *Virology* **2001**, *286*, 373–383.
  171. Deuschle, K.; Kepp, G.; Jeske, H. Differential methylation of the circular DNA in geminiviral minichromosomes. *Virology* **2016**, *499*, 243–258.
  172. Pilartz, M.; Jeske, H. Mapping of Abutilon Mosaic Geminivirus Minichromosomes. *J. Virol.* **2003**, *77*, 10808–10818.
  173. Hayes, R.J.; Macdonald, H.; Coutts, R.H.A.; Buck, K.W. Priming of Complementary DNA Synthesis in Vitro by Small DNA Molecules Tightly Bound to Virion DNA of Wheat Dwarf Virus. *J. Gen. Virol.* **1988**, *69*, 1345–1350.
  174. Donson, J.; Morris-Krsinich, B.A.; Mullineaux, P.M.; Boulton, M.I.; Davies, J.W. A putative primer for second-strand DNA synthesis of maize streak virus is virion-associated. *EMBO J.* **1984**, *3*, 3069–3073.
  175. Saunders, K.; Lucy, A.; Stanley, J. RNA-primed complementary-sense DNA synthesis of the geminivirus African cassava mosaic virus. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 6311–6315.
  176. Coursey, T.; Milutinovic, M.; Regedanz, E.; Brkljacic, J.; Bisaro, D.M. Arabidopsis Histone Reader EMSY-LIKE 1 Binds H3K36 and Suppresses Geminivirus Infection. *J. Virol.* **2018**, *92*.

177. Maio, F.; Arroyo-Mateos, M.; Bobay, B.G.; Bejarano, E.R.; Prins, M.; van den Burg, H.A. A Lysine Residue Essential for Geminivirus Replication Also Controls Nuclear Localization of the Tomato Yellow Leaf Curl Virus Rep Protein. *J. Virol.* **2019**, *93*.
178. Li, F.; Zhang, M.; Zhang, C.; Zhou, X. Nuclear autophagy degrades a geminivirus nuclear protein to restrict viral infection in solanaceous plants. *New Phytol.* **2020**, *225*, 1746–1761.
179. Nagar, S.; Pedersen, T.J.; Carrick, K.M.; Hanley-Bowdoin, L.; Robertson, D. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* **1995**, *7*, 705–719.
180. Ascencio-Ibáñez, J.T.; Sozzani, R.; Lee, T.J.; Chu, T.M.; Wolfinger, R.D.; Cella, R.; Hanley-Bowdoin, L. Global analysis of Arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiol.* **2008**, *148*, 436–454.
181. Desvoyes, B.; Ramirez-Parra, E.; Xie, Q.; Chua, N.H.; Gutierrez, C. Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during Arabidopsis leaf development. *Plant Physiol.* **2006**, *140*, 67–80.
182. Egelkrout, E.M. Proliferating Cell Nuclear Antigen Transcription Is Repressed through an E2F Consensus Element and Activated by Geminivirus Infection in Mature Leaves. *PLANT CELL ONLINE* **2001**, *13*, 1437–1452.
183. Argüello-Astorga, G.; Herrera-Estrella, L.; Rivera-Bustamante, R. Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Mol. Biol.* **2004**, *26*, 553–556.
184. Chakraborty, S.; Vanitharani, R.; Chattopadhyay, B.; Fauquet, C.M. Supervirulent pseudorecombination and asymmetric synergism between genomic components of two distinct species of begomovirus associated with severe tomato leaf curl disease in India. *J. Gen. Virol.* **2008**, *89*, 818–828.
185. Chandler, M.; De La Cruz, F.; Dyda, F.; Hickman, A.B.; Moncalian, G.; Ton-Hoang, B. Breaking and joining single-stranded DNA: the HUH endonuclease superfamily. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 525–538.
186. Wawrzyniak, P.; Płucienniczak, G.; Bartosik, D. The Different Faces of Rolling-Circle Replication and Its Multifunctional Initiator Proteins. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*.
187. Richter, K.S.; Götz, M.; Winter, S.; Jeske, H. The contribution of translesion synthesis polymerases on geminiviral replication. *Virology* **2016**, *488*, 137–148.
188. Ruhel, R.; Chakraborty, S. Multifunctional roles of geminivirus encoded replication initiator protein. *VirusDisease* **2019**, *30*, 66–73.
189. Pascal, E.; Sanderfoot, A.A.; Ward, B.M.; Medville, R.; Turgeon, R.; Lazarowitz, S.G. The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. *Plant Cell* **1994**, *6*, 995–1006.
190. Rojas, M.R.; Noueir, A.O.; Lucas, W.J.; Gilbertson, R.L. Bean Dwarf Mosaic Geminivirus

- Movement Proteins Recognize DNA in a Form- and Size-Specific Manner. *Cell* **1998**, *95*, 105–113.
191. Calil, I.P.; Quadros, I.P.S.; Araújo, T.C.; Duarte, C.E.M.; Gouveia-Mageste, B.C.; Silva, J.C.F.; Brustolini, O.J.B.; Teixeira, R.M.; Oliveira, C.N.; Milagres, R.W.M.M.; et al. A WW Domain-Containing Protein Forms Immune Nuclear Bodies against Begomoviruses. *Mol. Plant* **2018**, *11*, 1449–1465.
  192. Noueiry, A.O.; Lucas, W.J.; Gilbertson, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* **1994**, *76*, 925–932.
  193. Fujiwara, T.; Giesman-Cookmeyer, D.; Ding, B.; Lommel, S.A.; Lucas, W.J. Cell-to-cell trafficking of macromolecules through plasmodesmata potentiated by the red clover necrotic mosaic virus movement protein. *Plant Cell* **1993**, *5*, 1783–1794.
  194. Uchiyama, A.; Shimada-Beltran, H.; Levy, A.; Zheng, J.Y.; Javia, P.A.; Lazarowitz, S.G. The Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates the cell-to-cell movement of diverse plant viruses. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*.
  195. Lewis, J.D.; Lazarowitz, S.G. Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 2491–2496.
  196. Lefeuvre, P.; Moriones, E. Recombination as a motor of host switches and virus emergence: geminiviruses as case studies. *Curr. Opin. Virol.* **2015**, *10*, 14–19.
  197. Preiss, W.; Jeske, H. Multitasking in Replication Is Common among Geminiviruses. *J. Virol.* **2003**, *77*, 2972–2980.
  198. Jeske, H. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *EMBO J.* **2001**, *20*, 6158–6167.
  199. Jovel, J.; Preiß, W.; Jeske, H. Characterization of DNA intermediates of an arising geminivirus. *Virus Res.* **2007**, *130*, 63–70.
  200. Kumar, R.V. Plant Antiviral Immunity Against Geminiviruses and Viral Counter-Defense for Survival. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*.
  201. Hanley-Bowdoin, L.; Bejarano, E.R.; Robertson, D.; Mansoor, S. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 777–788.
  202. Pooggin, M. How Can Plant DNA Viruses Evade siRNA-Directed DNA Methylation and Silencing? *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 15233–15259.
  203. Saccardo, F.; Cettul, E.; Palmano, S.; Noris, E.; Firrao, G. On the alleged origin of geminiviruses from extrachromosomal DNAs of phytoplasmas. *BMC Evol. Biol.* **2011**, *11*.
  204. Nawaz-ul-Rehman, M.S.; Fauquet, C.M. Evolution of geminiviruses and their satellites. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 1825–1832.
  205. Krupovic, M.; Ravantti, J.J.; Bamford, D.H. Geminiviruses: A tale of a plasmid becoming a virus. *BMC Evol. Biol.* **2009**, *9*.

206. Ha, C.; Coombs, S.; Revill, P.; Harding, R.; Vu, M.; Dale, J. Molecular characterization of begomoviruses and DNA satellites from Vietnam: additional evidence that the New World geminiviruses were present in the Old World prior to continental separation. *J. Gen. Virol.* **2008**, *89*, 312–326.
207. Rybicki, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. *Arch. Virol.* **1994**, *139*, 49–77.
208. Alazem, M.; He, M.H.; Moffett, P.; Lin, N.S. Abscisic acid induces resistance against Bamboo mosaic virus through argonaute 2 and 3. *Plant Physiol.* **2017**, *174*, 339–355.
209. Bhattacharjee, S.; Zamora, A.; Azhar, M.T.; Sacco, M.A.; Lambert, L.H.; Moffett, P. Virus resistance induced by NB-LRR proteins involves Argonaute4-dependent translational control. *Plant J.* **2009**, *58*, 940–951.
210. Carr, J.P.; Murphy, A.M.; Tungadi, T.; Yoon, J.-Y. Plant defense signals: Players and pawns in plant-virus-vector interactions. *Plant Sci.* **2019**, *279*, 87–95.
211. Carr, J.P.; Lewsey, M.G.; Palukaitis, P. Signaling in Induced Resistance. In *Advances in Virus Research*; 2010; pp. 57–121.
212. Alazem, M.; Lin, N.-S. Antiviral Roles of Abscisic Acid in Plants. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*.
213. Alazem, M.; Lin, K.Y.; Lin, N.S. The abscisic acid pathway has multifaceted effects on the accumulation of Bamboo mosaic virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2014**, *27*, 177–189.
214. Faoro, F.; Gozzo, F. Is modulating virus virulence by induced systemic resistance realistic? *Plant Sci.* **2015**, *234*, 1–13.
215. Rahman, A.; Sinha, K.V.; Sopory, S.K.; Sanan-Mishra, N. Influence of virus–host interactions on plant response to abiotic stress. *Plant Cell Rep.* **2021**.
216. Pooggin, M.M. Small RNA-Omics for Plant Virus Identification, Virome Reconstruction, and Antiviral Defense Characterization. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*.
217. Deleris, A.; Gallago-Bartolome, J.; Bao, J.; Kasschau, K.D.; Carrington, J.C.; Voinnet, O. Hierarchical action and inhibition of plant dicer-like proteins in antiviral defense. *Science (80- )*. **2006**.
218. Yang, Z. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 667–675.
219. Ding, S.-W.; Li, H.; Lu, R.; Li, F.; Li, W.-X. RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Res.* **2004**, *102*, 109–115.
220. Ding, S.-W. RNA-based antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 632–644.
221. Pumplin, N.; Sarazin, A.; Jullien, P.E.; Bologna, N.G.; Oberlin, S.; Voinnet, O. DNA methylation influences the expression of DICER-LIKE4 isoforms, which encode proteins of alternative localization and function. *Plant Cell* **2016**, *28*, 2786–2804.
222. Patil, B.L.; Chakraborty, S.; Czosnek, H.; Fiallo-Olivé, E.; Gilbertson, R.L.; Legg, J.; Mansoor,

- S.; Navas-Castillo, J.; Naqvi, R.Z.; Rahman, S.U.; et al. Plant Resistance to Geminiviruses. In *Reference Module in Life Sciences*; Elsevier, 2020; pp. 1–13 ISBN 9780128096338.
223. Jackel, J.N.; Storer, J.M.; Coursey, T.; Bisaro, D.M. Arabidopsis RNA Polymerases IV and V Are Required To Establish H3K9 Methylation, but Not Cytosine Methylation, on Geminivirus Chromatin. *J. Virol.* **2016**, *90*, 7529–7540.
  224. Veluthambi, K.; Sunitha, S. Targets and Mechanisms of Geminivirus Silencing Suppressor Protein AC2. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*.
  225. Zhang, H.; Lang, Z.; Zhu, J.-K. Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 489–506.
  226. Parent, J.S.; Cahn, J.; Herridge, R.P.; Grimanelli, D.; Martienssen, R.A. Small RNAs guide histone methylation in Arabidopsis embryos. *Genes Dev.* **2021**.
  227. Zhang, M.; Kimatu, J.N.; Xu, K.; Liu, B. DNA cytosine methylation in plant development. *J. Genet. Genomics* 2010.
  228. Martínez-Marrero, N.; Avalos-Calleros, J.A.; Chiquito-Almanza, E.; Acosta-Gallegos, J.A.; Ambriz-Granados, S.; Anaya-López, J.L.; Argüello-Astorga, G.R. A new begomovirus isolated from a potyvirus-infected bean plant causes asymptomatic infections in bean and *N. benthamiana*. *Arch. Virol.* **2020**, *165*, 1659–1665.
  229. Butterbach, P.; Verlaan, M.G.; Dullemans, A.; Lohuis, D.; Visser, R.G.F.; Bai, Y.; Kormelink, R. Tomato yellow leaf curl virus resistance by Ty-1 involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by cucumber mosaic virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 12942–12947.
  230. Akbergenov, R. Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 462–471.
  231. Rodríguez-Gandarilla, M.G.; Rodríguez-Negrete, E.A.; Rivera-Bustamante, R.F. Superinfection by PHYVV Alters the Recovery Process in PepGMV-Infected Pepper Plants. *Viruses* **2020**, *12*, 286.
  232. Raja, P.; Jackel, J.N.; Li, S.; Heard, I.M.; Bisaro, D.M. Arabidopsis Double-Stranded RNA Binding Protein DRB3 Participates in Methylation-Mediated Defense against Geminiviruses. *J. Virol.* **2014**, *88*, 2611–2622.
  233. Jeske, H. Geminiviruses. In *Current Topics in Microbiology and Immunology*; 2009; pp. 185–226 ISBN 9783540709718.
  234. Zemach, A.; Kim, M.Y.; Hsieh, P.H.; Coleman-Derr, D.; Eshed-Williams, L.; Thao, K.; Harmer, S.L.; Zilberman, D. The arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell* **2013**.
  235. Sun, Y.W.; Tee, C.S.; Ma, Y.H.; Wang, G.; Yao, X.M.; Ye, J. Attenuation of Histone Methyltransferase KRYPTONITE-mediated transcriptional gene silencing by Geminivirus. *Sci. Rep.* **2015**.



236. Johnson, L.M.; Bostick, M.; Zhang, X.; Kraft, E.; Henderson, I.; Callis, J.; Jacobsen, S.E. The SRA Methyl-Cytosine-Binding Domain Links DNA and Histone Methylation. *Curr. Biol.* **2007**.
237. Elmore, J.M.; Lin, Z.-J.D.; Coaker, G. Plant NB-LRR signaling: upstreams and downstreams. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2011**, *14*, 365–371.
238. de Ronde, D.; Butterbach, P.; Kormelink, R. Dominant resistance against plant viruses. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*.
239. Guo, S.; Zhang, J.; Sun, H.; Salse, J.; Lucas, W.J.; Zhang, H.; Zheng, Y.; Mao, L.; Ren, Y.; Wang, Z.; et al. The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 51–58.
240. Strange, R.N.; Scott, P.R. Plant Disease: A Threat to Global Food Security. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2005**, *43*, 83–116.
241. Nygren, J.; Shad, N.; Kvarnheden, A.; Westerbergh, A. Variation in susceptibility to wheat dwarf virus among wild and domesticated wheat. *PLoS One* **2015**.
242. Beam, K.; Ascencio-Ibáñez, J.T. Geminivirus Resistance: A Minireview. *Front. Plant Sci.* 2020.
243. Verlaan, M.G.; Hutton, S.F.; Ibrahim, R.M.; Kormelink, R.; Visser, R.G.F.; Scott, J.W.; Edwards, J.D.; Bai, Y. The Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Genes Ty-1 and Ty-3 Are Allelic and Code for DFDGD-Class RNA-Dependent RNA Polymerases. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003399.
244. Yang, X.; Caro, M.; Hutton, S.F.; Scott, J.W.; Guo, Y.; Wang, X.; Rashid, M.H.; Szinay, D.; de Jong, H.; Visser, R.G.F.; et al. Fine mapping of the tomato yellow leaf curl virus resistance gene Ty-2 on chromosome 11 of tomato. *Mol. Breed.* **2014**.
245. Yamaguchi, H.; Ohnishi, J.; Saito, A.; Ohyama, A.; Nunome, T.; Miyatake, K.; Fukuoka, H. An NB-LRR gene, TYNBS1, is responsible for resistance mediated by the Ty-2 Begomovirus resistance locus of tomato. *Theor. Appl. Genet.* **2018**, *131*, 1345–1362.
246. Lapidot, M.; Karniel, U.; Gelbart, D.; Fogel, D.; Evenor, D.; Kutsher, Y.; Makhbash, Z.; Nahon, S.; Shlomo, H.; Chen, L.; et al. A Novel Route Controlling Begomovirus Resistance by the Messenger RNA Surveillance Factor Pelota. *PLOS Genet.* **2015**, *11*, e1005538.
247. Gill, U.; Scott, J.W.; Shekasteband, R.; Ogundiwin, E.; Schuit, C.; Francis, D.M.; Sim, S.-C.; Smith, H.; Hutton, S.F. Ty-6, a major begomovirus resistance gene on chromosome 10, is effective against Tomato yellow leaf curl virus and Tomato mottle virus. *Theor. Appl. Genet.* **2019**, *132*, 1543–1554.
248. Hutton, S.F.; Scott, J.W.; Schuster, D.J. Recessive Resistance to Tomato yellow leaf curl virus from the Tomato Cultivar Tyking Is Located in the Same Region as Ty-5 on Chromosome 4. *HortScience* **2012**, *47*, 324–327.
249. Kadirvel, P.; de la Peña, R.; Schafleitner, R.; Huang, S.; Geethanjali, S.; Kenyon, L.; Tsai, W.; Hanson, P. Mapping of QTLs in tomato line FLA456 associated with resistance to a virus causing tomato yellow leaf curl disease. *Euphytica* **2013**, *190*, 297–308.

250. García-Neria, M.A.; Rivera-Bustamante, R.F. Characterization of geminivirus resistance in an accession of capsicum chinense Jacq. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2011**.
251. León-Galván, F.; Joaquín-Ramos, A. de J.; Torres-Pacheco, I.; de la Rosa, A.P.B.; Guevara-Olvera, L.; González-Chavira, M.M.; Ocampo-Velazquez, R. V.; Rico-García, E.; Guevara-González, R.G. A germin-like protein gene (CchGLP) of Capsicum chinense Jacq. Is induced during incompatible interactions and displays Mn-Superoxide dismutase activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**.
252. Guevara-Olvera, L.; Ruíz-Nito, M.L.; Rangel-Cano, R.M.; Torres-Pacheco, I.; Rivera-Bustamante, R.F.; Muñoz-Sánchez, C.I.; González-Chavira, M.M.; Cruz-Hernandez, A.; Guevara-González, R.G. Expression of a germin-like protein gene (CchGLP) from a geminivirus-resistant pepper (Capsicum chinense Jacq.) enhances tolerance to geminivirus infection in transgenic tobacco. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2012**, *78*, 45–50.
253. Hussain, M.; Mansoor, S.; Iram, S.; Zafar, Y.; Briddon, R.W. The Hypersensitive Response to Tomato leaf curl New Delhi virus Nuclear Shuttle Protein Is Inhibited by Transcriptional Activator Protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2007**, *20*, 1581–1588.
254. Diamos, A.G.; Mason, H.S. Modifying the replication of geminiviral vectors reduces cell death and enhances expression of biopharmaceutical proteins in nicotiana benthamiana leaves. *Front. Plant Sci.* **2019**.
255. Van Wezel, R.; Dong, X.; Blake, P.; Stanley, J.; Hong, Y. Differential roles of geminivirus Rep and AC4 (C4) in the induction of necrosis in Nicotiana benthamiana. *Mol. Plant Pathol.* **2002**, *3*, 461–471.
256. Xie, Y.; Zhao, L.; Jiao, X.; Jiang, T.; Gong, H.; Wang, B.; Briddon, R.W.; Zhou, X. A recombinant begomovirus resulting from exchange of the C4 gene. *J. Gen. Virol.* **2013**.
257. Zhou, L.; Cheung, M.Y.; Li, M.W.; Fu, Y.; Sun, Z.; Sun, S.M.; Lam, H.M. Rice Hypersensitive Induced Reaction Protein 1 (OsHIR1) associates with plasma membrane and triggers hypersensitive cell death. *BMC Plant Biol.* **2010**.
258. Choi, H.W.; Kim, Y.J.; Hwang, B.K. The Hypersensitive Induced Reaction and Leucine-Rich Repeat Proteins Regulate Plant Cell Death Associated with Disease and Plant Immunity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2011**, *24*, 68–78.
259. Duan, Y.; Guo, J.; Shi, X.; Guan, X.; Liu, F.; Bai, P.; Huang, L.; Kang, Z. Wheat hypersensitive-induced reaction genes TaHIR1 and TaHIR3 are involved in response to stripe rust fungus infection and abiotic stresses. *Plant Cell Rep.* **2013**.
260. Mei, Y.; Ma, Z.; Wang, Y.; Zhou, X. Geminivirus C4 antagonizes the HIR1-mediated hypersensitive response by inhibiting the HIR1 self-interaction and promoting degradation of the protein. *New Phytol.* **2020**.
261. Gong, P.; Tan, H.; Zhao, S.; Li, H.; Liu, H.; Ma, Y.; Zhang, X.; Rong, J.; Fu, X.; Lozano-Durán, R.; et al. Geminiviruses encode additional small proteins with specific subcellular localizations and virulence function. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 4278.
262. Yong Chung, H.; Lacatus, G.; Sunter, G. Geminivirus AL2 protein induces expression of, and

- interacts with, a calmodulin-like gene, an endogenous regulator of gene silencing. *Virology* **2014**, *460–461*, 108–118.
263. Rajeswaran, R.; Sunitha, S.; Shivaprasad, P. V.; Pooggin, M.M.; Hohn, T.; Veluthambi, K. The mungbean yellow mosaic begomovirus transcriptional activator protein transactivates the viral promoter-driven transgene and causes toxicity in transgenic tobacco plants. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **2007**, *20*, 1545–54.
  264. van Wezel, R.; Liu, H.; Wu, Z.; Stanley, J.; Hong, Y. Contribution of the Zinc Finger to Zinc and DNA Binding by a Suppressor of Posttranscriptional Gene Silencing. *J. Virol.* **2003**, *77*, 696–700.
  265. Trinks, D.; Rajeswaran, R.; Shivaprasad, P. V.; Akbergenov, R.; Oakeley, E.J.; Veluthambi, K.; Hohn, T.; Pooggin, M.M. Suppression of RNA Silencing by a Geminivirus Nuclear Protein, AC2, Correlates with Transactivation of Host Genes. *J. Virol.* **2005**.
  266. Li, F.; Zhao, N.; Li, Z.; Xu, X.; Wang, Y.; Yang, X.; Liu, S.S.; Wang, A.; Zhou, X. A calmodulin-like protein suppresses RNA silencing and promotes geminivirus infection by degrading SGS3 via the autophagy pathway in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*.
  267. Hao, L.; Wang, H.; Sunter, G.; Bisaro, D.M. Geminivirus AL2 and L2 Proteins Interact with and Inactivate SNF1 Kinase. *Plant Cell* **2003**, *15*, 1034–1048.
  268. Shen, W.; Dallas, M.B.; Goshe, M.B.; Hanley-Bowdoin, L. SnRK1 Phosphorylation of AL2 Delays Cabbage Leaf Curl Virus Infection in *Arabidopsis*. *J. Virol.* **2014**, *88*, 10598–10612.
  269. Rentería-Canett, I.; Xoconostle-Cázares, B.; Ruiz-Medrano, R.; Rivera-Bustamante, R.F. Geminivirus mixed infection on pepper plants: Synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology* **2011**, *8*, 104.
  270. Basak, J. Tomato Yellow Leaf Curl Virus: A Serious Threat to Tomato Plants World Wide. *J. Plant Pathol. Microbiol.* **2016**, *07*.
  271. Fontenele, R.S.; Bhaskara, A.; Cobb, I.N.; Majure, L.C.; Salywon, A.M.; Avalos-Calleros, J.A.; Argüello-Astorga, G.R.; Schmidlin, K.; Roumagnac, P.; Ribeiro, S.G.; et al. Identification of the Begomoviruses Squash Leaf Curl Virus and Watermelon Chlorotic Stunt Virus in Various Plant Samples in North America. *Viruses* **2021**, *13*, 810.
  272. Iqbal, Z.; Sattar, M.N.; Shafiq, M. CRISPR/Cas9: A Tool to Circumscribe Cotton Leaf Curl Disease. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*.
  273. Lefevre, P.; Martin, D.P.; Harkins, G.; Lemey, P.; Gray, A.J.A.; Meredith, S.; Lakay, F.; Monjane, A.; Lett, J.-M.; Varsani, A.; et al. The Spread of Tomato Yellow Leaf Curl Virus from the Middle East to the World. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1001164.
  274. Chatterji, A.; Chatterji, U.; Beachy, R.N.; Fauquet, C.M. Sequence Parameters That Determine Specificity of Binding of the Replication-Associated Protein to Its Cognate Site in Two Strains of Tomato Leaf Curl Virus–New Delhi. *Virology* **2000**, *273*, 341–350.
  275. Choi, I.-R.; Stenger, D.C. Strain-Specific Determinants of Beet Curly Top Geminivirus DNA Replication. *Virology* **1995**, *206*, 904–912.

276. PATIL, B.L.; FAUQUET, C.M. Cassava mosaic geminiviruses: actual knowledge and perspectives. *Mol. Plant Pathol.* **2009**, *10*, 685–701.
277. Silva, F.N.; Lima, A.T.; Rocha, C.S.; Castillo-Urquiza, G.P.; Alves-Júnior, M.; Zerbini, F.M. 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. *Viol. J.* **2014**, *11*, 1–11.
278. Li, J.; Zhou, X. Molecular characterization and experimental host-range of two begomoviruses infecting *Clerodendrum cyrtophyllum* in China. *Virus Genes* **2010**, *41*, 250–9.
279. Gregorio-Jorge, J.; Bernal-Alcocer, A.; Bañuelos-Hernández, B.; Alpuche-Solís, Á.G.; Hernández-Zepeda, C.; Moreno-Valenzuela, O.; Frías-Treviño, G.; Argüello-Astorga, G.R. Analysis of a new strain of Euphorbia mosaic virus with distinct replication specificity unveils a lineage of begomoviruses with short Rep sequences in the DNA-B intergenic region. *Viol. J.* **2010**, *7*, 275.
280. Argüello-Astorga, G.R.; Ruiz-Medrano, R. 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. *Arch. Virol.* **2001**, *146*, 1465–1485.
281. Martínez, O.C.B. “BASES MOLECULARES DE LA INCOMPATIBILIDAD REPLICATIVA DE DOS CEPAS DE Rhynchosia mosaic Sinaloa virus, Instituto potosino de investigación científica y tecnológica, 2014.
282. Mauricio-Castillo, J. Caracterización de nuevas especies y cepas de geminivirus por un método molecular que optimiza la detección de infecciones mixtas, Instituto potosino de investigación científica y tecnológica, 2011.
283. Vega-Rocha, S.; Byeon, I.-J.L.; Gronenborn, B.; Gronenborn, A.M.; Campos-Olivas, R. Solution Structure, Divalent Metal and DNA Binding of the Endonuclease Domain from the Replication Initiation Protein from Porcine Circovirus 2. *J. Mol. Biol.* **2007**, *367*, 473–487.
284. Vega-Rocha, S.; Gronenborn, B.; Gronenborn, A.M.; Campos-Olivas, R. Solution structure of the endonuclease domain from the master replication initiator protein of the nanovirus faba bean necrotic yellows virus and comparison with the corresponding geminivirus and circovirus structures. *Biochemistry* **2007**, *46*, 6201–6212.
285. Dayaram, A.; Galatowitsch, M.; Harding, J.S.; Argüello-Astorga, G.R.; Varsani, A. Novel circular DNA viruses identified in *Procordulia grayi* and *Xanthocnemis zealandica* larvae using metagenomic approaches. *Infect. Genet. Evol.* **2014**, *22*, 134–141.
286. Schmidlin, K.; Sepp, T.; Khalifeh, A.; Smith, K.; Fontenele, R.S.; McGraw, K.J.; Varsani, A. Diverse genomoviruses representing eight new and one known species identified in feces and nests of house finches (*Haemorrhous mexicanus*). *Arch. Virol.* **2019**, *164*, 2345–2350.
287. Li, P.; Wang, S.; Zhang, L.; Qiu, D.; Zhou, X.; Guo, L. A tripartite ssDNA mycovirus from a plant pathogenic fungus is infectious as cloned DNA and purified virions. *Sci. Adv.* **2020**.
288. Dayaram, A.; Galatowitsch, M.L.; Argüello-Astorga, G.R.; van Bysterveldt, K.; Kraberger, S.;

- Stainton, D.; Harding, J.S.; Roumagnac, P.; Martin, D.P.; Lefeuvre, P.; et al. Diverse circular replication-associated protein encoding viruses circulating in invertebrates within a lake ecosystem. *Infect. Genet. Evol.* **2016**, *39*, 304–316.
289. Kraberger, S.; Waits, K.; Ivan, J.; Newkirk, E.; VandeWoude, S.; Varsani, A. Identification of circular single-stranded DNA viruses in faecal samples of Canada lynx (*Lynx canadensis*), moose (*Alces alces*) and snowshoe hare (*Lepus americanus*) inhabiting the Colorado San Juan Mountains. *Infect. Genet. Evol.* **2018**, *64*, 1–8.
290. Koonin, E. V.; Dolja, V. V.; Krupovic, M. Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity. *Virology* **2015**, *479–480*, 2–25.
291. Mauricio-Castillo, J.A.; Torres-Herrera, S.I.; Cárdenas-Conejo, Y.; Pastor-Palacios, G.; Méndez-Lozano, J.; Argüello-Astorga, G.R. A novel begomovirus isolated from sida contains putative cis- and trans-acting replication specificity determinants that have evolved independently in several geographical lineages. *Arch. Virol.* **2014**, *159*, 2283–2294.
292. Ingham, D.J.; Pascal, E.; Lazarowitz, S.G. Both Bipartite Geminivirus Movement Proteins Define Viral Host Range, but Only BL1 Determines Viral Pathogenicity. *Virology* **1995**, *207*, 191–204.
293. Schaffer, R.L.; Miller, C.G.; Petty, I.T.D. Virus and Host-Specific Adaptations in the BL1 and BR1 Genes of Bipartite Geminiviruses. *Virology* **1995**, *214*, 330–338.
294. Breitbart, M.; Delwart, E.; Rosario, K.; Segalés, J.; Varsani, A. ICTV Virus Taxonomy Profile: Circoviridae. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98*, 1997–1998.
295. Gregorio-Jorge, J. Evolución forzada de geminivirus : inestabilidad de mutaciones en la helice-4 del dominio de unión a Retinoblastoma de la proteína Rep, instituto potosino de investigacion científica y tecnologica, 2011.
296. Eini, O.; Behjatnia, S.A.A. The minimal sequence essential for replication and movement of Cotton leaf curl Multan betasatellite DNA by a helper virus in plant cells. *Virus Genes* **2016**.
297. Sánchez-Campos, S.; Díaz, J.A.; Monci, F.; Bejarano, E.R.; Reina, J.; Navas-Castillo, J.; Aranda, M.A.; Moriones, E. High Genetic Stability of the Begomovirus Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in Southern Spain Over an 8-Year Period. *Phytopathology*® **2002**, *92*, 842–849.
298. Eagle, P.A.; Orozco, B.M.; Hanley-Bowdoin, L. A DNA Sequence Required for Geminivirus Replication Also Mediates Transcriptional Regulation. *Plant Cell* **1994**, *6*, 1157.
299. Frey, P.M.; Schärer-Hernández, N.G.; Fütterer, J.; Potrykus, I.; Puonti-Kaerlas, J. Simultaneous analysis of the bidirectional African cassava mosaic virus promoter activity using two different luciferase genes. *Virus Genes* **2001**, *22*, 231–42.
300. Hur, J.; Choi, E.; Buckley, K.J.; Lee, S.; Davis, K.R. Identification of a promoter motif involved in Curtovirus sense-gene expression in transgenic *Arabidopsis*. *Mol. Cells* **2008**.
301. Cazonelli, C.I.; Burke, J.; Velten, J. Functional characterization of the geminiviral conserved late element (CLE) in uninfected tobacco. *Plant Mol. Biol.* **2005**, *58*, 465–481.

302. Ruiz-Medrano, R.; Guevara-González, R.G.; Argüello-Astorga, G.R.; Monsalve-Fonnegra, Z.; Herrera-Estrella, L.R.; Rivera-Bustamante, R.F. Identification of a Sequence Element Involved in AC2-Mediated Transactivation of the Pepper Huasteco Virus Coat Protein Gene. *Virology* **1999**, *253*, 162–169.
303. Abu El-Heba, G.A.; Hussein, G.M.; Fahmy, I.F.; Abdou, S.M.; Faisal, A.; Taha, O.; Abdallah, N.A. Impact of cis-acting elements' frequency in transcription activity in dicot and monocot plants. *3 Biotech* **2015**, *5*, 1007–1019.
304. LAUFS, J. Geminivirus replication: Genetic and biochemical characterization of rep protein function, a review. *Biochimie* **1995**, *77*, 765–773.
305. Sunter, G.; Hartitz, M.D.; Hormuzdi, S.G.; Brough, C.L.; Bisaro, D.M. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology* **1990**, *179*, 69–77.
306. Eagle, P.A.; Hanley-Bowdoin, L. cis elements that contribute to geminivirus transcriptional regulation and the efficiency of DNA replication. *J. Virol.* **1997**, *71*, 6947–55.
307. Ramos, P.L.; Fuentes, A.D.; Quintana, Q.; Castrillo, G.; Guevara-González, R.G.; Peral, R.; Rivera-Bustamante, R.F.; Pujol, M. Identification of the minimal sequence required for vascular-specific activity of Tomato mottle Taino virus Replication-associated protein promoter in transgenic plants. *Virus Res.* **2004**, *102*, 125–132.
308. Eini, O.; Behjatnia, S.A.A.; Dogra, S.; Dry, I.B.; Randles, J.W.; Rezaian, M.A. Identification of sequence elements regulating promoter activity and replication of a monopartite begomovirus-associated DNA  $\beta$  satellite. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 253–260.
309. Zhang, J.; Zhang, X.; Wang, Y.; Hou, H.; Qian, Y. Characterization of sequence elements from *Malvastrum* yellow vein betasatellite regulating promoter activity and DNA replication. *Virol. J.* **2012**, *9*, 234.
310. Monsalve-Fonnegra, Z.I.; Argüello-Astorga, G.R.; Rivera-Bustamante, R.F. Geminivirus Replication and Gene Expression. In *Plant Viruses As Molecular Pathogens*; CRC Press, 2001; pp. 257–278.
311. Lacatus, G.; Sunter, G. The Arabidopsis PEAPOD2 transcription factor interacts with geminivirus AL2 protein and the coat protein promoter. *Virology* **2009**, *392*, 196–202.
312. Cohen, S.; Lapidot, M. Appearance and Expansion of TYLCV: a Historical Point of View. In *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease*; Springer Netherlands: Dordrecht, 2007; pp. 3–12 ISBN 9781402047688.
313. Ning, W.; Shi, X.; Liu, B.; Pan, H.; Wei, W.; Zeng, Y.; Sun, X.; Xie, W.; Wang, S.; Wu, Q.; et al. Transmission of Tomato Yellow Leaf Curl Virus by Bemisia tabaci as Affected by Whitefly Sex and Biotype. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10744.
314. Duffy, S.; Holmes, E.C. Multiple Introductions of the Old World Begomovirus Tomato yellow leaf curl virus into the New World. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 7114–7117.
315. Mabvakure, B.; Martin, D.P.; Kraberger, S.; Cloete, L.; van Brunschot, S.; Geering, A.D.W.;

- Thomas, J.E.; Bananej, K.; Lett, J.-M.; Lefevre, P.; et al. Ongoing geographical spread of Tomato yellow leaf curl virus. *Virology* **2016**, *498*, 257–264.
316. Duffy, S.; Holmes, E.C. Phylogenetic Evidence for Rapid Rates of Molecular Evolution in the Single-Stranded DNA Begomovirus Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *J. Virol.* **2008**, *82*, 957–965.
317. Zubair, M.; Zaidi, S.S.E.A.; Shakir, S.; Farooq, M.; Amin, I.; Scheffler, J.A.; Scheffler, B.E.; Mansoor, S. Multiple begomoviruses found associated with cotton leaf curl disease in Pakistan in early 1990 are back in cultivated cotton. *Sci. Rep.* **2017**.
318. Lefevre, P.; Martin, D.P.; Hoareau, M.; Naze, F.; Delatte, H.; Thierry, M.; Varsani, A.; Becker, N.; Reynaud, B.; Lett, J.M. Begomovirus “melting pot” in the south-west Indian Ocean islands: Molecular diversity and evolution through recombination. *J. Gen. Virol.* **2007**.
319. Al-Shihi, A.A.M.; Khan, A.J.; Akhtar, S.; Lima, A.T.M.; Zerbini, F.M.; Briddon, R.W. Occurrence of a new recombinant begomovirus species infecting tomato in the Al-Batinah region of Oman. *Plant Pathol.* **2014**.
320. Bañuelos-Hernández, B.; Mauricio-Castillo, J.A.; Cardenas-Conejo, Y.; Guevara-González, R.G.; Arguello-Astorga, G.R. A new strain of tomato severe leaf curl virus and a unique variant of tomato yellow leaf curl virus from Mexico. *Arch. Virol.* **2012**, *157*, 1835–1841.
321. Crooks, G.E.; Hon, G.; Chandonia, J.M.; Brenner, S.E. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Res.* **2004**.
322. Khan, M.S.; Tiwari, A.K.; Khan, A.A.; Ji, S.H.; Chun, S.C. Current scenario of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) and its possible management: A review. *Vegetos* **2013**.
323. Ascencio-Ibáñez, J.T.; Diaz-Plaza, R.; Méndez-Lozano, J.; Monsalve-Fonnegra, Z.I.; Argüello-Astorga, G.R.; Rivera-Bustamante, R.F. First Report of Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus in Yucatán, México. *Plant Dis.* **1999**, *83*, 1178–1178.
324. Brown, J.K.; Idris, A.M. Introduction of the Exotic Monopartite Tomato yellow leaf curl virus into West Coast Mexico. *Plant Dis.* **2006**, *90*, 1360–1360.
325. Velten, J.; Morey, K.J.; Cazzonelli, C.I. Plant viral intergenic DNA sequence repeats with transcription enhancing activity. *Virol. J.* **2005**.
326. Liu, D.; Shi, L.; Han, C.; Yu, J.; Li, D.; Zhang, Y. Validation of Reference Genes for Gene Expression Studies in Virus-Infected *Nicotiana benthamiana* Using Quantitative Real-Time PCR. *PLoS One* **2012**, *7*, e46451.
327. Khan, Z.A.; Abdin, M.Z.; Khan, J.A. Functional characterization of a strong bidirectional constitutive plant promoter isolated from cotton leaf curl Burewala virus. *PLoS One* **2015**.
328. Lin, Z.J.D.; Taylor, N.J.; Bart, R. Engineering Disease-Resistant Cassava. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2019**, *11*, a034595.
329. Okogbenin, E.; Egesi, C.N.; Olasanmi, B.; Ogundapo, O.; Kahya, S.; Hurtado, P.; Marin, J.;

- Akinbo, O.; Mba, C.; Gomez, H.; et al. Molecular Marker Analysis and Validation of Resistance to Cassava Mosaic Disease in Elite Cassava Genotypes in Nigeria. *Crop Sci.* **2012**, *52*, 2576–2586.
330. Koeda, S.; Onouchi, M.; Mori, N.; Pohan, N.S.; Nagano, A.J.; Kesumawati, E. A recessive gene *pepy-1* encoding Pelota confers resistance to begomovirus isolates of PepYLCIV and PepYLCAV in *Capsicum annuum*. *Theor. Appl. Genet.* **2021**, *134*, 2947–2964.
331. Barbieri, M.; Acciarri, N.; Sabatini, E.; Sardo, L.; Accotto, G.P.; Pecchioni, N. Introgression of resistance to two Mediterranean virus species causing tomato yellow leaf curl into a valuable traditional tomato variety. *J. Plant Pathol.* **2010**.
332. Koeda, S.; Fujiwara, I.; Oka, Y.; Kesumawati, E.; Zakaria, S.; Kanzaki, S. Ty-2 and Ty-3a conferred resistance are insufficient against tomato yellow leaf curl kanchanaburi virus from southeast Asia in single or mixed infections of tomato. *Plant Dis.* **2020**.
333. Gaj, T.; Gersbach, C.A.; Barbas, C.F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* **2013**, *31*, 397–405.
334. Ntui, V.O.; Kong, K.; Khan, R.S.; Igawa, T.; Janavi, G.J.; Rabindran, R.; Nakamura, I.; Mii, M. Resistance to Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV) in genetically engineered cassava cv. KU50 through RNA silencing. *PLoS One* **2015**.
335. Leibman, D.; Prakash, S.; Wolf, D.; Zelcer, A.; Anfoka, G.; Haviv, S.; Brumin, M.; Gaba, V.; Arazi, T.; Lapidot, M.; et al. Immunity to tomato yellow leaf curl virus in transgenic tomato is associated with accumulation of transgene small RNA. *Arch. Virol.* **2015**, *160*, 2727–2739.
336. Sharma, V.K.; Basu, S.; Chakraborty, S. RNAi mediated broad-spectrum transgenic resistance in *Nicotiana benthamiana* to chilli-infecting begomoviruses. *Plant Cell Rep.* **2015**, *34*, 1389–1399.
337. Yasmeen, A.; Kiani, S.; Butt, A.; Rao, A.Q.; Akram, F.; Ahmad, A.; Nasir, I.A.; Husnain, T.; Mansoor, S.; Amin, I.; et al. Amplicon-Based RNA Interference Targeting V2 Gene of Cotton Leaf Curl Kokhran Virus-Burewala Strain Can Provide Resistance in Transgenic Cotton Plants. *Mol. Biotechnol.* **2016**, *58*, 807–820.
338. Duffy, S.; Holmes, E.C. Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: Phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 1539–1547.
339. Deng, D.; Yan, C.; Pan, X.; Mahfouz, M.; Wang, J.; Zhu, J.-K.; Shi, Y.; Yan, N. Structural Basis for Sequence-Specific Recognition of DNA by TAL Effectors. *Science (80-. )*. **2012**, *335*, 720–723.
340. Moscou, M.J.; Bogdanove, A.J. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science (80-. )*. **2009**, *326*, 1501–1501.
341. Sakuma, T.; Ochiai, H.; Kaneko, T.; Mashimo, T.; Tokumasu, D.; Sakane, Y.; Suzuki, K.; Miyamoto, T.; Sakamoto, N.; Matsuura, S.; et al. Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 3379.



342. Cheng, X.; Li, F.; Cai, J.; Chen, W.; Zhao, N.; Sun, Y.; Guo, Y.; Yang, X.; Wu, X. Artificial TALE as a convenient protein platform for engineering broad-spectrum resistance to begomoviruses. *Viruses* **2015**.
343. Chen, W.; Qian, Y.; Wu, X.; Sun, Y.; Wu, X.; Cheng, X. Inhibiting replication of begomoviruses using artificial zinc finger nucleases that target viral-conserved nucleotide motif. *Virus Genes* **2014**, *48*, 494–501.
344. Koonin, E. V.; Makarova, K.S. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2019**, *374*, 20180087.
345. Makarova, K.S.; Wolf, Y.I.; Iranzo, J.; Shmakov, S.A.; Alkhnbashi, O.S.; Brouns, S.J.J.; Charpentier, E.; Cheng, D.; Haft, D.H.; Horvath, P.; et al. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 67–83.
346. Ali, Z.; Ali, S.; Tashkandi, M.; Zaidi, S.S.-A.; Mahfouz, M.M. CRISPR/Cas9-Mediated Immunity to Geminiviruses: Differential Interference and Evasion. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 26912.
347. Qiuyan Wang, X.B.; Du, J.; Lu, Y.; Tao, L.; Tian Xie PAM-interacting domain swapping is extensively utilized in nature to evolve CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *bioRxiv* **2021**, 1–27.
348. Heler, R.; Samai, P.; Modell, J.W.; Weiner, C.; Goldberg, G.W.; Bikard, D.; Marraffini, L.A. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation. *Nature* **2015**, *519*, 199–202.
349. Lim, Y.; Bak, S.Y.; Sung, K.; Jeong, E.; Lee, S.H.; Kim, J.S.; Bae, S.; Kim, S.K. Structural roles of guide RNAs in the nuclease activity of Cas9 endonuclease. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13350.
350. Nidhi, S.; Anand, U.; Oleksak, P.; Tripathi, P.; Lal, J.A.; Thomas, G.; Kuca, K.; Tripathi, V. Novel CRISPR–Cas Systems: An Updated Review of the Current Achievements, Applications, and Future Research Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3327.
351. Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J.A.; Charpentier, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (80- )*. **2012**, *337*, 816–821.
352. Baltes, N.J.; Hummel, A.W.; Konecna, E.; Cegan, R.; Bruns, A.N.; Bisaro, D.M.; Voytas, D.F. Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR–Cas prokaryotic immune system. *Nat. Plants* **2015**, *1*, 15145.
353. Ji, X.; Zhang, H.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Gao, C. Establishing a CRISPR–Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. *Nat. Plants* **2015**, *1*, 15144.
354. Ali, Z.; Abulfaraj, A.; Idris, A.; Ali, S.; Tashkandi, M.; Mahfouz, M.M. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome Biol.* **2015**, *16*, 238.
355. Mehta, D.; Stürchler, A.; Anjanappa, R.B.; Zaidi, S.S.-A.; Hirsch-Hoffmann, M.; Grisse, W.; Vanderschuren, H. Linking CRISPR-Cas9 interference in cassava to the evolution of editing-resistant geminiviruses. *Genome Biol.* **2019**, *20*, 80.

356. Rybicki, E.P. CRISPR–Cas9 strikes out in cassava. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 727–728.
357. Mubarik, M.S.; Wang, X.; Khan, S.H.; Ahmad, A.; Khan, Z.; Amjid, M.W.; Razzaq, M.K.; Ali, Z.; Azhar, M.T. Engineering broad-spectrum resistance to cotton leaf curl disease by CRISPR-Cas9 based multiplex editing in plants. *GM Crop. Food* **2021**, 1–12.
358. Brinkman, E.K.; Chen, T.; Amendola, M.; Van Steensel, B. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res.* **2014**.
359. Roy, A.; Zhai, Y.; Ortiz, J.; Neff, M.; Mandal, B.; Mukherjee, S.K.; Pappu, H.R. Multiplexed editing of a begomovirus genome restricts escape mutant formation and disease development. *PLoS One* **2019**, *14*, e0223765.
360. Song, G.; Jia, M.; Chen, K.; Kong, X.; Khattak, B.; Xie, C.; Li, A.; Mao, L. CRISPR/Cas9: A powerful tool for crop genome editing. *Crop J.* **2016**, *4*, 75–82.
361. Nakade, S.; Yamamoto, T.; Sakuma, T. Cas9, Cpf1 and C2c1/2/3—What’s next? *Bioengineered* **2017**, *8*, 265–273.
362. García-Andrés, S.; Monci, F.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology* **2006**.
363. Sánchez-Campos, S.; Domínguez-Huerta, G.; Díaz-Martínez, L.; Tomás, D.M.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E.; Grande-Pérez, A. Differential Shape of Geminivirus Mutant Spectra Across Cultivated and Wild Hosts With Invariant Viral Consensus Sequences. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*.
364. Jordá, C.; Font, I.; Martínez, P.; Juárez, M.; Ortega, A.; Lacasa, A. Current Status and New Natural Hosts of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Spain. *Plant Dis.* **2001**.
365. Brinkman, E.K.; Kousholt, A.N.; Harmsen, T.; Leemans, C.; Chen, T.; Jonkers, J.; van Steensel, B. Easy quantification of template-directed CRISPR/Cas9 editing. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, e58–e58.
366. Hsu, P.D.; Scott, D.A.; Weinstein, J.A.; Ran, F.A.; Konermann, S.; Agarwala, V.; Li, Y.; Fine, E.J.; Wu, X.; Shalem, O.; et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 827–832.
367. Tycko, J.; Wainberg, M.; Marinov, G.K.; Ursu, O.; Hess, G.T.; Ego, B.K.; Aradhana; Li, A.; Truong, A.; Trevino, A.E.; et al. Mitigation of off-target toxicity in CRISPR-Cas9 screens for essential non-coding elements. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4063.

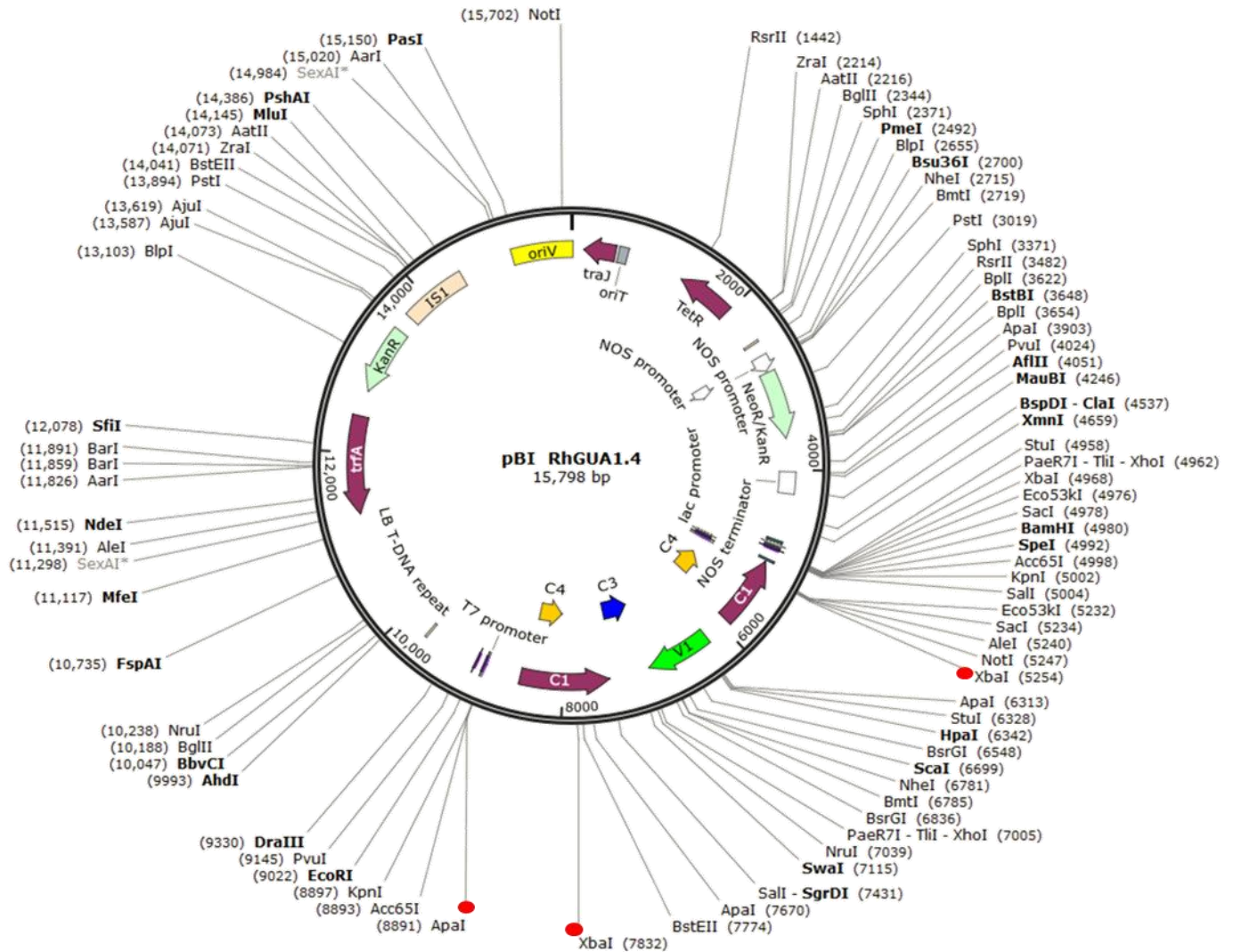
## ANEXOS

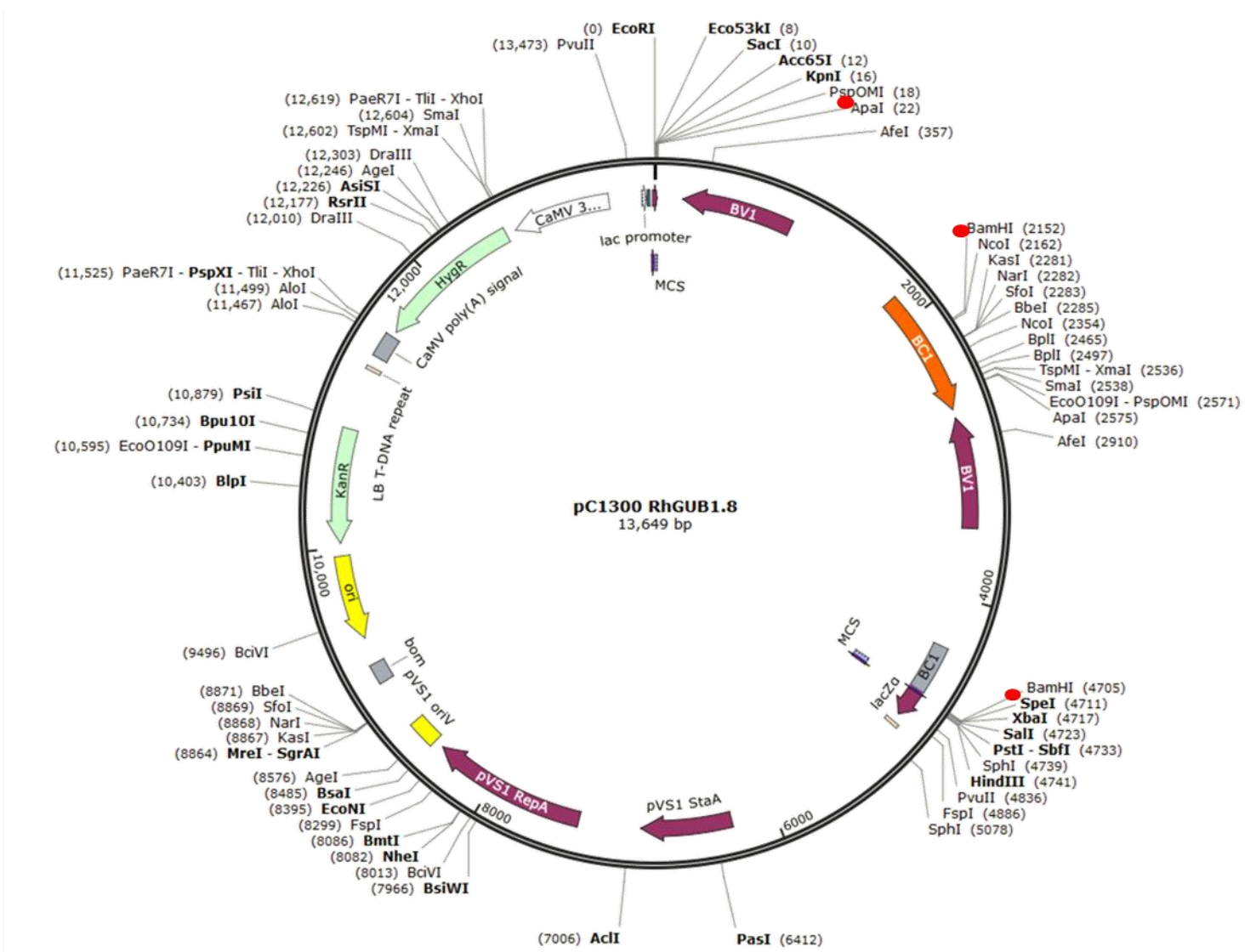
### Artículos

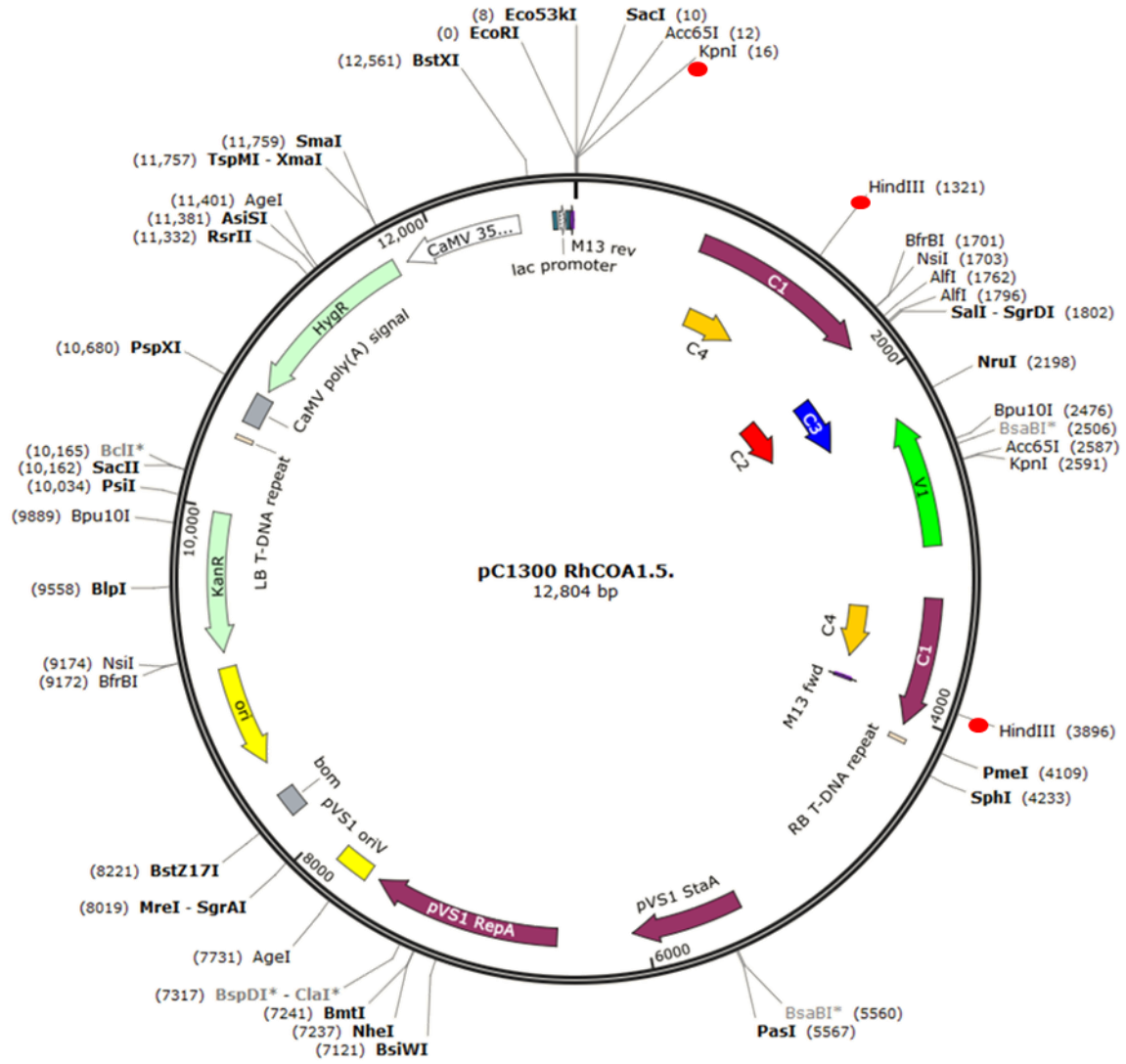
- 1.- **Avalos-Calleros, J. A.**, Pastor-Palacios, G., Bolaños-Martínez, O. C., Mauricio-Castillo, A., Gregorio-Jorge, J., Martínez-Marrero, N., Bañuelos-Hernández, B., Méndez-Lozano, J., & Argüello-Astorga, G. R. (2021). Two strains of a novel begomovirus encoding Rep proteins with identical  $\beta$ 1 strands but different  $\beta$ 5 strands are not compatible in replication. *Archives of virology*, 166(6), 1691–1709. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05066-2>
- 2.- Fontenele, R. S., Bhaskara, A., Cobb, I. N., Majure, L. C., Salywon, A. M., **Avalos-Calleros, J. A.**, Argüello-Astorga, G. R., Schmidlin, K., Roumagnac, P., Ribeiro, S. G., Krabberger, S., Martin, D. P., Lefevre, P., & Varsani, A. (2021). Identification of the Begomoviruses Squash Leaf Curl Virus and Watermelon Chlorotic Stunt Virus in Various Plant Samples in North America. *Viruses*, 13(5), 810. <https://doi.org/10.3390/v13050810>
- 3.- Fontenele, R. S., Salywon, A. M., Majure, L. C., Cobb, I. N., Bhaskara, A., **Avalos-Calleros, J. A.**, Argüello-Astorga, G. R., Schmidlin, K., Khalifeh, A., Smith, K., Schreck, J., Lund, M. C., Köhler, M., Wojciechowski, M. F., Hodgson, W. C., Puente-Martinez, R., Van Doorslaer, K., Kumari, S., Vernière, C., Filloux, D., ... Varsani, A. (2020). A Novel Divergent Geminivirus Identified in Asymptomatic New World Cactaceae Plants. *Viruses*, 12(4), 398. <https://doi.org/10.3390/v12040398>
- 4.- Fontenele, R. S., Salywon, A. M., Majure, L. C., Cobb, I. N., Bhaskara, A., **Avalos-Calleros, J. A.**, Argüello-Astorga, G. R., Schmidlin, K., Khalifeh, A., Smith, K., Schreck, J., Lund, M. C., Köhler, M., Wojciechowski, M. F., Hodgson, W. C., Puente-Martinez, R., Van Doorslaer, K., Kumari, S., Oyeniran, K. A., Vernière, C., ... Varsani, A. (2021). New World Cactaceae Plants Harbor Diverse Geminiviruses. *Viruses*, 13(4), 694. <https://doi.org/10.3390/v13040694>
- 5.- Fontenele, R. S., Köhler, M., Majure, L. C., **Avalos-Calleros, J. A.**, Argüello-Astorga, G. R., Font, F., Vidal, A. H., Roumagnac, P., Krabberger, S., Martin, D. P., Lefevre, P., & Varsani, A. (2021). Novel circular DNA virus identified in *Opuntia discolor* (Cactaceae) that codes for proteins with similarity to those of geminiviruses. *The Journal of general virology*, 102(11), 10.1099/jgv.0.001671. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001671>
- 6.- Cantú-Iris, M., Pastor-Palacios, G., Mauricio-Castillo, J. A., Bañuelos-Hernández, B., **Avalos-Calleros, J. A.**, Juárez-Reyes, A., Rivera-Bustamante, R., & Argüello-Astorga, G. R. (2019). Analysis of a new begomovirus unveils a composite element conserved in the CP gene promoters of several Geminiviridae genera: Clues to comprehend the complex regulation of late genes. *PLoS one*, 14(1), e0210485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210485>
- 7.- Martínez-Marrero, N., **Avalos-Calleros, J. A.**, Chiquito-Almanza, E., Acosta-Gallegos, J. A., Ambriz-Granados, S., Anaya-López, J. L., & Argüello-Astorga, G. R. (2020). A new begomovirus isolated from a potyvirus-infected bean plant causes asymptomatic infections in bean and *N. benthamiana*. *Archives of virology*, 165(7), 1659–1665. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04646-y>

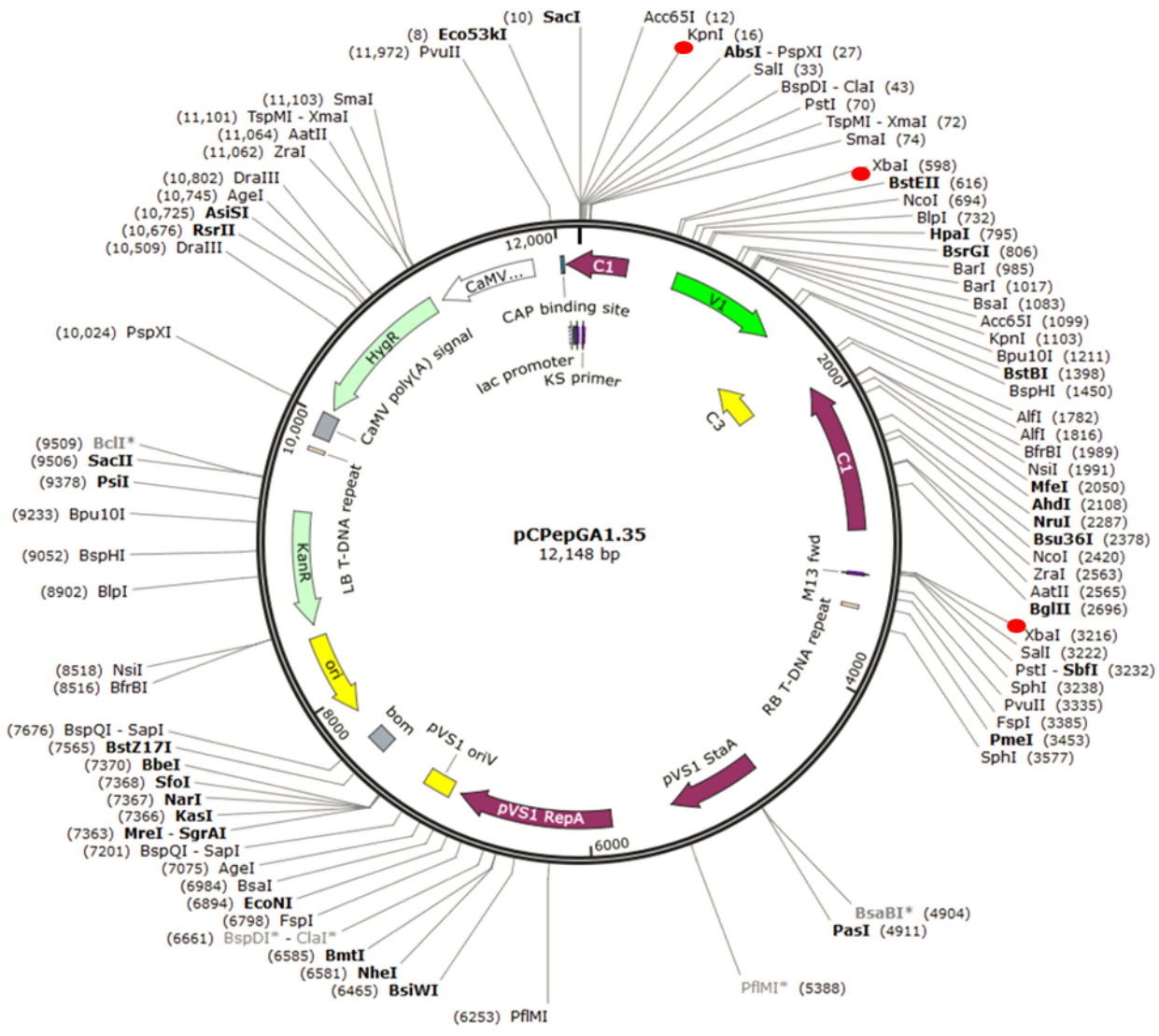
## Construcciones hemidiméricas en los vectores binarios.

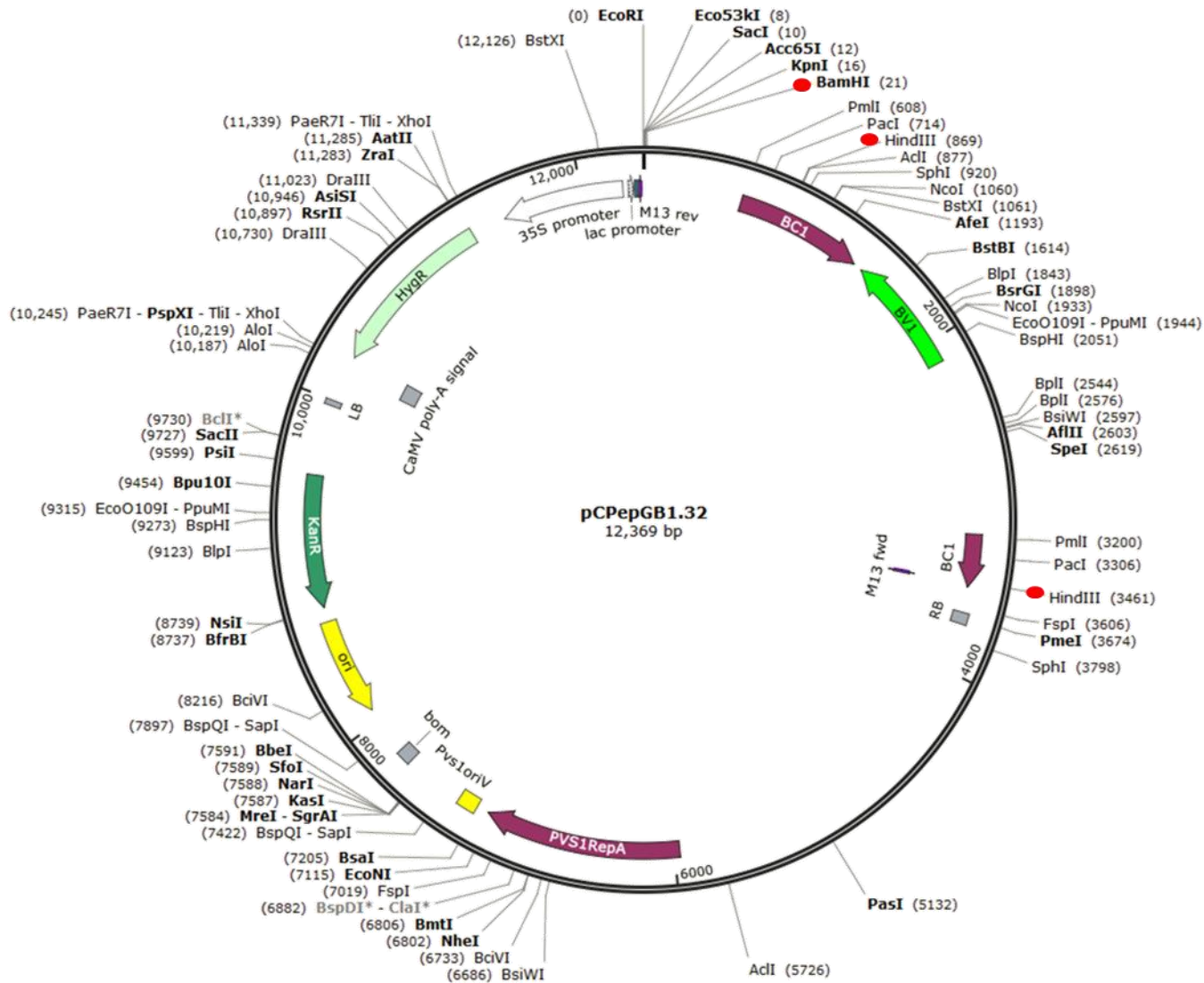
Los círculos rojos indican los sitios usados para generar las construcciones.





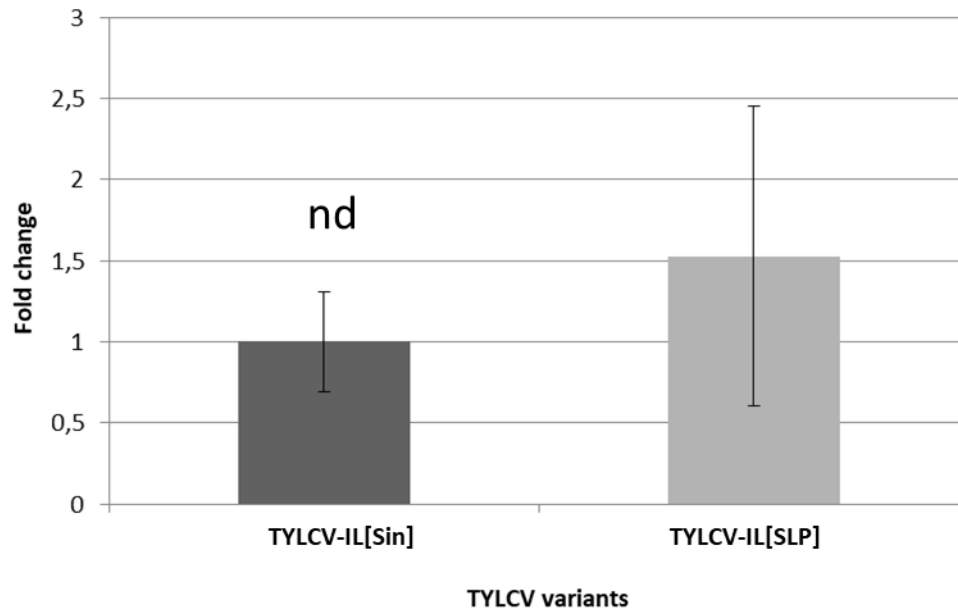








### Relative TYLCV accumulation



#### Acumulación relativa de las variantes de TYLCV A LOS 21 dpi

El análisis estadístico (t-student, de dos caras) no encontró diferencia significativa.

## Primers usados en este trabajo

Primer	Secuencia
Ber-BV1-rev	5'-CTAAGCTTGACCRWAYTGRTTYTCATG-3'
Dgr-Fw	5'-CAGATCTCCTCCTCTAGCAGWTCNCCGTC-3'
F-BoxFw	5'-GGCACTCACAACGTCTATTTTC-3'
F-BoxRv	5'-ACCTGGGAGGCATCCTGCTTAT-3'
qPGF	5'-CCACTCACAATAGAGGGCTGAG-3'
qPGR	5'-TGACAGGCGGGATGTGATTG-3'
RepDGR-Rv	5'-AGTCTAGACGGCAGATCWGCTAGAGGAGG-3'
RhMCoA-Rev	5'-ATAGAGGTACCATAGGGTCTCCTATCCCTC-3'
SL-2060-Fw	5'-CGGAATCCGGCGTTRRRRTARACGTCGTC-3'
SL2080-Rev-H3	5'-GCTAAGCTTACGACGTCTAYCAYAACGC -3'
TPepAC1/AC2FW	5'-CGTCTGCGAATAGGGCGC-3'
TPepAC1/AC2RV	5'-GCGGCAAGACAATGTGGG-3'
TPepBC1FW	5'-GGAGACGTAATGACGTTAAACGTC-3'
TPepBC1RV	5'-GCACAGCCGAAGTCTTTGC-3'
TPepBV1FW	5'-CGCTCCCACTGGCC-3'
TPepBV1RV	5'-CACTTCTGCTGCGGCATATTTTC-3'
TPEPIR/AV1FW	5'-GGAATGCTCCTCTCGTGATACC-3'
TPEPIR/AV1RV	5'-GATCGTTCCTCACGGTGGC-3'
TYL-120Fw	5'-GAGCAGCCACAGTCTAGGTC-3'
TYL-120Rv	5'-AATGCAACCTTCGTCACCCT-3'
YMAC-Fw	5'-CTAAGCTTGAYATGGCATGTACNCATGC-3'
YMAC-Rv	5'-ACAAGCTTWGASGCATGNGTACATGCCA-3'
C1xtyl	5'-CCGGTCTAGAGAGAGAACAATTGGGATATGTTAGG-3'
V1xtyl	5'-GAGTCTAGAGGGCGTGGAAATGATTATATCG-3'
BC1-1840F	5'-GATCTAGAGYRCTYCTKGAAGCCCA-3'
BC1-80 Rev	5'-CGTCTAGAGAYGARTATCARYTDTNCNATGA-3'

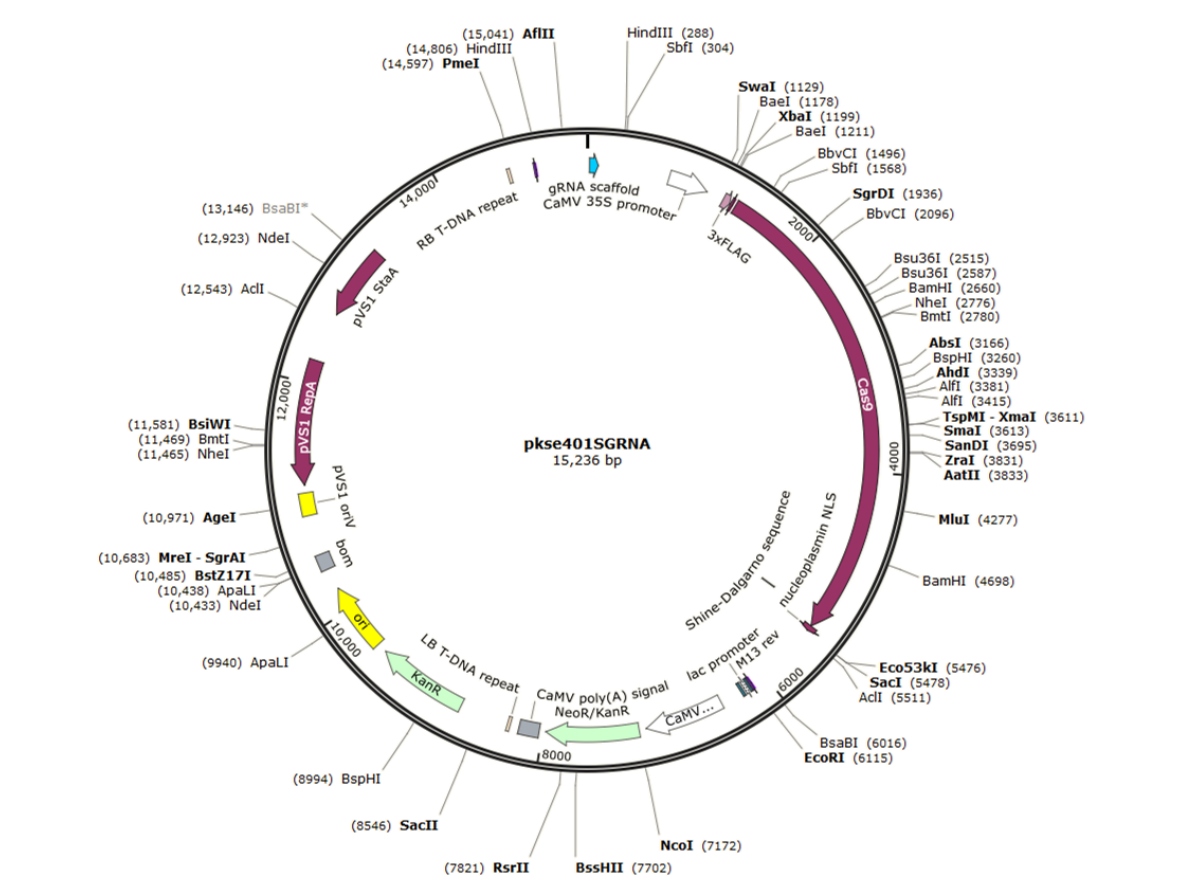
## sgRNAs no funcionales o no usados

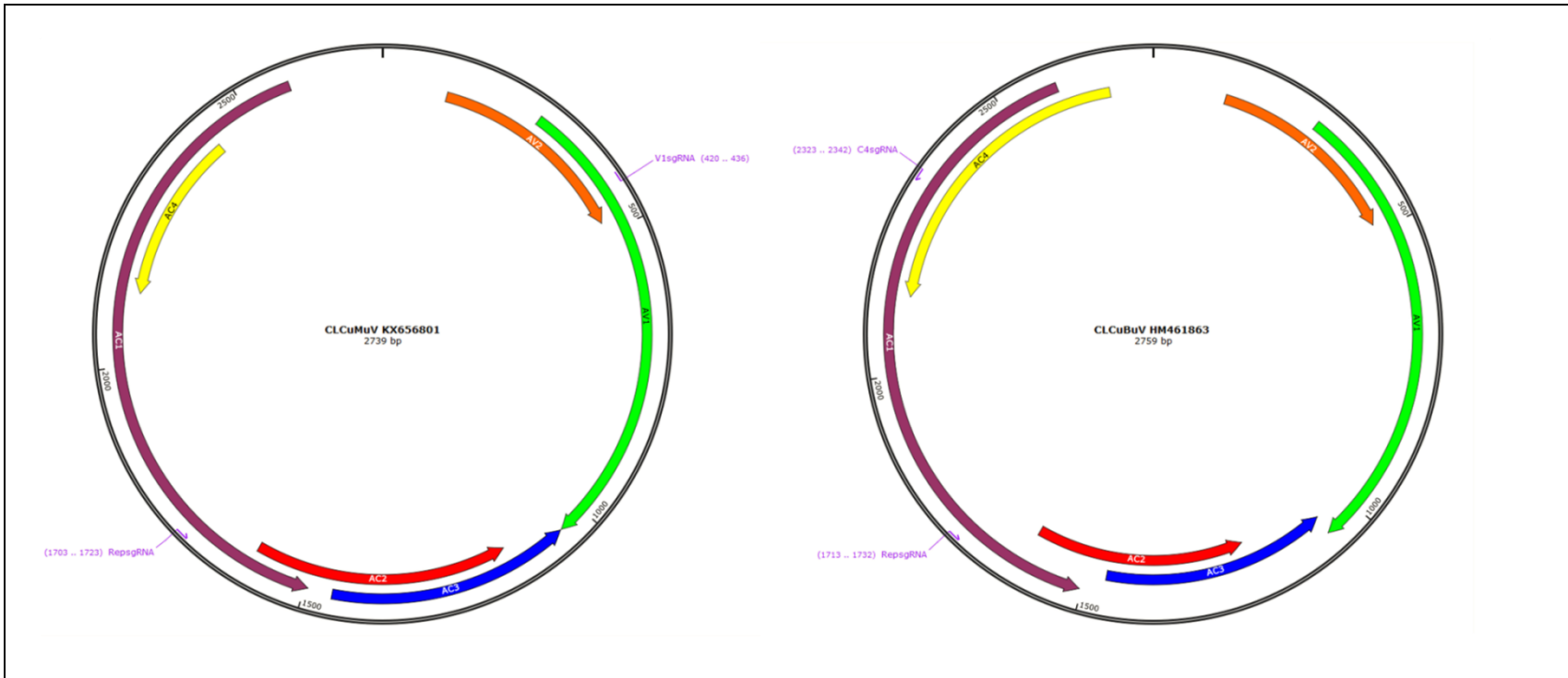
Upper	Down	Blanco
5'-attgACATTTCCATCCGAACATT-3'	5'-aacAATGTTCCGATGGAAATGT-3'	C4
5'-attgCAAGCCTACCTTTACACGAC-3'	5'-aacGTCGTGTAAAGGTAGGCTTG-3'	C4
5'-attgTTATGTATATAAGGGACTCC-3'	5'-aacGGAGTCCCTTATATACATAA-3'	IR de PepGMV (A y B)
5'-attgATCTAGGATCTTCGTACACG-3'	5'-aacCGTGTACGAAGATCCTAGAT-3'	IR de PHYVV B *
5'-attgAACTCCCATATACTATATAT-3'	5'-aacATATATAGTATATGGGAGTT-3'	IR de PHYVV (A y B) *

\* No probados experimentalmente

## Mapa general de las construcciones pKSE401::sgRNA

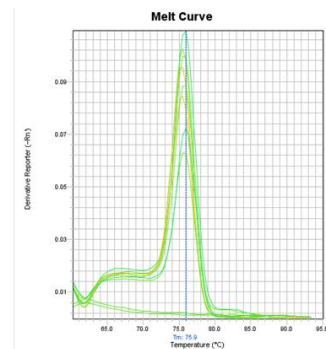
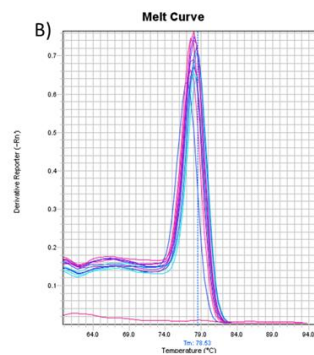
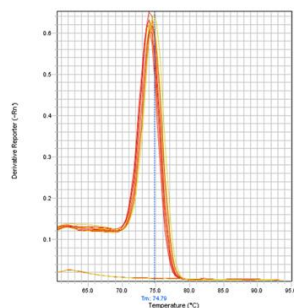
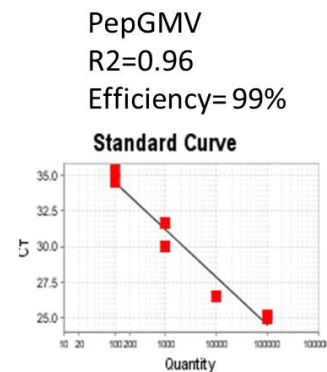
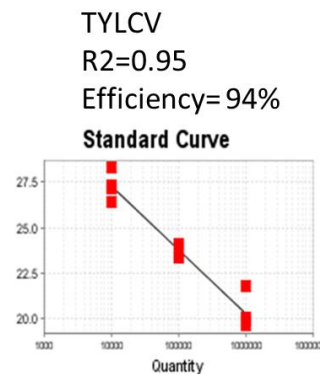
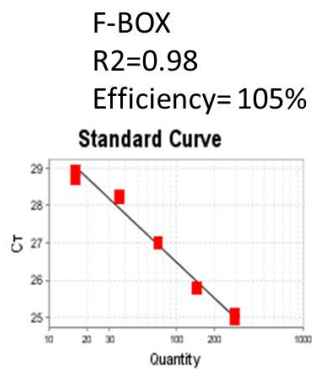
El sitio *BsaI* es eliminado durante la clonación por Golden gate, sin embargo en todos los casos puede usarse los sitios *HindIII* para verificar las clonas por patrón de digestión.





**Los sgRNAs diseñados en este trabajo que potencialmente podrían interferir la replicación de CLCuMuV y CLCuBuV**

En morado se representan los sitios donde hibridarían los sgRNAs.



**Curvas de melting y standard de los primers utilizados en este trabajo.**

**A)** Curva estándar, el gráfico muestra las ecuaciones obtenidas al trazar los valores del ciclo de cuantificación (Ct) de contará la concentración de DNA. Con estos datos se pudo determinar la eficiencia de amplificación y la confiabilidad del ensayo. **B)** Análisis de curva de melting, todos los productos qPCR generan un único pico, lo que indica un solo amplicón. Se muestran de izquierda a derecha para F-BOX, TYLCV y PepGMV.