



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Análisis de elementos de respuesta a AC2/TrAP en
promotores del begomovirus PHYVV por métodos de
expresión transitoria *in planta***

Tesis que presenta

Nadia Martínez Marrero

Para obtener el grado de

Doctor(a) en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga

Dr. Rafael Francisco Rivera Bustamante

San Luis Potosí, S.L.P., febrero de 2021



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Análisis de elementos de respuesta a AC2/TrAP en promotores del begomovirus PHYVV por métodos de expresión transitoria in planta**” presentada para obtener el Grado de Doctor(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Nadia Martínez Marrero** y aprobada el **15 de enero 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

Dr. Rafael Francisco Rivera Bustamante
Codirector

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Miembro del Comité Tutorial

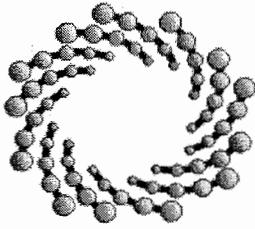
Dr. Guillermo Pastor Palacios
Miembro del Comité Tutorial



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** y la codirección del **Dr. Rafael Francisco Rivera Bustamante**.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No.Reg 742774) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



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 118 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 3 días del mes de febrero del año 2021, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Presidente	IPICYT
Dr. Guillermo Pastor Palacios	Secretario	IPICYT
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Sinodal	IPICYT

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

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Nadia Martínez Marrero

sobre la Tesis intitulada:

Análisis de elementos de respuesta a AC2/TrAP en promotores del begomovirus PHYVV por métodos de expresión transitoria in planta

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Dr. Rafael Francisco Rivera Bustamante (CINVESTAV)

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 11:38 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 3 días del mes de febrero de 2021.


Dr. Marcial Bomilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



A toda mi familia (ausente y presente), motor impulsor de mi existencia.

A mi hijo Darío, mi máspreciado tesoro y mi más duro crítico.

A Luis Ángel, mi amor, mi cómplice y todo...en la calle codo a codo...

A todos los que en mi país, contra viento y marea, hacen ciencia cada día.

A todo los que fuera de nuestro país, luchamos cada día por seguir el camino de la
ciencia...contra viento y marea.

Agradecimientos

Al **CONACYT**, por brindarme la posibilidad de estudiar un posgrado en México.

Al **IPICYT**, por abrirme sus puertas y apoyarme en todo momento.

A los **Drs. Lina Riego, Alvar Cruz y Osney Leiva**, y a **todo el departamento de posgrado del IPICYT**, por su preocupación y ocupación para mi ingreso al doctorado.

Al **Dr. Gerardo R. Argüello**, por aceptarme como su alumna aspirante a este grado y llevarme con su apoyo y conocimiento a la conclusión de mi objetivo.

Al **Dr. Rafael Rivera-Bustamante** por aceptar codirigir mi tesis y apoyarme con sus consejos, así como por revisar la tesis ayudándome a mejorarla.

A los **Drs. Ángel Alpuche, Guillermo Pastor, Bernardo Bañuelos y Jazmin Abrahams** por su inestimable ayuda, siempre dispuestos a atender mis dudas y mis peticiones de apoyo.

A la **Dra. Ruth Soria y los estudiantes de su laboratorio** en la Fac. de Ciencias Químicas de la UASLP, por su invaluable apoyo para los ensayos fluorométricos y su amabilidad y confianza para conmigo.

Al **Dr. Sergio Casas**, por su inapreciable preocupación y apoyo para la obtención de este grado.

Al **Biól. Salvador Ámbriz** y a la **IBt. Verónica Zarate**, por su valioso apoyo técnico en el laboratorio y con las secuenciaciones de ADN, respectivamente.

A la **Ing. Bioq. Sherly Sánchez** por su inmenso apoyo en la realización y análisis de muchos experimentos, por su dedicación a las *Nicotianas*, y por alentarme en los peores momentos.

Al **Dr. Nicolás Gómez** por su ayuda y recomendaciones para el cultivo de mis *Nicotianas*.

A **Mireya Sánchez, Ana Luz Romero y Rosalba Castillo** (sin títulos) por brindarme su amistad desinteresada y su ayuda desde mi primer día en el IPICYT.

A la **Sra. Rosy Cruz**, por su valiosísima labor, por estar siempre dispuesta a resolver mis pedidos urgentes.

A mis compañeros de laboratorio, en los que muchas veces me apoyé, y con los que muchas veces reí, lloré y hasta peleé... **Mireya, Melisa, Sherly, Karla, Fabiola,**

Angie, Karen, Marcela, Nohemí, Jennifer, Aaron, Leonardo, Max, Alejandro... todos me brindaron su mano para alcanzar esta meta.

A la secretaria de la DBM **Gabriela Pérez**, siempre amable y dispuesta a ayudar.

A la pequeña **Jackie**, grande en sus deseos de aprender y ayudar.

A la **Ing. Nonatzin Flores** y su hija **María José Ascencio**, al **Ing. Víctor Cardentey** y su esposa **Patricia Llamazares**, al **Ing. Jesús Leija**, y a mi querida amiga **Selene Eguía**, porque sin su apoyo fuera del ámbito académico yo no hubiera permanecido en SLP.

A mi **familia y esposo**, por estar siempre ahí, apoyando incondicionalmente mi lucha por este objetivo.

A cada **“Procusto”** que encontré en el camino, porque, sin duda, acostándome en su lecho me empujaron a ser fuerte.

Contenido

Páginas

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Anexos	xii
Abreviaturas	xiii
Resumen	xv
Abstract	xvi

Parte 1. Análisis de elementos de respuesta a AC2/TrAP en promotores del begomovirus PHYVV por métodos de expresión transitoria in planta

Introducción general	1
Materiales y Métodos	24
Resultados	37
Discusión y conclusiones	54
Referencias	60

Parte 2. Una nueva especie de begomovirus aislada de una planta de frijol infectada por potyvirus causa infecciones asintomáticas en *Phaseolus vulgaris* y *Nicotiana benthamiana*.

Resumen	75
Introducción	76
Materiales y Métodos	79
Resultados y discusión	85
Conclusiones	102
Referencias	103
Anexos	114

Lista de tablas

	Páginas
Parte 1.	
<hr/>	
1. Taxonomía de los geminivirus.	2
2. Resumen de las proteínas codificadas por el genoma de los begomovirus.	7
3. Iniciadores diseñados para amplificar fragmentos de la región intergénica en el DNA-B y el gen <i>AC2/TrAP</i> .	24
4. Iniciadores para amplificar fragmentos cadena arriba del ORF de <i>BV1/NSP</i> en el DNA-B del PHYVV.	30
<hr/>	
Parte 2.	
<hr/>	
1. Iniciadores utilizados para amplificar fragmentos del genoma de <i>Begomovirus</i> .	80

Lista de figuras

	Páginas
Parte 1.	
<hr/>	
1. Árbol filogenético de la familia <i>Geminiviridae</i> .	3
2. Organización genómica característica de los begomovirus.	5
3. Árbol filogenético representando los clados de begomovirus.	10
4. Representación esquemática del ciclo infectivo de los geminivirus.	12
5. Modelo de expresión propuesto para el virus huasteco de las venas amarillas del chile (PHYVV).	15
6. Esquema de la interacción de AC2/TrAP con factores del huésped y el genoma de <i>Begomovirus</i> .	17
7. Mapa con la ubicación de los iniciadores para amplificar fragmentos del genoma del PHYVV.	25
8. Esquema de los casetes de expresión construidos con los fragmentos de la IR.	27
9. Mapa con la ubicación de los iniciadores y esquema de los casetes de expresión obtenidos para la búsqueda de un elemento silenciador en el ADN-B.	30
10. Esquema de los casetes de expresión que portan los promotores quiméricos creados por Juárez-Reyes (2007).	33
11. Resultados de la determinación cuantitativa de la expresión de GUS con el promotor (-900)BV1.	39
12. Resultados de la determinación cuantitativa de la expresión de GUS con el promotor (-285)BV1.	40
13. Resultados de la determinación cuantitativa de la expresión de GUS con el promotor (-894)BC1.	41
14. Resultados de la determinación cuantitativa de la expresión de GUS con el promotor (-1315)BV1.	44
15. Resultados de la determinación cuantitativa de la expresión de GUS con el promotor (-1977)BV1.	45
16. Resultados de la determinación cuantitativa de la expresión de GUS con el promotor (-2589)BV1.	46
17. Resultados promedio de los experimentos para la determinación cuantitativa de la expresión de GUS de todos los promotores del ADN-B de PHYVV.	47
18. Resultados de la determinación cuantitativa de la expresión de GUS con la construcción quimérica pBI Ω 100sil	49
19. Resultados de la determinación cuantitativa de la expresión de GUS con la construcción quimérica pBI Ω 140sil.	50
20. Resultados de la determinación cuantitativa de la expresión de GUS con la construcción quimérica pBI Ω 248sil.	51
21. Resultados de la determinación cuantitativa de la expresión de GUS con la construcción quimérica pBI Ω 503sil.	52
<hr/>	

22. Valores promedio de los experimentos para la determinación cuantitativa de la expresión de GUS de los promotores quiméricos de AV1/CP.	53
---	-----------

Parte 2

1. Construcciones hemidiméricas infectivas de begCN30.	83
2. Patrones de restricción de clonas de amplicones del begCN30, con <i>EcoR</i> I y <i>Hinf</i> I	85
3. Organización del genoma de begCN30	87
4. Comparación entre las secuencias de nucleótidos (aminoácidos) de los ORFs traslapados con AV1/CP.	87
5. Potenciales elementos cis-reguladores detectados en la región intergénica del DNA-A del BLV.	89
6. Matriz de identidad de la secuencia de DNA-A del begCN30 (BLV) y la de begomovirus seleccionados por un análisis BLASTn.	90
7. Mapeo de contigs obtenidos a partir de siRSAs y ensamblados sobre el genoma de BLV.	91
8. Relaciones filogenéticas entre el DNA-A de BLV y begomovirus representativos de linajes del Viejo y Nuevo Mundo.	93
9. Relaciones filogenéticas entre el DNA-B de BLV y begomovirus representativos de linajes del Viejo y Nuevo Mundo.	94
10. Detección de los componentes genómicos de BLV (<i>de novo</i>) por PCR en extractos de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	100

Anexos

1. Secuencias utilizadas para la detección de eventos de recombinación en el genoma del BLV (begCN30) con el paquete de programas RDP4.	115
2. Cobertura de los componentes genómicos de BLV (begCN30) por los contigs ensamblados <i>de novo</i> (sRNAs) e identidad de nucleótidos con estos.	116
3. Lista de contigs ensamblados <i>de novo</i> correspondientes al genoma de BLV (begCN30).	117
4. Artículo publicado.	123

Abreviaturas

Parte 1.

AC1/Rep	Proteína asociada a la replicación viral
AC2/TrAP	Proteína activadora de la transcripción
AC3/Ren	Proteína potenciadora de la replicación viral
ADNcd	ADN de cadena doble
ADNcs	ADN de cadena sencilla
ARNm	ARN mensajero
AV1/CP	Proteína de la cápside
BC1/MP	Proteína de movimiento
BV1/NSP	Proteína lanzadera nuclear
CaMV	Virus del mosaico de la coliflor
CbLCV	Virus del rizado foliar de la col
CLE	Elementos tardíos conservados
HTS	Secuenciación de alto rendimiento
ICTV	Comité internacional de taxonomía de virus
IR	Región intergénica
NM	Nuevo Mundo
ORF	Marcos abiertos de lectura
p35S	Promotor 35S de CaMV
pBS	Plásmido pBlueScript KS+
PHYVV	Virus huasteco de las venas amarillas del chile
RCR	Replicación por círculo rodante
SLCV	Virus del rizado foliar de la calabaza
TGMV	Virus del mosaico dorado del tomate
VM	Viejo mundo

Parte 2.

ADNcd	ADN de cadena doble
ADNcs	ADN de cadena sencilla
ARNcd	ARNs de cadena doble
BCMNV	Virus del mosaico necrótico del frijol común
BCMV	Virus del mosaico del frijol común
begCN30	Begomovirus presente en la muestra CN30
BGVs	<i>Begomovirus</i>
BGYMV	Virus del mosaico dorado del frijol
BLV	Virus latente del frijol
HTS	Secuenciación de alto rendimiento
IR	Región intergénica
LISOP	Detección de <i>Begomovirus</i> basada en PCR traslapados, específica de linaje
NM	Nuevo Mundo
ORF	Marcos abiertos de lectura
Ori	Origen de replicación viral
p35S	Promotor 35S de CaMV

pBS	Plásmido pBlueScript KS+
RCA	Amplificación por círculo rodante
RCR	Replicación por círculo rodante
SDT	Herramienta para la demarcación de secuencias
siRNA	ARN interferentes pequeños
SLCV	Virus del enrollamiento de la hoja de calabaza
sRNA	ARN pequeños
VM	Viejo mundo

Resumen

Análisis de elementos de respuesta a AC2/TrAP en promotores del begomovirus PHYVV por métodos de expresión transitoria *in planta*.

El virus huasteco de las venas amarillas del chile (PHYVV) es un miembro del género *Begomovirus* y un excelente modelo para estudiar procesos virales básicos. Su genoma está compuesto por dos moléculas de ADN circular de cadena sencilla (ADNcs), denominados ADN-A y ADN-B. PHYVV regula finamente la expresión de sus genes en el tiempo: los genes tempranos se expresan por factores de la planta, y los genes tardíos requieren de proteínas virales producidas al inicio del ciclo infeccioso. El ADN-A codifica a la proteína de la cápside (CP) y el ADN-B a la proteína NSP (“nuclear shuttle protein”). Ambas proteínas unen a ADNcs que dan origen a ADNcd que actúa como intermediario para la transcripción y para la replicación del DNA viral. Los promotores de los genes tardíos son regulados por una proteína denominada AC2 o TrAP, la cual actúa por dos mecanismos: por des-represión en tejido vascular, y por activación en el mesófilo. En el caso del begomovirus TGMV. Los promotores CP y NSP fusionados a un gen reportero lo expresan en ausencia de TrAP si se elimina un silenciador que se encuentra ~1.2-1.5 Kpb corriente arriba del gen, en tanto que es activado por TrAP en mesófilo si están presentes ciertos elementos activadores cercanos al gen. Es importante que los genes *CP* y *NSP* no se expresen sino hasta que se haya acumulado suficiente ADNcs para no interferir con la replicación y la transcripción viral. Consecuentemente, los genes están inactivos en ausencia de TrAP. El ADN-A de PHYVV, tiene un promotor *CP* que es regulado por un silenciador, pero plantas transgénicas de tabaco que contienen el promotor NSP fusionado a GUS presentaron fuerte actividad del gen reportero en varios tejidos, en ausencia de factores virales. Para verificar esta observación realizamos experimentos de expresión transitoria *in planta*, agroinfiltrando en *N. benthamiana* varias construcciones con el promotor *NSP* fusionado a GUS. Por medio de esta metodología se verificó que el promotor *NSP* de PHYVV está activo en varios tejidos en ausencia de TrAP, confirmando las observaciones hechas independientemente en plantas transgénicas. Se discute sobre el significado funcional de esas diferencias. Se delimitó además una región de 259 pb del promotor *BV1/NSP* que responde a TrAP y que incluye varios elementos *cis*-reguladores que han sido implicados en la transactivación de los genes tardíos de begomovirus. El vector de expresión 35S::AC2-*nos* se utilizó para probar la capacidad de respuesta a AC2/TrAP de cuatro vectores derivados de pBI(-693)CP::GUS, que se utilizarán para delimitar con más precisión al hipotético silenciador del promotor CP de PHYVV, en plantas transgénicas. Todos los vectores mostraron clara respuesta a la agroinfiltración con el vector de expresión de TrAP.

PALABRAS CLAVE: regulación génica, genes tardíos, silenciador, transactivación.

Abstract

Analysis of responsive elements to the AC2 protein in promoters of the begomovirus PHYVV by methods of transient expression *in planta*.

The pepper huasteco yellow vein virus (PHYVV) is a member of the genus *Begomovirus* and an excellent model for studying basic viral processes. Its genome is composed by two single-stranded circular DNA (ssDNA) molecules, called DNA-A and DNA-B. PHYVV finely regulates the expression of its genes over time: early genes are expressed by plant factors, and late genes require viral proteins produced in the previous infective cycle stage. DNA-A codes for the coat protein (CP) and DNA-B for the nuclear shuttle protein NSP. Both proteins bind viral ssDNA that give rise to dsDNA that acts as an intermediate for transcription and replication of virus DNA. Promoters of late genes are regulated by a protein called AC2 or TrAP, which acts by two mechanisms: by derepression in vascular tissue, and by activation in the mesophyll. The *CP* and *NSP* promoters fused to a reporter gene express it in the absence of TrAP if a silencer that is ~ 1.2-1.5 Kbp upstream of the gene is not present, while it is activated by TrAP in mesophyll when certain activator elements are present close to the gene. It is important that the *CP* and *NSP* genes would not be expressed until enough ssDNA has accumulated in order to not interfere with viral replication and transcription. Consequently, late genes are not expressed in the absence of TrAP. PHYVV A-DNA has a CP promoter that is regulated by a tissue-specific silencer; however, in an unpublished study it was observed that transgenic plants containing the PHYVV *NSP* promoter fused to the *uidA* reporter gene exhibited strong GUS activity in several tissues, in the absence of viral factors. To verify this peculiar observation, we carried out transient expression experiments in planta, agroinfiltrating in *N. benthamiana* several constructions with the *NSP* promoter fused to GUS. By means of this methodology, it was determined that the PHYVV *NSP* promoter is strongly active in several tissues in absence of TrAP, thus confirming the perplexing observations in transgenic plants. The functional significance of those differences between the late genes of both genome components of PHYVV is broadly discussed. A 259 bp region of the *BV1 /NSP* promoter that is strongly responsive to TrAP and contains several *cis*-regulatory elements that have been implicated in the transactivation of begomovirus late genes was also delimited in this study.

The expression vector 35S::AC2-nos was also used to test the responsiveness to TrAP of four vectors derived from pBI(-693) CP::GUS, which will be used to more precisely delimitate the hypothetical silencer of the CP promoter of PHYVV, in transgenic plants. All vectors showed a clear response to agroinfiltration with the TrAP expression vector.

KEY WORDS: temporal gene regulation, late genes, transactivating protein, silencers.

**Parte 1. Análisis de elementos de respuesta a AC2/TrAP
en promotores del begomovirus PHYVV por métodos de
expresión transitoria *in planta***

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La familia de los geminivirus comprende importantes patógenos vegetales que causan pérdidas sustanciales en una gran variedad de cultivos de importancia económica, a nivel mundial. Los geminivirus infectan una amplia gama de especies vegetales (Rojas *et al.*, 2018). Estos virus son capaces de causar devastadoras enfermedades tanto a cultivos hortícolas y frutales (ej. calabaza, chile, tomate, papaya, maracuyá) (Vaca-Vaca *et al.*, 2012.; Inoue-Nagata *et al.*, 2016; Fontenele *et al.*, 2018), como a cultivos básicos para la alimentación (frijol, yuca, soya, maíz y otros) (Inoue-Nagata *et al.*, 2016; Carvajal-Yepes *et al.*, 2017; Moisés-Capenda da Rosa *et al.*, 2018), además de plantas ornamentales y productoras de fibras (Marwal *et al.*, 2018; Zaidi *et al.*, 2020). Los virus agrupados en esta familia son transmitidos por insectos succionadores de savia del orden Hemiptera, como la mosquita blanca, los saltahojas (“treehoppers”) y los pulgones.

Los geminivirus son virus no envueltos, muy pequeños (18 x 30 nm), cuyos genomas están compuestos por una o dos moléculas de ADN circular, de cadena sencilla (ADNcs), con un tamaño total que oscila de 2,6 a 5,4 kb, que codifican de cuatro a ocho proteínas en total, algunas de las cuales han evolucionado en proteínas multifuncionales para compensar el pequeño tamaño de sus genomas (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013; Fondong, 2013). Sus componentes genómicos están empacados en partículas icosaédricas geminadas, compuestas por 110 unidades de una sola proteína, la proteína de la cápside (CP, del Inglés) (Zhang *et al.*, 2001; Hesketh *et al.*, 2018). El nombre “geminivirus” fue acuñado por Harrison *et al.* (1977), dada la apariencia geminada de las partículas virales vistas al microscopio electrónico de transmisión, y deriva del término en latín *Geminis*, que significa “gemelos”. La replicación de estos virus ocurre en el núcleo de las células a través de un mecanismo de replicación por “círculo rodante” (RCR, del Inglés) aunque también tiene lugar un mecanismo de replicación dependiente de recombinación (Saunders *et al.*, 1991; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Preiss y Jeske, 2003). El pequeño número de proteínas codificadas por el genoma viral, no incluye ninguna ARN o ADN polimerasa, lo que determina que los geminivirus dependan casi por entero de la

maquinaria molecular del huésped para replicarse y expresar sus genes (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013). Los geminivirus transcriben sus genes bidireccionalmente, produciendo transcritos tanto de la cadena en el sentido del virión como de la cadena en el sentido complementario (Borah *et al.*, 2016).

1.1 Taxonomía y filogenia de los geminivirus

La familia *Geminiviridae* constituye el grupo de virus con genomas de ADNcs con más especies descritas hasta el presente, de acuerdo al **Comité internacional de taxonomía de virus** (ICTV, del Inglés) (Zerbini *et al.*, 2017). Esta familia se subdivide actualmente en 9 géneros y hay varias especies no asignadas todavía a un género definido (Tabla 1). La clasificación se basa en la organización genómica de sus miembros, las plantas que infectan (mono- o dicotiledóneas) y los insectos que los transmiten.

Tabla 1. Taxonomía de los geminivirus
<https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/9601>

Dominio	<i>Monodnaviria</i>
Reino	<i>Shotokuvirae</i>
Filo	<i>Cressdnaviricota</i>
Clase	<i>Repensiviricetes</i>
Orden	Geplafuvirales
Familia	<i>Geminiviridae</i>
Género (# de especies)	<i>Becurtovirus</i> (3) <i>Begomovirus</i> (424) <i>Capulavirus</i> (4) <i>Curtovirus</i> (3) <i>Eragrovirus</i> (1) <i>Grablovirus</i> (3) <i>Mastrevirus</i> (41) <i>Topocuvirus</i> (1) <i>Turncurtovirus</i> (3)

Especies no asignadas a géneros	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Citrus chlorotic dwarf associated virus</i> ▪ <i>Mulberry mosaic dwarf associated virus</i>
--	---

La Figura 1 muestra un árbol filogenético simplificado basado en las secuencias genómicas completas (o el componente genómico A, en el caso de begomovirus bipartitos) de especies representativas de geminivirus. En esa filogenia se observa el agrupamiento correspondiente a los nueve géneros. Este árbol ha sido presentado como una guía para describir similitudes relativas entre los grupos de geminivirus, ya que no es posible alinear todos los genomas representativos de los nueve géneros y de los aislados de geminivirus con secuencias muy divergentes. La recombinación entre especies, y miembros de diferentes géneros, ha jugado un papel importante en la evolución y diversificación de las especies virales representadas (Zerbini *et al.*, 2017).

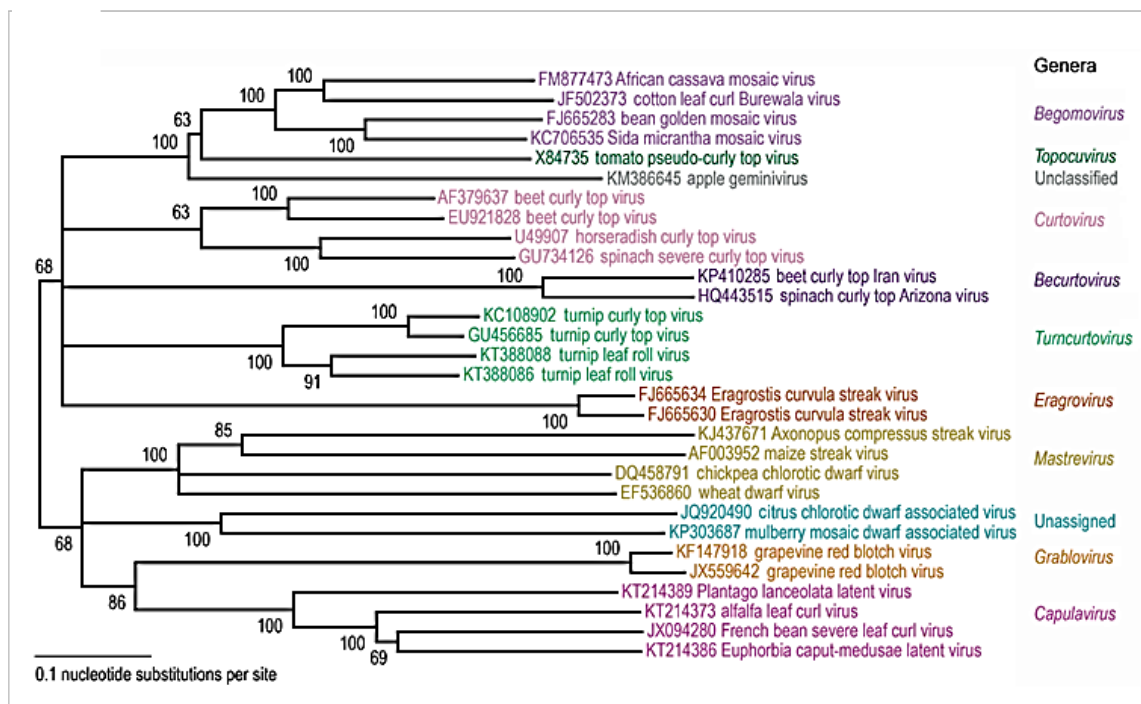


Figura 1. Árbol filogenético basado en las secuencias del genoma completo (ADN-A para geminivirus bipartitos) de aislados representativos de cada género de la familia *Geminiviridae*. Se puede observar la separación en los géneros actuales. El árbol no enraizado fue obtenido con el método Neighbor-Joining. Reproducido de Zerbini *et al.* (2017).

1.1.2. Género *Begomovirus*

Entre los géneros de la familia *Geminiviridae*, el de los *Begomovirus* conforma el subgrupo más diversificado y ecológicamente exitoso, con más de 400 especies descritas hasta el momento. El nombre de este género se deriva del nombre de su especie representativa, *Bean golden mosaic virus*.

Los begomovirus inducen diversos síntomas en sus hospederos, como enanismo y enrollamiento de las hojas, mosaicos amarillos o dorados, deformaciones foliares, malformación o ausencia de frutos. Estos virus, en conjunto, infectan una amplia gama de plantas dicotiledóneas aunque, individualmente, la mayoría tiene rangos de hospederos limitados (Rojas *et al.*, 2005). Los begomovirus son transmitidos por la mosquita blanca *Bemisia tabaci*, considerada un complejo de especies crípticas de hemípteros morfológicamente indistinguibles, de cerca de 1 mm de longitud (De Barro *et al.*, 2011). En los geminivirus la especificidad del vector depende de secuencias de aminoácidos específicas en la CP (Bridson *et al.*, 1990). Se sabe que algunos begomovirus se adaptan diferencialmente para una transmisión más eficiente por parte de los ecotipos locales de *B. tabaci*, pero esta evolución conjunta ha sido poco estudiada (Gilbertson *et al.*, 2015). Muy pocos begomovirus son transmisibles por inoculación mecánica, y la inmensa mayoría requiere para su transmisión del insecto vector. En el laboratorio la inoculación efectiva se logra por la transfección de ADN genómico clonado mediada por *Agrobacterium tumefaciens* o por biolística (Rojas *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2020).

Entre los geminivirus, solamente los que pertenecen al género *Begomovirus* incluyen especies que poseen dos componentes genómicos (bipartitas); los miembros de los géneros restantes poseen un solo componente genómico (monopartitas). En el caso específico de los begomovirus que poseen genomas bipartitas, las dos moléculas, de 2.5–2.7 kb cada una, se conocen como ADN-A y ADN-B (Figura 2).

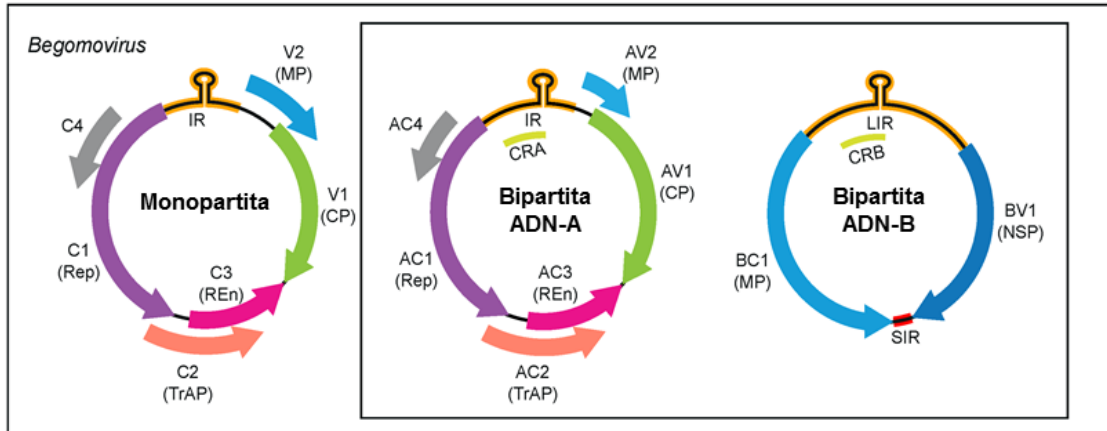


Figura 2. Organización genómica característica de los begomovirus. Se indican los marcos abiertos de lectura (ORF) que codifican para las diferentes proteínas virales (en colores), tanto en la cadena en el sentido del virión como en el sentido complementario. Se muestran también las estructuras de tallo-bucle dentro de la región intergénica y las regiones comunes en ambos componentes en los begomovirus bipartitas. Las proteínas y regiones se denotan por sus siglas en Inglés, **CRA** y **CRB**: regiones comunes A y B; **CP**: proteína de la cápside; **IR**: región intergénica; **MP**: proteína de movimiento; **NSP**: proteína lanzadera nuclear; **REn**: proteína potenciadora de la replicación; **Rep**: proteína asociada a la replicación; **SIR**: región intergénica corta; **LIR**: región intergénica larga; **TrAP**: proteína activadora de la transcripción. Adaptado del sitio https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/geminiviridae

El componente genómico A (**ADN-A**) y el genoma de los begomovirus del Viejo Mundo (VM) tienen una organización conservada de seis marcos de lectura abiertos (ORF, del Inglés): dos en la cadena del virión (denominados *V1* y *V2* en especies monopartitas y *AV1*, *AV2* en bipartitas) y cuatro en la cadena complementaria (*C1*, *C2*, *C3* y *C4* en monopartitas y *AC1*, *AC2*, *AC3* y *AC4* en bipartitas) (Figura 2). Por otro lado, el **ADN-B** de los virus bipartitas contiene dos ORFs, uno en cada sentido, *BC1* o gen *MP* (Movement protein, del Inglés), en la cadena complementaria; y *BV1* o gen *NSP* (Nuclear shuttle protein, del Inglés), en la cadena del virión (Brown *et al.*, 2012; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013). Los ORFs en las cadenas en el sentido del virión y en el sentido complementario están separados por la región intergénica (IR, del inglés). En los begomovirus bipartitas, el ADN-A se puede replicar autónomamente, pero requiere del componente B (ADN-B) para desarrollar una infección sistémica. Los componentes afines (“cognados”) de ADN-A y ADN-B comparten una secuencia de aproximadamente 200 pb de la IR. Esta región no codificante altamente conservada se denomina Región Común y contiene el origen de

replicación viral, que se caracteriza por un motivo de 9 nucleótidos conservado localizado en el ápice de una estructura potencial de tallo-bucle (“stem-loop”) (Figura 2) que actúa como el sitio de reconocimiento específico para que la proteína Rep, que es una endonucleasa específica de cadena sencilla, genere un “nick” en la cadena más (+), evento que inicia la replicación viral por un mecanismo de círculo rodante (Laufs *et al.* 1995).

En el caso específico de los begomovirus monopartitas, estos se encuentran asociados con frecuencia a moléculas satélites, que son de ADN de cadena sencilla (ADNcs) circulares de aproximadamente la mitad del tamaño del genoma del begomovirus asociado. Se han descrito tres clases de satélites circulares de ADN asociados con begomovirus: satélites beta, satélites alfa y satélites delta (Zhou, 2013; Lozano *et al.*, 2016). Las funciones de estos satélites se relacionan con la supresión de la respuesta de silenciamiento del huésped, un aumento de la virulencia y, en algunos casos, la diseminación viral (Cui *et al.*, 2005; Nawaz-ul-Rehman y Fauquet 2009; Fiallo-Olivé *et al.*, 2012; Lozano *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2017).

Los viriones de los begomovirus contienen una única proteína estructural, la CP, que encapsida el ADNcs y está involucrada también en el movimiento del DNA viral en los virus monopartitas. La proteína CP está codificada por el ORF V1/AV1, en la cadena del virión (Figura 2). No se han encontrado otras proteínas asociadas con los viriones (Goodman *et al.*, 1980; Zhang *et al.*, 2001). El resto de las proteínas codificadas en el genoma de begomovirus monopartitas están involucradas en la replicación del virus y la regulación de la expresión génica, en el movimiento intra-e intercelular del virus; así como en la supresión de las respuestas antivirales de la planta. La proteína AV2/V2, se ha relacionado con el movimiento en los virus del VM (Poornima-Priyadarshini *et al.* 2011) aunque evidencia más reciente demuestra que esa proteína funciona principalmente como un supresor del silenciamiento génico (Sharma *et al.*, 2010). En el sentido complementario se encuentran codificadas las proteínas: Rep (ORF AC1/C1), que es un iniciador de la RCR y una proteína multifuncional que interfiere con el ciclo celular y es esencial para la replicación del virus; TrAP (ORF AC2/C2), una proteína activadora de la transcripción de los genes tardíos y con múltiples funciones en el ciclo infectivo; REn

(ORF *AC3/C3*), una proteína potenciadora de la replicación; y la proteína *AC4/C4* (ORF *AC4/C4*), que está involucrada en la supresión de la respuesta de silenciamiento génico por parte del huésped (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013; Fondong, 2013). En el caso del **ADN-B** de begomovirus bipartitas, este contiene un ORF (*BV1* o gen *NSP*) en la cadena del virión, el cual codifica una proteína lanzadera nuclear, que hace posible el movimiento núcleo-citoplasma del ADN viral, mientras que el ORF *BC1* o gen *MP*, codifica una proteína de movimiento intercelular y para el movimiento sistémico del virus (Noueiry *et al.*, 1994; Sanderfoot y Lazarowitz, 1996) (Figura 2). En la tabla 2, se resumen las proteínas virales codificadas por los begomovirus y algunas de sus funciones.

Tabla 2. Resumen de las proteínas codificadas por el genoma de los begomovirus, y sus funciones.

Proteína	Gen	Tamaño (aa)	Función	Referencias
Rep	<i>C1/AC1/Rep</i>	345-361	-Inicia la replicación del ADN viral. - Regula la progresión del ciclo celular.	Arguello-Astorga <i>et al.</i> (2004) Hanley-Bowdoin <i>et al.</i> (2013)
TrAP	<i>C2/AC2/TrAP</i>	130	- Multifuncional -Transactiva la expresión de los genes en el sentido del virión (ADN-A y ADN-B). -Suprime la respuesta de silenciamiento transcripcional y postranscripcional de genes, por parte del hospedero. -Participa en la replicación	Sunter y Bisaro (1992) Hanley-Bowdoin <i>et al.</i> (2013)
REn	<i>C3/AC3/REn</i>	132	-Interactúa con reguladores del ciclo celular y es requerida	Settlage <i>et al.</i> (1996) Castillo <i>et al.</i> (2003)

			para una replicación eficiente del ADN viral.	
AC4	<i>C4/AC4</i>	87	-Determinante de síntomas implicado en el control del ciclo celular. -Contrarresta la respuesta del huésped a la expresión de Rep.	Lai <i>et al.</i> (2009) Hanley-Bowdoin <i>et al.</i> (2013) Ismayil <i>et al.</i> (2018) Li <i>et al.</i> (2018) Mei <i>et al.</i> (2018)
CP	<i>V1/AV1/CP</i>	254	-Forma la cápside viral -Participa en movimientos intra e intercelulares y en la transmisión a través de vectores.	Ward y Lazarowitz (1999) Rojas <i>et al.</i> (2001) Fondong (2013)
V2/AV2	<i>V2/AV2</i>	72	-Supresor del silenciamiento en virus del VM -Movimiento del virus en algunas especies.	Chowda-Reddy <i>et al.</i> (2008) Sharma <i>et al.</i> (2010) Glick <i>et al.</i> (2008) Poornima-Priyadarshini <i>et al.</i> (2011)
NSP	<i>BR1/BV1/NSP</i>	300	-Lanzadera nuclear que permite el tráfico de ADNcs viral entre el núcleo y el citoplasma	Noueiry <i>et al.</i> , (1994) Sanderfoot y Lazarowitz (1995)
MP	<i>BL/BC1/MP</i>	300	-Se localiza en la membrana plasmática y ayuda en el movimiento intra e intercelular del virus	Noueiry <i>et al.</i> (1994) Sanderfoot y Lazarowitz (1996) Lewis y Lazarowitz (2010)

Una observación interesante es que en la filogenia global de los begomovirus las especies se agrupan de acuerdo con su distribución continental (Briddon *et al.*, 2010) (Figura 3). Este hecho muestra, muy probablemente, la divergencia evolutiva surgida entre las especies por el aislamiento geográfico prolongado, a consecuencia de la separación de las masas continentales que formaban el supercontinente Gondwana (Briddon *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2013). La distribución geográfica de las especies de

begomovirus se refleja en sus relaciones filogenéticas, a pesar de la alta frecuencia de los eventos de recombinación entre ellas, y del aumento en el movimiento de plantas infectadas a través del orbe. Dentro del género existen al menos cinco grupos filogenéticos discernibles: 1) el grupo de los virus del Nuevo Mundo (NM), que incluye las especies nativas del continente americano; 2) los virus del clado del rizado foliar de la calabaza, SLCV, un linaje americano resultado de la recombinación de un virus del NM con un virus de identidad desconocida (Torres-Herrera *et al.*, 2019); 3) el extenso linaje del VM (África, Asia, Australia y Europa), tipificados por el virus bipartita ACMV (virus africano de la yuca) y el monopartita TYLCV (virus del rizado amarillo del tomate); 4) el clado de los "legumovirus" (Ilyas *et al.*, 2009), nativos del VM, y 5) el clado de los "sweepovirus, virus monopartitas que infectan a *Ipomoea batata* ("sweet potato" o camote) (Trenado *et al.*, 2011) (Figura 3). Los begomovirus del VM pueden poseer un genoma mono- o bipartita, contienen un ORF V2/ AV2 y, a menudo, se asocian con satélites alfa y/o beta (Nawaz-ul-Rehman y Fauquet, 2009). Los begomovirus del NM son en su mayoría bipartitos, carecen del ORF V2/AV2 y pueden asociarse con satélites alfa (pero hasta ahora no se ha demostrado asociación con satélites beta). Varios factores como la recombinación, pseudo-recombinación, sinergismo, mutaciones de distinto tipo (sustituciones y deleciones) y la transmisión por diversos ecotipos de *Bemisia tabaci*, han influido en la evolución de los begomovirus y sus satélites (Chakraborty *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2013; Melgarejo *et al.*, 2013; Nawaz-ul-Rehman y Fauquet, 2009, Kumar *et al.*, 2017; Kumar y Chakraborty, 2018).

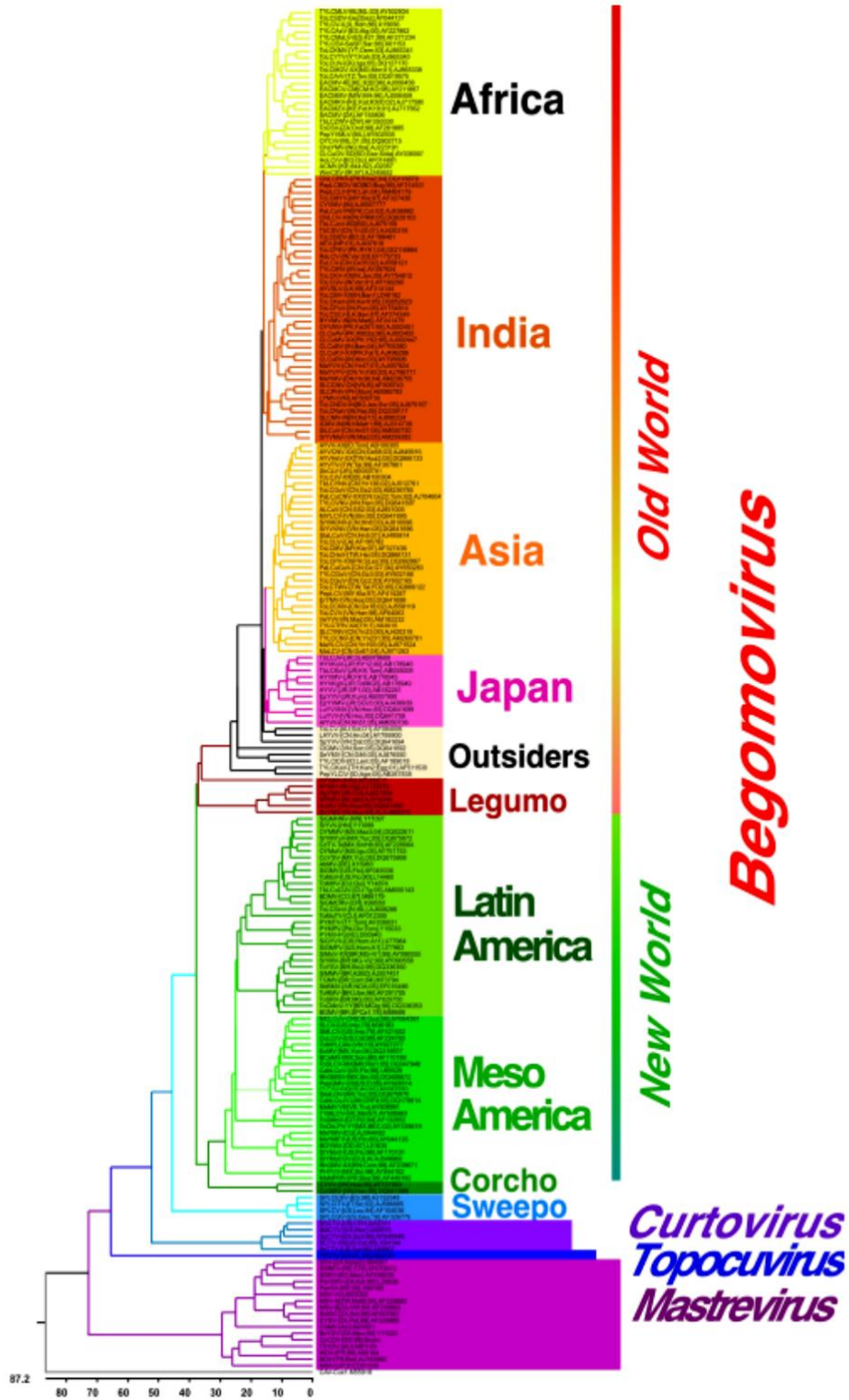


Figura 3. Árbol filogenético representando los clados de begomovirus. El árbol fue construido a partir de la comparación de las secuencias genómicas (o del ADN-A) de especies representativas de geminivirus. Reproducido de Briddon *et al.* (2010).

1.2 Replicación de geminivirus

La replicación de los geminivirus tiene lugar en el núcleo de la célula vegetal infectada, fundamentalmente por el mecanismo de RCR (Saunders *et al.*, 1991; Stenger *et al.*, 1991), aunque existe un mecanismo adicional de replicación dependiente de recombinación, que se da a la par con la RCR (Preiss y Jeske, 2003; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013). Cuando el insecto vector se alimenta de una planta introduce en las células del floema las partículas virales. Una vez en la célula la partícula viral se dirige al núcleo, a través de una señal de localización nuclear presente en la proteína CP. En el núcleo se desensambla la cápside, se libera el ADNcs viral en el nucleoplasma (Pooggin, 2013) y las ADN polimerasas del huésped sintetizan la cadena complementaria para generar un ADN de doble cadena (ADNdc); esta síntesis depende únicamente de factores del huésped (Saunders *et al.*, 1992; Hanley-Bowdoin *et al.* 2013). El intermediario de ADNdc es transcripcionalmente activo y constituye el sustrato indispensable para la RCR del genoma viral. Luego de la síntesis de la hebra complementaria, el ADNdc resultante se asocia con nucleosomas (Pilartz y Jeske, 1992; Pilartz y Jeske, 2003) y se transcribe por la ARN polimerasa II de la planta. La polimerasa II transcribe el minicromosoma viral en la orientación de la cadena complementaria para generar el ARN mensajero (ARNm) de Rep y otras proteínas que participan en la replicación, la transcripción y la supresión de las respuestas de defensa de la planta (Figura 4).

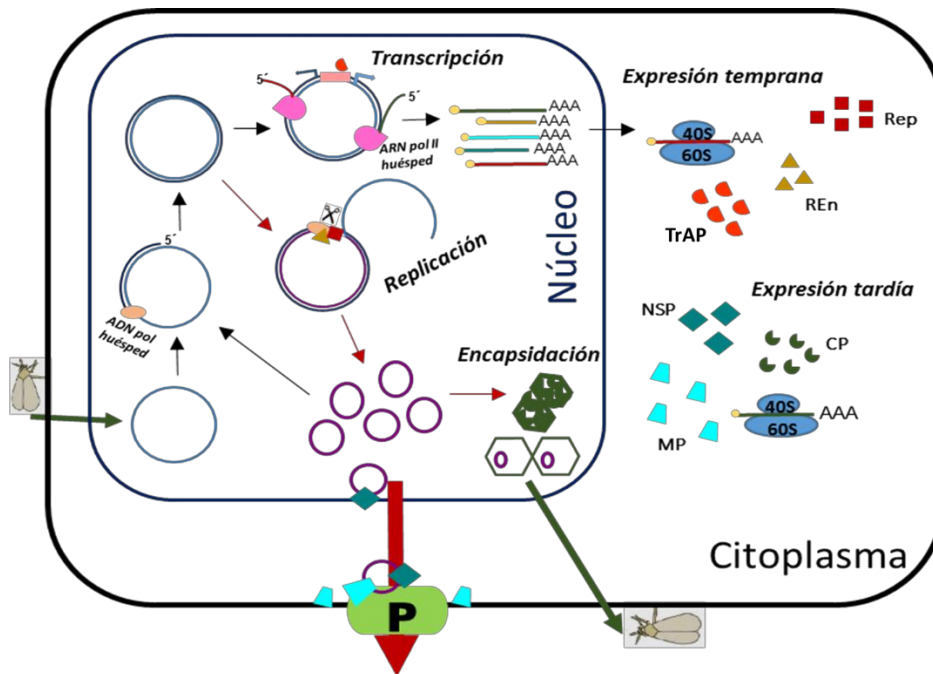


Figura 4. Representación esquemática del ciclo infeccioso de los geminivirus. Se detallan en el núcleo los procesos de formación del intermediario de ADNdc, la replicación, la transcripción y la encapsidación. Se representa por una flecha roja el transporte del material genético fuera del núcleo y hacia otra célula (a través de los plasmodesmos). En el citoplasma se simboliza el modelo de expresión génica de los geminivirus, dividido en dos etapas: temprana y tardía.

La síntesis de ADNcs del virus se inicia mediante un corte que realiza Rep en la cadena en el sentido del virión. Este corte ocurre cadena abajo inmediatamente después del residuo 3'-timidina en la secuencia conservada 5'-TAATATT↓AC-3' ubicada en el bucle o asa de la estructura tallo-bucle presente en la IR. (Fontes *et al.*, 1994; Laufs *et al.*, 1995). Como se mencionó con anterioridad, en el genoma de los geminivirus no está codificada una ADN polimerasa, de ahí que estos virus dependan totalmente de determinados factores del huésped que deben reclutarse desde las primeras etapas de la replicación. Después de una o más rondas de RCR se habrán sintetizado múltiples genomas virales a partir de una molécula de ADNcs complementario. Estos ADNcs pueden volver a entrar en el ciclo de replicación convertido en ADNcd o empaquetarse en viriones en etapas posteriores de la infección, cuando se expresa la proteína CP (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013). Como resultado de la RCR, se acumulan múltiples copias del genoma viral en el núcleo. La proteína NSP se une al ADN viral en el núcleo y lo

mueve de éste al citoplasma a través de los poros nucleares y, en asociación con la proteína MP, lo transporta luego a las células vecinas a través de los plasmodesmos (Figura 4).

1.3 Modelo de expresión temporal de genes en begomovirus.

La expresión de los genes virales se lleva a cabo de manera finamente regulada en el tiempo. La expresión temporal responde a una estrategia general de transcripción de los virus de ADN de plantas y animales, en la que los productos génicos tempranos activan la expresión de genes virales requeridos más tarde en el ciclo de la infección (Shimada-Beltran et al., 2007). La transcripción de los genes virales es bidireccional, a partir de la IR, con la generación de transcritos controlados independientemente (Sunter y Bisaro, 1989). Los geminivirus, al contener varios genes parcial o totalmente traslapados presentan un sistema de control transcripcional complejo (revisado por Borah *et al.*, 2016). Los ARNm son producidos por la ARN polimerasa II del huésped, y su subsecuente traducción da origen a las llamadas proteínas virales “tempranas” y “tardías”. Entre las proteínas tempranas destaca Rep, la proteína iniciadora de la replicación, esencial para el proceso de RCR (Gutiérrez *et al.*, 2004). La proteína REn, que también aparece tempranamente, actúa junto con Rep para iniciar la replicación viral. Al acumularse la proteína Rep reprime la transcripción de su propio gen al unirse a secuencias repetidas adyacentes a la caja TATA del promotor (Eagle *et al.*, 1994), lo que al mismo tiempo incrementa la expresión del gen contiguo, C2/AC2, que codifica a la proteína TrAP (Shung y Sunter, 2009). Cuando Rep reprime su propia expresión, la síntesis de los transcritos más cortos que codifican a TrAP y REn se mantiene a un alto nivel o es incluso reforzada. En esta etapa MP empieza a ser expresada. La expresión de TrAP se mantiene ya que se requiere como un determinante de patogenicidad y un potenciador de la susceptibilidad del huésped. Entonces, en la fase más tardía de la infección TrAP activa la expresión de los genes *AV1* y *BV1*.

La proteína TrAP/AC2/C2 o proteína activadora de la transcripción, es una proteína de 129-138 residuos aa en longitud, que está estructuralmente bien conservada en todos los begomovirus. En el caso mejor estudiado, el del virus del mosaico dorado del tomate

(TGMV) se distinguen tres dominios en la proteína: una región amino-terminal básica (residuos aa 13-28), una señal de localización nuclear (dominio 17-31) y una región acídica en la región C-terminal (aa 115 -129), en la que se distingue un dominio de activación transcripcional (aa 115-129) (Hartitz *et al.* 1999). La región central de TrAP (aa 36 a 53) contiene un dominio de tipo dedos de zinc. Se sabe que TrAP une zinc y es una diana para fosforilación (Wang *et al.*, 2003). Aunque esta proteína exhibe algunas características típicas de un factor transcripcional tales como un dominio de activación de tipo acídico (Hartitz *et al.*, 1999), localización tanto en el núcleo como en el citoplasma de células de *Nicotiana benthamiana* infectadas (Wang *et al.*, 2003) y capacidad de dimerizarse o multimerizarse, TrAP no es realmente un factor transcripcional “clásico” (Yang *et al.*, 2007). Se ha mostrado que C2/AC2/TrAP no se une de manera específica al ADN (Hartitz *et al.*, 1999) y por lo tanto reconoce sus sitios diana en los promotores de manera indirecta, a través de interacciones con factores transcripcionales de la planta. TrAP interactúa con varios factores del huésped tanto en el núcleo como en el citoplasma, debido a las múltiples funciones que desarrolla. Entre estas funciones pueden contarse: la supresión de algunas respuestas de defensa de la planta, incluyendo tanto el silenciamiento génico transcripcional (TGS, del Inglés) como postranscripcional (PTGS) (revisado en Guerrero *et al.*, 2020). Por ejemplo, TrAP aparentemente contribuye a suprimir el TGS al reprimir la actividad de la ADK (adenosín-kinasa), una enzima involucrada en la producción de S-Adenosilmetionina (SAM) (Wang *et al.*, 2003). La interferencia del sistema de ubiquitinación de la célula o de las vías del ácido jasmónico y el ácido siálico por TrAP son ampliamente revisados en Hanley-Bowdoin *et al.* (2013) y Guerrero *et al.* (2020). Las interacciones con factores de la planta están en el centro de los procesos de transactivación de la expresión de los genes tardíos, que codifican para la proteína de la capsida, CP, y las de movimiento NSP y MP (Figuras 4 y 5) (Lacatus y Sunter, 2008; Berger y Sunter 2013; Cantú-Iris *et al.*, 2019).

La regulación temporal de la expresión del gen CP es crítica para un ciclo infeccioso eficiente, ya que debe existir un balance muy preciso de intermediarios de ADNcd derivados del ADNcs producido por la RCR. Dado que los intermediarios de ADNcd son unidos por histonas para formar minicromosomas que son transcripcionalmente activos, y necesarios para generar más ADNcs a través de la RCR, es importante que los niveles

de ADNcs se mantengan altos para optimizar la generación de minicromosomas, y con ello la de las proteínas que interfieren las respuestas antivirales de la planta. Si el gen *CP* se expresa prematuramente, se favorece el secuestro de ADNcs en viriones y por lo tanto se disminuye globalmente la replicación y la fuente de transcritos para sintetizar supresores de silenciamiento y otras proteínas que evitan que la planta pueda responder eficazmente al ataque viral, lo que conduciría al aborto de la infección.

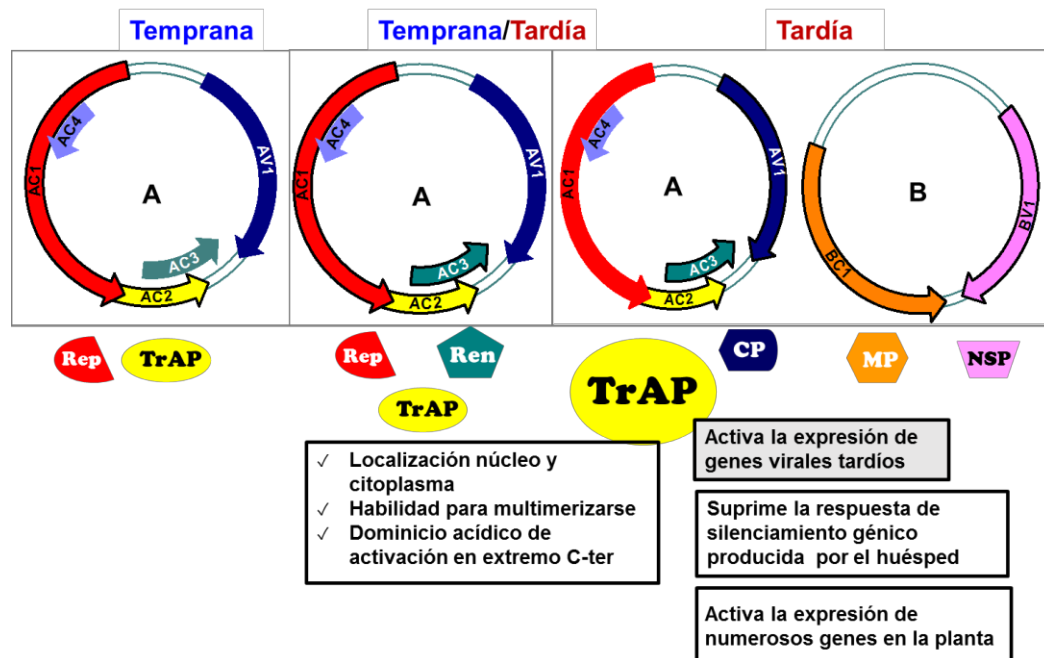


Figura 5. Modelo de expresión propuesto para el virus huasteco de las venas amarillas del chile (PHYVV). En la fase temprana del ciclo infeccioso se expresan las proteínas Rep y TrAP. Más tarde en la fase temprana aparece REn. En el comienzo de la fase tardía empieza a expresarse NSP y MP y finalmente CP. La proteína TrAP juega un papel fundamental en este proceso. Adaptado de Shimada-Beltrán y Rivera-Bustamante (2007).

1.4. Promotores de los genes tardíos CP y BV1

La IR contiene múltiples elementos de secuencia que participan en la replicación viral y la regulación de la expresión de los genes en el sentido del virión y el sentido complementario (Argüello-Astorga *et al.*, 1994; Monsalve-Fonnegra *et al.*, 2002). La IR contiene elementos reguladores de al menos dos importantes unidades transcripcionales

divergentes, que en el caso del componente genómico A incluyen a los promotores de los genes que codifican para CP y Rep. El promotor de AC2/C2 no reside en la IR sino en una región corriente abajo. En efecto, Shung y Sunter (2009) analizaron la expresión de AC2 y AC3 en TGMV y encontraron que dos ARNm que inician dentro de la región codificante de AC1, los transcritos AL-1935 y AL-1629, contienen los ORFs AC2 y AC3, pero la proteína TrAP se expresa solamente de AL-1629, en tanto que REn se expresa de ambos mensajeros, a través de mecanismos no bien comprendidos.

El estudio de la regulación de los genes tardíos, especialmente AV1 y BV1 ha revelado que el control de su expresión es complejo e involucra a TrAP y a varios factores transcripcionales de las plantas. En estudios que han utilizado plantas transgénicas que contienen construcciones del promotor de AV1 unido a un gen reportero, se ha demostrado que TrAP induce la expresión de este gen por diferentes mecanismos: por activación en células del mesófilo, y por desrepresión en tejidos vasculares (floema). Esto ha sido demostrado claramente en el caso de los begomovirus TGMV (Sunter y Bisaro, 1997) y el virus del rizado foliar de la col (CbLCV) (Lacatus y Sunter, 2008).

La secuencia mínima requerida para la activación del promotor AV1 de TGMV en el mesófilo de las plantas se encuentra entre los nucleótidos -125 y -60 pb cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción de AV1 (Sunter y Bisaro, 2003). En cambio, las secuencias que contienen el elemento represor (silenciador) se localizan entre 1.2 y 1.5 Kpb cadena arriba del sitio de inicio de AV1 (Sunter y Bisaro, 1997). Esa región de ~300 pb con propiedades silenciadoras contiene la mayor parte del ORF AC2 y parte de AC3, y no presenta elementos de secuencia en común con la región de activación del promotor. El promotor de CbLCV también contiene una secuencia con propiedades de silenciador que es homóloga a la de TGMV pues abarca secuencias de los genes AC2 y AC3. Esta separación de secuencias activadoras y represoras en el promotor AV1 de TGMV y de CbLCV es congruente con la observación de que ambas regiones interactúan con diferentes factores de la planta, lo que fue determinado por ensayos de cambio de movilidad electroforética usando extractos nucleares de *Nicotiana benthamiana*, espinaca y tomate (Lacatus y Sunter, 2008). En cambio, ensayos de inmunoprecipitación demostraron que ambas regiones, las activadoras y las represoras, son reconocidas y unidas por TrAP, lo que indica que este factor viral interactúa con diferentes factores de

la planta en regiones promotoras funcionalmente diferentes (Lacatus y Sunter, 2008). En el caso de las regiones con función activadora, existe clara evidencia de que TrAP interactúa directamente con el factor transcripcional PPD2, y que este factor reconoce secuencias dentro de las regiones de activación del promotor de AV1 de los virus antes mencionados (Lacatus y Sunter, 2009) (Figura 6).

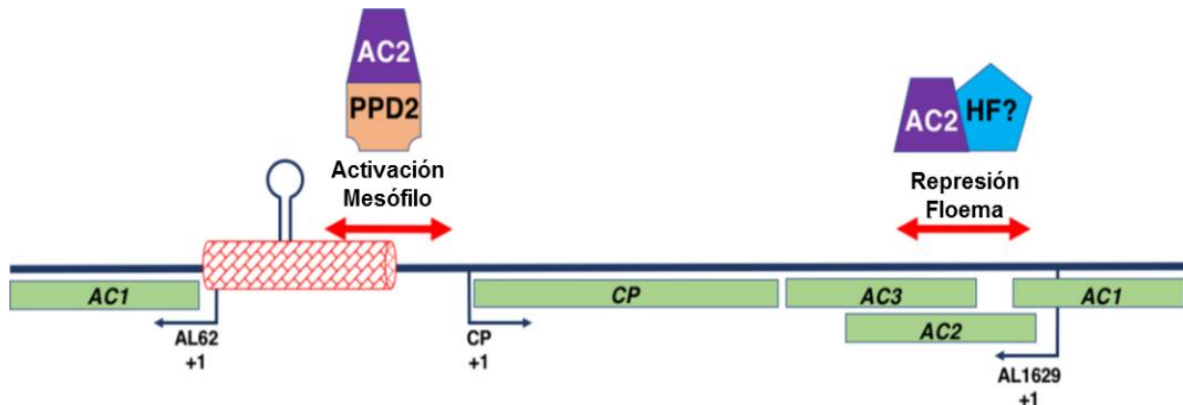


Figura 6. Esquema de la interacción de AC2/TrAP con factores del huésped y el genoma de *Begomovirus*. La figura representa un genoma de ADN-A de begomovirus, bicatenario y lineal. Los ORFs de AV1/CP, AC2/TrAP y AC3/Ren se muestran con cuadros de color verde claro, junto con el ORF de AC1/Rep, que aparece dividido en dos. Mediante flechas negras se indican los sitios de inicio (+1) de la transcripción para los transcritos de sentido viral (CP) y complementario (AL62 y AL1629). La región intergénica (cuadro rojo), contiene el origen de replicación, incluida la horquilla y su secuencia de bucle invariante. Con flechas rojas dobles se muestran las regiones del genoma implicadas en la activación (en el mesófilo) y la desrepresión (en el tejido del floema) mediada por AC2. A la izquierda, un complejo AC2-PPD2 se une a la secuencia del promotor de CP implicada en la activación mediada por AC2. A la derecha, se representa el complejo de AC2 con un factor desconocido (HF?, que probablemente es un factor transcripcional del huésped) para mediar en la des-represión. Adaptado de Guerrero *et al.* (2020).

Estudios análogos del gen tardío *BV1* de TGMV localizaron un segmento de 108 pb en la región proximal del promotor que es necesario y suficiente para la activación mediada por TrAP del mismo. La secuencia tiene un arreglo bipartita, con dos elementos localizados entre los nucleótidos -144 a -77, y -59 a -36 (respecto al inicio de la transcripción) cuya integridad se requiere para la respuesta de activación mediada por TrAP. Las secuencias antes mencionadas unieron proteínas nucleares de *Arabidopsis thaliana*, espinaca y tomate. El fragmento -144 a -36 también unió al factor PPD2 purificado de *Arabidopsis*, en ensayos de cambio de movilidad electroforética, sugiriendo que podría interactuar con TrAP de la misma manera que en los promotores de *AV1*

(Berger y Sunter, 2013). Una observación que enfatiza la similitud funcional del promotor *BV1* con la región equivalente del gen *AV1* es que plantas transgénicas de *Nicotiana benthamiana*, portadoras de una construcción del promotor *BV1* truncado en la posición -445 y fusionado al gen reportero *uidA(GUS)*, expresaron una fuerte actividad de GUS (determinada por tinción histoquímica) en los tejidos vasculares de las hojas y el tallo, en ausencia de cualquier proteína viral. De modo interesante, las plantas también expresaron GUS en mesófilo u otros tejidos al ser infectadas, siendo en este sentido muy similares a las plantas transgénicas con promotores *AV1* truncados, de TGMV (Sunter y Bisaro, 1997), CbLCV (Lacatus y Sunter, 2008) y PHYVV (Monsalve-Fonnegra *et al.*, 2002); que también expresan el gen reportero a niveles elevados en ausencia de TrAP. Estas observaciones sugieren que el promotor *BV1* de TGMV también podría activarse durante la infección por desrepresión en el tejido vascular, y activación en mesófilo (lo cual no ha sido demostrado todavía) por activación mediada por factores transcripcionales presentes en ese tejido (Berger y Sunter, 2013).

1.4.2. Promotores de genes tardíos de PHYVV

Observaciones análogas a las anteriormente descritas se han hecho en otro begomovirus modelo, PHYVV (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999). Plantas transgénicas de tabaco portadoras de una construcción en la que el promotor *AV1* truncado en la posición (-693) se fusionó a *uidA(GUS)* dirigió una alta expresión del gen reportero en tejidos vasculares, como las nervaduras de las hojas y los haces vasculares del tallo, en ausencia de factores virales (Monsalve-Fonnegra *et al.*, 2002). En el mismo estudio se determinó que la inclusión del ADN-A completo como promotor *AV1* fusionado al reportero *uidA(GUS)*, eliminó la actividad del reportero en ausencia de una fuente de TrAP, indicando la existencia de un silenciador del promotor corriente arriba de la posición (-693) (Ruiz-Medrano, 1996). Esa observación conduce a la hipótesis de que el silenciador de PHYVV se localiza en la región homóloga a la del silenciador de TGMV, que incluye secuencias de los genes *AC2* y *AC3*, que también se encuentran en la región silenciadora de CbLCV (Lacatus y Sunter, 2008).

Argüello-Astorga *et al.*, (1994) analizaron la IR de múltiples begomovirus buscando motivos de secuencias que estuvieran altamente conservados en los promotores de los genes tardíos (*AV1* y *BV1*) y podrían desempeñar un papel en su actividad modulada por TrAP. Sobre esta base, los autores postularon que algunas secuencias (consenso: GTGGTCCC) a las que llamaron elementos conservados tardíos (CLEs) podrían ser elementos de respuesta a TrAP. Posteriormente, Ruiz-Medrano *et al.* (1999) describieron evidencias experimentales que apoyan la participación de los CLEs en la transactivación del promotor del *AV1* en el ADN-A del PHYVV. En un estudio más reciente, Cantú-Iris *et al.* (2019) reportaron que plantas de tabaco transgénicas con multímeros sintéticos del CLE (3 ó 6 copias) fusionados al promotor mínimo 35S de CaMV (-46 a +8) y unido al gen *uidA(GUS)*, expresaron al gen reportero en el mesófilo pero no en tejido vascular, en ausencia de factores virales. Esta observación indica que el CLE es sitio de unión de al menos un factor transcripcional de acción positiva presente en las células del mesófilo. La actividad de los promotores sintéticos correlacionó con el número de copias del CLE, sugiriendo un efecto aditivo, el cual había sido previamente observado por Cazonelli *et al.* (2005). En el mismo estudio se analizó el promotor *AV1* truncado (-125/+1) de TGMV, que fue previamente identificado como una secuencia mínima que es activada por TrAP (Sunter y Bisaro, 2003), la cual contiene el único CLE canónico de dicho promotor. En experimentos de expresión transitoria en protoplastos de tabaco, se pudo mostrar que la mutación del CLE en el promotor (-125/+1) fusionado a *uidA(GUS)* abolió la respuesta transcripcional a TrAP, en tanto que la adición de un CLE inmediatamente arriba del promotor (-125/+1) incrementó la respuesta al transactivador por un factor de cuatro (Cantú-Iris *et al.*, 2019), indicando de ese modo que el CLE es un elemento de respuesta a TrAP, entre otros elementos potenciales. El estudio de los promotores de PHYVV ha sido más bien limitado, aunque se ha logrado establecer que existe un elemento de respuesta a TrAP en la región (-115/+1) del ADN-A, pues plantas transgénicas de tabaco con esa corta región promotora fusionada a *uidA(GUS)* no expresaron el reportero en ausencia de factores virales, pero lo expresaron a niveles elevados cuando las hojas fueron bombardeadas con el ADN-A de PHYVV como una fuente de TrAP (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999). Esta pequeña región incluye dos elementos de tipo CLE estrechamente asociados a la caja TATA del promotor de *AC1*. Por otra parte, como se mencionó antes,

plantas transgénicas con un promotor *AV1* de PHYVV truncado en la posición (-693) expresan el gen reportero en tejidos vasculares pero no en mesófilo, en ausencia de TrAP, lo que sugiere que al igual que otros begomovirus el control de la actividad del promotor *AV1* podría involucrar la actividad de un silenciador y un mecanismo de desrepresión en tejido vascular, y por otro lado, un mecanismo de activación en mesófilo (Monsalve-Fonnegra *et al.*, 2002).

Por lo que respecta a los promotores del componente genómico B de PHYVV, estos parecen funcionar de manera diferente a los de TGMV, ya que plantas transgénicas de tabaco con promotores *BC1* y *BV1* fusionados a *uidA(GUS)* expresaron al gen reportero a niveles elevados tanto en el mesófilo así como en el tejido vascular, en ausencia de proteínas virales (Ruiz-Medrano, 1996; Ruiz-Medrano y Rivera-Bustamante, datos no publicados), en contraste con lo observado con el promotor *BV1* de TGMV, que solo expresan el gen reportero en tejido vascular (Berger y Sunter, 2013) y no en el mesófilo. La actividad del promotor de *CP* en ausencia de factores virales también se ha observado en plantas transgénicas que portan una construcción *CP::GUS* del curtovirus del rizado de la punta de la espinaca, SpiCTV (Rao y Sunter, 2012; Guerrero *et al.*, 2020), lo que sugiere que este gen se expresa sin un control temporal, a diferencia de lo observado en begomovirus, lo que los mismos autores consideran una observación paradójica, si se toma en cuenta el impacto funcional que la expresión prematura de ese gen tardío tendría para la acumulación de ADNcs y la formación de nucleosomas transcripcionalmente activos (Rao y Sunter, 2012). Esto plantea un problema especial que obliga a buscar explicaciones plausibles acerca de cómo se evita el efecto negativo que la expresión prematura de *CP* podría tener sobre el ciclo infeccioso. Los autores sugieren que de alguna manera se debe mantener el patrón de regulación temporal de la expresión de *CP* en curtovirus, pero no proponen hipótesis específicas al respecto (Rao y Sunter, 2012) Más allá de observar la activación en ausencia de factores virales de los promotores *BC1* y *BV1* de PHYVV en plantas transgénicas de tabaco, el estudio detallado de esos promotores no ha sido abordado a la fecha, aunque se observan en ellos algunas características estructurales que los hacen atractivos como objeto de investigación. Por ejemplo, el análisis *in silico* de la IR del ADN-B de PHYVV revela una subregión en la que

se concentran cuatro CLEs en un segmento de 90 bp cercano al ORF de *BV1*, y en cambio no existe ninguno de esos elementos en la región cadena arriba del ORF de *BC1* que precede al elemento tallo-bucle. Esa observación es congruente con la hipótesis de que los elementos de respuesta a TrAP podrían ser compartidos por ambos genes del ADN B, como se determinó que ocurre en el caso del virus asiático del mosaico amarillo del frijol mungo (MYMV, del Inglés) (Shivaprasad *et al.*, 2005).

Esa característica distintiva identificada en el análisis *in silico* del componente genómico B, y la existencia de datos sobre la actividad atípica de los promotores de *BV1* y *BC1* de PHYVV en plantas transgénicas de tabaco (Ruiz-Medrano, 1996) hacen de este begomovirus un modelo interesante para delimitar y caracterizar funcionalmente elementos transcripcionales (potenciadores y/o silenciadores) implicados en el proceso de regulación de los genes tardíos en el ADN-B.

Justificación

Varias cuestiones relativas al control transcripcional de los genes tardíos de begomovirus pueden ser respondidas por metodologías de expresión transitoria *in planta*. Estos métodos se basan en la capacidad de *Agrobacterium tumefaciens* para transferir con alta eficiencia un segmento definido de ADN (T-DNA) al núcleo de las células vegetales cuando son infiltradas en los tejidos de las plantas (Gelvin, 2003). La expresión transitoria de genes reporteros presentes en el T-DNA de plásmidos binarios se ha utilizado ampliamente para demostrar y optimizar la transferencia de ADN a las células vegetales como requisito previo para el desarrollo de plantas transgénicas. Sin embargo, la expresión transitoria de genes heterólogos codificados en el T-DNA también se reconoce como una herramienta de investigación útil en sí misma, por sus ventajas sobre los métodos de transformación de protoplastos, o la transformación estable directa (Jones *et al.*, 2009). Un ejemplo de su empleo exitoso lo constituye el trabajo de Berger y Sunter (2013), en el cual analizaron la expresión transitoria *in planta* por la técnica de agroinfiltración, para delimitar elementos de respuesta a TrAP en el promotor de *BV1* de TGMV. Consecuentemente, en este trabajo, decidimos utilizar esas técnicas de expresión

transitoria por agroinfiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana*, para mapear dominios de respuesta a TrAP en los promotores de los genes del ADN-B de PHYVV. Adicionalmente, nos interesó determinar si esta metodología permitía corroborar el intrigante hallazgo de que los promotores del ADN-B dirigen una expresión elevada de genes reporteros en mesófilo, en ausencia de factores virales, lo cual es una observación difícil de conciliar con la regulación temporal de los genes virales. En relación con este último proceso, nos interesó determinar si el promotor de *BV1* de PHYVV es regulado por un elemento silenciador, como el que se encuentra en la región codificante del ADN-A del mismo virus.

Por otra parte, considerando que dispondríamos de un vector para expresar la proteína TrAP de PHYVV, decidimos examinar una serie de vectores binarios previamente generados, con los que se pretende delimitar con mayor precisión los elementos silenciadores del promotor de *AV1* de PHYVV. Si bien estos vectores fueron diseñados para examinarse en plantas transgénicas, en las que es posible estudiar la activación o represión tejido-específica, decidimos examinarlos de modo preliminar mediante métodos de expresión transitoria a fin de constatar su capacidad de respuesta al transactivador viral.

Objetivo General del Estudio

Determinar, mediante ensayos de expresión transitoria por agroinfiltración, la existencia de dominios funcionales que responden al transactivador AC2/TrAP en la región intergénica y regiones codificantes de los componentes genómicos de PHYVV.

Objetivos específicos

- 1-** Definir segmentos de la IR del ADN-B que sean altamente reactivos al transactivador viral de PHYVV, y analizar su composición.
- 2-** Comprobar si los promotores *BC1* y *BV1* de PHYVV presentan una actividad independiente de AC2 en mesófilo y otros tejidos, como se observó en un estudio previo no publicado.

3- Determinar si en el componente genómico B existe un elemento silenciador análogo al que se encuentra en el componente genómico A.

4- Examinar la capacidad de respuesta a TrAP de una serie de vectores binarios diseñados para estudiar la región homóloga del silenciador del gen *CP* de TGMV en PHYVV.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

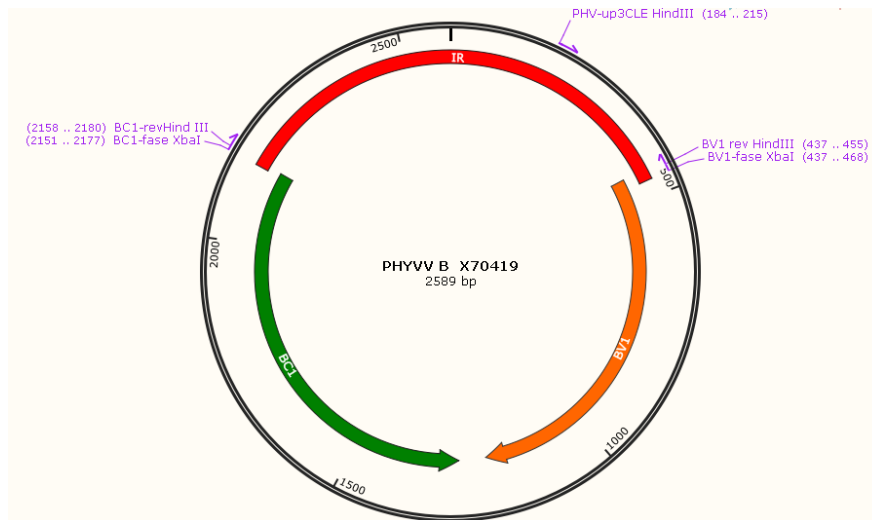
2.1 Generación de construcciones con promotores de genes tardíos fusionados a GUS

A partir de una clona monomérica del ADN-B de PHYVV (GenBank: X70419.1) se llevaron a cabo reacciones de PCR para amplificar segmentos específicos de la IR de ese componente genómico. Para la amplificación se utilizaron tres combinaciones de iniciadores (Tabla 3, Figura 7A) que se diseñaron con el fin de introducir en los productos amplificados sitios de restricción para las endonucleasas *Hind* III y *Xba* I (Tabla 3).

Tabla 3. Iniciadores diseñados para amplificar fragmentos de la región intergénica en el ADN-B y el gen AC2 (TrAP) en el ADN-A del PHYVV.

Nombre del iniciador	Secuencia	Temperatura de hibridación	Talla del fragmento (pb)	Nombre del fragmento
BV1-FaseXba I	5'GTCTAAATCTAGAAGAATACATATTTAAAT TGC 3'	58°C	259	(-259)BV1
PHV-up3CLE Hind III	5'CTCAAGCTTCTCCACCATTCTGAAWCG TTAGATA3'			
BV1-FaseXba I	5'GTCTAAATCTAGAAGAATACATATTTAAAT TGC 3'	55°C	900	(-900)BV1
BC1-Fase XbaI	5'CAATCTAGAATCCATATATGAAAATTTGG CAGCG3'			
BV1-FaseXba I	5'GTCTAAATCTAGAAGAATACATATTTAAAT TGC 3'	55°C	894	(-894)BC1
BV1-revHind III	5'TCAAGCTTAGAAGAATACATATTTAAATTG C3'			
PHC2F 35S-XbaI	5'ACTAGATCTGCGAAGAGAAAAATAGGAG CCTCAATGgCTGGGTCC-3'	55°C	442	gTrAP
PHC2R 35S-SacI	5'AATGAGCTCCTATTTAAGTAAATCTGCCC AG3'			

A)



B)

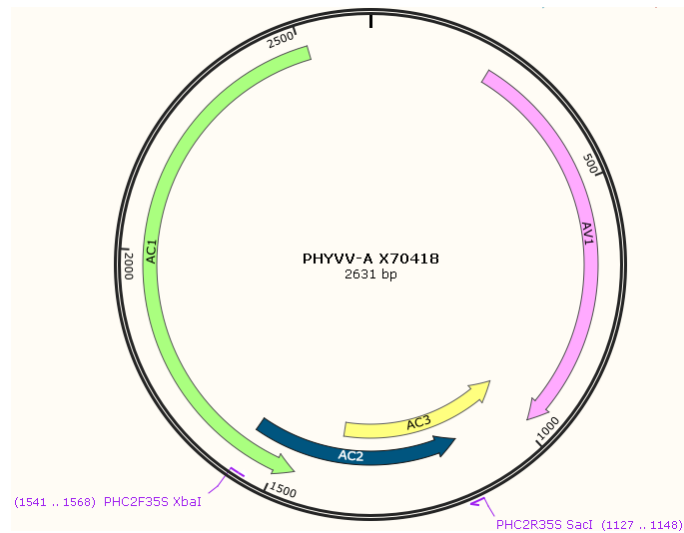


Figura 7. Mapa con la ubicación de los iniciadores para amplificar fragmentos de los componentes genómicos de PHYVV. A: iniciadores para amplificar fragmentos de la IR del ADN-B. **B:** iniciadores para amplificar el gen AC2

El fragmento denominado (-900)BV1 es una región de poco menos de 900 pb que comprende toda la IR, incluyendo por tanto a la caja TATA del promotor de *BV1*, un módulo de 90 pb que contiene cuatro CLEs (uno de ellos asociado a una caja G),

localizado en la región proximal al ORF BV1 (Figura 8), varios elementos reguladores putativos descritos en promotores de plantas y el origen de replicación (*Ori*) viral. El fragmento (-259)BV1 corresponde a una región de 259 pb que contiene básicamente a la caja TATA del promotor de BV1 y el módulo de cuatro CLEs asociado a una caja G. En el caso del fragmento (-894)BC1, este es una región de cerca de 900 pb de la IR, prácticamente idéntica a (-900)BV1, sólo que en sentido opuesto, pues tiene los sitios para el corte por enzimas de restricción) de manera invertida respecto a (-900)BV1 (para realizar la fusión traduccional con el gen reportero *GUS*), ya que se analizará como promotor *BC1*, en el extremo opuesto de la región intergénica del ADN-B.

Los productos de PCR fueron clonados en pGEM-T Easy y secuenciados. Posteriormente fueron digeridos con *Hind* III y *Xba* I y se utilizaron para sustituir al promotor 35S de CaMV (p35S) en el plásmido binario pBI121 (GenBank # AF485783.1) previa digestión *Hind* III-*Xba* I, para producir los plásmidos pBI(-900)BVI:*GUS* y pBI(-894)BC1:*GUS*, en los que los promotores de PHYVV están fusionados al gen reportero *uidA(GUS)*. En el caso del fragmento (-259)BV1, no se logró obtener directamente el vector binario, por lo que fue necesario reemplazar el promotor 35S por el promotor (-259)BV1 en el módulo de expresión 35S::*GUS*-nos derivado de pBI121, previamente subclonado en pBlueScript-KS⁺ (pBS). A partir de la clona en pBS, el módulo (-259)BV1::*GUS*-nos fue transferido como un fragmento *Hind* III-*EcoR* I al vector pCAMBIA300 (CAMBIA, Australia), generando el plásmido pCA (-259)BV1:*GUS*. Un esquema de las construcciones finales que portan los vectores binarios se ilustra en la figura 8.

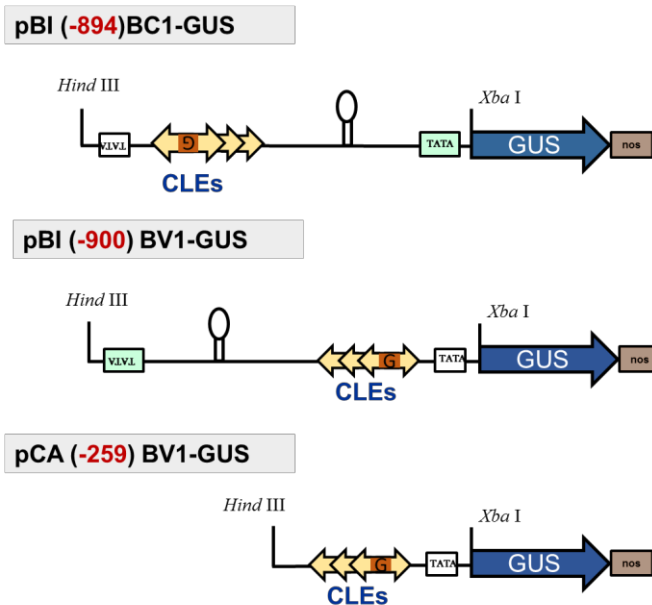


Figura 8. Esquema de los casetes de expresión contruidos con los fragmentos de la IR como promotores de BC1 y BV1. Aparecen señaladas en un cuadro blanco y otro verde las cajas TATA del promotor de BV1 y BC1, respectivamente. También se indican la estructura tallo-bucle y el arreglo de CLEs con una caja G traslapada. Los fragmentos de la IR clonados se obtuvieron por PCR.

2.2. Generación del vector de expresión del transactivador (AC2/TrAP) de PHYVV

Para generar el plásmido que sería la fuente de TrAP se amplificó el gen AC2 a partir de una clona monomérica del ADN-A de PHYVV. Los iniciadores se diseñaron a partir de la secuencia publicada del ADN-A (# acceso GenBank: X70418.1) y se sintetizaron con modificaciones para introducir sitios *Sac* I y *Xba* I en los productos de PCR, para facilitar su subclonación (Tabla 3; Figura 7B). La mezcla de reacción de PCR contenía ~100 ng del monómero del ADN-A de PHYVV, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 0.4 μM de cada iniciador, 1X de Taq Platinum DNA Polymerase Buffer (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) y agua libre de nucleasas (Promega, Madison, WI, EE.UU.) para obtener un volumen final de 25 μL. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C durante 3 min, 35 ciclos a 94°C durante 1 min, hibridación a 55 °C, durante 1 min y 72°C durante 1 min, seguido de una etapa de extensión final de 72°C por 7 min. Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (1%)

durante 45 min a 100 V en tampón TAE 1X. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio 0.5 mg/mL por 10 min. La visualización se realizó bajo luz ultravioleta y el gel fue documentado con el equipo UVP BioImaging System (UVP, Canadá). La presencia de la banda esperada y la cantidad de producto de PCR se evaluó comparando con el marcador de peso molecular 2log de NEB (New England).

El amplicón del gen AC2 se purificó por medio del estuche comercial Wizard SV (Promega Corp., Madison, WI), según las recomendaciones del proveedor. El fragmento purificado se clonó en el vector pGEM-T Easy (Promega Corp., Madison, WI) de acuerdo con el protocolo sugerido por sus fabricantes. La inserción de producto de PCR en pGEM se verificó mediante digestión con enzimas de restricción y la secuenciación de dos clonas positivas. A partir de la clona en pGEM se obtuvo el fragmento gTrAP por digestión con las enzimas *SacI*/*XbaI*. Posteriormente se clonó dicho fragmento bajo el p35S de un casete de expresión 35S::GUS-Nos, derivado de pBI121, previamente subclonado en el vector pBS. En esta clonación se substituyó el gen *GUS* por AC2 de PHYVV. El casete de expresión p35S::TRAP-nos (derivado de pBS por digestión con *Hind* III/*EcoR* I) se insertó en un vector pCAMBIA 1300 (CAMBIA, Australia), y el vector binario resultante, denominado pCA p35S::TrAP-Nos, fue secuenciado para verificar la integridad del módulo de expresión.

2.3 Generación de un vector binario sin promotor (control negativo)

Se construyó un casete de expresión carente de p35S, a partir del pBI-121. Este último fue cortado con las enzimas *Hind* III y *Xba* I y los extremos generados se rellenaron con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (NEB, New England). Una vez religado el vector se obtuvo la construcción denominada pBI121(35S⁻).

Nuevamente se realizó digestión con las respectivas enzimas de restricción y se secuenció un par de clonas para comprobar la delección del p35S.

2.4. Mapeo de un potencial elemento silenciador del gen BV1/NSP en el ADN-B del PHYVV

Se utilizó el software Bioedit (Oxford University, England) para el alineamiento de secuencias del TGMV ADN-A (NC-001507.1) y PHYVV (ADN-A X704198.1 y ADN-B X70419.1) en busca de secuencias conservadas en la región análoga de 300 pb del silenciador de TGMV, que proporcionaran indicios de una secuencia reguladora compartida por los componentes A y B. Se diseñaron tres iniciadores para que, en combinación con el iniciador **BV1 faseXba I** (que hace posible la fusión traduccional del promotor de *BV1* con el gen reportero *uidA(GUS)*), amplificar tres fragmentos de diferente extensión del ADN-B del PHYVV, que serían analizados como “promotores extensos” de *BV1* (Tabla 4). El fragmento denominado (-1315) *BV1* contiene toda la región intergénica y un fragmento de 416 pb del ORF de *BC1*. El fragmento (-1977) comprende toda la región intergénica e incluye además todo el ORF de *BC1*, y se extiende 111 pb en el *ORF BV1*. Por su parte el fragmento denominado (-2589) porta el monómero completo del ADN-B clonado como promotor en el sentido de *BV1*.

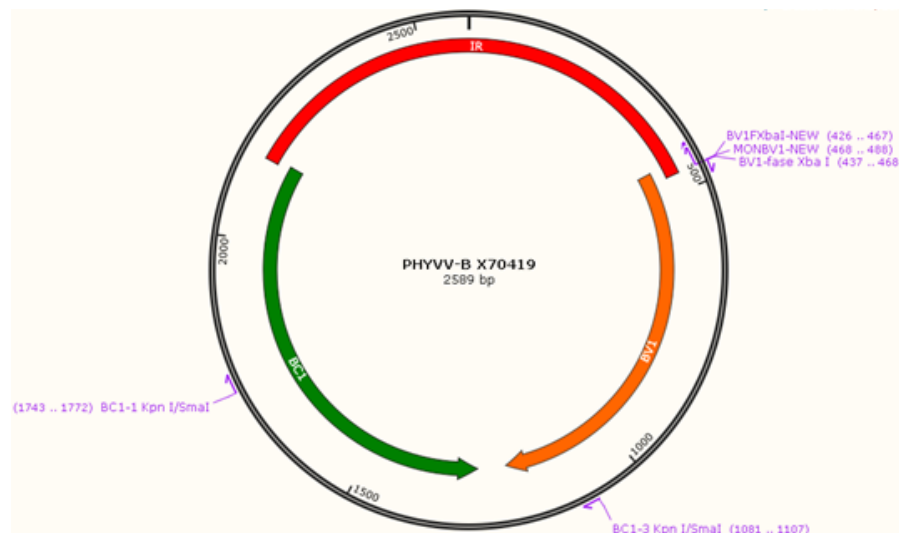
Los iniciadores se diseñaron también con base en la secuencia X70419.1 de PHYVV utilizando el programa SnapGene v1.1.3 (GSL Biotech LLC, USA). En ellos se incluyeron sitios de corte para las enzimas de restricción *Kpn I* y *Sma I* que permitieron la clonación posterior de los fragmentos del ADN-B en pBS y pCAMBIA 1300, a partir de sus clonas en pGEM-T Easy. Las reacciones de PCR y las clonaciones se realizaron de manera similar a lo descrito en los párrafos anteriores para los fragmentos de la IR y AC2.

En la figura 9 se muestra la ubicación de los iniciadores en el genoma de PHYVV y un esquema de las construcciones finales que portan los vectores binarios. Debe hacerse notar que una de las construcciones, (-2589)*BV1::GUS* contiene la totalidad del ADN-B como “promotor *BV1*”, para asegurar que todas las secuencias del componente B estuviesen representadas. Si existiese un silenciador dentro de las regiones codificantes de *BC1* o *BV1*, tendría que hacerse evidente en esa construcción, tal como se observó al usar de ADN-A completo de PHYVV como promotor de *AV1/CP*, lo que reveló la existencia de un silenciador que reprime totalmente a dicho promotor en plantas transgénicas (Ruiz-Medrano, 1996; Monsalve-Fonnegra, 2002).

Tabla 4. Iniciadores diseñados para amplificar fragmentos cadena arriba del ORF de *BV-1* en el ADN-B del PHYVV.

Nombre del iniciador	Secuencia	Temperatura de hibridación	Talla del fragmento (pb)	Nombre del fragmento
BV1-FaseXba I	5'GTCTAAATCTAGAAGAATACATATTAAATTGC3'	58°C	1315	(-1315)BV1
BC1-1 Kpn I/SmaI	5'ATCCCGGGTACCTTTGAACTTGCCAAAATGGGTGTTCTGA3'			
BV1-FaseXba I	5'GTCTAAATCTAGAAGAATACATATTAAATTGC3'	60°C	1977	(-1977)BV1
BC1-3 Kpn I/SmaI	5'ATCCCGGGTACCTTGATCCTTCGTCATGTAACGGCG3'			
BV1-FXbaI-NEW	5'TCTAAATCTAGAAGAATACATATTAATTGCTTAAAGATAAA 3'	64°C	2589	(-2589)BV1
MonBV1-NEW	5'AGTGGTACCGTGGGTTATCCTATGTTCCA 3'			

A)



B)

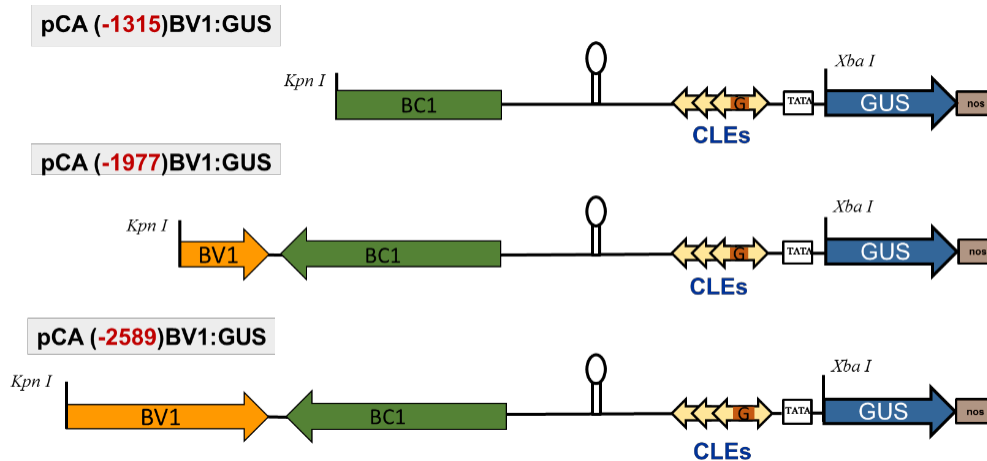


Figura 9. Mapa con la ubicación de los iniciadores y esquema de los casetes de expresión para la detección de un elemento silenciador en el ADN-B. A: Ubicación de los iniciadores en el ADN-B **B:** Esquema de los casetes de expresión que portan los vectores binarios creados para la detección de un posible elemento silenciador. Aparece señalada en un cuadro blanco la caja TATA del promotor de *BV1*. También se indican la estructura tallo-bucle y el arreglo de CLEs con una caja G traslapada. Los fragmentos del genoma de ADN-B clonados se obtuvieron por PCR.

2.5. Mapeo de un elemento silenciador del gen *AV1/CP* en el ADN-A del PHYVV

Para determinar la posición de un potencial elemento silenciador de la expresión del gen *AV1/CP* en el ADN- A de PHYVV, Juárez-Reyes (2007) realizó un análisis comparativo de la secuencia en la región de 300 pb donde se mapeó el silenciador en TGMV-A (Sunter y Bisaro, 1997; Lacatus y Sunter, 2008) y la región homóloga en posición en PHYVV (Juárez-Reyes, 2007). De esa manera, se escogió para su estudio una región cuyo límite 5' se ubica a 56 pb cadena arriba del inicio del gen *AC2* (nucleótido -1599), comprende todo el gen *AC2* y se extiende hasta el codón 94 del gen *AC3* (nucleótido -1097), que se traslapa parcialmente con *AC2*. Posteriormente generó los vectores binarios derivados de pBICP-693::GUS que denominó pBIQ503sil, pBIQ2480sil, pBIQ140sil y pBIQ100sil, en los que segmentos de 503, 248, 140 y 100 pb, respectivamente, de la región de PHYVV homóloga a la del silenciador de TGMV se colocaron corriente arriba al fragmento (-693) del promotor de *AV1/CP* de PHYVV (Figura 10) fusionado al gen reportero *uidA*,

que expresa el gen reportero GUS en ausencia de factores virales (Monsalve-Fonnegra et al., 2002). Con ello, se pretendía delimitar con mayor precisión la ubicación del silenciador de PHYVV, que en principio debía reprimir la actividad del promotor de CP truncado si ese elemento negativo estaba presente.

Las construcciones mencionadas se mantuvieron en congelación en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, para una eventual continuación de los estudios del promotor de CP de PHYVV iniciados por Juárez-Reyes (2007). En este trabajo de tesis decidimos realizar experimentos de expresión transitoria *in planta* (según sección 2.6), para verificar que las construcciones (que no fueron probadas experimentalmente) responden de modo eficiente a la presencia de TrAP, y llegar a conclusiones sobre la utilidad de estas construcciones para los propósitos originales. Dado que el promotor CP-693 dirige la expresión del reportero en el tejido vascular de las plantas transgénicas (Ruiz-Medrano, 1996; Monsalve-Fonnegra et al., 2002), su regulación por desrepression no puede ser evaluada, en principio, por medio de la metodología de agroinfiltración, que no afecta directamente al floema. No obstante, decidimos probar la capacidad de respuesta a TrAP de las construcciones antes mencionadas con la idea de determinar su reactividad a la presencia del transactivador. Para realizar estos experimentos fue necesario generar un control apropiado, que consistió en un casete de expresión que contiene solo el fragmento (-693)CP, como promotor. Para ello se amplificó el fragmento del promotor CP truncado en la posición (-693), fusionado al gen *uidA*/GUS y el terminador *Nos*, lo cual se hizo a partir de una de las construcciones realizada por Juárez-Reyes (2007). El fragmento amplificado se clonó luego en el vector binario pCAMBIA 1300.

A)

B)

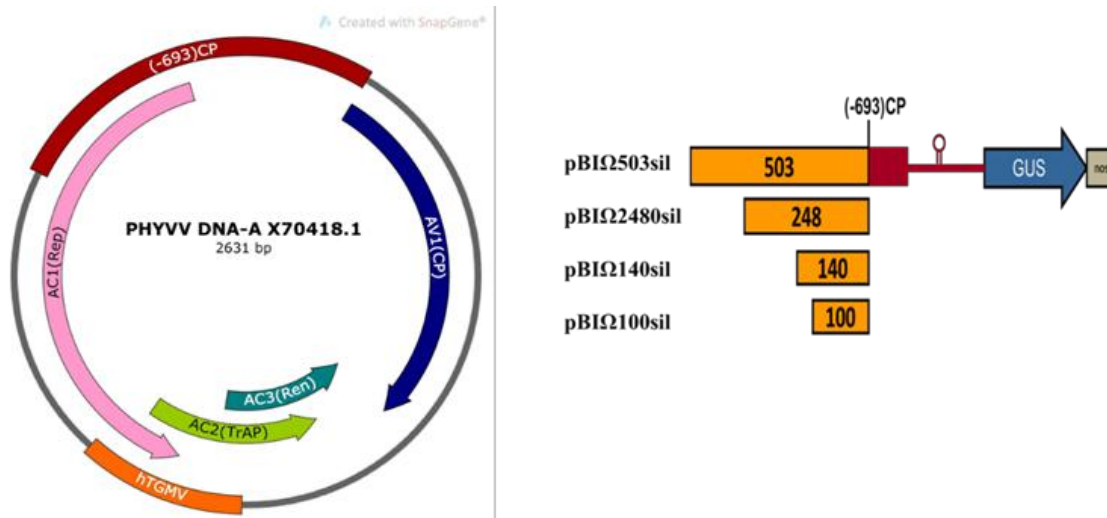


Figura 10. Esquema de los casetes de expresión que portan los promotores quiméricos creados por Juárez-Reyes (2007). En la figura **A**), en color naranja (hTGMV), aparece la ubicación en el ADN-A del PHYVV de la región homóloga en posición a la analizada en el TGMV, escogida por Juárez-Reyes (2007) para su estudio. En **B**) se muestra el esquema de los promotores quiméricos en los que se fusionaron fragmentos de tamaño decreciente de la región de homología con el silenciador de TGMV, colocados corriente arriba del promotor (-693) de AV1/CP. Los fragmentos “Sil” ilustrados corresponden a las regiones -1599/-1097 (F-503), -1599/-1351 (F-248), -1599/-1459 (F-140); y -1599/ -1501 (F-100) del ADN-A de PHYVV.

2.6. Ensayos de expresión transitoria del gen *uidA* (GUS) por agroinfiltración

Todos los vectores binarios fueron introducidos por electroporación, en células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101); para lo que se utilizaron las siguientes condiciones:

Voltaje	2500 V
Capacitancia	25 μ F
Resistencia	400 Ω
Celda	0.2 cm

Las células bacterianas se transformaron con 1 μ g de ADN de los vectores, y las células transformadas se crecieron en placas con medio SOC (complementado con Glucosa 20mM y $MgCl_2$ 20mM) en presencia de 40 mg/mL de Gentamicina, 50 mg/mL de

Kanamicina y 15 mg/mL de Rifampicina. Se confirmó por PCR la obtención de colonias transformadas con los vectores correspondientes.

2.6.1. Plantas

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se cultivaron en sustrato AFM-LM1 (Lambert, Canadá) bajo luz blanca fluorescente a 25 °C, en un ciclo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Las plantas se regaron diariamente y se suplementaron una vez por semana con el fertilizante comercial Miracle-Gro según indicaciones del fabricante (The Scotts company, Ohio, USA). Se utilizaron en los experimentos de agroinfiltración a la edad de 6 semanas.

2.6.2 Agroinfiltración

Las suspensiones bacterianas transformadas se prepararon a una DO= 0.5 en solución para agroinfiltración (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM, Acetosiringona 100 mM) y se infiltraron en tres hojas de cada planta utilizando una jeringa de 1mL, sin aguja. Las construcciones se agroinfiltraron individualmente o junto con el vector de expresión pCA p35S::gTrAP-Nos. Los vectores pBI-121 (que contiene al p35S de CaMV fusionado a GUS) y pBI-MCS (sin casete de expresión) se agroinfiltraron como control positivo y negativo del ensayo, respectivamente.

Los vectores pCAMBIA 1300, pBI121(35S⁻) y pCA 35S::gTrAP-Nos fueron agroinfiltrados independientemente para determinar la actividad inespecífica de GUS. Una suspensión de la cepa bacteriana GV3101 sin vector se agroinfiltró también para la detección de una potencial actividad de GUS. Una vez realizada la agroinfiltración, las plantas se mantuvieron bajo las mismas condiciones en que se crecieron, durante un período de dos días. Las hojas agroinfiltradas se cosecharon 48 h después de la infiltración para su posterior análisis. Cada construcción (agroinfiltrada sola o conjuntamente con la fuente de TrAP) se consideró como un tratamiento, así como cada control. Se evaluaron como mínimo tres réplicas (en tres plantas diferentes), por tratamiento.

2.6.3. Tinción histoquímica para detección cualitativa de actividad de GUS

Se tomaron discos de tejido de aproximadamente 1 cm de diámetro, de hojas agroinfiltradas, y se sometieron a tinción histoquímica para detección de la actividad de GUS de acuerdo a Jefferson *et al.*, 1987. A cada disco de hojas se añadió la mezcla de reacción de GUS (sal sódica de cicloheximida de 5-bromo-3-cloro-3-indoilo-β-D-glucurónido (X-Gluc) disuelta en metanol, tampón fosfato 2X pH = 7 (NaH₂PO₄ 0.1 M y Na₂HPO₄ 0.1 M), 10% Triton X-100, ferrocianuro de potasio 0.1 M). Posteriormente se sometieron a vacío (40 mm Hg, 1 min) y se incubaron en agitación suave a 37 ° C durante 16 h. Luego la mezcla de reacción de GUS se retiró y se reemplazó con etanol al 100%. Las muestras se mantuvieron a 37 ° C y se reemplazó el etanol varias veces hasta lograr la pérdida total de la clorofila en el tejido. Los discos de hojas fueron observados con un microscopio óptico (Axion, Zeiss) bajo el objetivo 10X y se fotografiaron, para la detección de la coloración azul indicativa de la actividad de β-glucuronidasa.

2.6.4. Ensayo fluorométrico para la detección cuantitativa de la actividad de GUS.

La detección cuantitativa de la actividad de GUS se llevó a cabo según la metodología descrita por Gallagher (1992), con modificaciones en los volúmenes, a partir de extractos de proteína de las hojas agroinfiltradas. La proteína total se extrajo de 150-200 mg de tejido foliar infiltrado, utilizando la metodología descrita por Joh *et al.*, 2006, y se cuantificó a través de un ensayo de Bradford (Bradford, 1976) y una curva estándar de BSA (1000-15.6 µg/mL, diluciones seriadas base 2).

Para la detección fluorométrica, los extractos se diluyeron 1:100 y 1:200 en la solución de ensayo de actividad de GUS (2 mM de 4 – metilumbeliferil-beta - D - glucurónido (MUG) en tampón de extracción (fosfato de sodio 50 mM, pH 5.0, DTT 10 mM). La reacción se incubó a 37 ° C durante 30 min y se detuvo añadiendo una solución de parada (Na₂CO₃ 0.2 M). Veinte microlitros del ensayo GUS en 180 µL de solución de parada se usaron para medir la fluorescencia. Esta se midió con filtros de emisión y excitación establecidos a 465 y 360 nm, respectivamente, usando un fluorómetro de 96 pocillos

(PROMEGA, USA.). Se prepararon diluciones de 4-metilumbeliferona (MU) en tampón de extracción (1000-15.6 nM, diluciones seriadas base 2) para trazar una curva estándar. La actividad de GUS de los extractos se calculó en nM de MU por μg de proteína por minuto.

2.6.5. Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas de comparación de medias de los valores de la actividad de GUS con el Test de Student (*, $0.05 < p$; **, $0.01 < p$ y ***, $p < 0.001$ y ****, $p < 0.0001$) y pruebas de comparaciones múltiples de las medias con ANOVA de un solo paso y corrección por el test de Turkey (*, $0.05 < p$; **, $0.01 < p$ y ***, $p < 0.001$ y ****, $p < 0.0001$). Las gráficas y las comparaciones se lograron con el programa Prisma 6.0 (GraphPad Software, La Jolla California, USA).

3. RESULTADOS

3.1 Amplificación y clonación de los fragmentos de la IR y el gen *AC2/TrAP*

Todos los fragmentos de la IR del ADN-B y el gen *AC2/TrAP* se amplificaron con las correspondientes combinaciones de iniciadores y las condiciones de reacción descritas. La correcta inserción de los productos de PCR en los vectores pGEM-T Easy, pBS, pBI-121 y pCAMBIA 1300 se comprobaron tanto por digestión con enzimas de restricción específicas, como por secuenciación de ADN.

No fue posible la inserción directa del fragmento (-259)BV1 en el vector pBI-121 a partir de pGEM-T Easy, debido probablemente a los tamaños contrastantes entre el vector (15 Kpb) y el inserto (259 pb). En su lugar se insertó en pBS un casete de expresión 35S::GUS-Nos derivado de PBI-121 y se reemplazó ahí el promotor (-259)BV1 que quedó fusionado a *GUS*, para luego transferir el casete de expresión a otro vector binario, pCAMBIA 1300 (9kb), el cual resultó en un mayor rendimiento respecto a pBI-121; por lo que decidimos utilizarlo como vector binario en construcciones posteriores.

La expresión de GUS se visualizó de forma cualitativa mediante tinción histoquímica de tejidos vegetales. Los discos de hojas agroinfiltradas con las clonas que portan los promotores (-900)BV1, (-894)BC1 y (-259)BV1 mostraron tinción con X-gluc en niveles notorios a simple vista, producto de la expresión de GUS en ausencia de TrAP. Los discos de hojas agroinfiltradas con estas construcciones y, con la adición de una fuente de TrAP, presentaron una tinción mucho más intensa (Figuras 11B, 12B y 13B).

Los discos de tejidos agroinfiltrados con pBI121, como control positivo, mostraron el color azul indicativo de la actividad de β -glucuronidasa (Figuras 11B, 12B y 13B), como se esperaba del promotor constitutivo 35S de CaMV, (Somssich, 2018), No se observó coloración cuando se tiñeron tejidos de plantas agroinfiltradas con la construcción para la expresión de TrAP (pCA 35S::gTrAP), tampoco con pBI-MCS o pBI121(-35S⁻). De igual forma, cuando se tiñeron tejidos de plantas agroinfiltradas con la cepa GV3101 sin ADN exógeno y pCAMBIA 1300, o plantas sin agroinfiltrar (“naive”) no se observó coloración alguna (Figuras 11B, 12B y 13B).

En las figuras 11A-13A se presentan los resultados de los ensayos fluorométricos para la detección cuantitativa de expresión de GUS. En los extractos de proteínas totales de las tres construcciones *BC1/BV1::GUS* agroinfiltradas se detectó actividad de GUS en ausencia de TrAP. Esta actividad en algunos experimentos resultó similar o ligeramente superior al promedio de los valores de pBI121. En presencia de TrAP, en todos los casos, el valor de la actividad de GUS ascendió notablemente respecto al nivel en ausencia del activador. El análisis estadístico demostró diferencias significativas entre las medias de los valores de actividad obtenidos con el promotor individual y en presencia de TrAP, en las construcciones con los tres diferentes fragmentos de la IR del ADN-B.

En todos los experimentos para la detección de expresión de GUS fue muy evidente la respuesta de los fragmentos utilizados como promotores en presencia de la proteína TrAP, con una potenciación notable de la expresión del gen reportero, que se dio en el orden de seis a tres veces sobre el valor en ausencia de AC2, y en algunos casos entre siete y diez veces (ver figuras en el orden correspondiente).

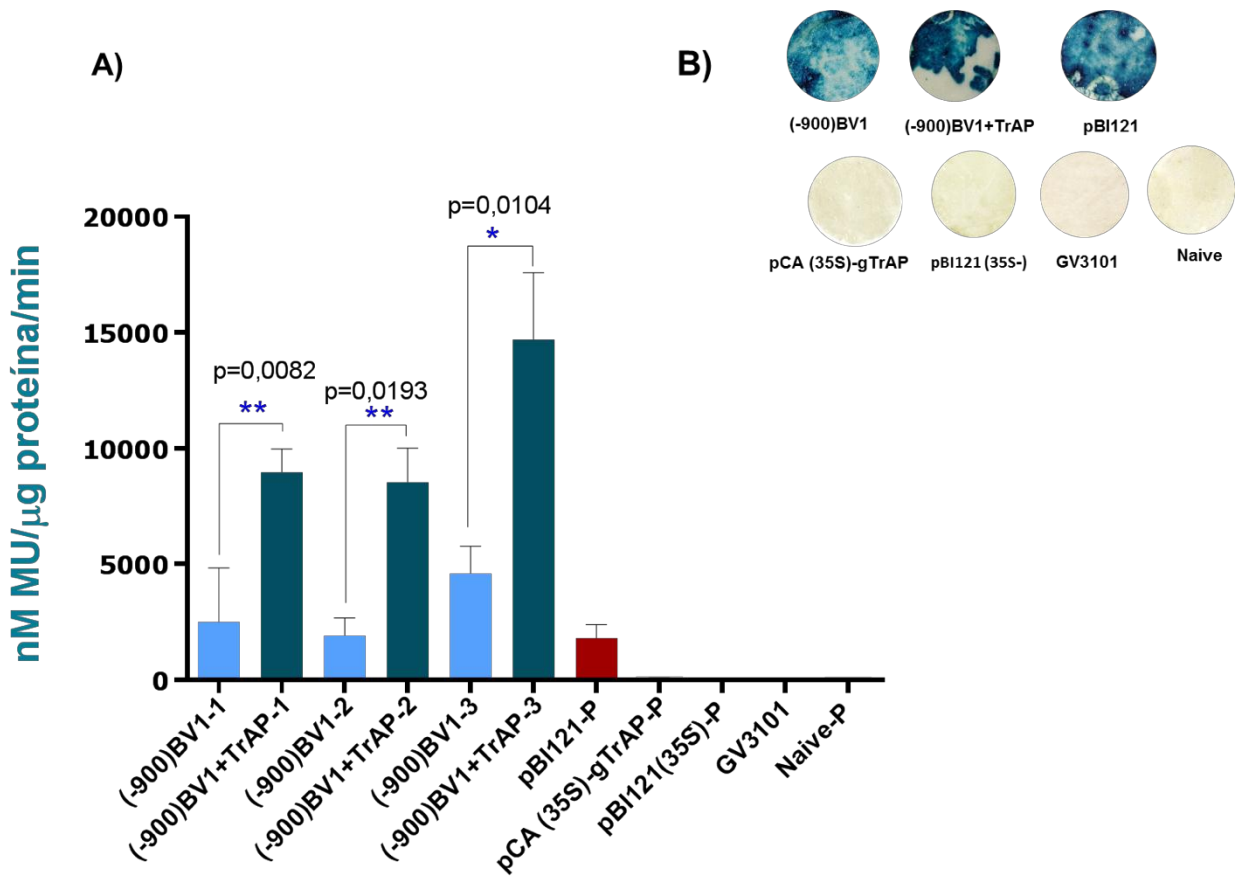


Figura 11. Resultados de la determinación cualitativa y cuantitativa de la expresión de GUS con el promotor (-900)BV1. **A)** La gráfica muestra tres experimentos (1, 2 y 3 n=3) en los cuales se agroinfiltró tanto el vector con el promotor: (-900)BV1, como el vector con el promotor y la fuente de TrAP: (-900)BV1+TrAP. Aparecen también los valores promedio (P) de los experimentos para: el control positivo (pBI121), el vector fuente de TrAP (pCA (35S)::gTrAP), el control negativo (pBI121 (35S-)) y las plantas sin tratamiento (naive). Los valores del ensayo utilizando la cepa GV3101 sin ADN exógeno, como control de células de *Agrobacterium*, también se muestran. El valor de probabilidad (p) en el test de Student, la significación y las barras de error aparecen también indicados. **B)** Fotografías de los discos de hojas agroinfiltradas y naive, teñidos para la detección cualitativa de la expresión de GUS.

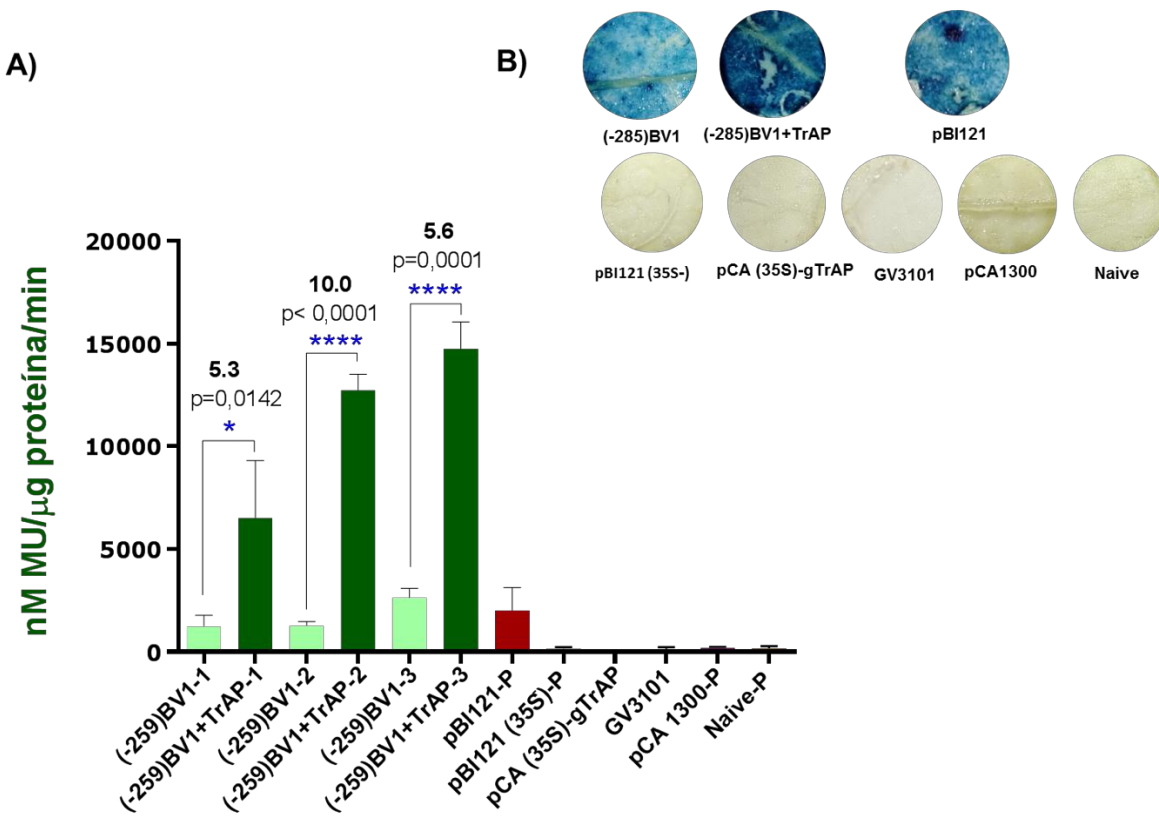


Figura 12. Resultados de la determinación cualitativa y cuantitativa de la expresión de GUS con el promotor (-259)BV1. **A)** La gráfica muestra tres experimentos (1, 2, n=3 y 3, n=5) en los cuales se agroinfiltró tanto el vector con el promotor: (-259)BV1, como el vector con el promotor y la fuente de TrAP: (-259)BV1+TrAP. Aparecen también los valores promedio (P) de ambos experimentos para: el control positivo (pBI121), el vector fuente de TrAP (pCA (35S)::gTrAP), los controles negativos (pCA-1300 y pBI121 (35S-)) y las plantas sin tratamiento (Naive). Los valores del ensayo utilizando la cepa GV3101 sin ADN exógeno, como control de células de *Agrobacterium*, también se muestran. El valor de probabilidad (p) en el test de Student, la significación y las barras de error también aparecen indicados. **B)** Fotografías de los discos de hojas agroinfiltradas y naive, teñidos para la detección cualitativa de la expresión de GUS.

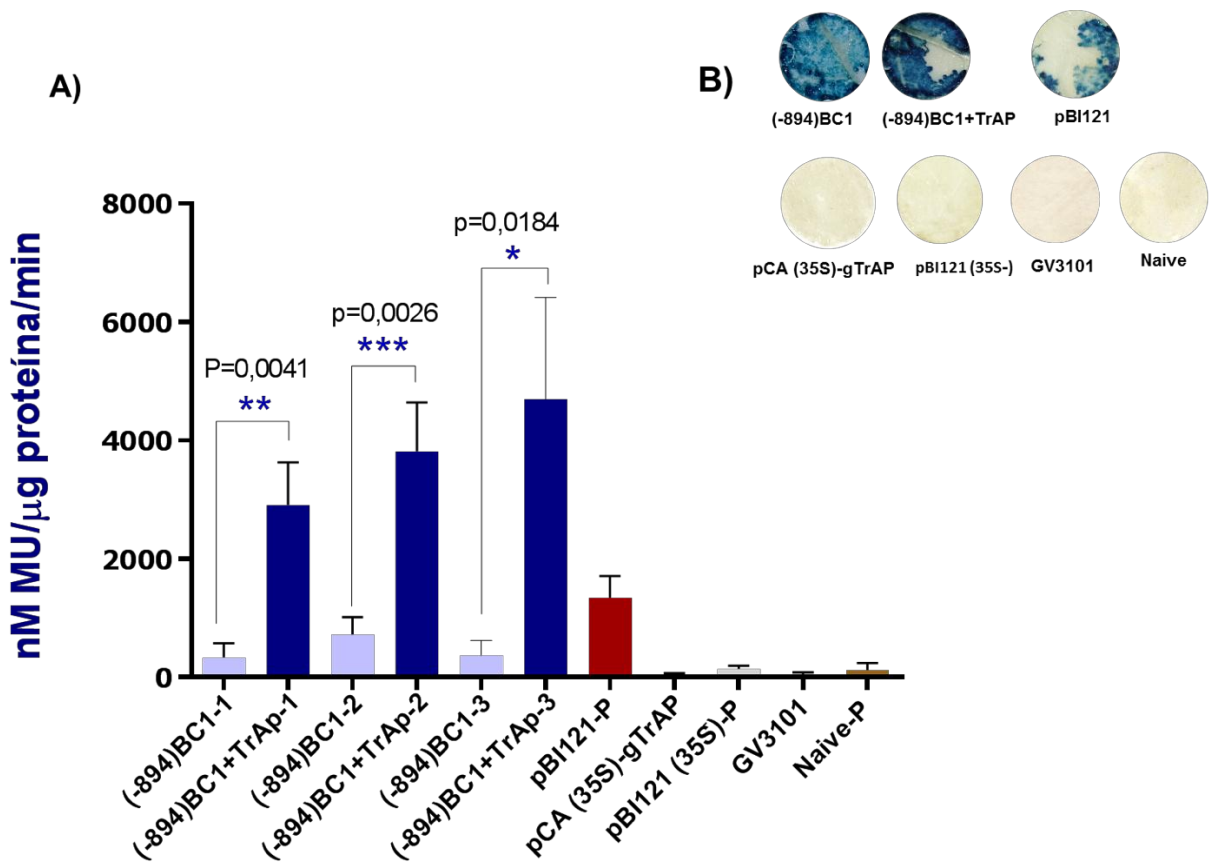


Figura 13. Resultados de la determinación cualitativa y cuantitativa de la expresión de GUS con el promotor (-894) BC1. A) La gráfica muestra tres experimentos (1, 2 n=3 y 3 n=4) en los cuales se agroinfiltró tanto el vector con el promotor: (-894)BC1, como el vector con el promotor y la fuente de TrAP: (-894)BC1+TrAP. Aparecen también los valores promedio (P) de ambos experimentos para: el control positivo (pBI121), el vector fuente de TrAP (pCA (35S)::gTrAP), el control negativo (pBI121 (35S-)), y las plantas sin tratamiento (Naive). Los valores del ensayo utilizando la cepa GV3101 sin ADN exógeno, como control de células de *Agrobacterium*, también se muestran. El valor de probabilidad (p) en el test de Student, la significación y las barras de error también aparecen indicados. **B)** Fotografías de los discos de hojas agroinfiltradas y naive, teñidos para la detección cualitativa de la expresión de GUS.

3.2. Mapeo de un potencial elemento silenciador en el ADN-B del PHYVV

Se diseñaron iniciadores que permitieron la amplificación de tres fragmentos más extensos para el mapeo de un posible silenciador del promotor de *BV1* en el ADN-B del PHYVV. La clonación de los fragmentos en pGEM, pBS y pCAMBIA 1300, y el posterior ensamblaje del casete de expresión, pudieron verificarse por la digestión con las enzimas específicas y también a través de secuenciación de ADN.

En el caso de los experimentos de expresión transitoria de GUS, esta se pudo visualizar tras la tinción histoquímica de discos de hojas agroinfiltradas con las construcciones, tanto en ausencia como en presencia de una fuente de AC2/TrAP. No se observó tinción cuando se tiñeron tejidos de plantas agroinfiltradas con las construcciones con pCA1300 y pBI121(35S⁻), o cuando se tiñeron tejidos de plantas sin agroinfiltrar (naive) (Figuras 14B-16B).

En las figuras 14A-16A se muestran los resultados de los ensayos cuantitativos de expresión de GUS. En el análisis se detectó actividad de GUS en ausencia de TrAP, muy similar o ligeramente superior al promedio de los valores de pBI121. En estos tres casos se observó también que el valor de la actividad de GUS ascendió de manera estadísticamente significativa en presencia de TrAP, respecto al nivel en ausencia del activador, y muy por encima del promedio de los valores de pBI121.

En todos los experimentos para la detección de expresión de GUS, tal y como se había observado con los fragmentos de la IR, se hace muy evidente la respuesta de los tres promotores a la presencia de la proteína TrAP.

Con ninguno de los fragmentos del promotor de *BV1* analizados en esta sección se observó la pérdida de la expresión, en ausencia de TrAP, lo que se esperaría si en alguno de ellos estuviera presente un elemento silenciador de la expresión del gen. Un análisis estadístico se realizó también comparando la media de los valores de la actividad de GUS detectados para el fragmento menor del promotor de *BV1* (-259), en la IR, con la media de los valores obtenidos para cada uno de los fragmentos restantes, en ausencia de TrAP. En este caso se observó una diferencia muy significativa (****) entre el fragmento

de (-259) y los fragmentos (-1977) y (-2589), este último corresponde al monómero de PHYVV-B funcionando como promotor de *BV1* (Figura 17).

El hecho de que el monómero del DNA-B funcione como un promotor muy potente en ausencia de TrAP demuestra que no existe un silenciador en el componente B de PHYVV, análogo al que está presente en el componente genómico A del mismo virus (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999; Monsalve-Fonnegra *et al.*, 2002) .

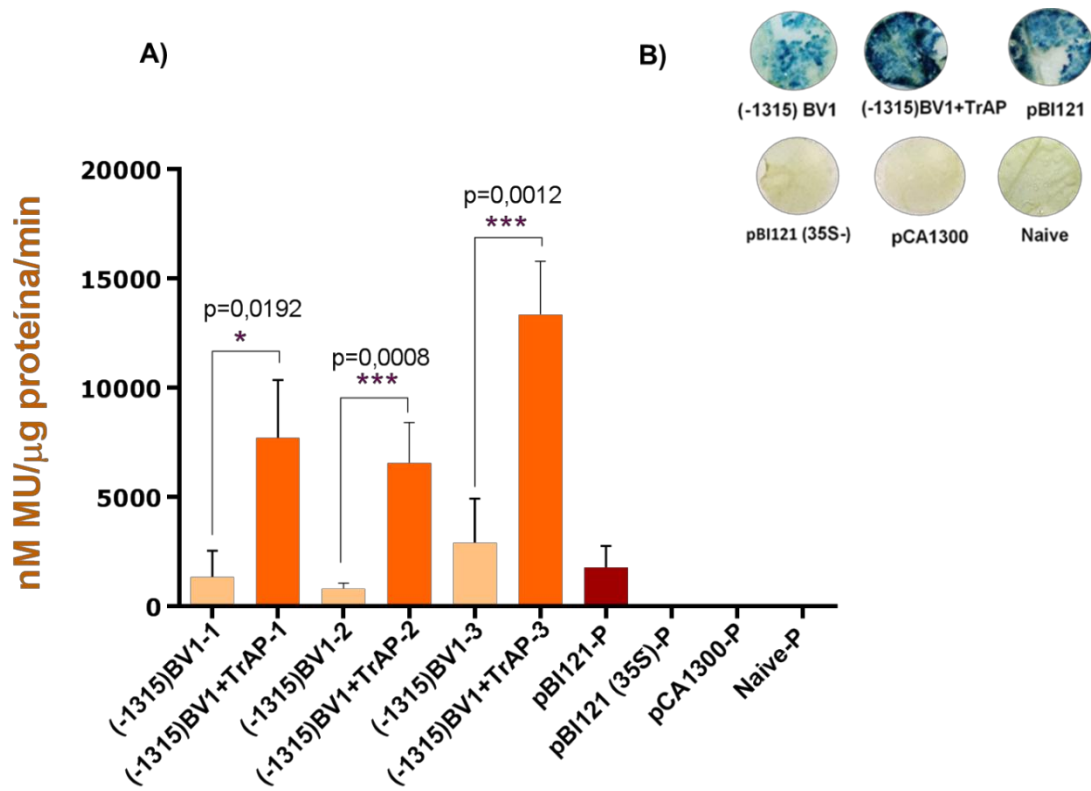


Figura 14. Resultados de la determinación cualitativa y cuantitativa de la expresión de GUS con el promotor (-1315) BV1. **A)** La gráfica muestra tres experimentos (1, n=3, 2 y 3, n=4) en los cuales se agroinfiltró tanto el vector con el promotor: (-1315)BV1, como el vector con el promotor y la fuente de TrAP: (-1315)BV1+TrAP. Aparecen también los valores promedio (P) de ambos experimentos para: el control positivo (pBI121), los controles negativos (pBI121(35S-) y pCA-1300) y las plantas sin tratamiento (Naive). El valor de probabilidad (p) en el test de Student, la significación y las barras de error también aparecen indicados. **B)** Fotografías de los discos de hojas agroinfiltradas y naive, teñidos para la detección cualitativa de la expresión de GUS.

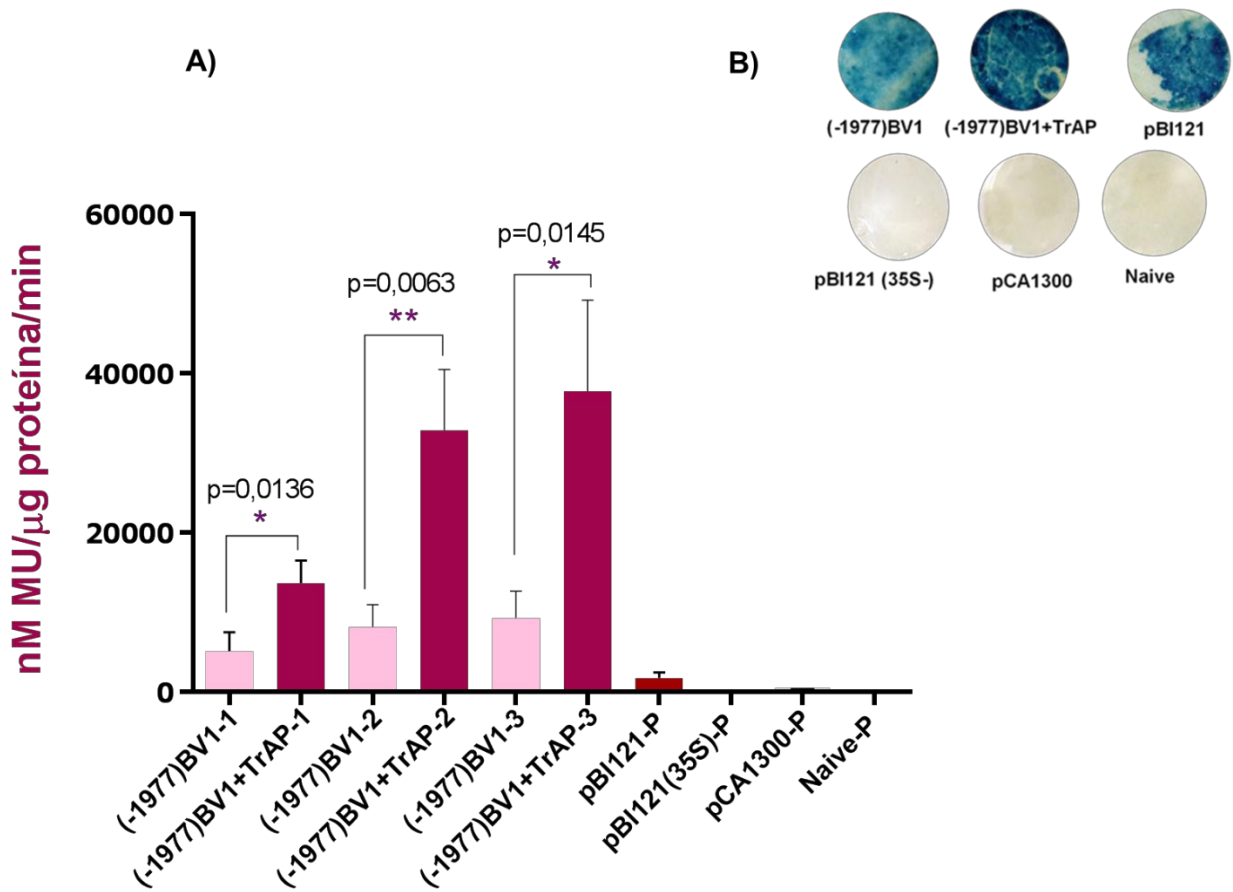


Figura 15. Resultados de la determinación cualitativa y cuantitativa de la expresión de GUS con el promotor (-1977) BV1. La gráfica muestra tres experimentos (1, 2 n=3 y 3 n=5) en los cuales se agroinfiltró tanto el vector con el promotor: (-1977)BV1, como el vector con el promotor y la fuente de TrAP:(-1977)BV1+TrAP. Aparecen también los valores promedio (P) de ambos experimentos para: el control positivo (pBI121), los controles negativos (pBI121 (35S-) y pCA-1300) y las plantas sin tratamiento (Naive). El valor de probabilidad (p) en el test de Student, la significación y las barras de error también aparecen indicados. **B)** Fotografías de los discos de hojas agroinfiltradas y naive, teñidos para la detección cualitativa de la expresión de GUS.

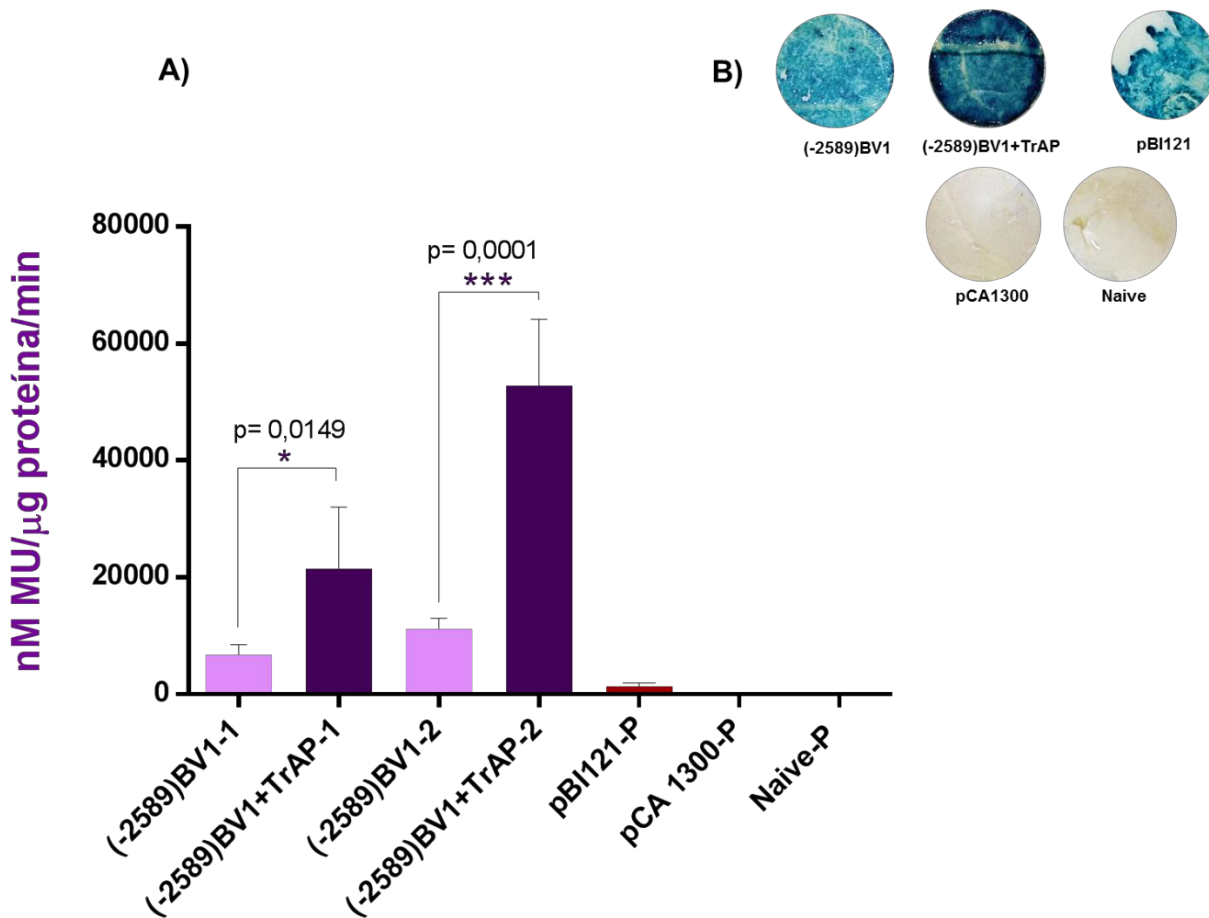
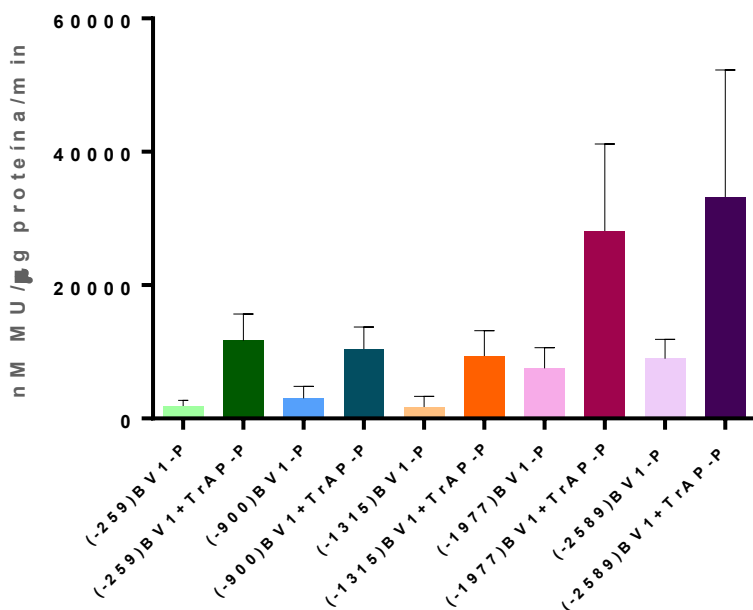


Figura 16. Resultados de la determinación cualitativa y cuantitativa de la expresión de GUS con el promotor (-2589) BV1. La gráfica muestra dos experimentos (1, n=4 y 2, n=6) en los cuales se agroinfiltró tanto el vector con el promotor: (-2589)BV1, como el vector con el promotor y la fuente de TrAP: (-2589)BV1+TrAP. Aparecen también los valores promedio (P) de ambos experimentos para: el control positivo (pBI121), un control negativo (pCA-1300) y las plantas sin tratamiento (Naive). El valor de probabilidad (p) en el test de Student, la significación y las barras de error también aparecen indicados. **B)** Fotografías de los discos de hojas agroinfiltradas y naive, teñidos para la detección cualitativa de la expresión de GUS.

A)



B)

(-259)BV1 vs	Valor de p (significación)
(-900)BV1	0,7648 (ns)
(-1315)BV1	0,3992 (ns)
(-1977)BV1	< 0,0001 (****)
(-2589)BV1	< 0,0001 (****)

Figura 17. Resultados promedio de los experimentos para la determinación cuantitativa de la expresión de GUS de todos los promotores del ADN-B de PHYVV. A: Gráfica que muestra los valores promedio (P) de los experimentos con cada uno de los promotores por separado y en presencia de la fuente de TrAP, así como del control positivo (pBI121). **B:** tabla que muestra los resultados del ANOVA de un solo paso con corrección por el test de Turkey, al comparar los valores de expresión basal del promotor (-259)BV1 con cada uno de los promotores restantes.

3.3. Mapeo de un elemento silenciador del gen AV1/CP en el ADN-A de PHYVV

Por lo que respecta a las construcciones quiméricas con fragmentos decrecientes de la región de PHYVV-A que es homóloga en posición al segmento silenciador de TGMV, se

pudo observar también de manera cualitativa, a simple vista, la expresión de GUS tras la tinción histoquímica, tanto en el tejido agroinfiltrado con las construcciones independientes como en presencia de la fuente de TrAP. Cabe destacar que, de manera análoga a los fragmentos de promotores del ADN-B, la tinción de los discos de tejido coinfiltrados con las construcciones de los promotores y la fuente de TrAP, fue mucho más fuerte (figuras 18B-22B).

Los discos de tejidos agroinfiltrados con pBI121, como control positivo, mostraron el color azul indicativo de la expresión de GUS. No se observó tinción cuando se tiñeron tejidos de plantas agroinfiltradas con los controles negativos, pBI-MCS o pBI121 (35S⁻) (figuras 18B-21B).

En las figuras 18A-21A se presentan los resultados de los ensayos para la detección cuantitativa de la expresión de GUS. En los extractos de proteínas totales de las cuatro construcciones agroinfiltradas, se detectó una baja actividad de GUS, en ausencia de TrAP, que en todos los experimentos fue menor que el promedio de los valores de pBI121. En presencia de TrAP, en todos los casos, el valor de la actividad de GUS ascendió de manera estadísticamente significativa, respecto al nivel en ausencia del activador.

En el caso de las construcciones del ADN-A, en los experimentos para la detección de expresión de GUS se hizo también evidente la respuesta de los fragmentos utilizados como promotores, a la presencia de la proteína TrAP, con una potenciación de la expresión del gen reportero.

Cuando se compararon los valores obtenidos con la versión truncada (-693) del promotor de CP, con la media de los valores obtenidos para el resto de las construcciones quiméricas, en ausencia de TrAP; no se detectaron diferencias significativas con la mayoría de los fragmentos examinados. La única diferencia (*) se observó entre el fragmento de (-693) y pBIQ100sil, figura 22.

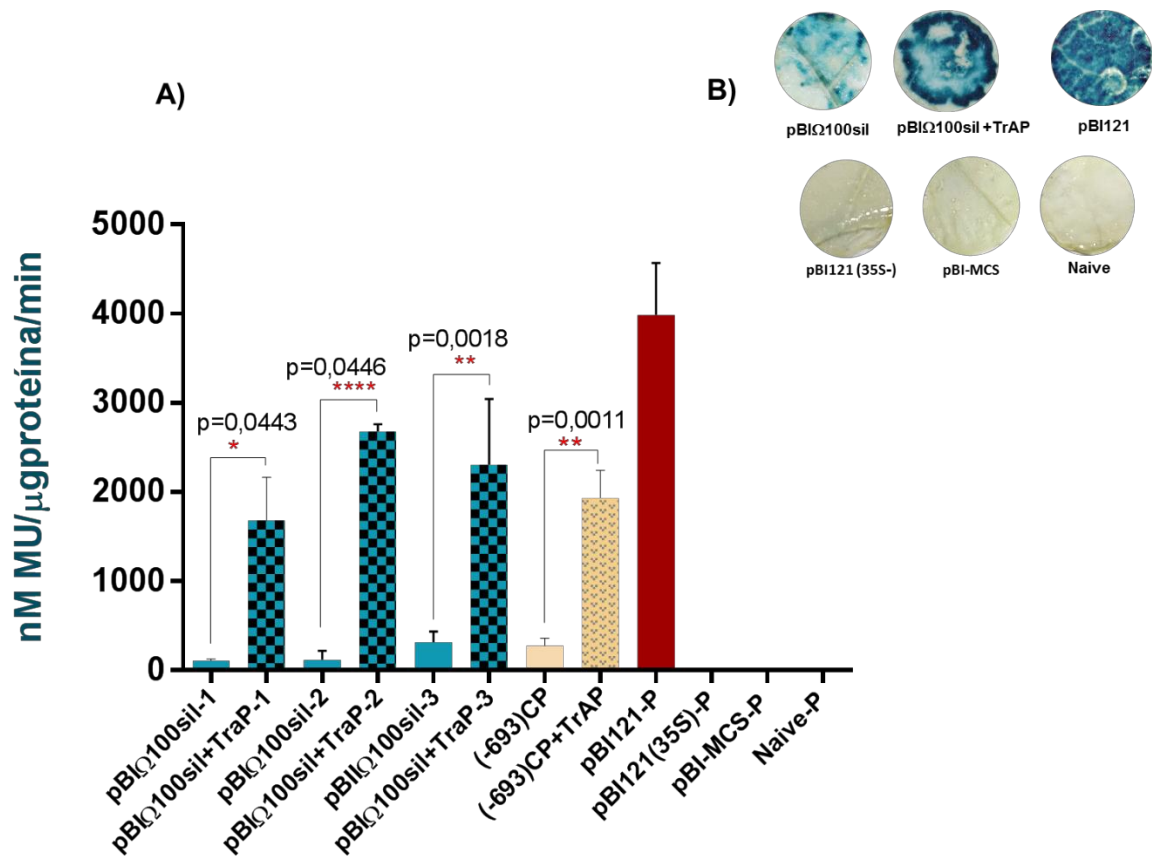


Figura 18. Resultados de la determinación cuantitativa de la expresión de GUS con la construcción quimérica pBIΩ100sil. La gráfica muestra tres experimentos (1, 2 n=3 y 3 n= 5) en los cuales se agroinfiltró tanto el vector con el promotor: pBIΩ100sil, como el vector con el promotor y la fuente de TrAP: pBIΩ100sil +TrAP. Se muestran también los valores obtenidos utilizando la construcción (-693)CP. Aparecen, además, los valores promedio (P) de los experimentos para: el control positivo (pBI121), los controles negativos (pBI121 (35S⁻) y pBI-MCS) y las plantas sin tratamiento (naive). El valor de probabilidad (p) en el test de Student, la significación y las barras de error también aparecen indicados.

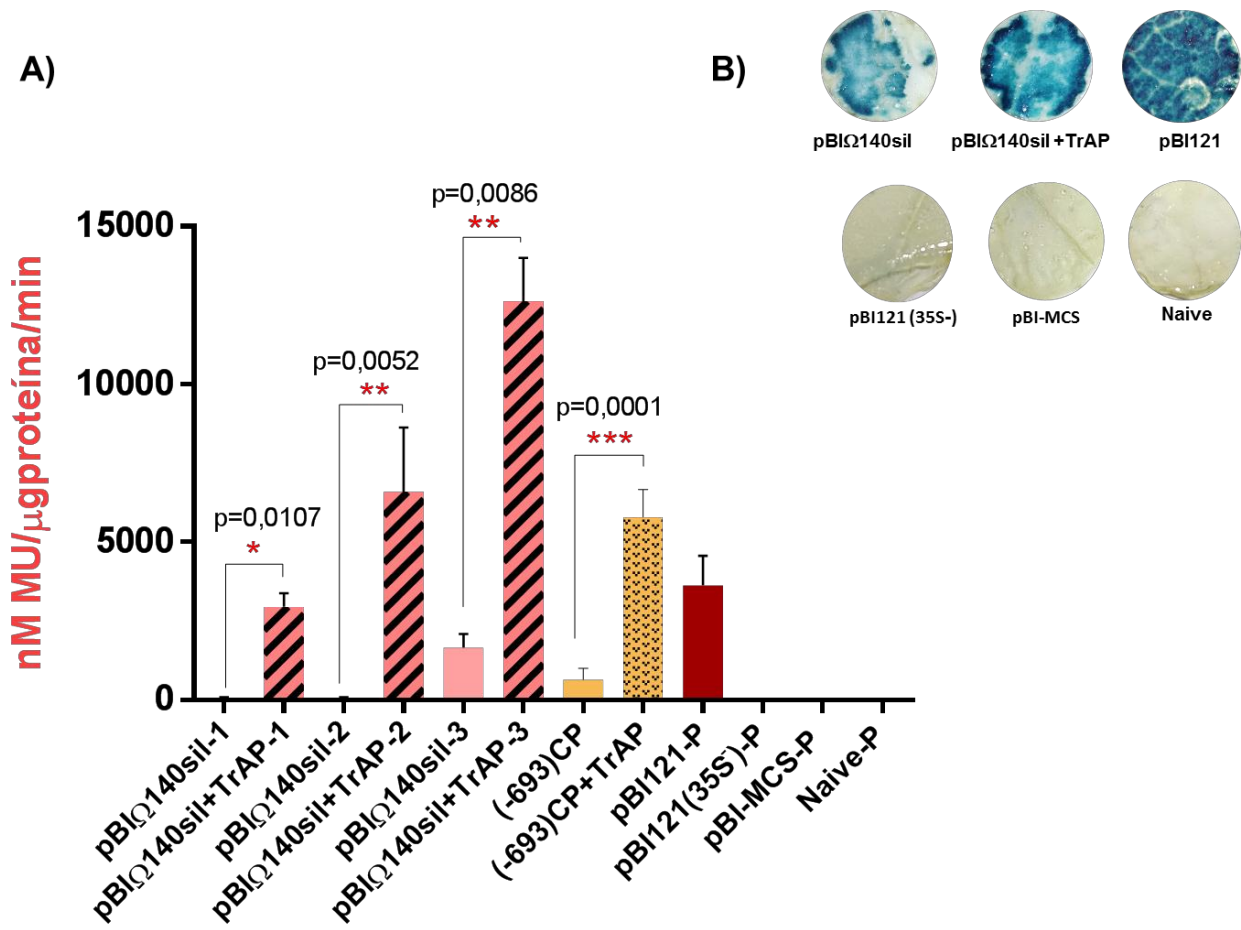


Figura 19. Resultados de la determinación cuantitativa de la expresión de GUS con la construcción quimérica pBIΩ140sil. La gráfica muestra tres experimentos (1, 2 n=3 y 3 n= 5) en los cuales se agroinfiltró tanto el vector con el promotor: pBIΩ140sil, como el vector con el promotor y la fuente de TrAP: pBIΩ140sil +TrAP. Se muestran también los valores obtenidos utilizando la construcción (-693)CP. Aparecen, además, los valores promedio (P) de los experimentos para: el control positivo (pBI121), los controles negativos (pBI121 (35S-) y pBI-MCS) y las plantas sin tratamiento (naive). El valor de probabilidad (p) en el test de Student, la significación y las barras de error también aparecen indicados

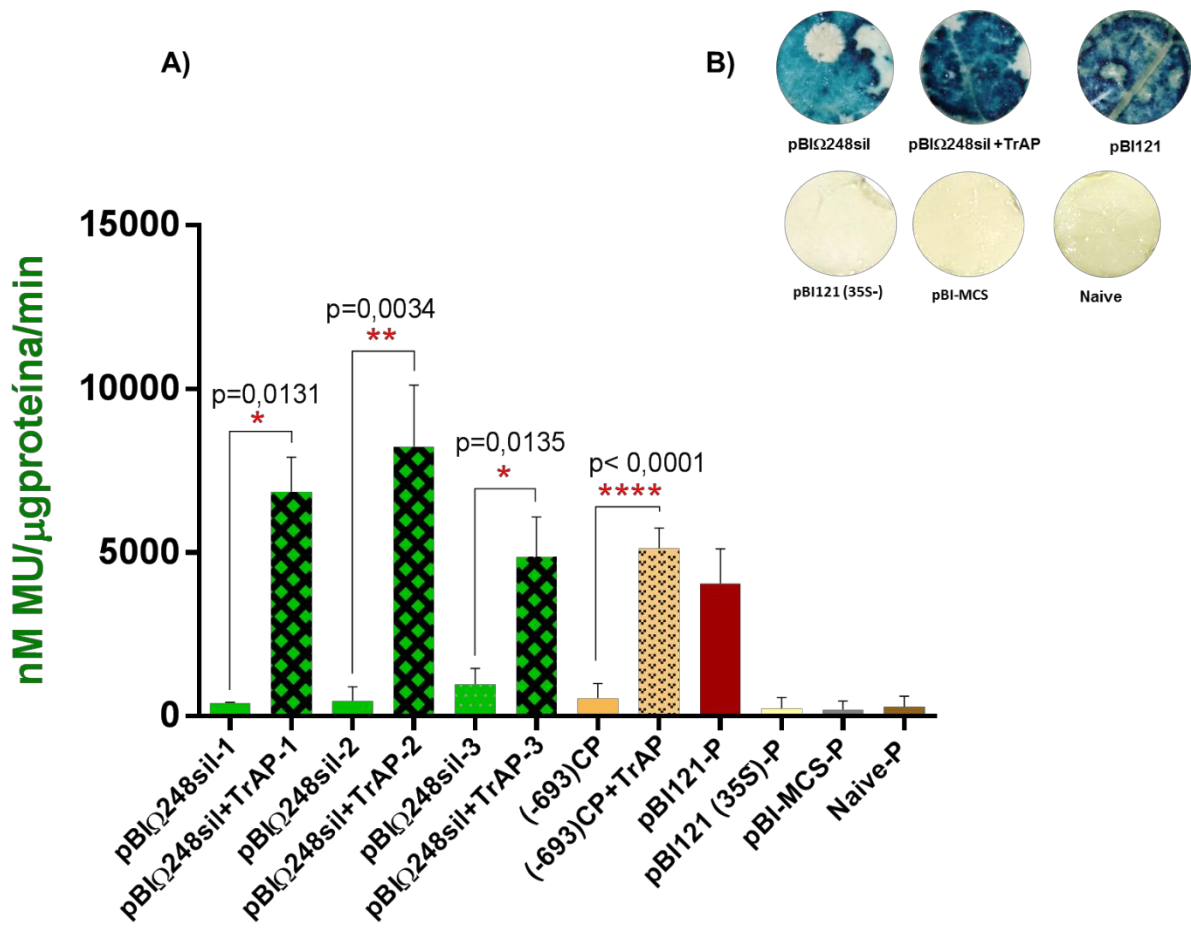


Figura 20. Resultados de la determinación cuantitativa de la expresión de GUS con la construcción quimérica pBIΩ248sil. La gráfica muestra tres experimentos (1, 2 n=3 y 3 n= 5) en los cuales se agroinfiltró tanto el vector con el promotor: pBIΩ248sil, como el vector con el promotor y la fuente de TrAP: pBIΩ248sil +TrAP. Se muestran también los valores obtenidos utilizando la construcción (-693)CP. Aparecen, además, los valores promedio (P) de los experimentos para: el control positivo (pBI121), los controles negativos (pBI121 (35S-) y pBI-MCS) y las plantas sin tratamiento (naive). El valor de probabilidad (p) en el test de Student, la significación y las barras de error también aparecen indicados.

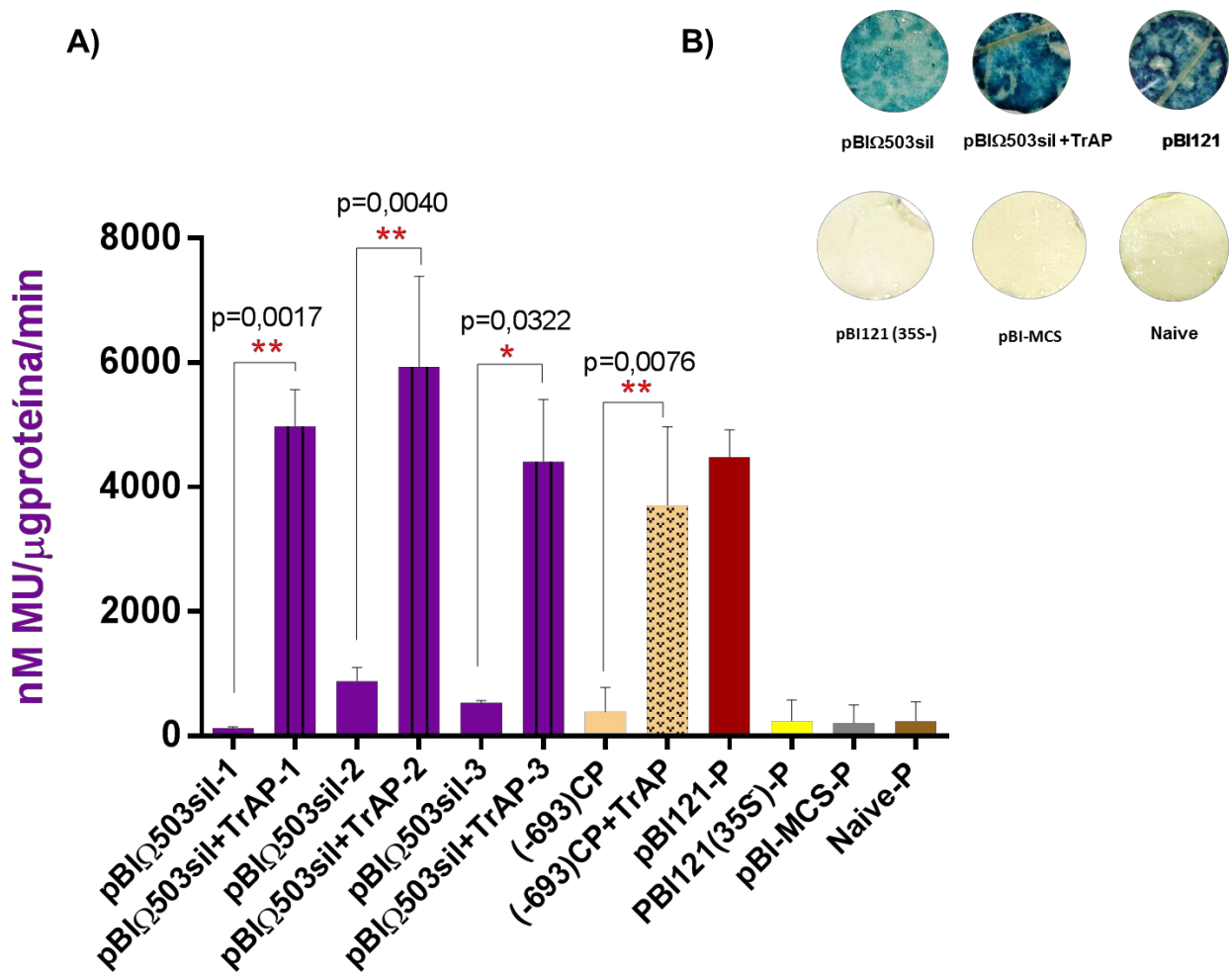
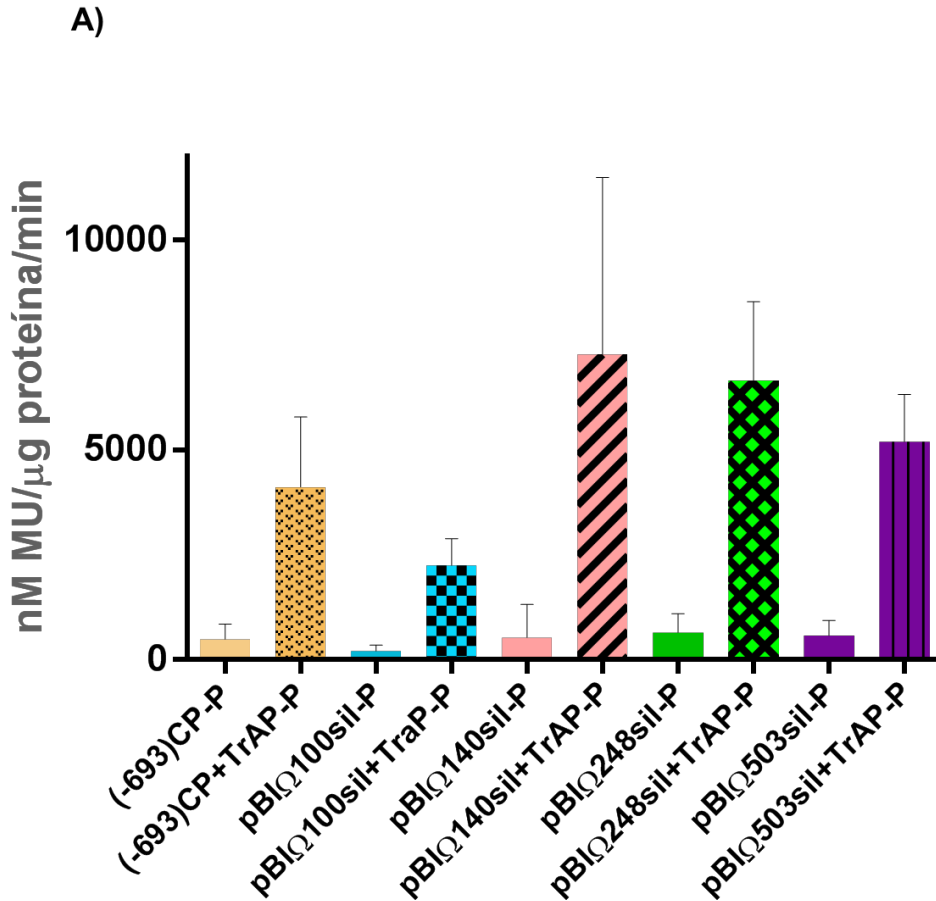


Figura 21. Resultados de la determinación cuantitativa de la expresión de GUS con la construcción química pBIΩ503sil. La gráfica muestra tres experimentos (1, n=3; 2, n=3 y 3; n= 5) en los cuales se agroinfiltró tanto el vector con el promotor: pBIΩ503sil, como el vector con el promotor y la fuente de TrAP: pBIΩ503sil +TrAP. Se muestran también los valores obtenidos utilizando la construcción (-693)CP. Aparecen, además, los valores promedio (P) de los experimentos para: el control positivo (pBI121), los controles negativos (pBI121 (35S-) y pBI-MCS) y las plantas sin tratamiento (Naive). El valor de probabilidad (p) en el test de Student, la significación y las barras de error también aparecen indicados.



B)

(-693CP) vs	Valor de p (significación)
pBIΩ100sil-P	0,0332 (*)
pBIΩ140sil-P	0,5926 (ns)
pBIΩ248sil-P	0,1550 (ns)
pBIΩ503sil-P	0,3143 (ns)

Figura 22. Resultados promedio de los experimentos para la determinación cuantitativa de la expresión de GUS de todos los promotores quiméricos del ADN-A. A: Gráfica que muestra los valores promedio (P) de los experimentos con cada uno de los promotores quiméricos y del promotor (-693)CP, en ausencia y presencia de la fuente de TrAP, así como del control positivo (pBI121) **B:** tabla que muestra los resultados del ANOVA de un solo paso con corrección por el test de Turkey al comparar los valores de expresión basal del promotor (-693)CP, con cada uno de los promotores quiméricos restantes.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los promotores de los genes tardíos del componente genómico B de begomovirus han sido comparativamente poco estudiados, en relación a los numerosos estudios del promotor del gen *CP* de varias especies virales. Con la excepción del promotor de *BV1* de TGMV, y del MYMV (Shivaprasad *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2020), poco se sabe de los elementos *cis*-reguladores que componen los promotores del ADN-B.

La observación de que plantas transgénicas de *N. benthamiana* portadoras de una construcción en la que el promotor (-445)*BV1* de TGMV fusionado a *GUS*, dirige una expresión fuerte del gen reportero en tejidos vasculares, en ausencia de factores virales (Berger y Sunter, 2013); tal como se ha visto en plantas transgénicas con los promotores de *CP* truncados de TGMV y CbLCV (Sunter y Bisaro, 1997; Lacatus y Sunter, 2008), sugiere que el promotor de *BV1* podría regularse de modo análogo al promotor de *CP*, esto es, por desrepresión en tejido vascular, y activación en mesófilo. Eso tiene sentido considerando que el gen *BV1*, de acuerdo a varias líneas de evidencia, parece haberse derivado evolutivamente del gen *CP* (Cárdenas-Conejo, 2012). Sin embargo, la observación de que los promotores de *BC1* y *BV1* de PHYVV, fusionados a *GUS*, expresan el gen reportero a elevados niveles, tanto en tejido vascular como en mesófilo, y en ausencia de factores virales (Ruiz-Medrano, 1996) no concuerda con esas expectativas, y plantea una contradicción aparente con la noción de que la expresión de esos genes debe ser el resultado de una activación por productos de genes tempranos, que aquí parecería no ser necesaria. También entra en contradicción con los resultados del estudio de Shimada-Beltrán y Rivera-Bustamante (2007), que demostraron que la expresión de transcritos de *BV1* de PHYVV iniciaba y aumentaba hasta la fase tardía del proceso infeccioso.

El promotor de BV1 es activo en ausencia de factores virales y no hay evidencia de un silenciador.

En el presente estudio de expresión transitoria *in planta* realizamos experimentos en los que los promotores *BC1* y *BV1* de PHYVV, fusionados al gen reportero *GUS*, fueron

examinados en ausencia y presencia de una fuente de TrAP. Los resultados obtenidos fueron congruentes con los resultados obtenidos previamente en plantas transgénicas de tabaco (Ruiz-Medrano, 1996; Ruiz-Medrano y Rivera-Bustamante, datos no publicados). En efecto, tanto la única construcción *BC1::GUS* como las cinco versiones del promotor *BV1* fusionadas al mismo gen reportero, mostraron niveles comparativamente elevados de actividad en ausencia de TrAP. Los niveles de actividad de GUS en ausencia de TrAP fueron cercanos e incluso superiores a los del promotor 35S de CaMV presente en el vector binario pBI-121, que se incluyó entre los controles usados en los experimentos (Figuras 15-17). Varias observaciones que merecen destacarse son las siguientes:

1) El promotor en la construcción (-894)*BC1::GUS* mostró, en ausencia TrAP, una actividad que fue ~3 veces menor a la de la construcción (-900)*BV1::GUS*, a pesar de que la secuencia de la región intergénica que contienen es la misma, pero en sentidos opuestos. Sin embargo la actividad de (-894)*BC1::GUS* se potenció a un nivel equiparable a (-900)*BV1::GUS*, en presencia de TrAP (Figuras 12 y 14).

2) La versión más corta del promotor de *BV1* (-259), mostró un nivel de potenciación en presencia de TrAP superior al de algunas versiones más extensas, como (-900) *BV1::GUS* y (-1351)*BV1::GUS* (Figuras 12, 13 y 15).

3) Las dos versiones más extensas del promotor *BV1*, (-1977) *BV1::GUS* y (-2589) *BV1::GUS* expresaron el gen reportero en ausencia de TrAP a niveles muy superiores (de cinco a diez veces) a las del control pBI121. Los niveles de expresión alcanzados en presencia de TrAP fueron varias veces superiores a las del mencionado control positivo (de 8 a 15 veces) (Figuras 16 y 17).

4) Con respecto a la construcción en la que se utilizó el ADN-B completo como “promotor” de *BV1* ((-2589)*BV1::GUS*), el nivel de actividad transcripcional observado, sumamente elevada, excluye la presencia de un silenciador del promotor de *BV1* análogo al silenciador del promotor de *CP* encontrado en la región codificante del ADN-A de PHYVV (Ruiz-Medrano, 1996; Monsalve-Fonnegra *et al.*, 2002), que era una de las preguntas importantes a responder en este proyecto.

5) En cuanto al mapeo de regiones de respuesta a TrAP se puede afirmar que la secuencia que corresponde a los primeros 259 pb del promotor contienen elementos necesarios y suficientes para la transactivación de *BV1*. Esta región incluye el módulo de

90 pb en los que se concentran cuatro CLEs y una caja G asociada a uno de ellos. Además de éstas secuencias, el análisis de potenciales elementos reguladores presentes en esta corta región promotora usando la base de datos de sitios reconocidos por factores transcripcionales de plantas PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) reveló la presencia de algunos elementos de respuesta a ácido abscísico (ABREs) (ACGTGG) y de elementos como una caja CCAAT, que se han encontrado también en la región proximal del promotor *BV1* de otros begomovirus, que son regulados por TrAP (Berger y Sunter, 2013; Sun *et al.*, 2020), lo que sugiere la participación de factores transcripcionales diversos en los procesos de control mediado por TrAP. Recientemente se describieron tres elementos de respuesta a ácido abscísico (ABREs) que juntos actúan como un elemento de respuesta a TrAP en el promotor de *BV1* del virus asiático MYMV (Sun *et al.*, 2020). Uno de los elementos es una caja G (“CACGTG”) adyacente a un CLE, que se asemeja al arreglo presente en el promotor de *BV1* de PHYVV. Considerando la clara respuesta de transactivación que se observó en nuestros ensayos, sería interesante examinar el efecto de mutaciones en este segmento Caja-G/ CLE en el contexto del promotor (-259) *BV1* de PHYVV, usando este sistema de expresión transitoria.

El nivel de variabilidad en los valores de los datos cuantitativos de las construcciones *BV1::GUS* y *BC1::GUS* fue muy elevado en nuestros experimentos, aunque este es un problema recurrente y difícil de eliminar en ensayos de este tipo, como ha sido discutido por varios autores (Bashandy *et al.*, 2015; Norkunas *et al.*, 2018).

En resumen, el ensayo transitorio *in planta* reprodujo en términos generales los resultados observados en plantas transgénicas de tabaco, esto es, una expresión muy elevada del gen reportero en varios tejidos de la planta, en ausencia de productos de genes virales tempranos. Dado que la expresión elevada de *CP* (en particular) y/o NSP, en etapas tempranas de la infección, secuestraría una parte sustancial de los ADNcs generados por la RCR, se comprometería el proceso de infección al disminuir los templados para la generación de formas replicativas del virus, y la generación de minicromosomas transcripcionalmente activos, que son la fuente de proteínas que suprimen una variedad de respuestas de defensa de las plantas. Consecuentemente,

consideramos que otros mecanismos deben estar involucrados en la expresión temporalmente regulada de los genes tardíos del ADN-B de PHYVV, de tal forma que los ARNm de *BV1*, o la proteína NSP misma, se acumulen hasta las etapas tardías del proceso infectivo. La observación de Rao y Sunter (2012), de que el promotor de *CP* del curtovirus BCTC-SpCT está aparentemente activo en floema en plantas transgénicas de *N. benthamiana* desde sus etapas tempranas, sin factores virales, ha sugerido que el promotor de *CP* de ese virus está reprimido en floema y que AC2/TrAP lo activa solo al final del ciclo infectivo, cuando se requiere la proteína CP; sin embargo, el mecanismo por el cual esto ocurre no fue demostrado de modo directo (Rao y Sunter, 2012). Una explicación análoga podría usarse en el caso del promotor de *BV1/NSP*, en la que los transcritos de *NSP* podrían estar regulados negativamente post-transcripcionalmente en las etapas iniciales de la infección, y que en la fase tardía sean regulados de modo diferente, y la proteína NSP fuese sintetizada hasta esa etapa. Sin embargo, no existe evidencia de que un proceso como ese tenga lugar en el caso de PHYVV. Más aún, fue reportado por Shimada-Beltrán y Rivera-Bustamante (2007) que los niveles de ARNm de *NSP* empiezan a incrementarse en la fase tardía pero no antes, y por lo tanto la regulación temporal de los genes tardíos del ADN-B en PHYVV parece seguir el patrón estándar de regulación temporal de la expresión génica en geminivirus. Por lo tanto, lo que ha de determinarse es el nivel de transcritos de *NSP* en plantas infectadas con PHYVV, y considerar que las observaciones de la actividad de los promotores del componente B en plantas transgénicas y en los ensayos de expresión transitoria *in planta*, son el resultado de procesos especiales aunque reproducibles, para los cuales no tenemos una explicación por el momento, pero que no reflejan apropiadamente el programa de regulación temporal de la expresión génica del ADN-B de PHYVV. Es posible que en esos procesos la co-existencia de los componentes genómicos A y B en la planta determine la actividad temporalmente regulada de los promotores y los genes tardíos, mediada tal vez por ARNs pequeños especiales o por microRNAs, producidos por el ADN-A para regular la actividad del segundo componente. Estas cuestiones pueden ser respondidas claramente en experimentos que usen ambos componentes genómicos de PHYVV simultáneamente, lo que no se examinó en las plantas transgénicas *BV1::GUS* y *BC1::GUS*, ni en los ensayos de expresión transitoria *in planta* que llevamos a cabo.

También debe considerarse que las construcciones promotor-gen reportero que se insertan en el genoma de las plantas por *Agrobacterium* son moléculas lineales, y por lo tanto los genes virales no guardan la relación original que tienen en su forma circular, episomal, lo cual puede causar alteraciones en los patrones de transcripción.

El promotor (-693)CP::GUS de PHYVV y sus variantes con regiones potencialmente silenciadoras fueron transactivados por TrAP

El vector de expresión AC2/TrAP de PHYVV que se generó para el análisis de la región intergénica del ADN-B fue utilizado posteriormente para examinar la capacidad de respuesta a TrAP de cuatro vectores binarios generados por Juárez-Rayes (2007) para delimitar con mayor precisión el elemento silenciador que controla al gen *CP* de PHYVV, en plantas transgénicas. En los experimentos de expresión transitoria *in planta* se observó de manera consistente la activación de los promotores quiméricos en presencia de TrAP, aunque la variabilidad de los resultados fue elevada, lo que no permitió llegar a conclusiones estadísticamente válidas respecto a las diferencias observadas, por ejemplo, en el efecto de la secuencia corriente arriba del promotor truncado (-693)CP::GUS. En ausencia de TrAP el nivel de expresión de GUS fue consistentemente baja pero detectable, como se aprecia en las figuras 19-22. Esta actividad fue por lo general similar o ligeramente menor a la observada en el control (-693)CP::GUS. El caso más claro fue el promotor pBIΩ100sil, que mostró los niveles más bajos en los tres experimentos (Figura 19). Por otra parte, el nivel de potenciación (expresión del gen reportero en presencia de TrAP respecto a la expresión en ausencia de esa proteína viral) fue consistentemente más alta pero muy variable entre la mayor parte de los promotores quiméricos examinados (Figura 20), lo que sugiere que la presencia de las secuencias cadena arriba de (-693)CP::GUS no parecen haber producido un efecto estadísticamente significativo sobre la actividad de ese promotor truncado. La transactivación observada en todos los casos se debe entonces, probablemente, a secuencias que se encuentran debajo de la posición -693 del promotor de *CP*, la cual contiene al menos una región de respuesta al transactivador, comprendida en los primeros 115 pb del promotor (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999), y tal vez otra(s) cadena arriba de -115 y cadena abajo de -693 (Monsalve-Fonnegra *et al.*, 2002). La región 1-115 contiene dos elementos CLEs

estrechamente asociados a la caja TATA del gen *CP*. Es probable que otros elementos *cis*-reguladores corriente arriba de la posición -115 potencien el efecto de los elementos asociados a la caja TATA de *CP* en tejidos específicos. Considerando la elevada conservación de los elementos que actúan coordinadamente para potenciar y reprimir la actividad de los promotores tardíos de *CP* y *NSP*, cabe esperar que los factores transcripcionales involucrados en esta regulación sean comunes a la gran mayoría de los begomovirus y las plantas que infectan, y que sea posible conocer, en mayor detalle, la maquinaria molecular involucrada. Puede anticiparse que algunos elementos de esa maquinaria participan en la regulación de los genes tardíos de ambos componentes genómicos.

En el caso de las construcciones generadas a partir de PHYVV para delimitar con precisión el elemento silenciador del promotor de *CP*, es evidente que solo serán útiles en sistemas transgénicos, al permitir evaluar la acción que los elementos represores distantes del gen *CP* tienen sobre los elementos de acción positiva que se encuentran cercanos a la parte inicial del gen. Los experimentos de expresión transitoria en planta realizados en este estudio preliminar solo nos permitieron establecer que las construcciones se activan, efectivamente, en presencia del transactivador, pero no influyeron en la actividad del promotor truncado en el floema, tejido al cual las agrobacterias no pueden acceder por agroinfiltración.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Argüello-Astorga, G. R., Guevara-González, R. G., Herrera-Estrella, L. R., & Rivera-Bustamante, R. F. (1994). Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology*, 203(1), 90–100.

<https://doi.org/10.1006/viro.1994.1458>

Argüello-Astorga, G., Lopez-Ochoa, L., Kong, L. J., Orozco, B. M., Settlage, S. B., & Hanley-Bowdoin, L. (2004). A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. *Journal of virology*, 78(9), 4817–4826.

<https://doi.org/10.1128/jvi.78.9.4817-4826.2004>

Berger, M. R., & Sunter, G. (2013). Identification of sequences required for AL2-mediated activation of the tomato golden mosaic virus-yellow vein BR1 promoter. *The Journal of general virology*, 94(Pt 6), 1398–1406. <https://doi.org/10.1099/vir.0.050161-0>

Bashandy, H., Jalkanen, S. & Teeri, T.H. Within leaf variation is the largest source of variation in agroinfiltration of *Nicotiana benthamiana* . *Plant Methods* 11, 47 (2015).

<https://doi.org/10.1186/s13007-015-0091-5>

Borah, B. K., Zarreen, F., Baruah, G., & Dasgupta, I. (2016). Insights into the control of geminiviral promoters. *Virology*, 495, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.04.033>

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

Briddon, R. W., Pinner, M. S., Stanley, J., & Markham, P. G. (1990). Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*, 177(1), 85–94.

[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90462-z](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90462-z)

Briddon, R. W., Patil, B. L., Bagewadi, B., Nawaz-ul-Rehman, M. S., & Fauquet, C. M. (2010). Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC evolutionary biology*, *10*, 97. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-97>

Brown, J.K., Fauquet, C.M., Briddon, R.W., Zerbini, M., Moriones, E. and Navas Castillo, J. (2012) Family Geminiviridae. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses—Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J., eds), 351–373. London: Elsevier Academic Press

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>

Cárdenas-Conejo, Y. Reconstrucción de la evolución genómica de los begomovirus por medio de un enfoque multidisciplinario integrado. (2012). (Tesis doctoral inédita). Posgrado en Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), San Luis Potosí, México.

Carvajal-Yepes, M., Zambrano, L., Bueno, J. M., Raatz, B., & Cuellar, W. J. (2017). Complete genome sequence of bean leaf crumple virus, a novel begomovirus infecting common bean in Colombia. *Archives of virology*, *162*(6), 1773–1776. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3271-y>

Castillo, A. G., Collinet, D., Deret, S., Kashoggi, A., & Bejarano, E. R. (2003). Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (Ren) and viral

replication protein (Rep). *Virology*, 312(2), 381–394. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(03\)00234-4](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(03)00234-4)

Cazzonelli, C. I., Burke, J., & Velten, J. (2005). Functional characterization of the geminiviral conserved late element (CLE) in uninfected tobacco. *Plant molecular biology*, 58(4), 465–481. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-6589-x>

Chakraborty, S., Vanitharani, R., Chattopadhyay, B., & Fauquet, C. M. (2008). Supervirulent pseudorecombination and asymmetric synergism between genomic components of two distinct species of begomovirus associated with severe tomato leaf curl disease in India. *The Journal of general virology*, 89(Pt 3), 818–828. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82873-0>

Chowda-Reddy, R. V., Achenjang, F., Felton, C., Etarock, M. T., Anangfac, M. T., Nugent, P., & Fondong, V. N. (2008). Role of a geminivirus AV2 protein putative protein kinase C motif on subcellular localization and pathogenicity. *Virus research*, 135(1), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.02.014>

Cui, X., Li, G., Wang, D., Hu, D., & Zhou, X. (2005). A Begomovirus DNAbeta-encoded protein binds DNA, functions as a suppressor of RNA silencing, and targets the cell nucleus. *Journal of virology*, 79(16), 10764–10775. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10764-10775.2005>

De Barro, P. J., Liu, S. S., Boykin, L. M., & Dinsdale, A. B. (2011). Bemisia tabaci: a statement of species status. *Annual review of entomology*, 56, 1–19. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085504>

Eagle, P. A., Orozco, B. M., & Hanley-Bowdoin, L. (1994). A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. *The Plant cell*, 6(8), 1157–1170. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.8.1157>

Fiallo-Olivé, E., Martínez-Zubiaur, Y., Moriones, E., & Navas-Castillo, J. (2012). A novel class of DNA satellites associated with New World begomoviruses. *Virology*, 426(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.01.024>

Fondong, V. N. (2013). Geminivirus protein structure and function. *Molecular plant pathology*, 14(6), 635–649. <https://doi.org/10.1111/mpp.12032>

Fontes, E. P., Eagle, P. A., Sipe, P. S., Luckow, V. A., & Hanley-Bowdoin, L. (1994). Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *The Journal of biological chemistry*, 269(11), 8459–8465.

Gallagher, S.R. (1992). GUS Protocols, Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression, 1st edn. (Academic Press Inc., San Diego), 127–162.

Gilbertson, R. L., Batuman, O., Webster, C. G., & Adkins, S. (2015). Role of the Insect Supervectors Bemisia tabaci and Frankliniella occidentalis in the Emergence and Global Spread of Plant Viruses. *Annual review of virology*, 2(1), 67–93. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085410>

Glick, E., Zrachya, A., Levy, Y., Mett, A., Gidoni, D., Belausov, E., Citovsky, V., & Gafni, Y. (2008). Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(1), 157–161. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709036105>

Goodman, R. M., Shock, T. L., Haber, S., Browning, K. S., & Bowers, G. R., Jr (1980). The composition of bean golden mosaic virus and its single-stranded DNA genome. *Virology*, 106(1), 168–172. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(80\)90236-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(80)90236-6)

Guerrero, J., Regedanz, E., Lu, L., Ruan, J., Bisaro, D. M., & Sunter, G. (2020). Manipulation of the Plant Host by the Geminivirus AC2/C2 Protein, a Central Player in the Infection Cycle. *Frontiers in plant science*, 11, 591. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00591>

Gutierrez, C., Ramirez-Parra, E., Mar Castellano, M., Sanz-Burgos, A. P., Luque, A., & Missich, R. (2004). Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Veterinary microbiology*, 98(2), 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.10.012>

Hanley-Bowdoin, L., Bejarano, E. R., Robertson, D., & Mansoor, S. (2013). Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature reviews. Microbiology*, 11(11), 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3117>

Harrison, B., Barker, H., Bock, K., Guthrie, E. J., Meredith, G. & Atkinson, M. (1977). Plant viruses with circular single-stranded DNA. *Nature* 270, 760–762. <https://doi.org/10.1038/270760a0>

Hartz, M. D., Sunter, G., & Bisaro, D. M. (1999). The tomato golden mosaic virus transactivator (TrAP) is a single-stranded DNA and zinc-binding phosphoprotein with an acidic activation domain. *Virology*, 263(1), 1–14. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9925>

Hesketh, E. L., Saunders, K., Fisher, C., Potze, J., Stanley, J., Lomonossoff, G. P., & Ranson, N. A. (2018). The 3.3 Å structure of a plant geminivirus using cryo-EM. *Nature communications*, 9(1), 2369. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04793-6>

Ilyas, M., Qazi, J., Mansoor, S., & Briddon, R. W. (2009). Molecular characterisation and infectivity of a "Legumovirus" (genus Begomovirus: family Geminiviridae) infecting the leguminous weed *Rhynchosia minima* in Pakistan. *Virus research*, 145(2), 279–284. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.07.018>

Inoue-Nagata, A. K., Lima, M. F. & Gilbertson, R. L. (2016). A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Horticultura Brasileira*, 34(1), 8-18. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620160000100002>

Ismayil, A., Haxim, Y., Wang, Y., Li, H., Qian, L., Han, T., Chen, T., Jia, Q., Yihao Liu, A., Zhu, S., Deng, H., Gorovits, R., Hong, Y., Hanley-Bowdoin, L., & Liu, Y. (2018). Cotton Leaf Curl Multan virus C4 protein suppresses both transcriptional and post-transcriptional gene silencing by interacting with SAM synthetase. *PLoS pathogens*, 14(8), e1007282. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007282>

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal*, 6(13), 3901–3907.

Joh, L. D., McDonald, K. A., & VanderGheynst, J. S. (2006). Evaluating extraction and storage of a recombinant protein produced in agroinfiltrated lettuce. *Biotechnology progress*, 22(3), 723–730. <https://doi.org/10.1021/bp0503235>

Juárez-Reyes, A. (2007). Delimitación de secuencias involucradas en el silenciamiento y transactivación de los genes tardíos del Virus Huasteco del Chile (PHV). (Tesis de maestría). Programa de Posgrado en Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y tecnológica, SLP, México.

Kumar, R. V., Prasanna, H. C., Singh, A. K., Ragunathan, D., Garg, G. K., & Chakraborty, S. (2017). Molecular genetic analysis and evolution of begomoviruses and betasatellites causing yellow mosaic disease of bhendi. *Virus genes*, 53(2), 275–285. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1414-y>

Lacatus, G., & Sunter, G. (2008). Functional analysis of bipartite begomovirus coat protein promoter sequences. *Virology*, 376(1), 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.03.012>

Lacatus, G., & Sunter, G. (2009). The Arabidopsis PEAPOD2 transcription factor interacts with geminivirus AL2 protein and the coat protein promoter. *Virology*, 392(2), 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.004>

Lai, J., Chen, H., Teng, K., Zhao, Q., Zhang, Z., Li, Y., Liang, L., Xia, R., Wu, Y., Guo, H., & Xie, Q. (2009). RKP, a RING finger E3 ligase induced by BSCTV C4 protein, affects geminivirus infection by regulation of the plant cell cycle. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 57(5), 905–917. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03737.x>

Laufs, J., Traut, W., Heyraud, F., Matzeit, V., Rogers, S. G., Schell, J., & Gronenborn, B. (1995). In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(9), 3879–3883. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.9.3879>

Lee, C. H., Zheng, Y. X., Chan, C. H., Ku, H. M. , Chang, C. J., Jan, F. J. (2020). A single amino acid substitution in the movement protein enables the mechanical transmission of a geminivirus. *Molecular Plant Pathology*, 21(4), 571-588. <https://doi.org/10.1111/mpp.12917>.

Lewis, J. D., & Lazarowitz, S. G. (2010). Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(6), 2491–2496. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909080107>

Li, H., Zeng, R., Chen, Z., Liu, X., Cao, Z., Xie, Q., Yang, C., & Lai, J. (2018). S-acylation of a geminivirus C4 protein is essential for regulating the CLAVATA pathway in symptom determination. *Journal of experimental botany*, 69(18), 4459–4468. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery228>

Lima, A., Sobrinho, R. R., González-Aguilera, J., Rocha, C. S., Silva, S., Xavier, C., Silva, F. N., Duffy, S., & Zerbini, F. M. (2013). Synonymous site variation due to recombination explains higher genetic variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. *The Journal of general virology*, 94(Pt 2), 418–431. <https://doi.org/10.1099/vir.0.047241-0>

Lozano, G., Trenado, H. P., Fiallo-Olivé, E., Chirinos, D., Geraud-Pouey, F., Briddon, R. W., & Navas-Castillo, J. (2016). Characterization of Non-coding DNA Satellites Associated with Sweepoviruses (Genus Begomovirus, Geminiviridae) - Definition of a Distinct Class of Begomovirus-Associated Satellites. *Frontiers in microbiology*, 7, 162. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00162>

Marwal A., Mishra M., Verma R., Prajapat R., Gaur R.K. (2018) In Silico Study of the Geminiviruses Infecting Ornamental Plants. In: Choudhary D., Kumar M., Prasad R., Kumar V. (eds) In Silico Approach for Sustainable Agriculture. Springer, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-0347-04>

Mei, Y., Wang, Y., Hu, T., Yang, X., Lozano-Duran, R., Sunter, G., & Zhou, X. (2018). Nucleocytoplasmic Shuttling of Geminivirus C4 Protein Mediated by Phosphorylation and Myristoylation Is Critical for Viral Pathogenicity. *Molecular plant*, 11(12), 1466–1481. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.10.004>

Melgarejo, T. A., Kon, T., Rojas, M. R., Paz-Carrasco, L., Zerbini, F. M., & Gilbertson, R. L. (2013). Characterization of a new world monopartite begomovirus causing leaf curl disease of tomato in Ecuador and Peru reveals a new direction in geminivirus evolution. *Journal of virology*, 87(10), 5397–5413. <https://doi.org/10.1128/JVI.00234-13>

Moisés-Capenda da Rosa, J. J., Miranda-Cabrera, I. & Martínez-Zubiaur Y. (2018). Epidemiology of african cassava mosaic diseases in Huíla province, Angola. *Revista de Protección Vegetal*, 33(3):1-8.

Monsalve-Fonnegra, Z., Argüello-Astorga, G.R., Rivera-Bustamante, R.F. (2002). Geminivirus Replication and Gene Expression. In: Viruses as molecular plant pathogens (Ed.) Khan, J.A. and Dijkstra, J. Haworth Press, Inc., New York, p.257-277.

Monsalve Fonnegra, Z. I. (2002). Caracterización funcional de los Elementos Tardíos Conservados (CLEs) presentes en el gen de la proteína de la cápside del Virus huasteco del chile. (Tesis doctoral inédita). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Irapuato, Gto., México.

Nawaz-ul-Rehman, M. S., Mansoor, S., Briddon, R. W., & Fauquet, C. M. (2009). Maintenance of an old world betasatellite by a new world helper begomovirus and possible rapid adaptation of the betasatellite. *Journal of virology*, 83(18), 9347–9355. <https://doi.org/10.1128/JVI.00795-09>

Norkunas, K., Harding, R., Dale, J., & Dugdale, B. (2018). Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant methods*, 14, 71. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0343-2>

Noueiry, A. O., Lucas, W. J., & Gilbertson, R. L. (1994). Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, 76(5), 925–932. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90366-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90366-2)

Pilartz, M., & Jeske, H. (1992). Abutilon mosaic geminivirus double-stranded DNA is packed into minichromosomes. *Virology*, 189(2), 800–802. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90610-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90610-2)

Pilartz, M., & Jeske, H. (2003). Mapping of abutilon mosaic geminivirus minichromosomes. *Journal of virology*, 77(20), 10808–10818. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.20.10808-10818.2003>

Pooggin M. M. (2013). How can plant DNA viruses evade siRNA-directed DNA methylation and silencing?. *International journal of molecular sciences*, 14(8), 15233–15259. <https://doi.org/10.3390/ijms140815233>

Poornima-Priyadarshini, C. G., Ambika, M. V., Tippeswamy, R., and Savithri, H. S. (2011). Functional characterization of coat protein and V2 involved in cell to cell movement of Cotton leaf curl Kokhran virus-Dabawali. *PLoS One*,6(11):e26929. doi: 10.1371/journal.pone.0026929.

Preiss, W., & Jeske, H. (2003). Multitasking in replication is common among geminiviruses. *Journal of virology*, 77(5), 2972–2980. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.5.2972-2980.2003>

Rao, K., & Sunter, G. (2012) . Sequences within the Spinach curly top virus virion sense promoter are necessary for vascular-specific expression of virion sense genes. *Virology*,432(1)10-9. doi: 10.1016/j.virol.2012.05.007

Rocha, C. S., Castillo-Urquiza, G. P., Lima, A. T., Silva, F. N., Xavier, C. A., Hora-Júnior, B. T., Beserra-Júnior, J. E., Malta, A. W., Martin, D. P., Varsani, A., Alfenas-Zerbini, P., Mizubuti, E. S., & Zerbini, F. M. (2013). Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. *Journal of virology*, 87(10), 5784–5799. <https://doi.org/10.1128/JVI.00155-13>

Rojas, M. R., Jiang, H., Salati, R., Xoconostle-Cázares, B., Sudarshana, M. R., Lucas, W. J., & Gilbertson, R. L. (2001). Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, Tomato yellow leaf curl virus. *Virology*, 291(1), 110–125. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1194>

Rojas, M. R., Hagen, C., Lucas, W. J., & Gilbertson, R. L. (2005). Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual review of phytopathology*, 43, 361–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135939>

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., Legg, J. P., Kvarnheden, A., Wintermantel, W. M., Sudarshana, M. R., Peterschmitt, M., Lapidot, M., Martin, D. P., Moriones, E., Inoue-Nagata, A. K., & Gilbertson, R. L. (2018). World Management of Geminiviruses. *Annual review of phytopathology*, 56, 637–677. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100327>

Ruiz-Medrano, R. (1996). Análisis de la expresión de los principales promotores del geminivirus huasteco del chile. (Tesis doctoral inédita). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Unidad Irapuato. Guanajuato. México.

Ruiz-Medrano, R., Guevara-González, R. G., Argüello-Astorga, G. R., Monsalve-Fonnegra, Z., Herrera-Estrella, L. R., & Rivera-Bustamante, R. F. (1999). Identification of a sequence element involved in AC2-mediated transactivation of the pepper huasteco virus coat protein gene. *Virology*, 253(2), 162–169. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9484>

Sanderfoot, A. A., & Lazarowitz, S. G. (1995). Cooperation in Viral Movement: The Geminivirus BL1 Movement Protein Interacts with BR1 and Redirects It from the Nucleus to the Cell Periphery. *The Plant cell*, 7(8), 1185–1194. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.8.1185>

Sanderfoot, A. A., & Lazarowitz, S. G. (1996). Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends in cell biology*, 6(9), 353–358. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(96\)10031-3](https://doi.org/10.1016/0962-8924(96)10031-3)

Saunders, K., Lucy, A., & Stanley, J. (1991). DNA forms of the geminivirus African cassava mosaic virus consistent with a rolling circle mechanism of replication. *Nucleic acids research*, 19(9), 2325–2330. <https://doi.org/10.1093/nar/19.9.2325>

Saunders, K., Lucy, A., & Stanley, J. (1992). RNA-primed complementary-sense DNA synthesis of the geminivirus African cassava mosaic virus. *Nucleic acids research*, 20(23), 6311–6315. <https://doi.org/10.1093/nar/20.23.6311>

Settlage, S. B., Miller, A. B., & Hanley-Bowdoin, L. (1996). Interactions between geminivirus replication proteins. *Journal of virology*, 70(10), 6790–6795. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.10.6790-6795.1996>

Sharma, P., & Ikegami, M. (2010). Tomato leaf curl Java virus V2 protein is a determinant of virulence, hypersensitive response and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Virology*, 396(1), 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.10.012>

Shimada-Beltrán, H., & Rivera-Bustamante, R. F. (2007). Early and late gene expression in pepper huasteco yellow vein virus. *The Journal of general virology*, 88(Pt 11), 3145–3153. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83003-0>

Shivaprasad, P. V., Akbergenov, R., Trinks, D., Rajeswaran, R., Veluthambi, K., Hohn, T., & Pooggin, M. M. (2005). Promoters, transcripts, and regulatory proteins of Mungbean yellow mosaic geminivirus. *Journal of virology*, 79(13), 8149–8163. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.8149-8163.2005>

Shung, C. Y., & Sunter, G. (2009). Regulation of Tomato golden mosaic virus AL2 and AL3 gene expression by a conserved upstream open reading frame. *Virology*, 383(2), 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.10.020>

Somssich, M. (2018) A short history of the CaMV 35S promoter. *PeerJ Preprints* <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27096v1>.

Stenger, D. C., Revington, G. N., Stevenson, M. C., & Bisaro, D. M. (1991). Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(18), 8029–8033. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.18.8029>

Sun, R., Han, J., Zheng, L., & Qu, F. (2020). The AC2 Protein of a Bipartite Geminivirus Stimulates the Transcription of the BV1 Gene through Abscisic Acid Responsive Promoter Elements. *Viruses*, 12(12), 1403. <https://doi.org/10.3390/v12121403>

Sunter, G., & Bisaro, D. M. (1989). Transcription map of the B genome component of tomato golden mosaic virus and comparison with A component transcripts. *Virology*, 173(2), 647–655. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90577-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90577-1)

Sunter, G., & Bisaro, D. M. (1992). Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *The Plant cell*, 4(10), 1321–1331. <https://doi.org/10.1105/tpc.4.10.1321>

Sunter, G., & Bisaro, D. M. (1997). Regulation of a geminivirus coat protein promoter by AL2 protein (TrAP): evidence for activation and derepression mechanisms. *Virology*, 232(2), 269–280. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8549>

Sunter, G., & Bisaro, D. M. (2003). Identification of a minimal sequence required for activation of the tomato golden mosaic virus coat protein promoter in protoplasts. *Virology*, 305(2), 452–462. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1757>

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. (2019). A Lineage of Begomoviruses Encode Rep and AC4 Proteins of Enigmatic Ancestry: Hints on the Evolution of Geminiviruses in the New World. *Viruses*, 11(7), 644. <https://doi.org/10.3390/v11070644>

Trenado, H. P., Orílio, A. F., Márquez-Martín, B., Moriones, E., & Navas-Castillo, J. (2011). Sweepviruses cause disease in sweet potato and related Ipomoea spp.: fulfilling Koch's postulates for a divergent group in the genus begomovirus. *PloS one*, 6(11), e27329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027329>

Vaca-Vaca, J.C., Betancur-Pérez, J.F. & López-López, K. (2012). Distribución y diversidad genética de begomovirus que infectan tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 60-76.

Wang, H., Hao, L., Shung, C. Y., Sunter, G., & Bisaro, D. M. (2003). Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *The Plant cell*, 15(12), 3020–3032. <https://doi.org/10.1105/tpc.015180>

Ward, B. M., & Lazarowitz, S. G. (1999). Nuclear export in plants. Use of geminivirus movement proteins for a cell-based export assay. *The Plant cell*, 11(7), 1267–1276. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.7.1267>

Yang, X., Baliji, S., Buchmann, R. C., Wang, H., Lindbo, J. A., Sunter, G., & Bisaro, D. M. (2007). Functional modulation of the geminivirus AL2 transcription factor and silencing suppressor by self-interaction. *Journal of virology*, 81(21), 11972–11981. <https://doi.org/10.1128/JVI.00617-07>

Zaidi, S. S., Naqvi, R. Z., Asif, M., Strickler, S., Shakir, S., Shafiq, M., Khan, A. M., Amin, I., Mishra, B., Mukhtar, M. S., Scheffler, B. E., Scheffler, J. A., Mueller, L. A., & Mansoor, S. (2020). Molecular insight into cotton leaf curl geminivirus disease resistance in cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant biotechnology journal*, 18(3), 691–706. <https://doi.org/10.1111/pbi.13236>

Zerbini, F. M., Briddon, R. W., Idris, A., Martin, D. P., Moriones, E., Navas-Castillo, J., Rivera-Bustamante, R., Roumagnac, P., Varsani, A., & Ictv Report Consortium (2017).

ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. *The Journal of general virology*, 98(2), 131–133. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000738>

Zhang, W., Olson, N. H., Baker, T. S., Faulkner, L., Agbandje-McKenna, M., Boulton, M. I., Davies, J. W., & McKenna, R. (2001). Structure of the Maize streak virus geminate particle. *Virology*, 279(2), 471–477. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0739>

Zhou X. (2013). Advances in understanding begomovirus satellites. *Annual review of phytopathology*, 51, 357–381. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102234>

Parte 2. Una nueva especie de begomovirus aislada de una planta de frijol infectada por potyvirus causa infecciones asintomáticas en *P. vulgaris* y *N. benthamiana*.

RESUMEN:

En este estudio, un begomovirus aislado de una planta de frijol co-infectada con los potyvirus BCMV (virus del mosaico común del frijol) y BCMNV (mosaico necrótico del frijol común) virus del mosaico común necrótico del frijol (BCMNV), fue caracterizado molecularmente. Los tres virus fueron detectados por la técnica de secuenciación de alto rendimiento (HTS) y ensamble de ARNs pequeños totales, pero aunque los potyvirus fueron totalmente secuenciados, los contigs relacionados a begomovirus no permitieron una identificación precisa de los virus presentes en la muestra. El análisis molecular basado en técnicas de amplificación de ADN convencionales (PCR y RCA) reveló la presencia de un solo begomovirus bipartita, que es una nueva especie de acuerdo a los criterios taxonómicos vigentes. Se generaron clonas infectivas y se agroinocularon en plantas de *Phaseolus vulgaris* y *Nicotiana benthamiana*. En todos los casos tanto el ADN-A como el ADN-B fueron detectados en los nuevos tejidos, pero no se observaron síntomas, indicando por tanto que este virus produce infecciones sistémicas asintomáticas.

Palabras clave: Infección asintomática, infección mixta, siRSA, HTS.

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es una de las legumbres más cultivadas a nivel mundial y es un cultivo básico muy importante en los países de África Central y Oriental, y en América Latina (Sasson *et al.*, 2018). El frijol es altamente susceptible a las infecciones por virus, especialmente por miembros de los dos mayores géneros de virus vegetales, *Potyvirus* y *Begomovirus* (Gibbs *et al.*, 2010; Zerbini *et al.*, 2017; Rojas *et al.*, 2018). Los potyvirus tienen un genoma compuesto de una molécula de ARN monocatenario de sentido positivo, de ~ 10,000 nt, empaquetada en viriones filamentosos flexibles que son transmitidos por pulgones (Gibbs *et al.*, 2010). Por otra parte, los begomovirus (BGVs) tienen genomas pequeños compuestos por una o dos moléculas circulares de ADN monocatenario de entre 2600-2800 nt, empaquetadas individualmente en una cápside cuasi-icosaédrica geminada (Hesketh *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2019).

Los BGVs infectan una variedad de cultivos silvestres y plantas dicotiledóneas, y son transmitidos exclusivamente por moscas blancas del complejo de especies crípticas *Bemisia tabaci* (De Barro *et al.*, 2011). El genoma de los BGVs nativos de las Américas se compone típicamente de dos moléculas circulares de ADNcs, denominadas ADN-A y ADN-B. El componente genómico A codifica proteínas involucradas en la replicación del ADN viral y la encapsidación, en la regulación temporal de genes virales, interferencia del ciclo celular vegetal y respuestas antivirales (por ejemplo, el silenciamiento génico) (Fondong, 2013; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013). El componente genómico B codifica proteínas involucradas en el movimiento intra e intercelular del ADN viral (Fondong, 2013). Conocer bien la diversidad de los virus que infectan los cultivos específicos es esencial para dirigir los esfuerzos hacia la generación de variedades resistentes a enfermedades, así como para implementar estrategias óptimas para el control de los virus (Rojas *et al.*, 2018). El análisis de la diversidad viral ha experimentado un avance formidable con el desarrollo de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (HTS), una poderosa herramienta para obtener información sobre poblaciones virales

presentes en plantas sintomáticas y asintomáticas (Idris *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2017; Rodriguez-Negrete *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2019).

En México y América Central, los potyvirus del mosaico del frijol común (BCMV, del Inglés) y del mosaico necrótico del frijol común (BCMNV, del Inglés), junto con el begomovirus denominado virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV, del Inglés), se consideran una limitación importante para la producción de frijol (Beebe *et al.*, 2011; Lepe-Soltero *et al.*, 2012). Algunos estudios como los de Flores-Esteves *et al.* (2003) y Lepe-Soltero *et al.* (2012) han revelado una alta incidencia de virus en varios estados productores de frijol de México, aunque menos del 50% de las muestras sintomáticas examinadas fueron positivas para potyvirus, lo que sugiere la presencia de otros virus pertenecientes a otros grupos taxonómicos.

Durante 2013-2015, se realizó por parte de investigadores del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) la colecta de quinientas treinta muestras de hojas de plantas silvestres y cultivadas de frijol común, que presentaban tanto síntomas de virosis, como asintomáticas, en los estados de Guanajuato, Jalisco, Nayarit, Veracruz y Chiapas (México). Setenta y dos de las muestras sintomáticas se analizaron mediante la "Tecnología de secuenciación y ensamblaje de ARN pequeños" (sRSA, del Inglés) (Anaya-Lopez *et al.*, en preparación). La biblioteca de ARN pequeños (sRNA, del Inglés) identificada como CG6Ls (BioProject accession no.PRJNA362733, SRA ID: SRX7528620) fue construida de ARN total. Una de las muestras analizadas en ese estudio no publicado corresponde a una planta de frijol común (cultivar "Mayocoba") que mostraba venas de color amarillento y rojizo en algunas hojas. Esta planta se colectó en un campo de secano (21.939864 N 105.18395 W) de Nayarit, México, en 2014. La muestra fue nombrada como "CN30" (BioSample Accession: SAMN06246801 ID: 6246801), y la biblioteca de sRNA correspondiente fue identificado como CN30Ls. A través del ensamblaje de los contigs obtenidos en CN30, se logró reconstruir la secuencia genómica completa de dos potyvirus, el BCMV (10052 pb; GenBank MG640411) y el BCMNV (9652 pb; GenBank MG640396), cada uno de los cuales mostró más de un 99% de identidad en secuencia con otros aislados de esos virus en México. Además de los potyvirus mencionados, una serie de contigs

relacionados con begomovirus se identificaron en la muestra CN30 por análisis con BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Sin embargo, la longitud de estos contigs fue generalmente pequeña, oscilando entre 500 pb y menos de 100 pb. Dado que la coincidencia en la secuencia de dichos contigs no fue significativa con ninguno de los virus específicos depositados en las bases de datos públicas, se sugirió que probablemente la muestra incluía dos o más begomovirus diferentes, quizás desconocidos, y que era necesario aislarlos para determinar su identidad.

De ahí, que el **objetivo principal** de esta parte del trabajo fuera **la identificación y caracterización genómica del (o los) begomovirus presente en la muestra CN-30.**

Para ello trabajamos bajo la **hipótesis** de que más de un begomovirus está presente en la muestra CN-30, y nos trazamos los objetivos específicos de caracterizar molecular y filogenéticamente estos virus, y generar clones infectivos para llevar a cabo infecciones experimentales para replicarlos y reproducir sus síntomas en frijol.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Caracterización molecular y filogenética

2.1.1 Detección de *Begomovirus* basada en PCR traslapados, específicos de linaje (LISOP, del Inglés). Análisis de fragmentos de restricción.

Para aislar y caracterizar el genoma de los BGVs presentes en la muestra CN30 se trabajó con los extractos de ácidos nucleicos totales que se obtuvieron a través del método de Abarshi *et al.* (2010). El extracto obtenido se utilizó como molde para una amplificación por círculo rodante (RCA) con el estuche comercial TempliPhi (GE Healthcare, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de RCA se sometieron luego a PCR con diferentes combinaciones de iniciadores degenerados, tanto universales como específicos de linaje para begomovirus; que habían sido diseñados previamente (Gregorio-Jorge *et al.*, 2010; Bañuelos-Hernández *et al.*, 2012; Torres-Herrera *et al.*, 2019) (Tabla1).

Todas las mezclas de reacción de PCR contenían ~ 100 ng de ADN, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 0.4 µM cada iniciador, 1X de Taq Platinum DNA Polymerase Buffer, 1U de Taq Platinum DNA Polymerase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y agua libre de nucleasas (Promega, Madison, WI, USA) para obtener un volumen final de 50µl. Las condiciones de amplificación fueron: 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min y 72 °C por 1 min, y una extensión final de 72 °C durante 7 min.

Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEM T-Easy (Promega, WI, EE. UU.), según las instrucciones del fabricante, y seis clonas de cada amplicón se digirieron con *EcoRI* y *Hinfl*. Tres clonas de las seis digeridas fueron secuenciadas en el LANBAMA (IPICYT, San Luis Potosí, México) utilizando un secuenciador automático modelo 3130 de Applied Biosystems.

Tabla 1. Iniciadores utilizados para amplificar fragmentos del genoma de Begomovirus.

	INICIADOR	SECUENCIA (5'- 3')
ADN-A	Rep-SL2150-For	GACGGCRTTGGYGTCTTTGGCWGC
	Rep-SL2370-Rev	CTGYCRTGGTCAGTCGTCAAACC
	Rep-DGRS-For	CAGATCTCCCCTCTAGCAGWTCTNCCGTC
	Rep-DKDG-Rev	CAAGTCCTACATCGACAAGGAYGGAGA
	CP-YMAC-Rev	TTWGASGCATGNGTACATGCCA
	CP-EGP70-For	GGTTGTGAAGNCCNTGTAAGGTYCA
ADN-B	BC1-290-For	GAGAARTAGTGGAGATCTATGTTTRCAYCT
	BC1-290-Rev	CCSATMAGRTGYAACATAGATCTCC
	BC1-DLH (104)-For	GGAAGCTGARAARTAGTGGAGATCTATG
	BC1-PWK (120)-For	TCGCAAACCTCKGTAATAGAGTTTCCATGG
	BV1-310-Rev	CAATYTTRACNGTACCYTTRAAACG
	BV1-310-For	TTYAAGGGTACCGTTAAGATTG
	BV1-GATP (116)-Rev	TTRGGGGTAGMACCGTCMATGTTTCATATC
	BV1-MSKA (240)-Rev	CGCCTTCGACATMGTRTCWGACATCCAAC

2.1.2 Análisis bioinformático

Con el fin de obtener la secuencia completa del genoma bipartito del único BGV detectado en la muestra CN30 (begCN30) se editaron y ensamblaron con el programa BioEdit v7.2.6.1 (Hall, 1999) las secuencias traslapadas de los diferentes fragmentos de PCR.

Las posiciones y los tamaños de los marcos abiertos de lectura (ORF, del Inglés) se predijeron con el programa SnapGene v.5.0.4 (GSL Biotech LLC, EE. UU).

La secuencia de la IR del componente genómico A se analizó con el programa Nsite (Shahmuradov *et al.*, 2015) y la base de datos New PLACE (Higo *et al.*, 1999) para detectar motivos de secuencia de ADN que potencialmente actúan como elementos reguladores en *cis*, en las plantas. La secuencia de la IR del ADN-A también se inspeccionó visualmente para localizar las secuencias de los iterones y detectar la presencia de elementos tardíos conservados (CLE, del Inglés).

Los ADN-A y B de begCN30 se compararon con los genomas de begomovirus (taxid:10814) depositados en el GenBank (NCBI, EE.UU) utilizando la herramienta BLASTn

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Las secuencias de ADN-A con las identidades más altas se alinearon con begCN30 utilizando MUSCLE (Edgar, 2004). Luego se calcularon las identidades de nucleótidos por pares con la herramienta para demarcación de secuencias (SDT v1.2, del Inglés) (Muhire *et al.*, 2014), con el objetivo de definir si begCN30 corresponde o no a una nueva especie begomoviral.

A través del programa CLC Genomics Workbench 20.0.2 (CLC Bio-Qiagen) se estimó la cobertura del genoma de begCN30 por las lecturas de los sRNAs contenidas en la biblioteca CN30Ls; mapeando las lecturas limpias en las secuencias de los componentes genómicos de A y B. La cobertura e identidad de nucleótidos con ambos componentes de ADN, de los contigs ensamblados de novo, se obtuvieron con BLASTn.

2.1.3 Inferencia filogenética

Para inferir la filogenia del begCN30 se generaron árboles filogenéticos basados en comparaciones de las secuencias completas del ADN-A y B de este virus con los componentes genómicos A y B de BGVs que mostraron la mayor identidad por BLASTn, así como otros representantes de los linajes del Nuevo (NM) y Viejo Mundo (VM) que constituyen virus infecciosos de leguminosas. Los árboles se obtuvieron por el método de máxima verosimilitud (ML) implementado en el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) utilizando un alineamiento de las secuencias generado por MUSCLE, el modelo de sustitución de nucleótidos GTR + G + I y 1000 repeticiones de bootstrap.

2.1.4 Análisis de recombinación

La detección de posibles puntos de recombinación y secuencias recombinantes se realizó a través del conjunto de métodos de detección de recombinación comprendidos en el paquete RDP 4 (Martin *et al.*, 2015). Las secuencias utilizadas para el análisis aparecen en el Anexo 1. El estudio se realizó con la configuración predeterminada en todos los métodos de detección y un valor de corte de $p=0.05$, corregido por el método

de Bonferroni. Se tuvieron en cuenta solo los eventos de recombinación que fueron detectados por más de cinco programas.

2.2 Infecciones experimentales

2.2.1 Generación de clonas infectivas

Para generar clonas infectivas de begCN30, primeramente, se obtuvo el monómero lineal del ADN-A digiriendo el producto de RCA con *Bam*HI, el cual fue clonado luego en el vector plasmídico pBlueScript KS⁺ (pBS) (Agilent Technologies, EE. UU) en ese sitio de restricción. El pBS que contenía el ADN-A se digirió entonces con *Apal* y *Bam*HI para conseguir un fragmento del monómero que contuviera el origen de replicación viral (*Ori*A), y que se clonó después en un pBS utilizando los sitios de restricción mencionados. Posteriormente, el monómero de A fue liberado de pBS e insertado cadena arriba del *Ori*A, en la construcción intermedia anterior, en el sitio *Bam*HI, generando así la construcción **pBS::VFA1.84**. A partir de esta construcción, el ADN-A hemidimérico se clonó en el vector binario pCAMBIA 1300 (CAMBIA, Australia) en los sitios *Kpn*I/*Xba*I tras digestión con estas enzimas. El plásmido así construido se denominó **pCA::VFA1.84** (Figura 1).

En el caso del ADN-B, las clonas infectivas se crearon por un procedimiento análogo, solo con cambios en las enzimas de restricción. El monómero lineal se obtuvo tras digerir el producto de RCA con *Cl*aI y se clonó luego en este mismo sitio de restricción en pBS. Posteriormente, el ADN-B clonado en pBS se digirió con *Eco*R I y *Cl*a I para obtener el fragmento que alberga el *Ori*B. Este fragmento también se clonó en pBS. Posteriormente, el monómero de B se liberó de pBS y se subclonó en el sitio *Cl*a I de la construcción intermedia que contenía el *Ori*B. Se obtuvo así el vector pBS::VFB1.72. Desde este último el fragmento hemidimérico del ADN-B se pasó a pCAMBIA 1300 de la misma forma que el hemidímero de A, generando así el vector infeccioso **pCA::VFB1.72** (Figura 1).

Ambos clonas infectivas fueron verificadas por secuenciación y transformadas luego en células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

2.2.2 Ensayos de infección en plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Phaseolus vulgaris*

Los cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (DO= 1) que portaban las clonas infectivas pCa::VFA1.84 y pCa::VFB1.72 fueron infiltrados (en una mezcla 1:1) en hojas de plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) y frijol común (*Phaseolus vulgaris*) para realizar experimentos de replicación viral y poder reproducir los síntomas inducidos por la infección.

La inoculación de diez plantas de *N. benthamiana* (3 semanas de germinadas) se realizó en dos hojas diferentes utilizando jeringas sin aguja, cada una con 500 µl de bacterias transformadas suspendidas en tampón de agroinfiltración (10 mM MES pH 5.6, 10 mM MgCl₂, 100 µM acetosiringona).

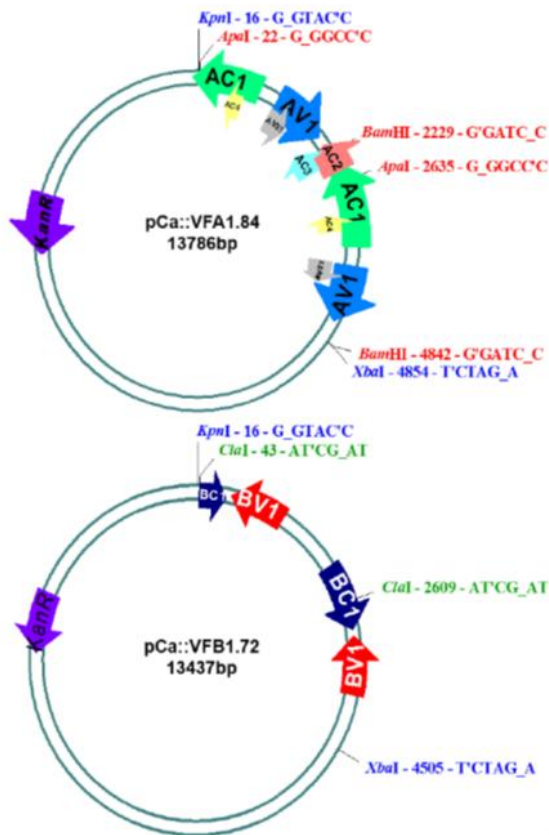


Figura 1. Construcciones hemidiméricas infectivas de begCN30. Para el ADN-A se denominó pCA::VFA 1.84 y para ADN-B, pCA::VFB 1.72.

En el caso de las plantas de frijol (una semana de germinadas), 20 μ L de la mezcla 1:1, se colocaron a ambos lados de la nervadura central en la base de las dos primeras hojas inferiores a las cuales se les había añadido una pequeña cantidad de carborundum. Luego se distribuyó la suspensión de células junto al carborundum, muy suavemente con dos dedos, hacia el ápice de la hoja y sobre la nervadura central. Diez plantas de frijol común de tres variedades diferentes, "Flor de Mayo-Eugenia", "Flor de Mayo-Dolores" y el frijol pinto "Rarámuri" fueron inoculados.

Para todos los experimentos tres plantas de tabaco y de cada cultivar de frijol fueron inoculadas con células GV3101 sin vector binario, o con células GV3101 que portaban el vector pCAMBIA 1300 (controles negativos). Otras dos plantas de cada especie y/o cultivar, permanecieron sin inocular como control del desarrollo natural de las plantas (naive).

Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento libre de insectos a 25°C, con un ciclo diario de 16 h de luz -8 h de oscuridad y regándose cada día con agua estéril. El estado de infección de las plantas inoculadas se evaluó diariamente por inspección visual en busca de síntomas descritos para geminivirus y se analizaron por PCR, a los 21 días posteriores a la inoculación (dpi). Siete plantas de tabaco inoculadas, tres de cada uno de los cultivares de frijol, así como las plantas control, se analizaron por PCR a los 21 dpi. La extracción de ADN *de novo* se realizó a partir de hojas nuevas, del ápice de las plantas, por el método de Dellaporta *et al.* (1983) modificado. Para la detección por PCR se utilizaron las combinaciones de iniciadores DGRS For/cpYMAC Rev, CPc70 For/DGRS Rev, para amplificar el ADN-A y BV1 310 For/BC1 290 Rev, para amplificar el ADN-B (Tabla 1), en las mismas condiciones de reacción y de amplificación descritas en la sección 2.2. Los productos de PCR de dos plantas de cada grupo experimental se clonaron en pGEM T-Easy y secuenciaron para verificar que realmente se derivaron de cada uno de los componentes genómicos A y B, de begCN30.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Caracterización molecular y filogenética

La mayoría de las combinaciones de iniciadores utilizados para la detección de BGVs a través del método LISOP, amplificaron el ADN de la muestra CN30. Solo las combinaciones que incluyen iniciadores específicos para miembros del clado del virus del enrollamiento de la hoja de calabaza (SLCV, del Inglés) no amplificaron, con lo cual quedó descartada la presencia de un BGV de este grupo en la muestra CN-30.

Se observaron patrones de bandas idénticos en las digestiones dobles de las clonas de cada amplicón, tanto en los obtenidos con los iniciadores para amplificar el ADN-A como el ADN-B (Figura 2). Este resultado sugería la presencia de un solo BGV en CN-30, lo cual fue confirmado luego tras el análisis de los resultados de la secuenciación.

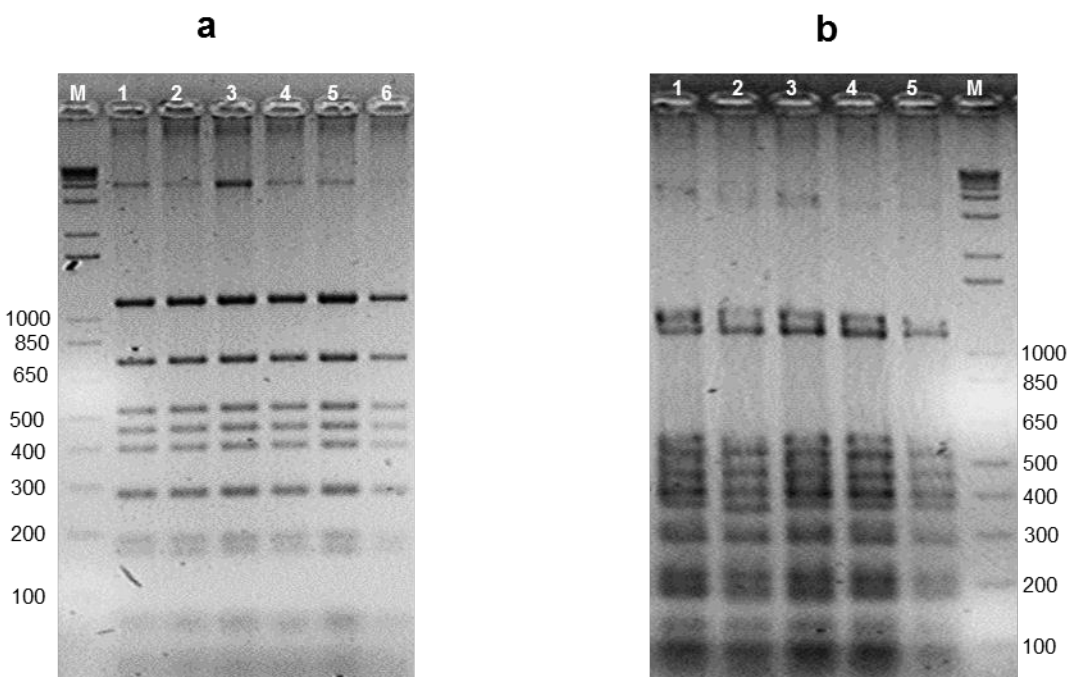


Figura 2. Patrones de restricción de clonas de amplicones del begCN30, con *EcoR* I y *Hinf* I. Las clonas contienen un amplicón de ADN-A (a) o ADN-B (b) del begomovirus presente en la muestra de frijol común CN30. Se observa un patrón único de bandas en las clonas analizadas para cada amplicón.

Se conoce que los virus que infectan a las plantas generalmente portan un genoma pequeño con limitada capacidad de codificación. En varios estudios han sido destacados la complejidad de estos genomas y el carácter multifuncional de las proteínas virales. Para desarrollar sus variadas funciones, las proteínas de estos virus participan en una amplia red de interacciones con otras proteínas del propio virus y del huésped; así como con hormonas, lípidos, orgánulos y membranas intracelulares (Laliberté y Sanfaçon, 2010; Wang, 2015; Nagy, 2016).

Dados los datos obtenidos en este estudio tras la secuenciación de todos los productos de PCR traslapados, se pudieron ensamblar las secuencias completas de los componentes genómicos A y B del begCN30. El análisis de detección de ORFs predijo una organización distintiva de los BGVs del NM en el genoma de begCN30.

La molécula de ADN-A (2613-nt) contiene los cuatro ORFs (*AC1/Rep*, *AC2/TrAP*, *AC3/REn* y *AC4*) descritos en la cadena complementaria y el ORF (*AV1/CP*) en la cadena en el sentido del virión. Sin embargo, se observa además un ORF traslapado con *AV1/CP* que codifica para una proteína hipotética de 119 aa y que no es característico de BGVs del NM (Figura 3). Hasta el momento solo se han descrito dos supuestos ORFs homólogos a este, uno en el virus del mosaico dorado del frijol (BGMV, del Inglés) (Morinaga *et al.*, 1987) y otro en el recientemente descrito virus de la hoja torcida del tomate (ToTLV, del Inglés) (Romay *et al.*, 2019). La función de estas proteínas de BGMV y ToTLV no ha sido estudiada pero parece poco probable que estos ORFs constituyan un gen real. El alineamiento de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de las mencionadas proteínas hipotéticas y la de begCN30, muestra un bajo porcentaje de identidad entre ellas, lo que sugiere que no son realmente homólogas (Figura 4 a y b).

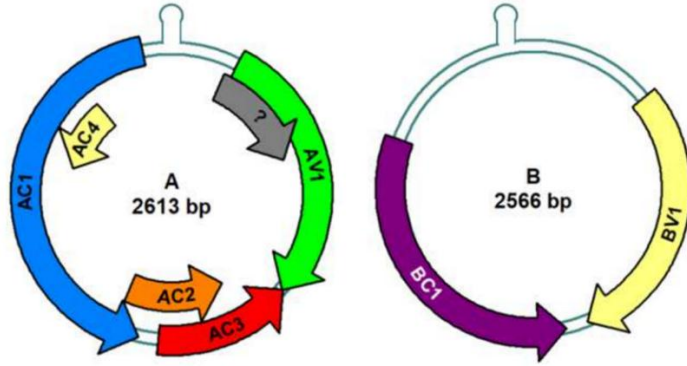


Figura 3. Organización del genoma de begCN30. El ADN-A codifica cinco proteínas: proteína de inicio de replicación (*AC1/Rep*; flecha azul), proteína activadora de la transcripción (*AC2/TrAP*; naranja), proteína potenciadora de la replicación (*AC3/REn*; rojo), proteína *AC4* (amarillo) y proteína de la cápside (*AV1/CP*; verde). Un ORF atípico adicional, parcialmente traslapado con el *AV1/CP*, aparece señalado con una flecha gris. El ADN-B codifica dos proteínas, la proteína de movimiento (*BC1/MP*; púrpura) y la proteína que conforma la lanzadera nuclear (*BV1/NSP*; amarillo). El origen de replicación del virus es indicado con una estructura en forma de horquilla.

a)

begCN30 Pre-CP	1	-----MLILFNS-KCLSAMP
BGMV Pre-CP	1	-----P.PRV.PE...V.RH
ToTLV Pre-CP	1	MRERLWSLDIMTWSLSCGPIKEMTLSSLCHFNS...G..H
begCN30 Pre-CP	16	GAQWRGPPRSAAAPRIIRLVEVWVQRWTRPLLGLTGPCIGS
BGMV Pre-CP	17	.VK..E.T.FPVLA..HQEVE.A.NPS..MH.S...E.
ToTLV Pre-CP	41	..LL..Q..L.LLLS...V..AL---.Q.....T..
begCN30 Pre-CP	56	PGYIGSKEDLTSLEAVKGLVRS S H L N S V M I F L M L V R S F V Y
BGMV Pre-CP	57	L....CT.AQ.CPKD..D.A..N.M.NA..Y....KLC..
ToTLV Pre-CP	78	..STELGDH...PRD..AH..F.L.S..T.S...G.X---
begCN30 Pre-CP	96	LMSHVVTVLLI V W E N V F V L S L C I F X
BGMV Pre-CP	97	P I ...G M ...P...L V ...X-----
ToTLV Pre-CP	114	-----

b)

Secuencias	Identidad de secuencias nt (aa) en %		
	begCN30 Pre-CP	BGMV Pre-CP	ToTLV Pre-CP
begCN30 Pre-CP	ID	73.5 (47.1)	49.6 (33.1)
BGMV Pre-CP	73.5 (47.1)	ID	46.7 (22.3)
ToTLV Pre-CP	49.6 (33.1)	46.7 (22.3)	ID

Figura 4. Comparación entre las secuencias de nucleótidos (aminoácidos) de los ORFs traslapados con AV1/CP. La comparación se realizó entre las secuencias en el begCN30, el virus de la hoja retorcida del tomate (ToTLV) y el virus del mosaico dorado del frijol (BGMV). a) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las tres proteínas hipotéticas. Sombreados en gris aparecen los aminoácidos idénticos que comparten la misma posición en la secuencia. b) Tabla que resume el porcentaje de identidad en las secuencias.

En el caso del ADN-B (2566-nt), este muestra los dos ORFs característicos de los NM-BGVs, el *BV1/NSP* en la cadena en el sentido del virión y el *BC1/MP* en la cadena complementaria (Figura 3).

Además de los genes para las proteínas virales, los geminivirus contienen además una multiplicidad de elementos de secuencia de acción en *cis*, que regulan su replicación, transcripción, traducción y encapsidación a través de interacciones con proteínas del virus y del huésped (Simon y Miller, 2013; Newburn y White, 2015). En el caso de los BGVs bipartitas, las regiones intergénicas de sus componentes genómicos contienen promotores bidireccionales que incluyen los elementos reguladores que actúan en *cis*, sitios de unión de factores de transcripción y el sitio de inicio de la transcripción, requeridos para el control de la expresión y replicación génica.

En este estudio, el alineamiento de la secuencia de nucleótidos de las IR de ambos componentes genómicos del begCN30 reveló que comparten un segmento de 194 pb con una identidad de secuencia de 98.5%. Esta región común incluye el origen de replicación viral y tres iterones de tipo "GGTGTA" (Figura 5).

Luego de su análisis con el programa Nsite y la base de datos New PLACE, en el ADN-A se identificaron también motivos de secuencia que actúan como elementos reguladores en *cis* en las plantas. Entre ellos se reconoce un sitio probable de unión al factor de transcripción PPD2, un elemento de respuesta a Etileno (ERE, del Inglés), una caja CCAAT y una caja G, como puede observarse en la Figura 5. Dado que los BGVs dependen de las polimerasas de ADN y ARN del huésped vegetal para su replicación y transcripción, y que también tienen la capacidad de neutralizar la respuesta de defensa de la planta; la presencia en el genoma begomoviral de elementos reguladores que actúan en *cis* en plantas responde a sus diversas, complejas, y aún poco estudiadas, estrategias para controlar y reprogramar los procesos celulares del huésped y así lograr una infección eficiente.

Por otra lado, tras el cálculo de la identidad de secuencia del ADN-A con las secuencias más cercanas depositadas en el GenBank, a través del programa SDT, se pudo determinar que el pariente más cercano de begCN30 es el virus del moteado rugoso del

tomate (ToMoWV, KM243020.1), descrito en Argentina, con el que muestra un 80,66% de identidad de secuencia total (Figura 6).

De acuerdo con los criterios taxonómicos actuales del ICTV para definir nuevas especies en el género *Begomovirus* (Brown *et al.*, 2015), begCN30 es una nueva especie de BGVs ya que muestra menos de un 91 % de identidad con la especie más cercana. De ahí, y teniendo en cuenta los resultados de las infecciones experimentales que se explican más adelante en este capítulo, se decidió la denominación de **virus latente del frijol (*Bean latent virus, BLV, del Inglés*)** para el begCN30. A su vez, las secuencias de los componentes genómicos A y B fueron depositadas en la base de datos de secuencias GenBank-NCBI, bajo este mismo nombre con los números de acceso MN158325.1 y MN158326.1, respectivamente.

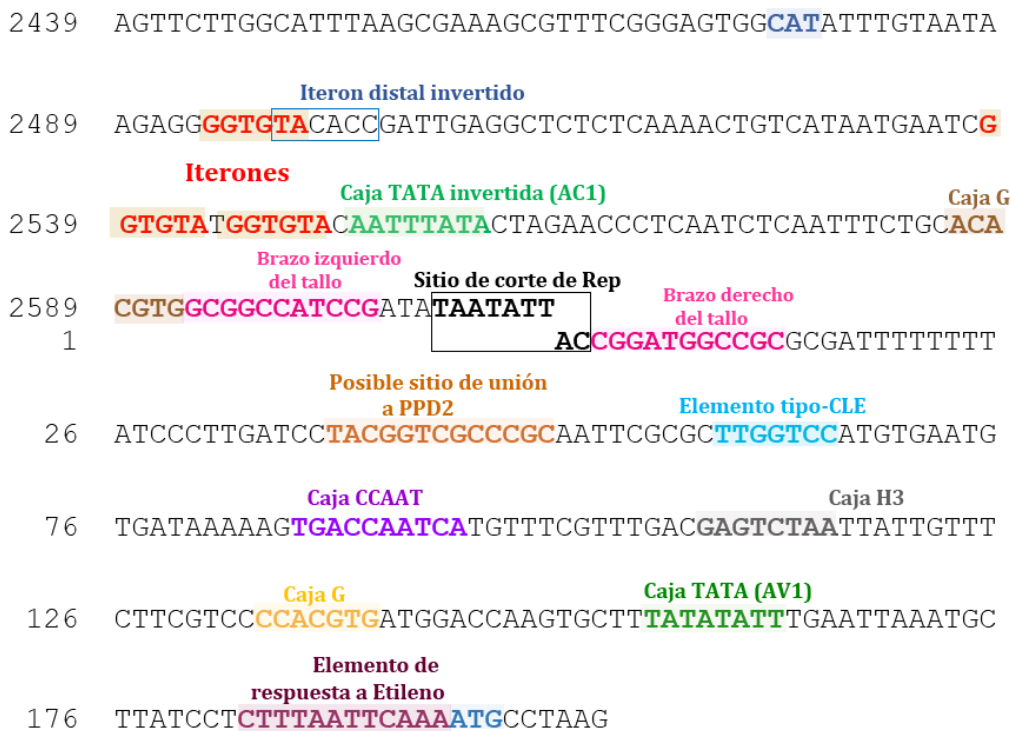


Figura 5. Potenciales elementos cis-reguladores detectados en la región intergénica del ADN-A del BLV.

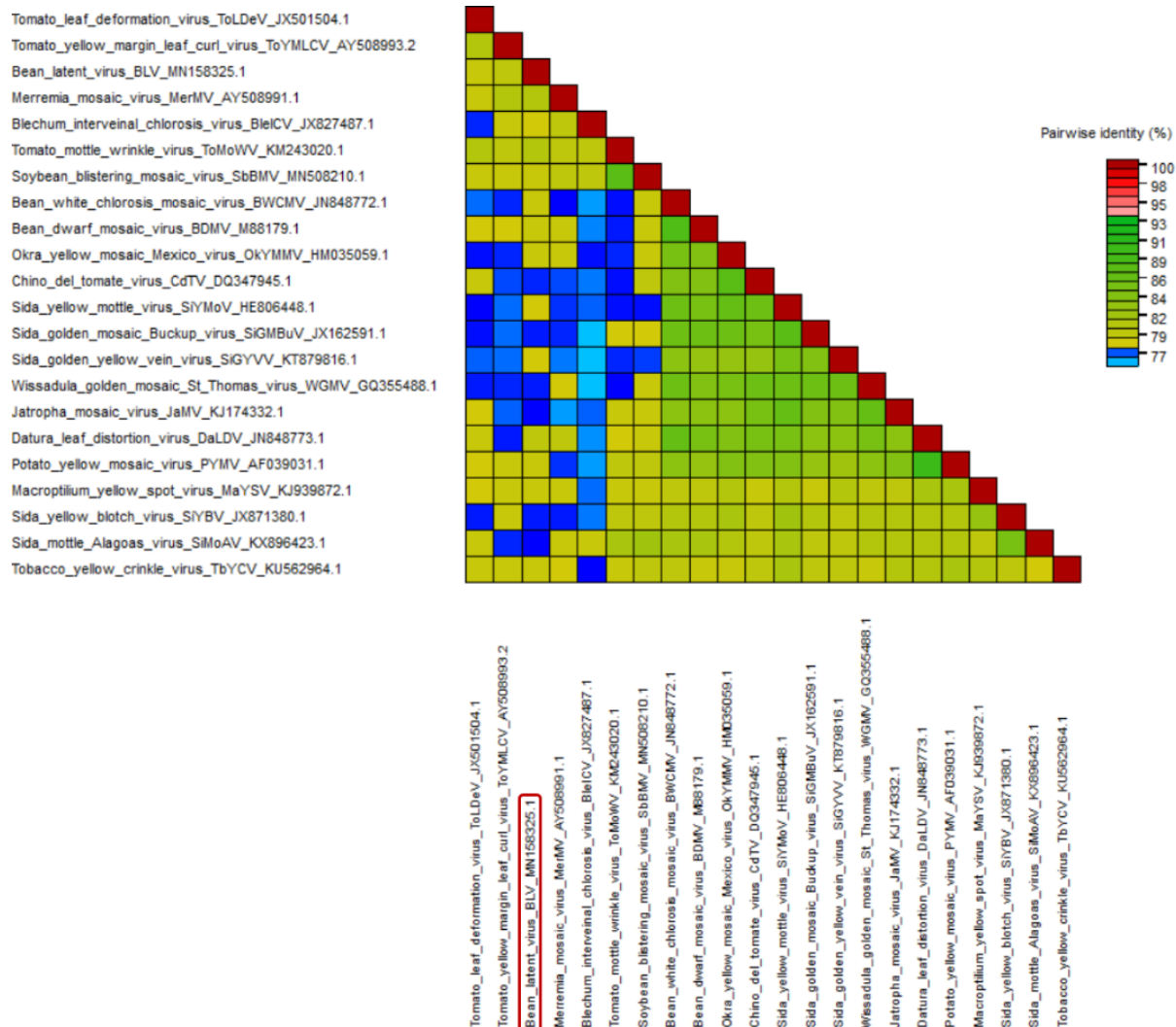


Figura 6. Matriz de identidad de la secuencia de ADN-A del begCN30 (BLV) y la de begomovirus seleccionados por un análisis BLASTn. La escala de tres colores representa el porcentaje de identidad de nucleótidos obtenida con SDTv1.2. Enmarcada en rojo aparece la posición de BLV en la matriz.

A partir de la secuencia completa de los componentes genómicos A y B de BLV también fue posible mapear en estos varios de los contigs que se habían obtenido por HTS de siRNAs. Se mapearon 16 contigs (con longitudes entre 45 y 458 nt) en el ADN-A y 10 contigs (con longitudes entre 45y 1187 nt) en el ADN-B. Veintiuno de los contigs ubicados exhibieron 100% de identidad con la secuencia del componente utilizado como referencia (Anexo 2). Los contigs mapeados cubrieron el 79 y el 94% del ADN-A y ADN- B,

respectivamente (Figura 7). Todos los contigs de BLV ensamblados *de novo* se enumeran en el Anexo 3.

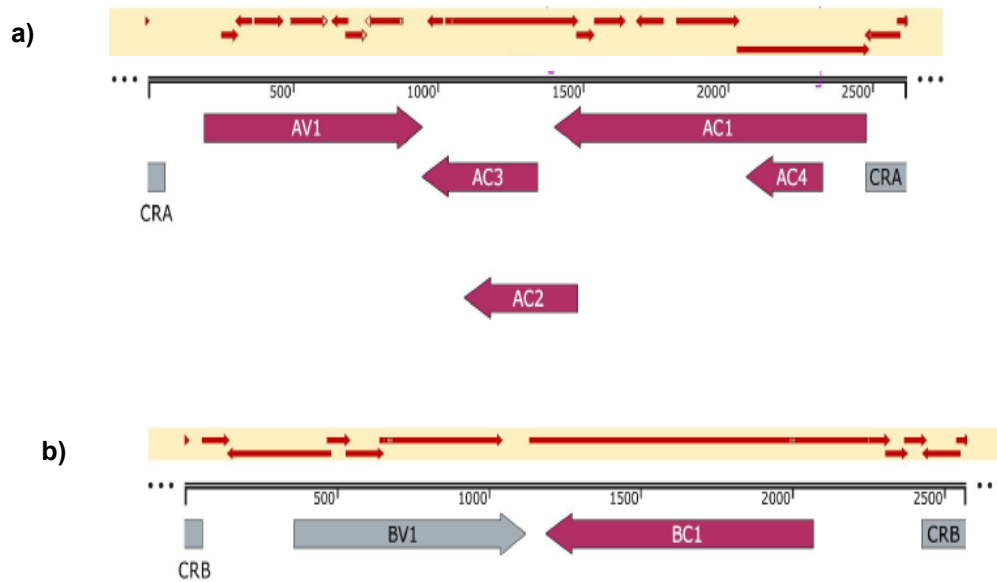


Figura 7. Mapeo de contigs obtenidos a partir de siRSAs y ensamblados sobre el genoma de BLV.

a) Organización genómica del ADN-A y mapeo de contigs (flechas marrones) sobre este.

b) Organización genómica del ADN-B y mapeo de contigs (flechas marrones) sobre este.

En la última década un considerable número de virus en cultivos agrícolas han sido descubiertos a través de HTS, independientemente del molde de ácido nucleico utilizado (Barba *et al.*, 2014; Roossinck *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015). Sin embargo, el uso de los sRNAs como molde para la HTS tiene la ventaja de su gran sensibilidad para la detección de virus conocidos y de nuevos virus, dentro de plantas individuales (Roossinck *et al.*, 2015). En sus estudios, Donaire *et al.* (2009) y Kreuze *et al.* (2009) demostraron que, efectivamente, los ARN interferentes pequeños (siRNA) derivados de la respuesta de defensa de las plantas a una infección viral (por el mecanismo de silenciamiento génico), pueden utilizarse para detectar tanto virus conocidos como virus no caracterizados previamente. Desde entonces, este enfoque ha sido ampliamente utilizado para detectar

diversos virus que infectan plantas. Resultan sumamente interesantes los trabajos en los que se pudieron reconstruir por HTS a partir de siRNAs genomas de virus de ADN como los caulimovirus y geminivirus (Kreuze *et al.*, 2009; Hagen *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Loconsole *et al.*, 2012; Seguin *et al.*, 2014). El genoma de estos virus, de manera similar a los virus de ARN, está densamente cubierto por especies no redundantes de siRNA virales y, por lo tanto, pueden ser reconstruidas a partir de los contigs de estos siRNAs (Seguin *et al.*, 2014). Lo anterior se pudiera explicar dada la idea de que tanto las regiones codificantes del ADN de cadena doble (ADNcd) circular viral, como las no codificantes, se transcriben en ambas orientaciones en el núcleo para generar ARNs de cadena doble (ARNcd) que al ser procesados por las enzimas del sistema de defensa de la planta darán lugar a siRNA virales (Seguin *et al.*, 2014). Sin embargo, no se han recuperado genomas de virus de ADN basado en análisis de ARNcd, por lo que es probable que estos se formen de manera muy transitoria y no se acumula a niveles detectables. En nuestro caso, el hecho de que múltiples contigs de siRNAs detectados en el estudio por HTS cubran un alto porcentaje del ADN-A y casi todo el componente B del BLV, indica que, efectivamente, estos pertenecían al nuevo BGV; el cual se replicó dentro de la planta de donde se obtuvo la muestra CN30 y que, a su vez, ésta desarrolló una respuesta antiviral de silenciamiento génico contra él.

En el caso de los análisis filogenéticos realizados, la inferencia obtenida para el ADN-A con el programa MEGA X reveló una estrecha relación del nuevo BGV con el virus del mosaico de la merremia (MerMV AY508991.1), descrito en cultivos de tomate en Venezuela (Nava *et al.*, 2006). El BLV formó con este virus un nodo (con un soporte estadístico de 93%) claramente separado de otros clados que incluyen especies que infectan al frijol común (Figura 8).

En contraste, el árbol filogenético obtenido para el ADN-B no infiere relaciones significativas entre MerMV y BLV. En este caso el pariente más cercano de BLV fue el virus del enrollamiento clorótico de la hoja del pepino (CuChLCV MN013787.1), detectado recientemente en el estado de Colima, México, con el cual forma también un nodo bien definido (con un soporte estadístico del 100 %) y separado a su vez de otros grupos de secuencias que incluyen especies que infectan al frijol común (Figura 9).

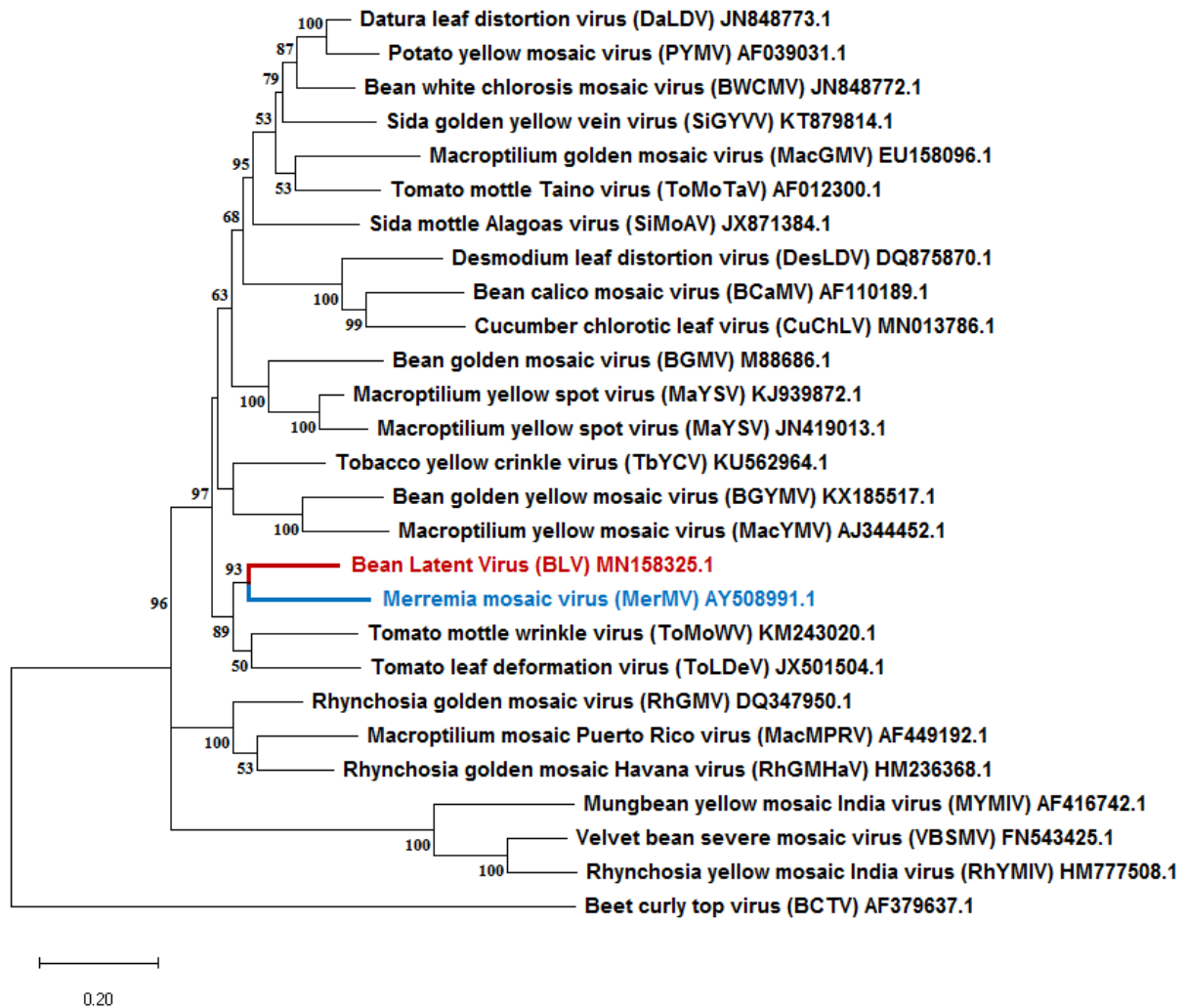


Figura 8. Relaciones filogenéticas entre el ADN-A de BLV y begomovirus representativos de linajes del Viejo y Nuevo Mundo (que incluyen virus que infectan leguminosas). Los valores de soporte estadístico (1000 repeticiones) se muestran como porcentajes y solo los nodos con valores superiores al 50% están etiquetados. La secuencia del genoma del virus del rizado de la remolacha (BCTV), un curtovirus, se utilizó como especie externa. Se destaca el nuevo begomovirus en letras rojas, y su pariente más cercano en letras azules.

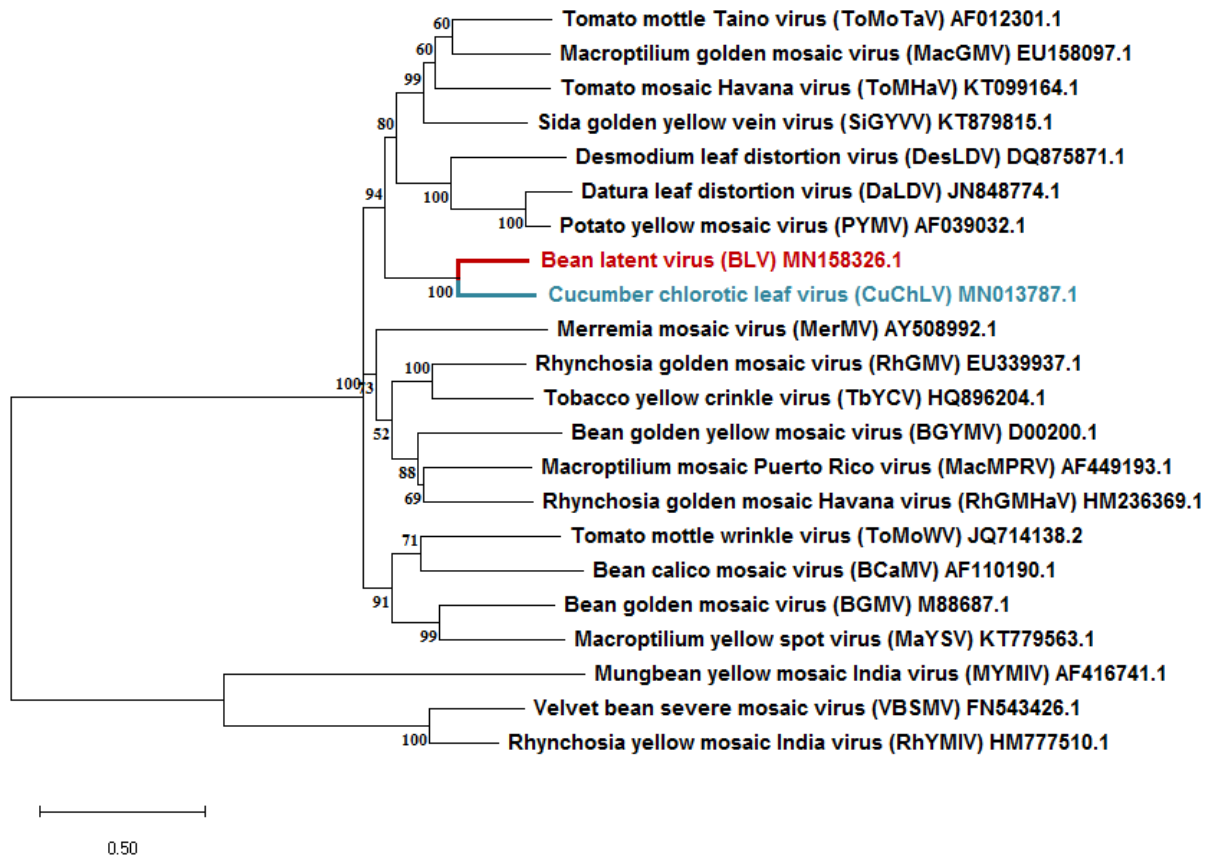


Figura 9. Relaciones filogenéticas entre el ADN-B de begCN30 (BLV) y begomovirus representativos de linajes del Viejo y Nuevo Mundo (que incluyen virus que infectan leguminosas). Los valores de soporte estadístico (1000 repeticiones de bootstrap) se muestran como porcentajes y solo los nodos con valores superiores al 50% están etiquetados. Las secuencias de varios virus del Viejo Mundo se utilizaron como especies externas. Se destaca el nuevo begomovirus en letras rojas, y su pariente más cercano en letras azules.

En sus estudios Briddon *et al.* (2010) luego de realizar comparaciones filogenéticas y de secuencia por pares de los componentes genómicos de BGVs bipartitos, demostraron que las dos moléculas tienen historias de evolución molecular muy distintas. En sus análisis de co-evolución de los ADN-A y ADN-B, estos autores hallaron diferencias distintivas entre la mayoría de los virus del VM. Sin embargo, un grupo que incluía todos los BGVs NM y una pequeña cantidad de virus VM mostró una co-evolución casi perfecta de sus componentes de ADN-A y ADN-B (la mayoría de las secuencias se agruparon de la misma forma en la inferencia filogenética obtenida con el ADN-A o el B, mientras que para la mayoría de los virus VM no fue así). Lo anteriormente expuesto indica que para la mayoría de los BGVs bipartitos del VM los componentes de ADN-A y ADN-B han estado bajo presiones evolutivas distintas o han respondido de manera diferente a la presión.

En el caso del BLV muy probablemente no ocurrió esta co-evolución descrita por Briddon *et al.* (2010) para los componentes genómicos de los BGVs del NM y este hallazgo puede ser un punto de partida para nuevas investigaciones dirigidas directamente sobre el componente B.

En sus investigaciones sobre la variabilidad genética y fenotípica del complejo del PepGMV, Brown *et al.* (2005) obtuvieron un resultado similar al nuestro, donde las relaciones filogenéticas entre los componentes genómicos del virus fueron incongruentes porque el ADN-A de PepGMV mostró una historia evolutiva inferida distinta de la del ADN-B.

Fiallo-Olivé *et al.* (2010), en su estudio de dos nuevos BGVs del NM (RhGMHaV y RhRGMV) que infectan *Rhynchosia minima* en Cuba, reportan también que las relaciones filogenéticas inferidas para el componente B de los aislados de estos BGVs difería de los obtenidos para sus correspondientes ADN-As. Los autores explican que este hecho fue especialmente evidente para el aislado RhRGMV, que había mostrado en los análisis de identidad de secuencia una discrepancia en las mayores identidades de cada uno de sus componentes genómicos en comparación con otras secuencias de BGVs. Esto último también sucedió en nuestro caso.

Por su parte Xavier (2019) en su tesis doctoral realizó un análisis evolutivo paralelo de los componentes de ADN-A y ADN-B de BGVs-NM, para lo cual analizó un total de 292

secuencias de ADN-A y 315 de ADN-B pertenecientes a cinco especies (BGMV, BLYSV, MaYSV, EuYMV y ToSRV). El autor explica que, aunque se observó una clara segregación geográfica para ambos componentes genómicos en los estudios filogenéticos, también se observaron diferencias en la estructura genética obtenida con cada uno de ellos, dadas por su inclusión en grupos genéticos distintos. En general el autor pudo concluir que el ADN-A y ADN-B de estos cinco virus, así como diferentes regiones en un gen o en un componente genómico, muestran diferentes patrones evolutivos, con diferencias significativas en la variación y en los niveles de recombinación.

Luego de realizar el análisis de recombinación para el ADN-A de BLV con el paquete RDP4 se identificó un evento con puntos de intercambio entre las posiciones 1879 y 2505 del genoma. Este evento de recombinación fue detectado por siete métodos: RDP (p 1.409×10^{-23}), GENECON (p 0.401×10^{-17}), Bootscan (p 1.671×10^{-22}), Maxchi (p 2.26×10^{-17}), Quimera (p 1.381×10^{-16}), SIScan (p 3.017×10^{-22}) y Phylpro (p 5.528×10^{-9}), con alta probabilidad de ocurrencia en la mayoría de ellos. El análisis determinó que el supuesto progenitor menor, un fragmento de 626 nt de longitud, probablemente se derivó del virus del mosaico dorado de la rhyngchosia (RhGMV DQ347950.1; 90% de identidad), que fue detectado en cultivos de soya en Sinaloa, México. El supuesto progenitor principal fue probablemente el virus del mosaico dorado del frijol (BGMV M88686.1; 78,6% de identidad).

La recombinación es un fenómeno que se ha detectado repetidamente en virus de ADN de cadena sencilla (ADNcs). En los geminivirus, de manera particular, la recombinación juega un papel esencial en la diversificación y evolución de estos (Bridson *et al.*, 1996; Sanz, *et al.*, 2000; Lefeuvre y Moriones, 2015). Su contribución a la aparición de nuevas especies geminivirales ha sido ampliamente documentada (Umaharan *et al.*, 1998; Padidam *et al.*, 1999; Monci *et al.*, 2002; García *et al.*, 2006; Lefeuvre *et al.*, 2007a; Owor *et al.*, 2007). De ahí que la detección de un evento de recombinación en el ADN-A del BLV no constituya un hallazgo inesperado.

Una característica conservada entre los virus de ADNcs que usan el mecanismo de RCR para replicar sus genomas es la ubicación no aleatoria de puntos de intercambio en la recombinación (Lefeuvre *et al.*, 2007a, b; Prasanna y Rai 2007; Martin *et al.*, 2011). Esta

ubicación no aleatoria se conserva entre los genomas mono y bipartitos de los BGVs, con puntos calientes en la porción N-terminal del gen *Rep* y en el extremo 5' de la región común (Lefeuvre *et al.*, 2007 b; Prasanna y Rai, 2007). Se ha demostrado que los eventos de recombinación que preservan interacciones intragenomas co-evolucionadas (proteína-proteína y/o proteína-ADN) son favorecidos por la selección (Martin *et al.*, 2011).

En el caso del evento de recombinación detectado en el ADN-A del BLV, los puntos de intercambio se reconocen en la región 5' del gen *AC1/Rep*, lo cual coincide con múltiples reportes en la literatura donde se ha analizado directamente la frecuencia de eventos de recombinación en el gen *Rep* o se han referido eventos de recombinación en este al realizar trabajos de caracterización viral de nuevas cepas o especies de geminivirus. Por ejemplo, en su estudio Vadivukarasi *et al.*, (2007) realizaron un análisis de recombinación utilizando 101 secuencias que representaban, en su momento, todas las especies de la familia *Geminiviridae*. La región utilizada para el análisis comienza desde el extremo 3' del gen *Rep* y termina después de la región del tallo-asa en la IR, incluyendo la región nucleotídica conservada TAATATTAC. Entre los 77 eventos predichos por los programas utilizados para la detección de recombinación, 42 tuvieron lugar en la región que abarca desde la mitad 5' de la IR hasta el extremo 5' del gen *Rep*. Treinta eventos se detectaron solo en la región 5' del gen *Rep* y solo dos eventos se predijeron en el extremo 3'. En sus investigaciones, Fiallo-Olivé *et al.* (2010) reportan eventos de recombinación en el gen *Rep* de dos nuevos virus (RhGMHaV y RhRGMV) pertenecientes a dos linajes diferentes de BGVs del NM y que infectan *Rhynchosia minima* en Cuba. Los autores plantean que la mayoría de los eventos de recombinación detectados están cerca de puntos críticos de recombinación descritos previamente para los BGVs por Lefeuvre *et al.* (2007a) (2009). Por su parte, Lima *et al.* (2013) en su trabajo compararon la evolución molecular y la genética de poblaciones de dos BGVs distantes (MaYSV y ToSRV) que infectan plantas cultivadas y no cultivadas en Brasil. En sus análisis de la población de MaYSV observaron que la mayoría de los eventos de recombinación detectados involucraron el gen *Rep*, con al menos un punto de intercambio ubicado en la porción del N-terminal de *Rep* y/o en el extremo 5' de la región común. En este caso los autores resaltan que el enlace entre el N-terminal de *Rep* y la porción 5' de la región común no

se rompió por los eventos de recombinación detectados en la población de MaYSV. Comentan que estas regiones se intercambiaron como bloques que las preservan como originarias del mismo fondo genético, lo que muy probablemente mantiene viables a estos genomas recombinantes por el hecho de preservar la interacción entre los dominios catalíticos en la porción N-terminal de Rep y su iteron cognado presente en la porción 5' de la región común. Recientemente, Fontenele *et al.* (2020) estudiaron varios genotipos de un nuevo geminivirus divergente (*Opuntia virus 1* (OpV1)) identificado en plantas asintomáticas de *Cactaceae* del NM. Los autores encontraron que la región *Rep/AC4* del genoma de los virus OpV1, de manera similar a los patrones de puntos de intercambio detectados en otros geminivirus recombinantes, parece ser el sitio del genoma fuera de la IR donde la recombinación ocurre con mayor frecuencia.

Por su parte, Pereira (2017) en sus estudios de filogenia y recombinación de NM-BGVs encontró un fuerte agrupamiento entre especies basada en sus lugares de origen, lo que sugirió que la introducción y/o migración de genomas de diferentes áreas contribuyen en gran medida al aumento de los eventos de recombinación y pseudo-recombinación, lo que aumentaría la probabilidad de aparición de nuevas variantes virales mejor adaptadas que sus parentales.

En el caso del virus que hallamos en este estudio es muy probable que el evento de recombinación detectado haya ocurrido puesto que, como mencionamos anteriormente, el RhGMV fue reportado en México en 2006 (Méndez-Lozano *et al.*, 2006), en el estado de Sinaloa, un estado contiguo al estado de Nayarit de donde se obtuvo la muestra CN30. Por lo tanto, una migración del vector trasmisor de este virus pudo haber ocurrido desde Sinaloa hasta Nayarit, tanto naturalmente como por intervención humana a través del trasiego entre los estados, dando lugar a co-infecciones con otros begomovirus y a eventos de recombinación entre ellos.

3.2 Infecciones experimentales

Tras 21-30 dpi ninguna de las plantas desarrolló síntomas asociados con geminivirus. Se obtuvieron productos de PCR derivados de los ADN-A y B, a partir de extractos de ADN total a los 21 dpi, en todas las plantas de *N. benthamiana*; no así en el caso de las plantas de frijol en las que no se observó amplificación directamente de los extractos de ADN. Sin embargo, cuando los extractos de ADN de los cultivares de frijol se sometieron a RCA antes de la reacción de PCR, se observaron los productos esperados de ADN-A y ADN-B en todas las plantas analizadas. Esto sugiere que el nivel de replicación del ADN viral en los tejidos jóvenes de plantas de frijol es demasiado bajo para amplificarse directamente en cantidades significativas. La figura 10 muestra como ejemplo los resultados de PCRs realizadas a varias muestras para la detección *de novo* de los componentes A y B.

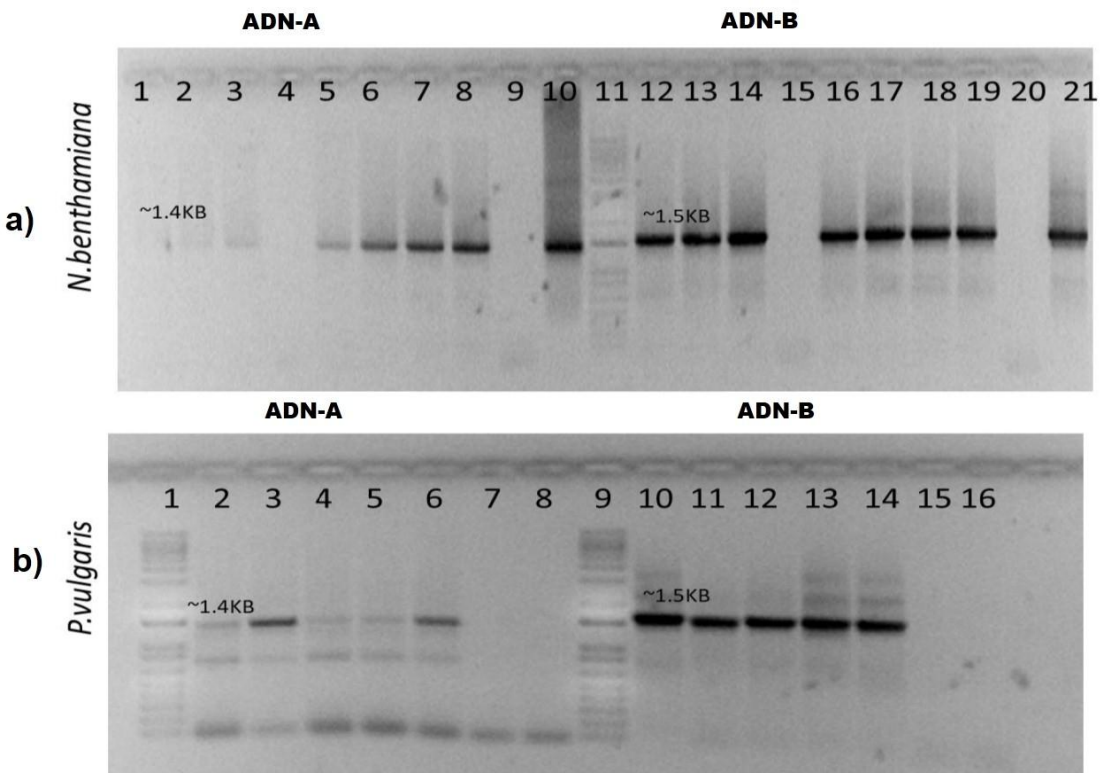


Figura 10. Detección de los componentes genómicos de BLV (*de novo*) por PCR en extractos de plantas de *Nicotiana benthamiana* (a) y *Phaseolus vulgaris* (b) a los 21 dpi. a) ADN-A: carriles 1-3 y 5-8, extractos de ADN de hojas nuevas de plantas agroinfiltradas con las construcciones hemidiméricas infectivas. 4 y 9 planta “naive” y control negativo, respectivamente. **ADN B:** carriles 12-14 y 16-19 extractos de ADN de hojas nuevas de plantas agroinfiltradas con las construcciones hemidiméricas infectivas. 15 y 20 planta “naive” y control negativo, respectivamente. 10 y 21 RCA de extracto original de begCN30, como control positivo. Carril 11, marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen). **b) ADN A:** Carriles 2-3 extractos de ADN de hojas nuevas agroinfiltradas con las construcciones hemidiméricas infectivas (Cultivar Mayo Dolores), 4 cultivar Mayo Eugenia y 5-6 cultivar Pinto-Ramuri. Carriles 7 y 8 planta “naive” y control negativo, respectivamente. **ADN B:** carriles 10-11 extractos de ADN de hojas nuevas agroinfiltradas con las construcciones hemidiméricas infectivas (cultivar Mayo Dolores), 12 cultivar Mayo Eugenia, 13-14 cultivar Pinto-Ramuri. Carriles 15 y 16 planta “naive” y control negativo, respectivamente. Carriles 1 y 9, marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen).

El hecho de detectar especies de geminivirus asintomáticas en varias especies de plantas ha sido descrito previamente. Por ejemplo, Fuentes *et al.* (2016) detectaron la presencia de un nuevo BGV en plantas de tomate transgénicas asintomáticas, que denominaron virus latente del tomate (TLV), dada la ausencia de síntomas visibles de la enfermedad y los bajos niveles de ADN viral detectado. La agroinoculación de clonas infecciosas de TLV en tomate y *N. benthamiana* demostró que desarrolla infecciones sistémicas sin síntomas en ambos huéspedes.

Se informó un caso análogo por Fontenele *et al.* (2017), quienes aislaron un geminivirus que no produjo síntomas visibles en plantas de tomate en el campo ni tampoco en plantas de *N. benthamiana* inoculadas experimentalmente. En ambas especies los autores comprobaron que el virus estableció una infección sistémica.

Recientemente Fontenele *et al.* (2020) reportaron el hallazgo por HTS de múltiples genomas, que se agrupan en una sola especie divergente de Geminivirus, a partir de muestras de cactus sin síntomas de infección por virus. En los ensayos de infección viral con clonas de uno de estos virus, los autores detectaron infección sistémica en plantas de *N. benthamiana*, por PCR. Esta infección fue corroborada por Southern-blot y microscopía electrónica. Sin embargo, en ninguna de las plantas analizadas se observaron síntomas de infección viral.

Teniendo en cuenta las características infectivas del BLV en las plantas de frijol, es notable que fue el único BGV detectado en la muestra CN30, tanto por análisis sRSA como por escrutinio exhaustivo por LISOP. Es razonable suponer que la coinfección con

los potyviruses BCMV y BCMNV generaron condiciones favorables para el establecimiento de la infección por BLV, contra la cual la planta montó una respuesta de silenciamiento antiviral. De los datos de este estudio solamente, no se puede excluir la posibilidad de que la coinfección por BLV haya contribuido de alguna manera a los síntomas observados en la planta. Por lo tanto, continúa siendo importante la idea de co-inocular experimentalmente frijol común con BCMV, BCMNV y BLV para determinar si este último influye significativamente en los síntomas de la planta con una infección mixta.

4. CONCLUSIONES

El hallazgo de begomovirus como BLV, que produce infecciones asintomáticas pero que induce claramente una respuesta antiviral que se refleja en los siRNAs que la planta produjo, es un resultado notable que muestra las complejas y sutiles interacciones entre plantas y virus co-infectantes que pueden pasar fácilmente desapercibidas.

Es muy probable que la gama de geminivirus que no inducen síntomas pero sí evocan una respuesta a nivel de sRNAs en las plantas sea más amplia de lo que pensamos, y que esas interacciones puedan ir acompañadas de alteraciones sutiles en las plantas, además de contribuir a la evolución de los propios virus por eventos de recombinación.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abarshi, M. M., Mohammed, I. U., Wasswa, P., Hillocks, R. J., Holt, J., Legg, J. P., Seal, S. E., & Maruthi, M. N. (2010). Optimization of diagnostic RT-PCR protocols and sampling procedures for the reliable and cost-effective detection of Cassava brown streak virus. *Journal of virological methods*, 163(2), 353–359.

<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.10.023>

Bañuelos-Hernández, B., Mauricio-Castillo, J. A., Cardenas-Conejo, Y., Guevara-González, R. G., & Arguello-Astorga, G. R. (2012). A new strain of tomato severe leaf curl virus and a unique variant of tomato yellow leaf curl virus from Mexico. *Archives of virology*, 157(9), 1835–1841. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1358-z>

Barba, M., Czosnek, H., & Hadidi, A. (2014). Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*, 6(1), 106–136.

<https://doi.org/10.3390/v6010106>

Beebe, S., Ramírez, J., Jarvis, A., Rao, I. M., Mosquera, G., Bueno, J. M., & Blair, M.W. (2011). Genetic improvement of common beans and the challenges of climate change. In: S.S. Yadav et al. (Eds.), *Crop adaptation to climate change* (356-369). Wiley-Blackwell, Oxford, GBR.

Briddon, R. W., Bedford, I. D., Tsai, J. H., & Markham, P. G. (1996). Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. *Virology*, 219(2), 387–394.

<https://doi.org/10.1006/viro.1996.0264>

Briddon, R. W., Patil, B. L., Bagewadi, B., Nawaz-ul-Rehman, M. S., & Fauquet, C. M. (2010). Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC evolutionary biology*, 10, 97. [https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-](https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-97)

[97](https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-97)

Brown, J. K., Idris, A. M., Ostrow, K. M., Goldberg, N., French, R., & Stenger, D. C. (2005). Genetic and Phenotypic Variation of the Pepper golden mosaic virus Complex. *Phytopathology*, 95(10), 1217–1224. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1217>

Brown, J. K., Zerbini, F. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J. C., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R. W., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Malathi, V. G., Martin, D. P., Rivera-Bustamante, R., Ueda, S., & Varsani, A. (2015). Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of virology*, 160(6), 1593–1619. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2398-y>

De Barro, P. J., Liu, S. S., Boykin, L. M., & Dinsdale, A. B. (2011). Bemisia tabaci: a statement of species status. *Annual review of entomology*, 56, 1–19. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085504>

Dellaporta, S. L., Wood, J. & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19–21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>

Donaire, L., Wang, Y., Gonzalez-Ibeas, D., Mayer, K. F., Aranda, M. A., & Llave, C. (2009). Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. *Virology*, 392(2), 203–214. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.005>

Edgar R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

Fiallo-Olivé, E., Navas-Castillo, J., Moriones, E., & Martínez-Zubiaur, Y. (2010). Two novel begomoviruses belonging to different lineages infecting *Rhynchosia minima*. *Archives of virology*, 155(12), 2053–2058. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0803-0>

Flores-Estévez, N., Acosta-Gallegos, J. A., & Silva-Rosales, L. (2003). Bean common mosaic virus and Bean common mosaic necrosis virus in Mexico. *Plant disease*, 87(1), 21–25. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.21>

Fondong V. N. (2013). Geminivirus protein structure and function. *Molecular plant pathology*, 14(6), 635–649. <https://doi.org/10.1111/mpp.12032>

Fontenele, R. S., Lamas, N. S., Lacorte, C., Lacerda, A., Varsani, A., & Ribeiro, S. G. (2017). A novel geminivirus identified in tomato and cleome plants sampled in Brazil. *Virus research*, 240, 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.08.007>

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>

Fuentes, A., Carlos, N., Ruiz, Y., Callard, D., Sánchez, Y., Ochagavía, M. E., Seguin, J., Malpica-López, N., Hohn, T., Lecca, M. R., Pérez, R., Doreste, V., Rehrauer, H., Farinelli, L., Pujol, M., & Pooggin, M. M. (2016). Field Trial and Molecular Characterization of RNAi-Transgenic Tomato Plants That Exhibit Resistance to Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 29(3), 197–209. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-15-0181-R>

García-Andrés, S., Monci, F., Navas-Castillo, J., & Moriones, E. (2006). Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology*, 350(2), 433–442. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.02.028>

Gibbs, A., & Ohshima, K. (2010). Potyviruses and the digital revolution. *Annual review of phytopathology*, 48, 205–223. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114404>

Gregorio-Jorge, J., Bernal-Alcocer, A., Bañuelos-Hernández, B., Alpuche-Solís, A. G., Hernández-Zepeda, C., Moreno-Valenzuela, O., Frías-Treviño, G., & Argüello-Astorga, G. R. (2010). 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. *Virology journal*, 7, 275. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-275>

Hagen, C., Frizzi, A., Kao, J., Jia, L., Huang, M., Zhang, Y., & Huang, S. (2011). Using small RNA sequences to diagnose, sequence, and investigate the infectivity characteristics of vegetable-infecting viruses. *Archives of virology*, 156(7), 1209–1216. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-0979-y>

Hall, T. A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

Hanley-Bowdoin, L., Bejarano, E. R., Robertson, D., & Mansoor, S. (2013). Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature reviews. Microbiology*, 11(11), 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3117>

Hesketh, E. L., Saunders, K., Fisher, C., Potze, J., Stanley, J., Lomonossoff, G. P., & Ranson, N. A. (2018). The 3.3 Å structure of a plant geminivirus using cryo-EM. *Nature communications*, 9(1), 2369. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04793-6>

Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., & Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic acids research*, 27(1), 297–300. <https://doi.org/10.1093/nar/27.1.297>

Idris, A., Al-Saleh, M., Piatek, M. J., Al-Shahwan, I., Ali, S., & Brown, J. K. (2014). Viral metagenomics: analysis of begomoviruses by illumina high-throughput sequencing. *Viruses*, 6(3), 1219–1236. <https://doi.org/10.3390/v6031219>

Jones, S., Baizan-Edge, A., MacFarlane, S., & Torrance, L. (2017). Viral Diagnostics in Plants Using Next Generation Sequencing: Computational Analysis in Practice. *Frontiers in plant science*, 8, 1770. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01770>

Kreuze, J. F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barker, I., & Simon, R. (2009). Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology*, 388(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.03.024>

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Laliberté, J. F., & Sanfaçon, H. (2010). Cellular remodeling during plant virus infection. *Annual review of phytopathology*, 48, 69–91. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114239>

Lefevre, P., Martin, D. P., Hoareau, M., Naze, F., Delatte, H., Thierry, M., Varsani, A., Becker, N., Reynaud, B., & Lett, J. M. (2007a). Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands: molecular diversity and evolution through recombination. *The Journal of general virology*, 88(Pt 12), 3458–3468. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83252-0>

Lefevre, P., Lett, J. M., Reynaud, B., & Martin, D. P. (2007b). Avoidance of protein fold disruption in natural virus recombinants. *PLoS pathogens*, 3(11), e181. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030181>

Lefevre, P., Lett, J. M., Varsani, A., & Martin, D. P. (2009). Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. *Journal of virology*, 83(6), 2697–2707. <https://doi.org/10.1128/JVI.02152-08>

Lefevre, P., & Moriones, E. (2015). Recombination as a motor of host switches and virus emergence: geminiviruses as case studies. *Current opinion in virology*, 10, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.12.005>

Lepe-Soltero, D., Sánchez- García, B. M., Jiménez- Hernández, Y., Salinas- Pérez, R. A., García-Neria, M. A., González de León, D., Becerra- Leor, N. E., Acosta- Gallegos, J. A., & Silva Rosales, L. (2012). Presence of BCMV and BCMNV in five dry bean-producing states in Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15, 313-321.

<https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/1243/747>

Lima, A., Sobrinho, R. R., González-Aguilera, J., Rocha, C. S., Silva, S., Xavier, C., Silva, F. N., Duffy, S., & Zerbini, F. M. (2013). Synonymous site variation due to recombination explains higher genetic variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. *The Journal of general virology*, 94(Pt 2), 418–431.

<https://doi.org/10.1099/vir.0.047241-0>

Loconsole, G., Onelge, N., Potere, O., Giampetruzzi, A., Bozan, O., Satar, S., De Stradis, A., Savino, V., Yokomi, R. K., & Saponari, M. (2012). Identification and characterization of citrus yellow vein clearing virus, a putative new member of the genus Mandarivirus. *Phytopathology*, 102(12), 1168–1175. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-12-0140-R>

Martin, D. P., Lefevre, P., Varsani, A., Hoareau, M., Semegni, J. Y., Dijoux, B., Vincent, C., Reynaud, B., & Lett, J. M. (2011). Complex recombination patterns arising during geminivirus coinfections preserve and demarcate biologically important intra-genome interaction networks. *PLoS pathogens*, 7(9), e1002203.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002203>

Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., & Muhire, B. (2015). RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus evolution*, 1(1), vev003.

<https://doi.org/10.1093/ve/vev003>

Méndez-Lozano, J., Perea-Araujo, L. L., Ruelas-Ayala, R. D., Leyva-López, N. E., Mauricio-Castillo, J. A., & Argüello-Astorga, G. R. (2006). A Begomovirus Isolated from Chlorotic and Stunted Soybean Plants in Mexico is a New Strain of Rhynchosia golden mosaic virus. *Plant disease*, 90(7), 972. <https://doi.org/10.1094/PD-90-0972B>

Monci, F., Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J., & Moriones, E. (2002). A natural recombinant between the geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology*, 303(2), 317–326. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1633>

Morinaga, T., Ikegami, M., Shimotohno, K., & Miura, K. (1987). Total nucleotide sequences of the infectious cloned DNAs of bean golden mosaic virus. *Microbiology and immunology*, 31(2), 147–154. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1987.tb03078.x>

Muhire, B. M., Varsani, A., & Martin, D. P. (2014). SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PloS one*, 9(9), e108277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277>

Nagy P. D. (2016). Tombusvirus-Host Interactions: Co-Opted Evolutionarily Conserved Host Factors Take Center Court. *Annual review of virology*, 3(1), 491–515. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042312>

Nava, A. R., Patte, C. P., Hiebert, E., & Polston, J. E. (2006). Detection and Variability of Begomoviruses in Tomato from the Andean States of Venezuela. *Plant disease*, 90(1), 61–66. <https://doi.org/10.1094/PD-90-0061>

Owor, B. E., Martin, D. P., Shepherd, D. N., Edema, R., Monjane, A. L., Rybicki, E. P., Thomson, J. A., & Varsani, A. (2007). Genetic analysis of maize streak virus isolates from Uganda reveals widespread distribution of a recombinant variant. *The Journal of general virology*, 88(Pt 11), 3154–3165. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83144-0>

Padidam, M., Sawyer, S., & Fauquet, C. M. (1999). Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*, 265(2), 218–225. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0056>

Pereira, H. M. (2017). Phylogeny and recombination of new world begomoviruses. (Tesis de maestría inédita) Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

Prasanna, H. C., & Rai, M. (2007). Detection and frequency of recombination in tomato-infecting begomoviruses of South and Southeast Asia. *Virology journal*, 4, 111. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-111>

Rodríguez-Negrete, E. A., Morales-Aguilar, J. J., Domínguez-Duran, G., Torres-Devora, G., Camacho-Beltrán, E., Leyva-López, N. E., Voloudakis, A. E., Bejarano, E. R., & Méndez-Lozano, J. (2019). High-Throughput Sequencing Reveals Differential Begomovirus Species Diversity in Non-Cultivated Plants in Northern-Pacific Mexico. *Viruses*, 11(7), 594. <https://doi.org/10.3390/v11070594>

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., Legg, J. P., Kvarnheden, A., Wintermantel, W. M., Sudarshana, M. R., Peterschmitt, M., Lapidot, M., Martin, D. P., Moriones, E., Inoue-Nagata, A. K., & Gilbertson, R. L. (2018). World Management of Geminiviruses. *Annual review of phytopathology*, 56, 637–677. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100327>

Romay, G., Geraud-Pouey, F., Chirinos, D. T., Mahillon, M., Gillis, A., Mahillon, J., & Bragard, C. (2019). Tomato Twisted Leaf Virus: A Novel Indigenous New World Monopartite Begomovirus Infecting Tomato in Venezuela. *Viruses*, 11(4), 327. <https://doi.org/10.3390/v11040327>

Roossinck, M. J., Martin, D. P., & Roumagnac, P. (2015). Plant Virus Metagenomics: Advances in Virus Discovery. *Phytopathology*, 105(6), 716–727. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0356-RVW>

Sanz, A. I., Fraile, A., García-Arenal, F., Zhou, X., Robinson, D. J., Khalid, S., Butt, T., & Harrison, B. D. (2000). Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *The Journal of general virology*, 81(Pt 7), 1839–1849. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-7-1839>

Sasson, A., & Malpica, C. (2018). Bioeconomy in Latin America. *New biotechnology*, 40(Pt A), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.007>

Seguin, J., Rajeswaran, R., Malpica-López, N., Martin, R. R., Kasschau, K., Dolja, V. V., Otten, P., Farinelli, L., & Pooggin, M. M. (2014). De novo reconstruction of consensus master genomes of plant RNA and DNA viruses from siRNAs. *PloS one*, 9(2), e88513. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088513>

Shahmuradov, I. A., & Solovyev, V. V. (2015). Nsite, NsiteH and NsiteM computer tools for studying transcription regulatory elements. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(21), 3544–3545. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv404>

Simon, A. E., & Miller, W. A. (2013). 3' cap-independent translation enhancers of plant viruses. *Annual review of microbiology*, 67, 21–42. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155609>

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. (2019). A Lineage of Begomoviruses Encode Rep and AC4 Proteins of Enigmatic Ancestry: Hints on the Evolution of Geminiviruses in the New World. *Viruses*, 11(7), 644. <https://doi.org/10.3390/v11070644>

Umaharan, P., Padidam, M., Phelps, R. H., Beachy, R. N., & Fauquet, C. M. (1998). Distribution and diversity of geminiviruses in trinidad and tobago. *Phytopathology*, 88(12), 1262–1268. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.12.1262>

Vadivukarasi, T., Girish, K. R., & Usha, R. (2007). Sequence and recombination analyses of the geminivirus replication initiator protein. *Journal of biosciences*, 32(1), 17–29. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0003-6>

Wang A. (2015). Dissecting the molecular network of virus-plant interactions: the complex roles of host factors. *Annual review of phytopathology*, 53, 45–66. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120001>

Wu, Q., Ding, S. W., Zhang, Y., & Zhu, S. (2015). Identification of viruses and viroids by next-generation sequencing and homology-dependent and homology-independent algorithms. *Annual review of phytopathology*, 53, 425–444. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120030>

Xavier, C. A. (2019). Begomoviruses: variability, evolution, and interactions with hosts and vectors. (Tesis doctoral inédita). Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

Xu, X., Zhang, Q., Hong, J., Li, Z., Zhang, X., & Zhou, X. (2019a). Cryo-EM Structure of a Begomovirus Geminiate Particle. *International journal of molecular sciences*, 20(7), 1738. <https://doi.org/10.3390/ijms20071738>

Xu, Y., Li, S., Na, C., Yang, L., & Lu, M. (2019b). Analyses of virus/viroid communities in nectarine trees by next-generation sequencing and insight into viral synergisms implication in host disease symptoms. *Scientific reports*, 9(1), 12261. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48714-z>

Zerbini, F. M., Briddon, R. W., Idris, A., Martin, D. P., Moriones, E., Navas-Castillo, J., Rivera-Bustamante, R., Roumagnac, P., Varsani, A., & Ictv Report Consortium (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. *The Journal of general virology*, 98(2), 131–133. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000738>

Zhang, Y., Singh, K., Kaur, R., & Qiu, W. (2011). Association of a novel DNA virus with the grapevine vein-clearing and vine decline syndrome. *Phytopathology*, 101(9), 1081–1090. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-11-0034>

ANEXOS

Anexo 1. Secuencias utilizadas para la detección de eventos de recombinación en el genoma del BLV (begCN30) con el paquete de programas RDP4.

Nombre del virus (del Inglés)	Acrónimo	Número de acceso GenBank
Bean calico mosaic virus	BCaMV	AF110189.1
Bean dwarf mosaic virus	BDMV	M88179.1
Bean golden mosaic virus	BGMV	M88686.1
Bean golden yellow mosaic virus	BGYMV	KX185517.1
Bean white chlorosis mosaic virus	BWCMV	JN848772.1
Datura leaf distortion virus	DaLDV	JN848773.1
Desmodium leaf distortion virus	DesLDV	DQ875870.1
Macroptilium golden mosaic virus	MacGMV	EU158096.1
Macroptilium mosaic Puerto Rico virus	MacMPRV	AF449192.1
Merremia mosaic virus	MerMV	AY508991.1
Potato yellow mosaic virus	PYMV	AF039031.1
Rhynchosia golden mosaic virus	RhGMV	DQ347950.1
Rhynchosia golden mosaic Havana virus	RhGMHaV	HM236368.1
Sida golden yellow vein virus	SiGYVV	KT879814.1
Sida mottle Alagoas virus	SiMoAV	KX896423.1
Tobacco yellow crinkle virus	TbYCV	KU562964.1
Tomato leaf deformation virus	ToLDeV	JX501504.1
Tomato mottle wrinkle virus	ToMoWV	KM243020.1

Anexo 2. Cobertura de los componentes genómicos de BLV (begCN30) por los contigs ensamblados *de novo* (sRNAs) e identidad de nucleótidos con estos.

	Contig ^a	Max Score	Total Score	Query Cover	E- value	Per. Ident
DNA-A	CONTIG258 (455)	841	841	17%	0	100.00%
	CONTIG119 (458)	841	841	17%	0	99.78%
	CONTIG22 (219)	405	405	8%	4.00E-116	100.00%
	CONTIG196 (135)	244	244	5%	1.00E-67	100.00%
	CONTIG120 (134)	235	235	5%	6.00E-65	98.50%
	CONTIG234 (126)	228	228	4%	1.00E-62	99.21%
	CONTIG65 (109)	202	202	4%	6.00E-55	100.00%
	CONTIG210 (100)	185	185	3%	6.00E-50	100.00%
	CONTIG262 (96)	178	178	3%	1.00E-47	100.00%
	CONTIG159 (78)	143	143	2%	4.00E-37	100.00%
	CONTIG146 (63)	117	117	2%	2.00E-29	100.00%
	CONTIG187 (60)	111	111	2%	1.00E-27	100.00%
	CONTIG107 (59)	110	110	2%	4.00E-27	100.00%
	CONTIG18 (58)	108	108	2%	1.00E-26	100.00%
	CONTIG3 (58)	108	108	2%	1.00E-26	100.00%
	CONTIG129 (45)	54.7	54.7	1%	2.00E-10	100.00%
	Total			79%		
DNA-B	CONTIG201 (1187)	2165	2165	46%	0	99.58%
	CONTIG218 (405)	721	721	15%	0	98.77%
	CONTIG178 (344)	636	636	13%	0	100.00%
	CONTIG234 (126)	233	233	4%	3.00E-64	100.00%
	CONTIG108 (126)	233	233	4%	3.00E-64	100.00%
	CONTIG88 (91)	169	169	3%	7.00E-45	100.00%
	CONTIG1 (83)	152	152	3%	7.00E-40	100.00%
	CONTIG30 (77)	143	143	3%	4.00E-37	100.00%
	CONTIG199 (76)	141	141	2%	2.00E-36	100.00%
	CONTIG129 (45)	54.7	54.7	1%	2.00E-10	100.00%
	Total			94%		

^a: The nucleotide length of the contig is indicated in parentheses

Anexo 3. Lista de contigs ensamblados *de novo* correspondientes al genoma de BLV (begCN30).

ADN-A

>CONTIG3 ASSEMBLED136 58

AGCTGTTGCTTTTCGCAACAGACAGACCATATGTAACTCATGTAATAGAAGATCATTCA
A

>CONTIG18 ASSEMBLED296 58

CAGGTCCTCTTTGGACCCGATATATCCTGGGCTTCCTATACATGGGCCTGTAAACCA
CA

>CONTIG22 ASSEMBLED94 219

ATACTAATAGGTCTCTCTGTCCGCGCAGCGGCACCCCTTCCGAAATAATCGTCAGC
CCATTGTTGCATATCCAGTGGAACGTTGTTGAACGACGATTGTGGAAATGGAGGAA
CCCATGGTTCCGGGGTTTTTGAATATCCTTGTTGCGTTTGAGACCAGATTATGATA
TTGAAGGAAGAAATGTTGAGGTTGTTCTTCCTTGATTATCTGCAGAGCC

>CONTIG65 ASSEMBLED24 109

GCCCCCTCTCCTGGATTGCAAAGCACAATTGATGGGATACCACCTTTAATTTGAACT
GGCTTTCCGTACTIONGCAATTTGTTTGCCAATTCTTTTGGGCCCCGATAAGCT

>CONTIG107 ASSEMBLED235 59

CGAAGATCGTTCTTGACAGTGGCAGTACTGGGCTCATTGTCATACATGTAAAGAC
TTG

>CONTIG119 ASSEMBLED244 458

ACATTATTAATTGAAATAACGCCTAAATTGTCTAAGTACAACATGACTAAATGCCTAA
ATCTATTTAAGTAAGTCGTTCCAGAACTCGAATCAATGTCGTCCAGACTTGGAAT
TTAGATACGCTTGTGTAGATCCAGAGCCCTCCTCAGGTTGTGGTTGAACCTTATCT

GGATGTGGAATATCCTCGTCAAGGAGAACGGTGGATCCTCTACTCTTGTTATCTTG
AAATAAAGGGGATTTGGCACCTCCCAGTAAAAACGCCACTCTCTGCTTGATGCGCA
GTGATGGGTTCCCCTGTGAGTGAATCCATGATTGAAGCAGTTGATGTGTAGGAAGA
TCGAACAGCCGCACTCCAAGTCGATTCTTCTACGTCCGACTGCCTGCGTTTTGCAA
ACCGGTGCTGAGGTTTGATAGAGGGGGGAGTTGAGGAAGATGAATTTGCGATTAT
GAAGC

>CONTIG120 ASSEMBLED62 134

GCATGAGTGCATGCCATATACAATAGTAACGCATTCTCCGTGTGATTCTCGTACTTG
GCTGCTTCTTGATGATTGTACACGACATGATTATTCACCTTCCAAAATCGCCTAACA
ATAGCCTGCTCGTGCTAGG

>CONTIG129 ALIGNED55 45

CACACGTGGCGGCCATCCGATATAATATTACCGGATGGCCGCGCG

>CONTIG146 ASSEMBLED14 63

TGAAGCGTCCACGCTTTTAGATGTGCATTCTCTTGTCTATCCAAGTAGTCTTTATAA
CTCGCC

>CONTIG159 ASSEMBLED16 78

ACGATCTTCGTGATCGTTTTCAAGTTTTACACAGGTTCTATGCGAAGGTGACTGGTG
GTCAGTATGCTAGCAACGAGA

>CONTIG187 ASSEMBLED293 60

ATTCGCCTCGTGGAGGTATGGGTCCAAAGATGGACAAGGCCTCTGCTTGGGTTAA
CAGGC

>CONTIG196 ASSEMBLED51 135

AAAAACGTTTTTGTGTTAAGTCTGTGTATATTTTAGGTAAGATATGGATGGACGAG
AATATTAATTGAAGAACCACACGAACAGCGTCATGTTCTGGTTGGTCAGAGACAG
AAGACCATATGGCAGCCTATT

>CONTIG210 ASSEMBLED284 100

GAGGCTGTGAAGGGCCTTGTAAGGTCCAGTCATTTGAACAGCGTCATGATATTTCT
CATGTTGGTAAGGTCATTTGTATATCTGATGTCACACGTGGTAA

>CONTIG234 ASSEMBLED222 126

GGCCGCCACGTGTGCAGAAATTGAGATTGAGGGTTCTAGTATAAATTGTACACCAT
ACACCGATTCATTATGACAGTTTTGAGAGAGCCTCAATCGGTGTACACCACTCTTAT
TACAAATATGCCA

>CONTIG258 ASSEMBLED195 455

TGCAGAGCCGCTTCTGCAGAACCTGCATTTAATGCCTTCGCGTATGTGTCGTTAGC
AGATTGCTGACCTCCTCTAGCAGATCTGCCGTCGATTTGGA ACTCTCCCCATTCAAT
TGTATCTCCATCCTGTCGATGTAGGACTTGACATCGGAGCTGGATTTAGCTCCCTG
TATGTTCCGGATGGAAATGTGCTGACCTGGTTGTGGAGACCAGGT CGAAGAATCTGT
TATTTGAACATTGGTATTTCCCTTCGAACGGATAAGCACGTGTAGATGAGGTTGCC
ATCTTCATGTGTTTCTCTGCATATCTTGATAAACTTCTTGTTAACTGGAGTTGTTAGA
CGTTGTAATTGTGATAATGCCTCTTCTTTGGATATGGAACATGAGGATATGTGAGGA
AGTAGTTCTTGGCATTTAAGCGAAAGCGTTTCGGGAGTGGCATATTTGTAATAAG

>CONTIG262 ASSEMBLED237 96

ACGTTCATTAGGTTCTCATAACTTACTTGAGTGGACACCTGGATTTCAATTCTTTTGTC
TATTCAAATAATGTAGATTACAACGTCATTGATGACGT

ADN-B

>CONTIG1 ASSEMBLED320 83

AGTTCGAGTAAGTCTAATAAGGCCCATGAAGAGCCTAAGATGGTGGCCCAATGCAT
ACATGAGAATCAATATGGGCCTGATTA

>CONTIG30 ASSEMBLED357 77

GACCTTTTGAGTCTTTTGTAAACTCTTGATATGAATATAACGAAAAACCCAGGTGT
AATGGCATATTTGTAATAAG

>CONTIG88 ASSEMBLED218 91

GCCCTCCTCTGCCTCCTTTCTTGGTGTGAGTGCGGTTCTCGACTGTCGCGCACTAA
TATCTGTCTCCCATGTGCTTTTTAACTTTGAATTT

>CONTIG108 ASSEMBLED223 126

TCAATATGGGCCTGATTATGTATTGGCCCATAACAACGCTCTCGCTACGTTTATCAG
TTATCCAAGTCTTGGTAAGATCTTACCCAACAGGAACAGGAGTTATATTAAGTTGAA
ACGTTTACGTTT

>CONTIG129 ALIGNED55 45

CACACGTGGCGGCCATCCGATATAATATTACCGGATGGCCGCGCG

>CONTIG178 ASSEMBLED264 344

ATTAGACTTACTCGAACGACGTCTCAAATCATGTCGTTTAGCTAAAGTAGAACGTTT
ATGGGCATAATTACGTCGTTGAGTAGAAGGGAATCCACGTTTATATCTAGTAGGATA
CATAATCATAAAAATGACGACACAAAATAGATTTGGTTAGACAATAAAAATAAACGTG
GAATAGAGCCGAGTCACGTTCAATAAAAATATGTATCAAGTCCTATATACACATTC
TTGGTTCACGATAAATGTTAAACAAATCGGCAGCATGGTTCATAAACAGCCACGTCT
ATCATAATTCAAATGGACCATGCTTATCGTCGCGCTTCAATAATTCAAATTCAAAG

>CONTIG199 ASSEMBLED141 76

AACAAATGTATATTGTTTGCAGTTATGTCTGTTAGGGTTTATATAGAAACCCAGATGT
TTATGACCTTTTGAGTCT

>CONTIG201 ASSEMBLED257 1187

AACTACTGTTTTAGCAAACATTGAACTTTCATTATTGAACAATAACCTTCATATTACTT
TAATGTTTTGGATTCTGAATGATTACAATTGTTGTTGATACACTCCTGGACCGTCGTT
CTAACAAATCTACTTAATTGTTCCATTGACATTGTTATACTTGACTCACACCTCTTAGC

CCCCACTATAGACGCCGAATCTCCTGGGTCTAATACGATGCTACCCAGCCTACTCA
TGTGTTTATACGGGTGCATTGCGTATCCATTTCCGATTGCGCATCCGAGTTACTAAG
GCCCAATGTACTCTTTGAAGCCCAAGACTCACCGGGTTGAATTTCAATTGGGCTGG
GTAACCCAACCTTTGACATAGATGCGCAACGGATGGGTTTCTCTCCCACTTGCCGT
AATCCACGTGTGAGAAATCGATATCTCTGTCTGGAGAAGTGTGTTTGGATAGGATTTTCA
CCGTTGGTGCCCGAAAGGGGATATCTACGGAGTGTTTTGCAGTGGAGAGTTCAGC
TTCCCTTTGAATTTGGCGAAATGCGTCCCCTGATGAACATTTGTATCAGAACTCGG
TAATAGAGTTTCCATGGATTAGGGTCTTTAAGTGAGAAGAAGGAAGCTGAAAAATAG
TGGAGATCTTGTTACATCTTATGGGAAACGTCCAAGATGCTTGTAATGATTCGTTGT
CTGTCATTCTTCTGTCATGAATCTCCACAATTACAGACCCTGTGGCGTTAATTGGAA
CTTGCTGCCTGTATTCAATTACCAGTGGTCTATTTTCATGCATGAACGACTCAGCCT
TGCTGTTAATTGAGACGCCACAGAAGGAAATTGCAAGATAATTTCCGTCAGGTCAT
GAGACAGTTGATATTCATCACGATGAGACTCTATATGTTAAAGGCATTTGGAGGATT
TGTCAATTGAGAATTCATTTCAAGAAGATAGTCCGCGCAGCGGCACCTCTTCAAAA
GAGGATGACTATGGAATTAAGATGATATGTCGTTTTGACAAGGACGAAGAAATGAA
CAACGAATGACGATGATATTGTTGTCCTTGAACAACGGAGATGAACTGACTATAGTA
GAAGCATAGCAACGACTGATGAAGAAGACAAGAATTCTCTGGAAATTTGAGAAAGA
ATATAAACTGCTCTCCAAGTTTTAATGAACAAATGTATATTGT

>CONTIG218 ASSEMBLED60 405

AAACGTTTACGTTTCAAAGGAACGGTTAAGATTGAACGTGCACATGCTGATATGAAC
ATTGACGGTTCTACCCCTAAAATTGAAGGAGTGTTCTCCCTTGTGGTTGTGGTTGAT
CGAAAACCATATGGTCCGTCTGGTCATCTACAAACATTTGATGAAGTTTTCGGTG
CTAGAATCCATAGTCATGGGAACTTATCCGTAACCTCCGTCTTTGAAAGACCGTTACT
ATATACGCCATGTGTTTAAGCGTGTTTATCCGTGGAGAAGAACAACACTACTTTGGTTGA
TGATAGATGGATCTTGTTCTCTCTAATAGGCGTTATAATATGTGGTCTACGTTTAAAT
GATTATGATCATGATTCATGTAAAGGTGTTTATGGCAAATTAGCAAAAACGCCTTATT
A

>CONTIG234 ASSEMBLED222 126

GGCCGCCACGTGTGCAGAAATTGAGATTGAGGGTTCTAGTATAAATTGTACACCAT
ACACCGATTCATTATGACAGTTTTGAGAGAGCCTCAATCGGTGTACACCACTCTTAT
TACAAAT

Anexo 4. Artículo publicado

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*, 1659-1665. doi: 10.1007/s00705-020-04646