



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estudio preliminar de la interacción de geminivirus tomando como modelo plantas de tomate y tabaco

I.A. Alexandra García Torres.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencias Agrarias
Palmira, Colombia
2020

Estudio preliminar de la interacción de geminivirus tomando como modelo plantas de tomate y tabaco

I.A. Alexandra García Torres

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias Agrarias

Director (a):

Ph.D., MSc, Biol. Juan Carlos Vaca Vaca

Codirector (a):

Ph.D., Ing Bioq. Karina López López

Línea de Investigación: Protección de Cultivos

Grupo de Investigación: IPMA (Interacción Planta - Microorganismo - Ambiente)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencias Agrarias

Palmira, Colombia

2020

A Dios, por la vida, por guiarme, por darme una nueva oportunidad, por darme fortaleza cuando sentía desfallecer, por ese ángel que envió a darme su apoyo y superar cada prueba.

A mis padres por sus enseñanzas, sus palabras de aliento en especial a ti mami por el sacrificio y precio que tuviste que pagar para que este logro fuera una realidad.

¡Infinitas gracias!

*Si una persona es perseverante,
aunque sea dura de entendimiento,
se hará inteligente;
y aunque sea débil
se transformará en fuerte*

Leonardo Da Vinci

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Nombre Alexandra García Torres

Fecha 13/04/2021

Fecha

Agradecimientos

Agradezco infinitamente al Dr. Juan Carlos Vaca Vaca y a la Dra. Karina López López, por permitirme ser parte de su grupo de investigación, Interacción Planta, Microorganismo, Ambiente (IPMA), por sus enseñanzas, consejos, apoyo, dedicación, paciencia y colaboración incondicional para alcanzar esta meta a pesar de todos los tropiezos que tuve gracias.

A la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira (DIPAL) por la financiación del proyecto titulado “EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INFECTAR CULTIVOS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) Y TABACO (*Nicotiana tabacum* L.) DE BEGOMOVIRUS AISLADOS DE ARVENSES LOCALIZADAS EN EL VALLE DEL CAUCA, COLOMBIA”. Código HERMES 31564, el cual hace parte de este trabajo de investigación.

A mi familia por permitirme tomar el tiempo que era de ustedes, a Lura Camila y Ana María por ser esa motivación para culminar este proyecto y dar un paso más.

A los que fueron mis compañeros del grupo IPMA, gracias por su apoyo por su paciencia y por escucharme. A todas las personas con las cuales he compartido en esta última etapa y han puesto ese granito para que este sueño sea una realidad.

Gracias Ing. Carlos Aníbal, Beatriz, Alejandra, Danna, Olveina, Yineth, Carlos Andrés, por esas conversaciones tan productivas en las tardes, por las risas y tiempo compartido.

Resumen

Numerosas enfermedades causadas por begomovirus han sido el resultado de eventos de pseudorecombinación, el cual involucra procesos de transcomplementación y transreplicación. El virus del mosaico amarillo de la papa (PYMV) es un begomovirus que afecta el cultivo del tomate en Colombia, el virus del mosaico dorado de croton (CohGMV), el virus del mosaico dorado de rhynchosia de Colombia (RhGMCV), y el virus moteado de verbena (VeMV) fueron aislados de las arvenses *Croton hirtus*, *Rhynchosia minima* y *Verbena* sp. respectivamente, todas ellas asociadas al cultivo de tomate en Valle del Cauca. El objetivo de este trabajo fue evaluar la posibilidad de que se presenten eventos de transcomplementación heteróloga entre los componentes genómicos A y B de los begomovirus aislados de estas arvenses y PYMV. Para cumplir este objetivo, se co-bombardearon por biobalística hojas jóvenes de tomate y tabaco con mezclas de componentes genómicos de PYMV-A, PYMV-B, CohGMV-A, RhGMCV-A, y VeMV-B. Posibles interacciones virus-virus entre PYMV, CohGMV, RhGMCV, y VeMV, fueron estudiadas en tres niveles a los 21 y 45 dpi: replicación, movimiento y expresión de síntomas. La replicación y movimiento fue evaluada por la detección de los virus inoculados en hojas bombardeadas y hojas apicales jóvenes, mediante PCR empleando oligos específicos para cada virus estudiado. Finalmente, análisis bioinformáticos de los promotores de los genes AL1, AR1, BL1 y BR1 de PYMV, CohGMV, RhGMCV, y VeMV fueron realizados para identificar elementos *cis* regulatorios comprometidos en replicación (interones) y movimiento (CLEs). Se evidenciaron eventos de transreplicación y transcomplementación en todas las combinaciones heterólogas evaluadas en plantas de tomate, y en algunas evaluadas en tabaco. Este resultado podría indicar que a futuro podrían emerger nuevos pseudorecombinantes begomovirales a partir de la combinación de los componentes genómicos de PYMV, CohGMV, RhGMCV y VeMV, con probabilidad de mayor capacidad infectiva para el cultivo de tomate en Colombia.

Palabras Claves: geminivirus, tomate, tabaco, biobalística, pseudorecombinación.

Abstract

Numerous diseases caused by begomoviruses have resulted from pseudorecombination events, which involve transcomplementation and transreplication. Potato yellow mosaic virus (PYMV) is a begomovirus that affects the tomato crop in Colombia. Croton golden mosaic virus (CohGMV), Colombian rhynchosia golden mosaic virus (RhGMCV), and verbena mottle virus (VeMV) were isolated from the arvenses *Croton hirtus*, *Rhynchosia minima*, and *Verbena* sp., respectively, all associated with tomato cultivation in Valle del Cauca. The objective of this work was to evaluate the possibility of heterologous transcomplementation events between genomic components A and B of begomoviruses isolated from these arvenses and PYMV. To meet this objective, young leaves of tomato and tobacco were bioballistically co-bombarded with mixtures of genomic components of PYMV-A, PYMV-B, CohGMV-A, RhGMCV-A, and VeMV-B.

Possible virus-virus interactions between PYMV, CohGMV, RhGMCV, and VeMV were studied at three levels at 21 and 45 dpi: replication, movement, and symptom expression. Replication and movement were evaluated by detection of inoculated viruses in bombarded leaves and young apical leaves by PCR using specific oligos for each virus studied. Finally, bioinformatic analyses of the promoters of the AL1, AR1, BL1 and BR1 genes of PYMV, CohGMV, RhGMCV, and VeMV were performed to identify cis-regulatory elements involved in replication (interons) and movement (CLEs). Transreplication and transcomplementation events were evidenced in all heterologous combinations evaluated in tomato plants, and in some evaluated in tobacco. This result could indicate that in the future new begomoviral pseudorecombinants could emerge from the combination of the genomic components of PYMV, CohGMV, RhGMCV and VeMV, with a higher infective capacity for tomato cultivation in Colombia.

Key words: geminivirus, tomato, tobacco, bioballistics, pseudorecombination.

Contenido

Resumen	VI
Lista de figuras.....	IX
Lista de tablas	X
Lista de Símbolos y abreviaturas	XI
Introducción	3
Objetivos.....	6
1. Marco teórico.....	7
1.1 Los virus, grandes limitantes en la agricultura.....	7
1.2 Características generales e importancia de los geminivirus	8
1.2.1 Importancia general	8
1.2.2 Síntomas de la enfermedad	9
1.3 Género <i>Begomovirus</i>	12
1.3.1 Organización genómica de los begomovirus bipartitas.....	13
1.3.1.1 El gen AV1 codifica la proteína de la cápside geminiviral (CP).....	14
1.3.1.2 Gen AC1 codifica la proteína asociada a la replicación (Rep)	15
1.3.1.3 Gen AC2 codifica la proteína asociada a la transactivación (TrAP).....	15
1.3.1.4 Gen AC3 codifica la proteína potenciadora de la replicación REn.....	16
1.3.1.5 Gen AL4 codifica la proteína AC4	16
1.3.1.6 Gen BV1 codifica la proteína NSP	16
1.3.1.7 Gen BC1 codifica la proteína MP	17
1.4 Mecanismo de replicación en los begomovirus	17
1.5 Ciclo infectivo de begomovirus	19
1.6 Movimiento de los virus en las plantas	20
1.7 Mecanismos que generan la diversidad genética de los geminivirus en nuevos hospederos.....	21
1.7.1 Mutación	21
1.7.2 Recombinación	22
1.7.3 Pseudorecombinación	22
1.8 Begomovirus en Colombia	24
1.9 Begomovirus en arvenses	25
1.10 Begomovirus presentes en arvenses de Colombia	27
1.11 Infecciones mixtas	28
1.11.1 Efectos de las infecciones mixtas y su papel en la variabilidad genética y la evolución.....	29
1.11.2 Infecciones mixtas en arvenses	30
2. MATERIALES Y METODOS	32
2.1 Metodología.....	32

XII	tomate y tabaco
2.2	Descripción de begomovirus utilizado en este trabajo 32
2.3	Multiplicación de las clonas begomovirales (purificación de DNA plasmídico)..... 33
2.4	Material vegetal empleado 34
2.4.1	Obtención de material vegetal de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> var. xanthi) para ensayo realizado in vitro 34
2.4.2	Obtención de plántulas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> var. Santa Calara) para ensayo realizado en invernadero..... 35
2.5	Diseño experimental..... 35
2.5.1	Variables a evaluar 36
2.6	Inoculación por biobalística de baja presión de begomovirus 37
2.6.1	Preparación de <i>microcarriers</i> de tungsteno con el DNA begomoviral..... 37
2.6.2	Preparación de cartuchos 37
2.6.3	Inoculación de las diferentes combinaciones realizadas con los componentes virales A y B en plantas de tabaco germinadas <i>In vitro</i> 38
2.6.4	Inoculación de las diferentes combinaciones realizadas con los componentes virales A y B en plantas de tomate germinadas en casa de mallas 38
2.7	Evaluación de síntomas virales 39
2.8	Detección por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de componentes geminivirales inoculados en plantas de tomate y tabaco 40
2.9	Análisis bioinformático de la región promotora de genes begomovirales 41
3.	Resultados..... 43
3.1	Evaluación de trans complementación de componentes genómicos (DNA-A / DNA-B) de PYMV y begomovirus aislados de arvenses RhGMCV, CohGMV y VeMV inoculados por biobalística en plantas de tomate..... 43
3.1.1	Evaluación de transcomplementación de componentes genómicos de PYMV y arvenses: PYMV-A y VeMV-B; CohGMV-A y PYMVA-B; CohGMV-A y VeMV-B inoculados por biobalística en plantas de tomate 43
3.1.2	Evaluación de transcomplementación de componentes genómicos de RhGMCV-A y VeMV-B inoculados por biobalística en plantas de tomate 46
3.1.3	Detección del componente genómicos B de PYMV y de VeMV inoculados por biobalística en plantas de tomate..... 47
3.2	Evaluación de síntomas en plantas de tomate que fueron inoculados por biobalística con diferentes combinaciones de componentes genómicos (DNA-A / DNA-B) de PYMV y begomovirus aislados de arvenses RhGMCV -A , CohGMV-A y VeMV-B. 50
3.3	Evaluación de trans complementación de componentes genómicos (DNA-A / DNA-B) de PYMV y begomovirus aislados de arvenses RhGMCV, CohGMV y VeMV inoculados por biobalística en plantas de tabaco..... 53
3.3.1	Evaluación de transcomplementación de componentes genómicos de RhGMCV-A y VeMV-B inoculados por biobalística en plantas de tabaco 53
3.3.2	Evaluación de síntomas en plantas de tabaco que fueron inoculados por biobalística con diferentes combinaciones de componentes genómicos (DNA-A / DNA-B) de PYMV y begomovirus aislados de arvenses RhGMCV -A , CohGMV-A y VeMV-B 55
3.4.	Análisis bioinformático de elementos <i>cis</i> regulatorios implicados en la transcomplementación de componentes genómicos (DNA-A / DNA-B) de PYMV y begomovirus aislados de arvenses RhGMCV, CohGMV y VeMV 57
	Discusión..... 60
4.	Conclusiones..... 77

Lista de figuras

	Pág.
Figura1: Partículas de geminivirus.....	10
Figura2: Organización genómica de los begomovirus bipartitas.....	13
Figura3: Esquema que representa el ciclo de replicación de DNA en geminivirus.....	19
Figura 4: Sitios de unión de las proteínas Rep (iterones), los sitios de acción de diferentes reguladores de la transcripción (motivos, CLEs), y la estructura tallo-asa	19
Figura 5: Concentración de DNA por clona, obtenidas después de la multiplicación	34
Figura 6: Hojas bajas que fueron inoculadas con los diferentes componentes virales a evaluar y las hojas apicales que serán evaluadas.....	37
Figura 7: Inoculación de plantas con la pistola manual Helios Gene Gun System.....	39
Figura 8: Evaluación de trans complementación de componentes genómicos (DNA-A / DNA-B) de PYMV y begomovirus aislados de arvenses en plantas de tomate, VeMV-B y CohGMV-A.....	44
Figura 9: Evaluación de trans complementación de componentes genómicos (DNA-A/ DNA-B) de begomovirus aislados de arvenses en plantas de tomate, RhGMCV-A y VeMV-B	46
Figura 10: Detección del componente genómico B, en hojas apicales y bajas de plantas de tomate	48
Figura 11: Detección por PCR de un fragmento de 320 pb del componente genómico B de VeMV	49
Figura 12: Hojas apicales colectadas de plantas de tomate inoculadas mediante la técnica de biobalística de baja presión	52
Figura 13: Evaluación de trans complementación de componentes genómicos (DNA-A / DNA-B) de begomovirus aislados de arvenses en plantas de tabaco, RhGMCV- A y VeMV-B.....	54
Figura 14: Plantas de tabaco inoculadas con diferentes combinaciones de componente genómicos (DNA-A / DNA-B) de begomovirus transcurridos 45dpi	56
Figura 15: Representación esquemática de la Región intergénica de los componentes genómicos (DNA-A / DNA-B) de PYMV y begomovirus aislados de arvenses en plantas de tomate, RhGMCV- A, CohGMV-A y VeMV-B.....	57

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1: Clasificación de la familia <i>Geminiviridae</i>	11
Tabla 2: Nomenclatura de genes de begomovirus bipartita.....	14
Tabla 3: Clona virales obtenidas objeto de estudio para realizar combinaciones de componentes geminivirales.....	33
Tabla 4: Combinaciones de los diferentes componentes virales a evaluar, incluido control positivo; con el número de repeticiones por tratamiento en tabaco y en tomate	36
Tabla 5. Porcentaje de síntomas presentes en plantas de tomate en dos tiempos de evaluación.....	50
Tabla 6. Porcentaje de síntomas presentes en plantas de tabaco en dos tiempos de evaluación.....	55

Lista de abreviaturas

Aa	Aminoácido
AbMV	Abutilon mosaic virus
AC4	Proteína determinante de patogenicidad
ACMV	African cassava mosaic virus
BCTV	Beet curly top virus
BDMV	Bean dwarf mosaic virus
BGMV	Bean golden mosaic virus
BGYMV	Bean golden yellow mosaic virus
BLCrV	Bean leaf crumple virus
Bp	Pares de bases
CLEs	Elementos conservados tardíos (Conserved Late Elements)
CMV	Cucumber mosaic virus
CohGMV	Croton golden mosaic virus
CP	Proteína de la cápside
CR	Región común
DeLDV	Desmodium leaf distortion virus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAds	Doble cadena de DNA
DNAss	Cadena sencilla de DNA
Dpi	Días post inoculación
EACMV-UG	East African cassava mosaic virus
EcmLV	Euphorbia caput-medusae latent virus
ECSV	Eragrostis curvula streak virus
ER	Retículo endoplasmático
EuMV	Euphorbia mosaic virus
FR	Fenotipo de recuperación
GRBV	Grapevine red blotch virus
ICTV	Comité Internacional de taxonomía de Virus
INSV	Impatiens necrotic spot virus
MaYMHeV	Virus del mosaico amarillo de malvastrum
MaYSV	Virus de la mancha amarilla de macroptillium
MLAs	Marco de lectura abierto
MP	Proteína de movimiento
MSV	Maize streak virus
NM	Muevo Mundo
NSP	Proteína de transporte de DNA viral
Nt	nucleótido
OYMV	Okra yellow mosaic Mexico virus
PCNA	Antígeno de proliferación nuclear
PepDMV	Pepper deforming mosaic virus

PepGMV	Pepper Golden mosaic virus
PHYVV	Pepper huasteco yellow vein virus
PLDV	Passion fruit leaf distortion virus
PRMV	Pepper rugose mosaic virus
PTGS	Supresora del silenciamiento postranscripcional
PVX	Potato Virus X
PYMV	Potato yellow mosaic virus
PYVV	Potato yellow vein virus
RBR	Proteína homóloga del retinoblastoma
RC	Región común de los Geminivirus
RCR	Replicación por círculo rodante
REn	Proteína potenciadora de replicación
REP	Proteína asociada a la replicación
RH	Respuesta de hipersensibilidad
RhGMCV	Rhynchosia golden mosaic virus of Colombia
RhYMYuV	Rhynchosia yellow mosaic Yucatan virus
RI	Región intergénica de los Geminivirus
RNA	Ácido ribonucleico
RNAds	RNA de doble cadena
SbBMV	Virus del mosaico de blistering de soya
SiGMBcV	Virus del mosaico dorado de sida de braco
SiGMV	Sida golden mosaic virus
SiGYVV	Sida golden yellow vein virus isolate
SiMMV	Virus del mosaico de sida micrantha
siRNA	RNA de cadena sencilla
SoMBoV	Solanum mosaic Bolivia virus
SqLCV	Virus del encrespamiento de la hoja del squash
TCTV	Turnip curly top virus
TEV	Tobacco etch Virus
TGMV	Tomato golden mosaic virus
TMV	Tobacco mosaic virus
TMMV	Tomato mild mosaic virus
ToLDV	Tomato leaf distortion virus
ToLCNDV	Tomato leaf curl New Delhi virus
ToLCPaLV	Tomato leaf curl Palampur virus
ToMV	Tomato mosaic virus
ToMoTV	Tomato mottle taino virus
ToMoV	Tomato mottle virus
ToRMV	Tomato rugose mosaic virus
ToSRV	Virus rugoso severo del tomate
ToTV	Tomato torrado virus
TPCTV	Tomato pseudo-curly top virus
TRSV	Tobacco ringspot virus
TSWV	Tomato spotted wilt virus
ToYSV	Tomato yellow spot virus
TrAP	Proteína transactivadora
TYLCV	Tomato yellow leaf curl virus
TYLCSV	Tomato yellow leaf curl Sardinia virus TYLCV
	Tomato yellow leaf curl virus
VeMV	Verbena mottle virus
VM	Viejo Mundo

Introducción

A nivel mundial el tomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas más cultivadas e importantes a nivel mundial. De acuerdo a los datos reportados por la FAO, los principales países productores de tomate son: China, India, Estados Unidos, Turquía, Egipto, Irán, Italia, Brasil, España, Uzbekistan, Chile, Argentina. Colombia ocupa el puesto 34 con 595.299 Ton (FAOSTAT - FAO 2014).

En Colombia para el año 2018, el área cultivada era de 7.283 ha, con una producción de 183.419 t (Agronet, 2018), aunque se ha presentado un aumento en el área cultivada, el rendimiento a disminuido a través de los años en un 10% aproximadamente, este sigue siendo un cultivo hortícola de mucha importancia e implementación; el departamento del Valle del Cauca en Colombia ocupa el sexto lugar de producción a gran escala, agrupado en dos grandes áreas de ladera y zona plana de con una productividad de 8.4 t/ha (Gobernación del Valle del Cauca. Guía de costos agrícolas 2014).

El descenso del rendimiento y la producción se atribuye al uso elevado de agroquímicos, factores fitosanitarios como enfermedades causadas por hongos, bacterias, nematodos y virus; así como también a factores ambientales tales como el cambio climático que afecta las poblaciones de los vectores, el intercambio de material vegetal (semillas) de igual modo la introducción de genotipos susceptibles a virus endémicos en una región, etc. (Cardona et. al. 2001; Polston y Anderson, 1997; Tamayo y Jaramillo 2013; Varma y Malathi, 2003).

Los virus en plantas cultivadas (tomate) representan una grave amenaza debido a que son causales de la reducción de la productividad, así como la calidad del fruto. En el 2010 Hanssen et al., reportaron que aproximadamente 136 especies de virus que afectan este cultivo, la mayoría de estos virus corresponden a las familias *Bunyaviridae* (género *Tospovirus*), *Potiviridae* (género *Potyvirus*), *Bromoviridae* (género *Cucumovirus*),

Virgaviridae (género *Tobamovirus*) y *Geminiviridae* (género *Begomovirus*) (Adams et al., 2009; Arnaud et al., 2007; Gómez et al., 2013).

Para Colombia, se han reportado seis géneros de virus afectando tomate, *Tobamovirus* (*Tabacco mosaic virus* -TMV y/o *Tomato mosaic virus* - ToMV), *Cucumovirus* (*Cucumber mosaic virus* -CMV), *Tospovirus* (*Tomato spotted wilt virus* -TSWV, *Impatiens necrotic spot virus* -INSV, *Tomato torrado virus*- ToTV), *Crinivirus* (*Potato yellow vein virus* -PYVV), *Potyvirus* (*Pepper deforming mosaic virus* -PepDMV) *Nepovirus*, (*Tobacco ringspot virus* -TRSV) y *Begomovirus* (*Potato yellow mosaic virus* -PYMV) (Morales et al., 2009; Tamayo y Jaramillo, 2006; Tamayo et al., 2005; Vaca-Vaca et al., 2011; Verbeek - M., y Dullemans - A. M. 2012)

En nuestro país han sido reportados los siguientes geminivirus afectando cultivos de interés agronómico: el virus del mosaico amarillo de la papa (PYMV) en tomate; (Martínez *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2002; Vaca-Vaca *et al.*, 2012); virus de la distorsión de la hoja del maracuyá (*Passionfruit leaf distortion virus*. PLDV) (Vaca-Vaca, Carrasco-Lozano, y López-López, 2016), en maracuyá también un begomovirus no caracterizado, en ají se ha reportado (Vaca-Vaca, Lopez-lopez, y Morales- Euse, et al., 2020); en frijol se han reportado dos virus del mosaico dorado del frijol (*Bean Golden mosaic virus* BGMV) y virus del mosaico enano del frijol (*Bean dwarf mosaic virus* BDMV) (Morales, Martinez, y Velasco, 2002) (Carvajal-Yepes, Zambrano, Bueno, Raatz, y Cuellar, 2017). (Vaca-Vaca, et al., 2019) (Vaca-Vaca, et al., 2020)

Los geminivirus no solo se encuentran en las plantas cultivadas si no en las acompañantes llamadas arvenses, estas últimas se comportan como reservorios begomovirales favoreciendo la aparición de nuevas variantes, producto de mutaciones, recombinaciones, sinergismos, pseudorecombinaciones y trans complementaciones, entre componentes virales, los cuáles pueden llegar a su a vez ser más virulentos que aquellos de los cuáles son originarios (Fauquet et al., 2006; Padimman et al., 1999; Da silva et al., 2011).

Algunas de las familias botánicas de arvenses reportadas con mayor frecuencia como hospederas de geminivirus son: Malvaceae, Fabaceae, Euphorbiaceae, Solanaceae (Morales y Anderson, 2001), Sterculiaceae Amaranthaceae y Asteraceae (Arnaud et al., 2007; Castillo-Urquiza et al., 2008; Fernández - N., 2010; Vaca Vaca et al., 2011; López-López et al., 2012; Vaca-Vaca et al., 2018; López-López et al., 2019).

Para Colombia se han reportado como reservorios de geminivirus las arverses: *Amaranthus dubius* (Amaranthaceae), *Caesalpinia sp* (Fabaceae), *Croton hirtus* (Euphorbiaceae), *Desmodium sp.*, (Fabaceae), *Hybanthus attenuatus* (Violaceae), *Lantana cámara* (Verbenaceae), *Laportea estuans* (Urticaceae), *Momordica charantia* (Cucurbitaceae), *Petiveria alliaceae* (Phytolaccaceae), *Plumbago sp* (Plumbaginaceae), *Rhynchosia mínima* (Fabaceae), *Rivina humilis* (Phytolaccaceae), *Verbena sp.*, (Verbenaceae) (Vaca-Vaca et al., 2011; López-López et al., 2012; López-López et al., 2014; Vaca-Vaca et al., 2018; Vaca-Vaca et al., 2019; Vaca-Vaca et al., 2020)

Ya que el tomate es un hospedero natural de los begomovirus y en sus alrededores se han encontrado arvenses tales como *Croton hirtus*, *Rhynchosia mínima*, *Verbena sp*; entre otras, en las cuales se han reportado los virus de virus *del* mosaico dorado de crotón (CohGMV-Co), virus del mosaico dorado de *Rhynchosia* de Colombia (RhGMCoV), virus moteado de *Verbena*(VeMV-Co) (Jara-Tejada 2016).

El objetivo del presente trabajo fue comprender el fenómeno evolutivo de estos virus desde la perspectiva de la pseudorecombinación que se pueda dar entre componentes genómicos (A/B) pertenecientes a diferentes begomovirus, así como los efectos que este evento pueda tener de la transcomplememntación a nivel de movimiento. Para alcanzar este objetivo se tomará como modelo el PYMV que se encuentra afectando principalmente el cultivo de tomate en Colombia (Betancur-Perez, y *colaboradores.*, 2012) así como otros begomovirus aislados de arvenses como por ejemplo CohGMV-Co, RhGMCoV y VeMV-Co.

Objetivos

Objetivo General

Analizar la capacidad de trans-complementación a nivel de replicación y movimiento de geminivirus endémicos aislados de arvenses y tomate en el Suroccidente del Valle del Cauca.

Objetivos Específicos

- ✓ Determinar si hay trans-complementación entre los componentes genómicos de geminivirus aislados de arvenses y PYMV-Col a nivel de la replicación.
- ✓ Determinar si hay trans-complementación entre los componentes genómicos de geminivirus aislados de arvenses y PYMV-Col a nivel del movimiento.
- ✓ Utilizar herramientas bioinformáticas para identificar elementos cis-regulatorios en la región común de cada virus y explicar los posibles eventos de trans-complementación de los geminivirus estudiados.

1. Marco teórico

1.1 Los virus, grandes limitantes en la agricultura

La siembra de frutas y hortalizas, día a día enfrenta nuevos retos de producción que se ven disminuidos por diferentes problemas relacionadas con el ambiente donde se desarrollan (Canto et al., 2009). De estos, tal vez los más importantes a los que se enfrentan son las enfermedades a consecuencia de agentes fitopatógenos (que incluyen a las bacterias, hongos y virus); es decir, aquellos que generan un desbalance en el desarrollo normal del cultivo (Obregón, 2017). Hernández et al., en 2018 concluyeron que los virus son una de las principales causas de la disminución del rendimiento en los cultivos de importancia agrícola llegando al punto de generar pérdidas parciales o totales de la producción agrícola.

Este argumento se ha soportado; en los resultados reportados por Anderson et. al. (2004) y Navas-Castillo et al., (2011), donde los virus son el agente fitopatógeno que causa la mayor cantidad de enfermedades en los cultivos, debido principalmente a dos factores; el primero, la eficiencia genética de éstos para infectar el huésped y segundo, por la abundancia y distribución de los vectores de diseminación. (Pradhan et al., 2017; Rojas et al., 2005).

Los virus son parásitos intracelulares obligados, estos se hallan constituidos por una cápside proteica, que protege el material genético el cual está conformado por ácidos nucleicos (DNA o RNA) y proteínas; el genoma DNA o RNA de los virus puede presentarse en cadenas dobles (ds) o en cadena sencilla (ss). Hay casos como los viroides que no presentan cápside como tal, los cuales hasta la fecha únicamente se han identificado en infecciones en plantas (Hull, 2002). Los virus al ser parásitos obligados, solo se multiplican

en células vivas debido a que estos carecen de organelos, así como de vías metabólicas propias para realizar sus actividades como replicación y síntesis de proteínas, alterando el funcionamiento de las células del huésped desarrollando en éste deficiencias fisiológicas que tienden a confundirse con otros desordenes metabólicos como deficiencia en algunos nutrientes. (Brown et al., 2011; Gergerich y Dolja,2006).

Dentro del grupo de virus de DNA que afectan cada vez más lo cultivos agrícolas, generando pérdidas económicas importantes, se encuentran los geminivirus (género, *Begomovirus*) (Adams et al., 2013; Wu et al., 2020).

1.2 Características generales e importancia de los geminivirus

1.2.1 Importancia general

La primera descripción de una enfermedad viral en plantas fue realizada en un poema japonés del siglo VIII D.C. escrito por la emperatriz KoKen en el año 752, en el cual describió un amarillamiento de las venas de la planta *Eupatorium*, enfermedad inducida por un geminivirus (Bock y colaboradores., 1982; Casco y colaboradores., 2002; Saundersy colaboradores., 2003). El primer reporte sobre enfermedades causadas por geminivirus data del siglo XIX, donde sobresalen los estudios realizados con el mosaico de la yuca en el Este de África (Harrison 1985). Para inicios de los noventas, a los geminivirus no se les consideraba un peligro potencial, por la poca información que se tenía de ellos y sus colocaciones de identificación tan remotas; e incluso, por un tiempo se sugirieron usar como posible modelo de estudio para evaluar el comportamiento de ciertos genes en las plantas huésped; no obstante, esta percepción cambio absolutamente al irse identificando más casos de infecciones por geminivirus en diversos cultivos vegetales de todo el mundo, con consecuencias devastadoras(Fauquet y Thouvenel, 1977; Legg y Fauquet, 2004; Moffat, 1999).

Los geminivirus (Familia *Geminiviridae*) forman parte de una de las familias virales más abundantes en el mundo vegetal, por el número de virus aislados en plantas tanto mono

como dicotiledóneas (Díaz - P *et al.*, 2020, Fauquet *et al.*, 2008). Asimismo, se les atribuyen innumerables casos de infección en cultivos agrícolas de amplio valor económico alrededor del mundo, que han diezclado en gran medida las cosechas de los mismos, creando con ello, una señal de alarma para la seguridad agroalimentaria de las zonas subtropicales y tropicales en muchos de los países en vías de desarrollo, desde hace más de 60 años (Bernardo *et al.*, 2013; Singhal, P, *et al.*, 2020).

Tal es el caso de la yuca en África que ha dejado pérdidas hasta por el 80% según el cultivar a causa de la enfermedad causada por *African cassava mosaic virus* (ACMV) (Legg y Fauquet., 2004; Owor *et al.*, 2004). Otro geminivirus como el *Bean golden mosaic virus* (BGMV) que se encuentra ampliamente distribuido en el continente americano, ha logrado causar la pérdida casi total de la producción de frijol común (Morales y Anderson, 2001; Brown y Bird, 1992); también *Beet curly top Virus* causó pérdidas de casi toda la producción de remolacha azucarera en el oeste de los Estados Unidos a principios de 1900 (Soto *et al.*, ., 2003; Stenger *et al.*, ., 1997); *Cotton; Maize streakvirus* en África causa pérdidas entre el 30 y 100% de la producción de maíz (Alegbejo *et al.*, ., 2002); *Tomato yellow leaf curl virus* limita la producción de tomate en muchas regiones del mundo como África, las Américas, Asia y Europa (Salati *et al.*, ., 2002; Nakhla *et al.*, ., 1998; Pradhan, Tien, Dey, y Mukherjee, 2017; Zerbini *et al.*, ., 2017; Inoue, Lima y Gilbertson, 2016).

1.2.2 Síntomas de la enfermedad

Una planta afectada por geminivirus, puede presentar los siguientes síntomas de manera general: una reducción de crecimiento; tanto de la planta como en el fruto, amarillamiento foliar, enroscamiento o rizado de las hojas, epinastias, clorosis foliar marginal, abultamientos foliares, reducción del área foliar y enanismo en la planta y fruto. (Marwal *et al.*, 2014).

1.2.3 Morfología genómica y taxonomía

El genoma de los geminivirus es circular de DNA de cadena sencilla, este virus por ser DNA se replica en el núcleo de las células vegetales de sus hospederos (Fontenele et al., 2017). Los genomas de los geminivirus están conformados por uno o dos componentes los cuales están encapsulados en subunidades proteicas geminadas (gemelas) semejantes a icosaedros fusionados por una de sus caras, que observado al microscopio electrónico da este aspecto al virión, de ahí emana su nombre (Zhang, W., et al., 2001; Juárez-Reyes, 2007) (Figura 1).

Cada una de las partículas está constituida por una cápside de 110 subunidades de 29- 30 kD. Al ser parásitos obligados, estos virus aportan pocos elementos para su replicación y transcripción siendo dependientes de las RNA y DNA polimerasas nucleares de su hospedante (Fondong, 2013).

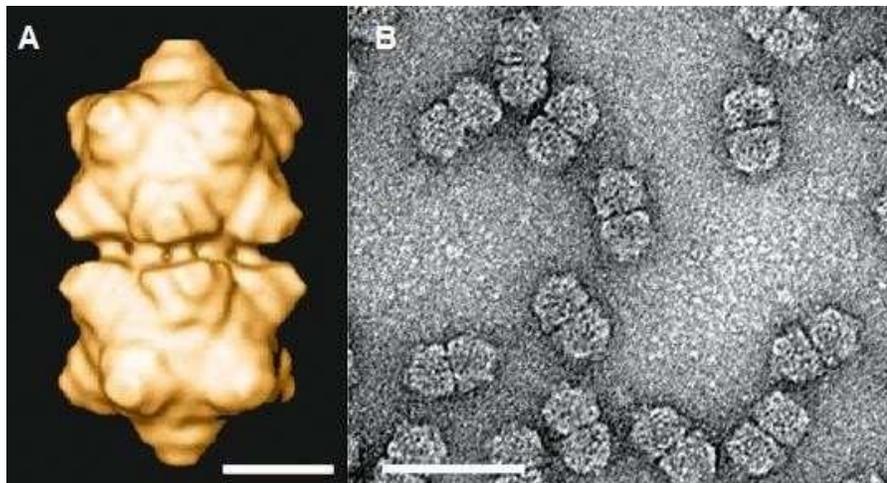


Figura 1 Partículas de geminivirus

A, Reconstrucción de una partícula del virus del rayado del maíz (MSV) la barra representa 10 nm.
B, partículas purificadas de MSV teñidas con acetato de uranilo, la barra representa 50 nm. Tomado de: Zhang, W et al., 2001.

Los geminivirus utilizan el mecanismo de replicación por círculo rodante (RCA) para replicar su genoma de DNA de cadena sencilla (ssDNA) y producir DNA de doble cadena

(dsDNA), que utiliza posteriormente como molde para la replicación y transcripción del virus (Preiss y Jeske, 2003; Gutiérrez et al., 2004).

La familia *Geminiviridae* se clasifica actualmente en nueve géneros *Begomovirus*, *Becurtovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grabovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* y *Turncurtovirus*, tomando como criterios principales, la organización genómica, su insecto vector y las plantas hospederas, y 485 especies según el comité internacional de taxonomía de virus 2020 (**Tabla 1**) (Varsani et al., 2017, ICTV2020). El grupo más numeroso de la familia *Geminiviridae* corresponde al género *Begomovirus*, que incluye más de 596 especies reportadas hasta el año 2020 reportado en el ICTV.

Tabla 1. Clasificación de los miembros de la familia *Geminiviridae*. Tomado y adaptado de: (Rojas et al., 2005; Varsani et al., 2017; Kumar, 2019; ICTV, 2020).

Genero	Miembro típico	Acrónimo	Hospedero	Vector	Genoma	Especies reconocidas (ICTV)
<i>Becurtovirus</i>	<i>beet curly top Iran virus</i>	BCTIV	Dicotiledóneas	Saltahojas (<i>Cicadellidae</i>)	Monopartita	3
<i>Begomovirus</i>	<i>bean golden yellow mosaic virus</i>	BGYMV	Dicotiledóneas	Mosca blanca (<i>Aleyrodidae</i>)	Monopartita y bipartita	596
<i>Capulavirus</i>	<i>Euphorbia caput-medusaelatent virus</i>	EcmLV	Dicotiledóneas	Afido o pulgon (<i>Aphididae</i>)	Monopartita	4
<i>Curtovirus</i>	<i>beet curly top virus</i>	BCTV	Dicotiledóneas	Saltahojas (<i>Cicadellidae</i>)	Monopartita	3
<i>Eragrovirus</i>	<i>Eragrostis curvula streak virus</i>	ECSV	Monocotiledóneas	Vector desconocido	Monopartita	1
<i>Grabovirus</i>	<i>Grapevine red blotch virus</i>	GRBV	Dicotiledóneas	saltahojas (<i>Membracidae</i>)	Monopartita	3
<i>Mastrevirus</i>	<i>maize streak virus</i>	MSV	Monocotiledóneas y dicotiledóneas	Saltahojas (<i>Cicadellidae</i>)	Monopartita	37
<i>Topocuvirus</i>	<i>Tomato pseudo-curly top virus</i>	TPCTV	Dicotiledóneas	saltahojas (<i>Membracidae</i>)	Monopartita	1
<i>Turncurtovirus</i>	<i>Turnip curly top virus</i>	TCTV	Dicotiledóneas	Saltahojas (<i>Cicadellidae</i>)	Monopartita	2

1.3 Género *Begomovirus*

El género *Begomovirus* está compuesto mayoritariamente por geminivirus bipartitas es decir conformados por dos componentes genómicos denominados componente A y Componente B, donde cada componente tiene un tamaño aproximado de 2,6 - 2,8 kb (ICTV, 2020; Lefkowitz et al., 2018) (Figura 2). Los begomovirus se encuentran distribuidos a nivel mundial y de acuerdo a su ubicación geográfica se les conocen del Viejo Mundo (VM) reportados en las regiones de India, Asia, África y Japón, donde predominan los begomovirus monopartitas es decir de un solo componente genómico; y del Nuevo Mundo (NM) que prevalecen en las regiones de América (ICTV 2017a).

El componente genómico DNA-A se halla toda la maquinaria genética para la replicación y en el núcleo a través de dos procesos fundamentales, transformación de ssDNA a dsDNA, mediante la amplificación por círculo rodante y el proceso de encapsidación (Gutierrez, 2002), mientras que el componente genómico DNA-B se hayan componentes que intervienen en el movimiento de los viriones a corta y larga distancia así como también la producción de síntomas en las células huésped (Briddon, Patil, Bagewadi, Nawaz-UI-Rehman, y Fauquet, 2010)

Todos los miembros de la familia *Geminiviridae* tienen una región intergénica (IR) de aproximadamente 300 nt. En esta región intergénica es posible distinguir diversos elementos de secuencia característicos tales como una estructura de tallo y asa la cual es absolutamente conservada que contiene la secuencia de nucleótidos TAATATTAC que marca el origen de replicación mediante círculo rodante y delimita dos promotores divergentes, así como otro elemento de secuencia denominado región común denominada con este nombre porque está presente y es idéntica entre los componentes genómicos A y B de un mismo begomovirus; esta región posee múltiples repeticiones de secuencias de 6-12nt que actúan como sitios de unión para la proteína asociada a la replicación (Rep) denominados iterones (Argüello-Astorga y Ruiz-Medrano, 2001; Linda Hanley-Bowdoin, Settlege, Orozco, Nagar, y Robertson, 1999).

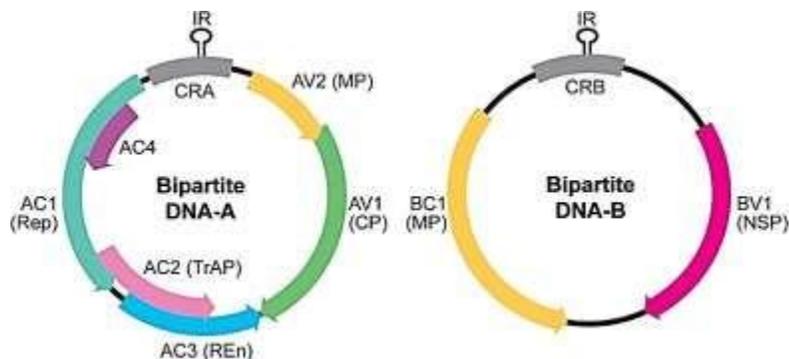


Figura 2. Organización genómica de un begomovirus bipartita. Tomado de: Varsani, et al., 2017

1.3.1 Organización genómica de los begomovirus bipartitas

Los genes de los begomovirus bipartitas se designan de forma alfanumérica, en el cual la primera letra refiere al componente viral (A o B) y la segunda letra (V o C) muestra el sentido en el cual se transcriben los genes. La letra V indica que el gen se transcribe en sentido del virión equivalente a la letra R (right) es decir que los genes se transcriben en dirección al movimiento de las manecillas del reloj mientras que la letra C o L (left) significa en sentido complementario al sentido del virión o en contra de las manecillas del reloj. (Tabla 2).

En el caso de los begomovirus bipartitas, el componente genómico A posee cinco marcos de lectura abiertos (MLAs); así mismo presentan dos promotores divergentes en relación a la estructura de tallo y asa. Los genes que se encuentran en el sentido del virión corresponden en el componente genómico A al gen AV1 (CP), y en componente genómico B (BV1), en contrasentido del virión encontramos los marcos de lectura abiertos correspondientes a los genes AC1, AC2 y AC3 los cuales codifican la proteína asociada a la replicación (Rep), un trans-activador transcripcional (TrAP) y un enhancer de la replicación (Ren) y un supresor del silenciamiento pos-transcripcional vegetal (AC4) (Fondong, 2013; Gutiérrez, 2000).

El componente genómico B contiene 2 MLA que codifican para funciones de movimiento intra e intercelular del virus a través de la planta. En el antisentido del virión, se halla la

proteína MP, implicada en el movimiento a larga distancia y la expresión de síntomas, y en el sentido del virión, se halla la proteína NPS encargada del movimiento del DNA del núcleo al citoplasma (Fondong, 2013; Shimada-Beltrán y Rivera-Bustamante, 2007) (Tabla 2).

Tabla 2. Nomenclatura de genes de begomovirus bipartita

COMPONENTE	GEN	PROTEINA	FUNCION
A	AC1	REP	Proteína asociada a la replicación
	AC2	TrAP	Proteína transactivadora
	AC3	REn	Potencializador de la replicación
	AV1	CP	Proteína de la capsida
	AL4	AC4	Determinante de patogenicidad
B	BC1	MP	Proteína de movimiento
	BV1	NSP	Proteína de transporte del DNA del núcleo al citoplasma

1.3.1.1 El gen AV1 codifica la proteína de la cápside geminiviral (CP)

La cápside es una supra estructura molecular proteica encargada de proteger al genoma begomoviral de agentes externos libres tanto en el citoplasma del vector biológico como en citoplasma de la célula vegetal que tienen la capacidad de degradar molécula de DNA (Kunik et al., 1999), así como también estar relacionada con la especificidad del mismo (Ascencio-Ibañez, Monsalve-Fonnegra, Pruna-Camacho, Díaz-Plaza, y Francisco, 1999). Asimismo, presenta semejanza con la proteína BV1 de Begomovirus bipartitas y es fundamental para el movimiento del DNA viral (Rojas, Hagen, Lucas, y Gilbertson, 2005). En los geminivirus transmitidos por mosca blanca, la proteína de la cápside se halla suficientemente conservada en comparación con los que son transmitidos por cicadélidos, ya que muestran una alta variabilidad, por lo que se ha referido que la proteína de la cápside está estrechamente relacionada con la transmisión de los vectores, así como la especificidad de los mismos (Briddon, Bedford, Tsai, y Markham, 1996).

1.3.1.2 Gen AC1 codifica la proteína asociada a la replicación (Rep)

Rep es la única proteína viral necesaria para iniciar la replicación del virus por el mecanismo de círculo rodante por su actividad ATP/GTPasa ya que contiene una secuencia de unión específica al DNA y actividad endonucleolítica sitio específica, esta tiende a ser conservada en función, posición y secuencia (Gutierrez, 2000; Laufs, Schumacher, Geisler, Jupin, y Gronenborn, 1995; Lazarowitz y Shepherd, 1992). El proceso de replicación se inicia cuando la proteína Rep se acopla con los iterones ubicados cerca de la estructura tallo y asa, este proceso esto ocurre en el núcleo de la célula infectada (Raghavan et al., ., 2004) este proceso se lleva a cabo mediante el mecanismo de círculo rodante donde emplea la maquinaria enzimática del hospedero; durante este proceso el motivo I de Rep actúa como endonucleasa y corta el enlace de unión fosfodiéster entre los últimos T y A en la secuencia de nonanucleótidos en un proceso bioquímico mediado por el motivo II (Fondong, 2013; Raghavan, Malik, Choudhury, y Mukherjee, 2004).

1.3.1.3 Gen AC2 codifica la proteína asociada a la transactivación (TrAP)

La proteína TrAP, que es el producto del gen (AV1) es un trans-activador transcripcional de elementos de secuencia conservados llamados CLEs (Conserved late elements) los cuales están presentes en los promotores tardíos tanto de AV1 así como de BV1 (Hanley et al., 1999). TrAP es una proteína presente en todos los begomovirus bipartitas siendo susceptible de ser compartida, como trans-activador transcripcional por begomovirus filogenéticamente relacionados cuyos CLEs sean similares a nivel de secuencia (Ruíz-Medrano et al., 1999). En 2007, los estudios de Yang et al., corroborado por las investigaciones de Moreno (2013), permitieron identificar que TrAP además de ser un trans-activador transcripcional, tenía un papel destacado como proteína supresora

del silenciamiento postranscripcional (PTGS), mediado por Kinasas vinculada a la metilación del DNA vía SAM (s-adenilmetionina) (Moreno, 2013).

1.3.1.4 Gen AC3 codifica la proteína potenciadora de la replicación REn

La proteína REn se encuentra en la zona codificante del gen (AC1), en el núcleo de las células infectadas a niveles similares de Rep, sugiriendo que puede actuar con ella durante la replicación de DNA viral aumentando el título viral. La interacción REn/Rep incrementa la afinidad de Rep por el origen de replicación al igual que potencia el corte y unión del DNA (Linda Hanley-Bowdoin et al., 1999; Laufs et al., 1995). Por esto se dice que Ren potencia la replicación del DNA viral y también interactúa consigo misma y con otras proteínas del mismo virus (Ascencio-Ibañez et al., 1999; L Hanley-Bowdoin, Settlege, Orozco, Nagar, y Robertson, 2000; Rojas et al., 2005a)

1.3.1.5 Gen AL4 codifica la proteína AC4

En el caso de gen AL4, este codifica la proteína AC4 se considera como determinante de patogenicidad, se ha visto que acentúan la intensidad de los síntomas producidos de forma específica para cada hospedero (Krake et al., 1997; Hanley-Bowdoin, Bejarano, Robertson, y Mansoor, 2013). También se conoce que posee funciones relacionadas con el silenciamiento génico (Fondong, 2013).

1.3.1.6 Gen BV1 codifica la proteína NSP

La proteína NSP es codificada por el gen BV1 (proteína de transporte nuclear); su orientación se halla en el sentido del virión, este gen presenta afinidad por DNA viral de cadenas dobles y sencilla (Rojas et al., 1998). El producto del gen BV1 es el encargado de transportar el DNA geminiviral entre el núcleo y el citoplasma vegetal

formando un complejo llamado NSP-DNA viral. (Lazarowitz y Shepherd, 1992; Pascal et al., 1994). Para el movimiento larga distancia, entiéndase la diseminación desde la célula infectada a otras vecinas, el complejo NSP-DNA interacciona con el producto del gen BC1 (MP) condición necesaria para que el genoma geminiviral pueda diseminarse de célula a célula, con el concurso de los plasmodesmos hasta alcanzar la luz del floema y a partir de allí diseminar por toda la planta y reiniciar todo el ciclo infectivo (Zhou et al., 2007).

1.3.1.7 Gen BC1 codifica la proteína MP

El marco de lectura abierto del gen MP o BC1 se encuentra ubicado en posición antisentido del virión, este gen codifica para la proteína de movimiento (MP) de célula a célula, MP se sitúa entre la pared celular y la membrana plasmática por su correlación con el DNA de cadena doble y sencilla. (Lazarowitz y Shepherd, 1992).

Las funciones realizadas por la proteína MP llevadas a cabo mediante el proceso de transporte son: a) acoplarse al complejo NPS-DNA y enviarlo al plasmodesmo; b) alterar el tamaño del plasmodesmo; c) permitir la transferencia célula- célula; y d) soltar el DNA- NSP en la siguiente entrada plasmodesmal. Por su parte NSP interacciona con la región central de MP, quien debe soportar modificaciones postranscripcionales para establecer el complejo NSP-DNA-MP envolviéndose en distintos mecanismos de transporte celular (Kleinow et al., 2009).

1.4 Mecanismo de replicación en los begomovirus

Los begomovirus replican su genoma mediante el mecanismo de Replicación por Círculo Rodante (RCR) (Fontes, 1994; L Hanley-Bowdoin et al., 2000) Este proceso se lleva a cabo en el núcleo de las células vegetales infectadas empleando como modelo intermediarios de DNA de doble cadena (DNAds) (Gutierrez, 2002), siendo fundamental la participación de la proteína Rep, en la cual se han encontrado residuos de aminoácidos

conservados involucrados en la unión a secuencias repetidas específicas de DNA (Londoño, Riego-Ruiz, y Argüello-Astorga, 2010).

Los Begomovirus emplean la estrategia de replicación por CR, actividad que acontece en el núcleo de las células de la planta infectada ya que usan diversos elementos o factores de replicación de estas. La actividad hidrolizadora de ATP/GTP de la proteína Rep estaría presente en la regulación del ciclo celular de manera que incrementa los niveles del antígeno de proliferación nuclear (PCNA) que a su vez reprime una proteína homóloga del retinoblastoma (RBR) en plantas para promover que las células diferenciadas que se encuentran en fase G entren en fase S o de síntesis de DNA (Laufs et al., 1995; Gutierrez, 2002).

La replicación geminiviral implica la conversión de un DNA de cadena sencilla (DNAss) a un DNA de cadena doble (DNAds). Este DNAds va a ser utilizado por el replisoma de la planta como molde para llevar a cabo la replicación, así como la transcripción (Figura 3) (Gutierrez, 2002; John et al., 2009). Para el reconocimiento del sitio de origen de replicación presente en el genoma geminiviral el replisoma vegetal reconoce con la ayuda de la proteína Rep los siguientes elementos de secuencia presentes en la región intergénica viral: una secuencia conservada que da origen a una estructura de tallo y asa cuya secuencia es (TAATATTAC); otro elemento de secuencia reconocido por Rep presente en el promotor de AC1 necesario para el proceso de inicio de la replicación lo constituyen los iterones. (Figura 4) (Argüello-Astorga, Guevara-González, Herrera-Estrella, y Rivera-Bustamante, 1994; Ascencio-Ibañez et al., 1999). El replisoma vegetal lleva a cabo la replicación del genoma geminiviral siguiendo el modelo del círculo rodante; para ello el producto del gen AL1 (Rep) es el encargado de hacer un nick (corte ó melladura) en el sitio Sty-I presente en la secuencia nonanucleotídica (TAATATT*AC), obteniéndose así un extremo OH libre que servirá como primer o cebador condición necesaria para iniciar la replicación. Ascencio-Ibañez *et al.*, 1999).

Después del corte, la polimerasa de la célula vegetal acorta varias unidades del genoma viral llamados concatámeros, usandolos como modelo de la cadena complementaria, a continuación, Rep que tiene actividad endonucleasa/ligasa corta los concatámeros, dando origen a la liberación de las unidades genómicas. Continuo de esto, une los extremos del

DNA viral, generando las moléculas circulares lo que significa una copia del genoma viral (Haible, Kober, y Jeske, 2006).

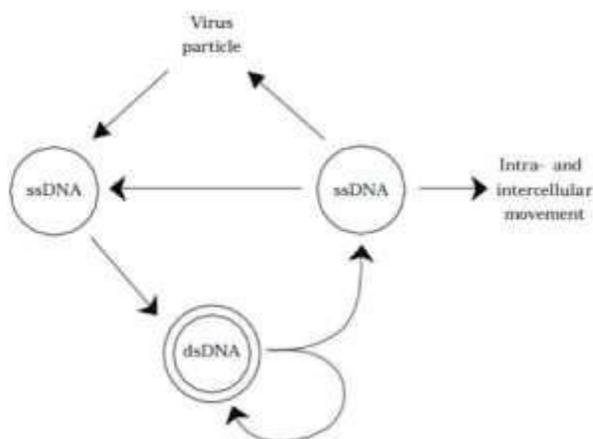


Figura 3. Esquema que representa el ciclo de replicación de DNA en geminivirus.

Tomado de Gutiérrez, 2002.

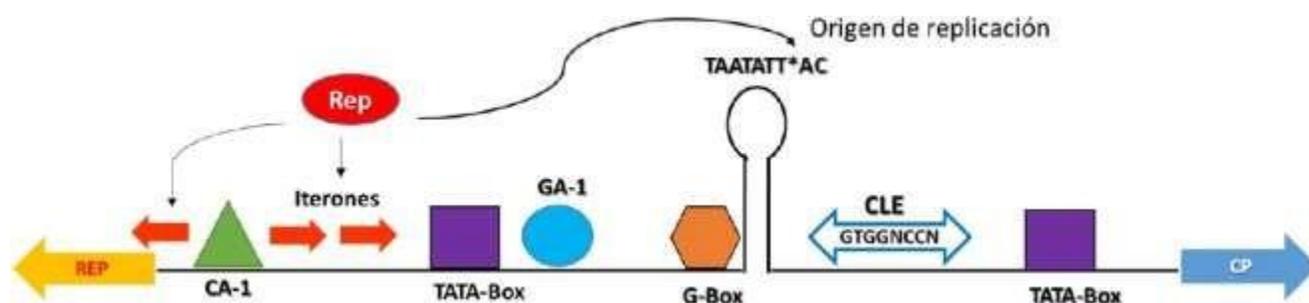


Figura 4. Elementos Cis regulatorios (Iterones y CLEs) identificados como blancos de acción que reconocen Rep (AL1) y TrAP (AL2) respectivamente

1.5 Ciclo infectivo de begomovirus

El ciclo infectivo de los begomovirus inicia a partir del momento en que su vector biológico la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) inocula el virus en una planta susceptible mientras se está alimentando de la misma. Gracias a que los begomovirus tienen una preferencia por el tejido del floema (tropismo de tejido), logran identificar células vegetales susceptibles de

poner en fase “S”, condición necesaria para dar origen al ciclo infeccioso begomoviral. Una vez las células susceptibles están en fase S comienza la expresión organizada y secuencial de los genes geminivirales. Esto implica la expresión temporal de estos marcos de lectura es decir la expresión de genes tempranos y de genes tardíos. Entre los genes considerados como tempranos se destacan el gen AL 1 y AL3 que codifican la proteína asociada a la replicación (Rep) así como un enhancer de la replicación (Ren); los productos de estos genes son los primeros en expresarse ya que son los responsables de reclutar el replisoma de la planta al DNA geminiviral con el fin de multiplicar el genoma del virus. (Rojas, et al., 2005; Lozano-Duran et al., 2016; Hanley-Bowdoin et al., 2013).

Se cree que una vez se alcanza un título particular elevado de genomas begomovirales en aquella primera célula infectada, AC1 (Rep) se auto reprime transcripcionalmente permitiendo la expresión del gen AC2 que codifica una proteína trans-activadora transcripcional (TrAP) que es la encargada de activar en “*trans*” la expresión de los genes tardíos (AV1) relacionados con la síntesis de la proteína de la cápside (CP) así como los genes del movimiento a corta y larga distancia: BC1 responsable del movimiento a larga distancia, y BV1 encargado del movimiento a corta distancia (Gafni y Epel, 2002).

1.6 Movimiento de los virus en las plantas

El primer movimiento que realizan los begomovirus dentro de la planta se conoce como movimiento célula-célula, este hace referencia a la célula inicial donde el virus se replicó y de allí debe transportarse a las células vecinas a través de los plasmodesmos, (Lucas 2006). Llegando a células con núcleo para poder replicarse, las cuales están conectadas por los plasmodesmos llegando así al floema (Lough y Lucas,2006). Una vez alcanzan la luz del floema los geminivirus se dispersan por toda la planta siguiendo el modelo de flujo a presión de los fotosintatos evento que les permite a estos virus alcanzar nuevas células, jóvenes, muchas de ellas localizadas lejos del sitio donde estos fueron inoculados por su insecto vector, reiniciando así un nuevo ciclo infeccioso viral (Wege 2007).

Las proteínas de movimiento (MP y NSP) de los begomovirus ayudan al aumento el tamaño de los plasmodesmos lo que permite un mejor movimiento de una célula a otra (Carrington 1996; Lazarowitz y Sanderfoot 1966).

1.7 Mecanismos que generan la diversidad genética de los geminivirus en nuevos hospederos

Al replicarse los begomovirus en el núcleo de las células hay una mayor probabilidad de que ocurra una variación genética ya sea por recombinación, mutación o pseudorecombinación, esto sumado a las condiciones ambientales cambiantes, la facilidad de adaptación a nuevos hospederos y la alta diversidad genética en las poblaciones virales es un mundo propicio para la aparición de nuevos recombinantes virales lo que a su vez conlleva a la evolución de los virus (Aguilar, et al., 2020).

A nivel de virología animal, muchos y cuantiosos estudios han expuesto datos sobre la tasa de mutaciones, la adaptación y selección, la naturaleza y significado biológico de las cuasiespecies, y el papel de la recombinación en la evolución de las familias virales, sin embargo, en el área de la virología vegetal, estos estudios no son tan amplios siendo importantes ya que permiten considerar el impacto económico que se podría generar en la agricultura y la emergencia epidemiológica que estos causarían.

Diversos estudios empiezan a mostrar la importancia de las mutaciones, las recombinaciones y los reordenamientos genómicos que han llevado a la evolución de los geminivirus y en consecuencia sus hospederos (Schnippenkoetter et al., 2001; Pita, Fondong, Sangaré, Kokora, y Fauquet, 2001; Padidam et al., 1999; Monci, Sánchez-Campos, Navas-Castillo y Moriones 2002; García - Arenal et al., 2000)

1.7.1 Mutación

La cantidad de mutaciones en virus de plantas de DNAs aún no es conocida (García-Arenal, Fraile, y Malpica, 2001). Las mutaciones reportadas son generalmente de los virus de RNA, a pesar de las posibilidades de que debería ser menor para virus de DNA debido a la actividad correctora de la DNA polimerasa.

No obstante, se cree que los geminivirus no utilizan los mecanismos del huésped para la corrección en caso de una combinación errónea que involucra la metilación de DNA, permitiendo que las mutaciones no mortales (Seal et al., 2006).

1.7.2 Recombinación

El intercambio genético por medio de la recombinación proporciona al virus mecanismos para evolucionar velozmente, en los virus de DNA y RNA el intercambio genético es realizado en el proceso de replicación entre cepas de la misma especie permitiendo el aumento en el rango de hospederos y aumento en la virulencia del mismo (Fargette et al., 2006; Froissart et al., 2004; Wispelaere et al., 2005; Martin, Van der Walt, Posada, y Rybicki, 2005; Seal et al., 2006; García- Arenal y McDonald, 2003). Un ejemplo de recombinación de begomovirus fue reportado por Zhou et al., (1997), cuando describieron una nueva especie begomoviral en Uganda, consecuencia de la recombinación entre dos virus *African cassava mosaic virus* (ACMV) y *East African cassava mosaic virus* (EACMV). También, Monci et al., en el 2002 describieron un recombinante entre *Tomato yellow mosaic virus* (TYLCSV) y *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) en Italia. Así mismo, Stewart et al., (2014), muestran que el virus del mosaico dorado de sida de braco (SiGMBcV) es un recombinante derivado del virus del mosaico amarillo de malvastrum (MaYMHeV).

1.7.3 Pseudorecombinación

La pseudorecombinación es un modelo de variabilidad genética y representa el cambio de componentes genómicos (DNA-A ó DNA-B) entre dos Begomovirus (Garrido-Ramírez, Sudarshana, y Gilbertson, 2000; Pita et al., 2001; Ramos *et al.*, 2003; Idris y Brown, 2004; Seal et al., 2006), En el año de 1980 se demostró experimentalmente la posibilidad de intercambio entre componentes genómicos (DNA-A ó DNA-B) entre el virus del mosaico de la cassava africana aislado de Nigeria y el virus del mosaico de la cassava africana de Kenya, los cuales formaron pseudorecombinantes viables. (Stanley, Townsend, y Curson, 1985).

El componente geminiviral DNA-A de algunos begomovirus pueden formar pseudorecombinantes viables con componentes geminivirales DNA-B de otros begomovirus permitiendo generar infección, cuando existe entre ellos iterones similares, de lo contrario

estos pseudorecombinantes serían químericos (Karthikeyan et al., 2004). Se han realizado reporte de begomovirus monopartitas que han interactuado con el DNA-B de otro virus adquiriéndolo permanentemente pasando a ser begomovirus bipartitas. Estos begomovirus han sido definidos como mono-bipartitas, un ejemplo de este tipo de virus, es el *Tomato yellow leaf curl disease* (TYLCV) que es un virus mono-bipartita que adquirió un DNA-B que se hallaba en la planta huésped, el cual intensificó los síntomas causados solo por el DNA-A (Chakraborty, Pandey, Banerjee, Kalloo, y Fauquet, 2003; Saunders et al., 2002). Basado en estos ejemplos Seal et al., (2006) afirman que a través de la recombinación que se puede presentar una rápida evolución de los virus de las plantas, generando en muchos casos cambios en la virulencia y los hospederos.

De esta manera, los ensayos realizados han servido para conocer nuevas funciones de los genes en particular, y sobre algunos elementos involucrados en procesos tales como la replicación. Aunque los reordenamientos no son fenómenos comunes, este evento puede tener un efecto dramático sobre la evolución de nuevas especies virales, especialmente si la nueva combinación confiere ventajas selectivas, como una gama de hospederos mucho más expandida.

El papel de la recombinación y la pseudorecombinación en la emergencia de enfermedades virales con nuevas características se demostró a través de la caracterización del complejo de begomovirus que infecta a la yuca en Uganda (Pita et al., 2001) y del aislado ES421/99 en las plantaciones de tomate en España (Monci et al., 2002). En el primer caso, se demostró por primera vez la estabilidad en la naturaleza de un pseudorrecombinante entre dos cepas de *East African cassava mosaic virus* (EACMV-UG2 y EACMV-UG3) y entre los componentes genómicos de dos especies begomovirales distintas (EACMV y ACMV). Para el segundo caso, el aislado ES421/99 es el producto de la recombinación natural entre los begomovirus monopartitas TYLCV y TYLCSV, los cuales se presentan frecuentemente en infecciones mixtas en las plantaciones de tomate del sur de España. El resultado del recombinante infeccioso exhibe nuevas características biológicas que le pueden ofrecer ventajas adaptativas, al tomar en cuenta que su presencia en la población es cada vez más frecuente (Monci et al., 2002).

1.8 Begomovirus en Colombia

Los primeros reportes begomovirales para el país datan de 1975, cuando Gálvez et al., (1975) describieron mosaicos dorados y moteados cloróticos en cultivos de frijol en El Espinal, Tolima. Años más tarde Hidayat et al., (1993), caracterizaron su genoma viral en muestras de frijol provenientes de Palmira (Valle) recolectadas en 1987, al cual denominaron virus del mosaico enanismo del frijol *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV).

Posteriormente, Morales *et al.*, (2000) realizaron estudios de diagnóstico begomoviral demostrando que los begomovirus se habían extendido a cultivos de badea en Córdoba, frijol y soya en el Valle del Cauca, melón en el Atlántico y a tabaco en el Huila. Aunado a los cambios climáticos y las presiones antrópicas, los begomovirus se han extendido por el país.

Para el Valle del Cauca, el fuerte verano registrado en septiembre de 2002 favoreció la reproducción de *B. tabaci* biotipo B y con ello su incremento poblacional desplazó rápidamente al Biotipo A y aumentó los desórdenes fisiológicos en campos de tomates probablemente asociados a Begomovirus (Rodríguez, Morales, Bueno, y Cardona M., 2005). Para conocer el agente causal de dichos desórdenes en tomate, Martínez et al., (2008) aislaron un begomovirus de tomate que denominaron virus del mosaico amarillo del tomate *Tomato yellow mosaic virus* (ToYMV), el cual es homólogo en un 92% de identidad con el virus del mosaico amarillo de la papa de Venezuela *Potato yellow mosaic virus* (PYMV).

Así mismo Vaca-Vaca et al., (2012), reportaron que PYMV es la especie begomoviral predominante afectando y limitando los cultivos de tomate en Colombia; lo detectaron por primera vez empleando estrategias moleculares en muestras de tomate colectadas en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca, Santander, Quindío, Risaralda y Antioquía, demostrando así su prevalencia en las principales zonas tomateras de Colombia. Posteriormente fueron reportados el virus del mosaico suave del tomate *Tomato mild mosaic virus*, (TMMV), en plantas cultivadas en el Valle del Cauca (Jaramillo y Tamayo, 2013).

Hacia el año 2016 se detecta por medios moleculares por primera vez la presencia de un begomovirus afectando el cultivo de maracuyá. (*Passiflora edulis* var. *Flavicarpa*, familia Passifloraceae) en el departamento del Valle del Cauca. Hacia el año 2017 se termina la caracterización molecular de este begomovirus que afecta el maracuyá y se establece que es un nuevo virus al cual se le denomina con el nombre de virus de la distorsión de la hoja de maracuyá (*Passionfruit leaf distortion virus*, PLDV) (Vaca-Vaca, Carrasco-Lozano, y López-López, 2017; Vaca-Vaca, Carrasco-Lozano, Rodríguez-Rodríguez, Betancur-Pérez, y López-López, 2016).

Este mismo año 2017 en el departamento del Valle, se encontraron dos begomovirus nuevos. El primero, aislado del cultivo de frijol (*P. vulgaris*), denominado virus de la arruga de la hoja de frijol (*Bean leaf crumple virus*, BLCrV) (Carvajal-Yepes, Zambrano, Bueno, Raatz, y Cuellar, 2017) y el segundo, en plantas de ají (*Capsicum* spp.) llamado tentativamente como virus del mosaico rugoso del ají (*Pepper rugose mosaic virus*, PRMV), cuya identidad molecular aún se encuentra en estudio (López-lópez, Morales-Euse, y Vaca-Vaca, 2017; Vaca-Vaca, Morales-Euse, *et al.*, 2019).

1.9 Begomovirus en arvenses

Las arvenses son todas aquellas plantas que conviven con los cultivos. Existen arvenses muy agresivas (malezas) y otras que tienen poco desarrollo aéreo o de follaje y poco desarrollo de la raíz (arvenses nobles, plantas acompañantes no deseables). Las malezas limitan el crecimiento y la producción de los cultivos ya que compiten por luz, nutrientes, agua y espacio. (Blanco-Valdés, 2016; Salazar e Hincapié, 2011) Son plantas que aparecen en los cultivos, crecen donde el agricultor no quiere y casi siempre son perjudiciales.

Existen muchos ejemplos que ilustran que las malezas pueden fungir como reservorios de virus, en particular de begomovirus particularmente generando las condiciones para la aparición de nuevas variantes, producto de recombinaciones, pseudorecombinaciones y mutaciones entre los mismos virus. (Díaz-Pendóm y colaboradores., 2020).

Muchas de las plantas acompañantes que se encuentran alrededor del cultivo las cuales se reportan como hospederos de begomovirus pertenecen a las familias Malvaceae, Euphorbiaceae y Fabaceae (Morales y Anderson, 2001). Así mismo, en la base de datos Genbank (NCBI, 2019) se registran varias especies de arvenses como hospederas de begomovirus en Latinoamérica. Estos begomovirus fueron aislados de 85 especies de arvenses, repartidas en 47 géneros y 17 familias botánicas: Acanthaceae (2 sp.), Alstroemeriaceae (1 sp.), Amaranthaceae (2 sp.), Caryophyllaceae (1 sp.), Cleomaceae (3sp), Compositae (3 sp.), Convolvulaceae (6 sp.), Euphorbiaceae (6 sp.), Lamiaceae (4 sp.), Leguminosae (14 sp.), Malvaceae (64 sp.), Martyniaceae (1 sp), Nyctaginaceae (2 sp.), Oxalidaceae (1 sp.), Scrophulariaceae (1 sp.), Solanaceae (7 sp.) y Verbenaceae (1 sp.).

Vale la pena resaltar el caso de la familia malvaceae Malvaceae por presentar un alto número de especies hospederas de diversos begomovirus (64) reportados a la fecha en el Genbank, tal es el caso del virus del mosaico amarillo de okra aislado México (*Okra yellow mosaic Mexico virus*, OYMV), detectado en las malváceas *Abutilon permolle*, *Anoda cristata*, *Corchorus siliquosus*, *Herissantia crispa*, *Malachra fasciata*, *Sida acuta*, *Sida aggregata*, *Sida haenkeana*, *Sida hyssopifolia* y *Sida rhombifolia*, que han sido producto de recombinaciones, esto corroborando lo reportado por en 2001 por Morales y Anderson.

De igual manera, se repiten cuatro begomovirus distribuidos ampliamente en Latinoamérica: virus del mosaico dorado de sida (*Sida golden mosaic virus*, SiGMV) aislado en Brasil, Cuba, Honduras, Jamaica, México y Venezuela, virus del mosaico de Euphorbia (*Euphorbia mosaic virus*, EuMV) detectado en Cuba, Jamaica, México, Nicaragua y Puerto Rico, virus del mosaico dorado de Rhynchosia (*Rhynchosia golden mosaic virus*, RhGMCV) reportado en Colombia, Cuba, Honduras, Jamaica y México, y virus del mosaico dorado de sida (*Sida golden mosaic virus*, SiGMV) aislado en Argentina, Bolivia, Brasil y México .

Por ejemplo, en España el virus del enrollamiento de la hoja del tomate de Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV) fue aislado en las arvenses *Sonchus oleraceus* (Compositae), *Ecballium elaterium* (Cucurbitaceae), *Datura stramonium* y *Solanum americanum* (Solanaceae) (Juárez et al., 2019), como en Estados

Unidos fue encontrado el begomovirus monopartita virus del rizo de la hoja amarilla del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) en *Amaranthus retroflexus* (Amaranthaceae) (Smith, Seijo, Vallad, Peres, y Druffel, 2015).

Otros estudios publicados reportan la presencia de begomovirus en arvenses en Costa Rica, en las especies *Brassica* sp. (Brassicaceae), *Phytolacca icosandra* (Phytolaccaceae) y *Solanum quitoense* (Solanaceae) (Solórzano-Morales et al., 2017), por otra parte en Jamaica se han detectado la presencia de begomovirus en arvenses pertenecientes a las especies de *Macroptilium lathyroides* (Leguminosae), *Malvastrum americanum*, *Sida spinosa* y *Wissadula amplissima* (Malvaceae) (Roye, McLaughlin, Nakhla, y Maxwell, 1997).

En México, en el estado de Yucatán la presencia de begomovirus ha sido evidenciada en arvenses tales como *Euphorbia heterophylla* (Euphorbiaceae), *Desmodium glabrum*, *Rhynchosia minima* (Leguminosae), *A. permolle*, *A. cristata*, *Malvastrum coromandelianum*, *S. acuta* (Malvaceae) y en la especie *Boerhavia coccinea* (Nyctaginaceae) (Hernández-Zepeda, Idris, Carnevali, Brown, y Moreno-Valenzuela, 2007). Por otra parte, Hernández-Zepeda et al., (2009) reportaron el virus de la distorsión de la hoja de *Desmodium* (*Desmodium leaf distortion virus*, DeLDV) fue encontrado en la especie botánica *Desmodium glabrum* (Leguminosae); mientras que el virus del mosaico amarillo de *Rhynchosia* aislado Yucatán (*Rhynchosia yellow mosaic Yucatan virus* (RhYMYuV) fue detectado en las arvenses *R. minima* y *Desmodium scorpiurus* (Leguminosae) (Hernández-Zepeda et al., 2010).

1.10 Begomovirus presentes en arvenses de Colombia

El virus BDMV fue identificado en el año 1990 en la arvense *S. spinosa* (familia Malvaceae), recolectada cerca de los cultivos de frijol en el Valle del Cauca (Morales et al., 1990).

Luego en el año 2011 se reportó por primera vez la presencia de begomovirus bipartitas en arvenses asociadas al cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*), recolectadas en el departamento del Valle del Cauca, en las arvenses: *Amaranthus dubius* (Amaranthaceae),

Desmodium sp. (Leguminosae), *Rivina humilis* (Phytolaccaceae), *Laportea aestuans* (Urticaceae) y *Lantana camara* (Verbenaceae), (Vaca-Vaca, Otavo-Fiscal, y López-López, 2011).

Evaluaciones posteriores, dieron a conocer la detección de begomovirus en las arvenses *A. dubius* (Amaranthaceae), *Croton hirtus* (Euphorbiaceae), *Caesalpinia* sp., *Desmodium* sp., *R. minima* (Leguminosae), *R. humilis* (Phytolaccaceae), *L. camara*, *Verbena* sp. (Verbenaceae.), *Hybanthus attenuatus* (Violaceae) y *Plumbago* sp. (Plumbaginaceae) (López-López, Jara-Tejada, y Vaca-Vaca, 2014).

En el año 2018, Vaca-Vaca et al., publicaron el genoma completo del virus del mosaico dorado de *Croton* (*Croton golden mosaic virus*, CroGMV), primer begomovirus bipartita detectado en la especie *C. hirtus* en Colombia y primer reporte a nivel mundial de un begomovirus bipartita infectando a esta especie botánica; en el año 2019 se halló un nuevo begomovirus denominado virus del mosaico dorado de *Rhynchosia* de Colombia (*Rhynchosia golden mosaic Colombia virus*, RhGMCV), aislado de las arvenses *R. minima*, *R. humilis*, *Desmodium* sp., *A. dubius* y *Caesalpinia* sp. (López-López et al., 2019).

Finalmente, en un primer estudio realizado en el Valle del Cauca en plantas acompañantes asociadas al cultivo de ají (*Capsicum* spp.), se evidenció la infección begomoviral en la flora arvense *Parthenium hysterophorus* (Compositae), *Malvastrum* sp., *S. acuta* (Malvaceae), *Acalypha* sp., *Euphorbia hirta* (Euphorbiaceae), *R. minima* (Leguminosae) y *Rivina humilis* (Phytolaccaceae), (Corredor-Saenz, 2019).

1.11 Infecciones mixtas

Las infecciones mixtas del género *Begomovirus* transmitidos por mosca blanca son comunes en la naturaleza, encontrándose en cultivos de importancia agrícola y plantas silvestres, sobre todo en regiones tropicales y subtropicales (Torres, 1996; Saenz et al., 2000) y la interacción entre los patógenos coinfectantes pueden inducir diversos fenómenos potenciadores o atenuadores de la virulencia (Caricagton, 1995; Accotto et al., 2003; Jovel et al., 2004).

Las infecciones conducen a una variedad de interacciones entre los virus, que co-infectan el mismo hospedero, éstas pueden ser severas interaccionado como un sinergismo, donde los síntomas son exacerbados que los causados por una infección simple o un antagonismo en el cual se restringe la infección del segundo virus (Seal et al., 2006), siendo probable que se produzcan mezclas de interacciones sinérgicas y antagónicas, que crean consecuencias biológicas y epidemiológicas generalmente impredecibles. Los mecanismos de algunos de estos aún son desconocidos. (Syller-J 2012).

Estas interacciones sinérgicas pueden desembocar en la aparición de la enfermedad, pero también llevar cambios metabólicos y hormonales responsables, por ejemplo, de una modificación en el patrón de emisión de compuestos volátiles por parte de la planta, haciéndola más atractiva a insectos vectores potenciales (Blanc y Michalakis, 2016).

1.11.1 Efectos de las infecciones mixtas y su papel en la variabilidad genética y la evolución

Las infecciones mixtas favorecen los procesos de recombinación genética, un evento determinante en la evolución de los begomovirus. Al igual que los procesos de competencia y selección podrían generar nuevas variantes de virus atenuadas o de mayor patogenicidad en corto tiempo (Padidam, M., Sawyer, S., y Fauquet, 1999; Da Silva et al., 2011).

Los ensayos de infecciones mixtas se han realizado de manera artificial por Alves et al., en 2009, utilizando los virus *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) y *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) aislados en Brasil afectando tomate, el estudio consistió en inocular en diferentes tiempos plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) con ToRMV y ToYSV evaluando la infección mixta entre ellos, los resultados mostraron que el sinergismo no depende de la replicación viral, puesto que ToRMV obstaculiza la replicación de ToYSV en fases iniciales de la infección, mientras que ToYSV permite la infección sistémica de ToRMV de manera más rápida en tabaco, también se halló ToYSV en células del mesófilo y ToRMV limitado al floema, estos

resultados permitieron concluir ToYSV está mejor adaptado que ToRMV, y esta adaptación fue más evidente en *N. benthamiana* que en tomate.

Diferentes tipos de interacciones se presentan entre los geminivirus, estas pueden acentuar o exacerbarlos los síntomas en sus hospederos naturales; un ejemplo de ello fue demostrado por Mendez-Lozano et al., (2003), al inocular una mezcla tripartita del virus huasteco del amarillamiento de la vena del chile (PHYVV) componentes genómicos DNA-A y DNA-B, junto con el componente geminiviral "A" de PepGMV donde hubo trans-complementación a nivel de movimiento de PepGMV-A, presentando síntomas en las plantas inoculadas, mientras que el componente genómico "B" de PepGMV no fue exitoso en la transcomplementación del componente geminiviral "A" de PHYVV. Rentería et al., (2011), evidenciaron que también el éxito de las interacciones depende del hospedero de los virus; puesto que estos mismos virus inoculados en plantas de ají (*Capsicum annum*), presentaron antagonismo entre ellos, diferente a lo observado en *N. benthamiana* y *N. tabacum* que presentaron sinergismo cuando los virus fueron inoculados al tiempo.

En 2009 Andrade et al., realizaron ensayos con virus aislados de arvenses del género *Sida* spp, plantas acompañantes del cultivo de tomate y el begomovirus *Tomato yellow spot virus* que afecta este cultivo, resultando pseudorecombinantes no viables mostrando así que, aunque exista una alta homología entre sus componentes geminivirales no siempre se van pseudorecombinar.

1.11.2 Infecciones mixtas en arvenses

Mediante las relaciones filogenéticas de los begomovirus aislados en plantas cultivadas y arvenses tal vez se puede explicar la interacción que hubo entre estos begomovirus para la aparición de ellos de forma natural. Por ejemplo, el virus del mosaico de Solanum de Bolivia (SoMBoV) está relacionado filogenéticamente con el virus del mosaico de blistering de soya (SbBMV) (Wyant, Gotthardt, Schäfer, Krenz, y Jeske, 2011).

El virus del mosaico dorado de Sida (SiGMV-Co) de Costa Rica se emparenta con el virus del mosaico del enanismo del frijol (BDMV) de Colombia y el virus del moteado de tomate

(ToMoV) de Cuba (Höfer, Engel, Jeske, y Frischmuth, 1997). Al igual que el virus de la mancha amarilla de *Blainvillea* aislado de *Blainvillea rhomboidea* está estrechamente relacionado con el virus del mosaico dorado del frijol (BGMV) (Castillo-Urquiza et al., 2008).

En las arvenses *Crotalaria juncea*, *Sida* sp., *Euphorbia heterophylla* y *N. physaloides* se han detectado simultáneamente el virus del mosaico dorado de Euphorbia (EuYMV), el virus del mosaico de sida micrantha (SiMMV) y el virus rugoso severo del tomate (ToSRV) (Barreto, 2012).

En la especie *Sida jamaicensis* se encuentra el virus del mosaico dorado de sida de braco (SiGMBcV), el virus del mosaico dorado de sida de liguanea y el virus de las venas amarillas dorado de sida (*Sida golden yellow vein virus isolate*, SiGYVV). (Stewart et al., 2014).

Los virus tienden a estar latentes en las plantas silvestres o cultivares nativos de una zona geográfica dada, cuando se presenta la introducción de una especie cultivada los begomovirus aprenden rápidamente a infectarlos y dependiendo de la naturaleza de la interacción virus-planta-hospedero, podrían evolucionar a tal punto de ser emergencias epidémicas (Nawazul- Rehman y Fauquet, 2009; Calvin et al., 2004).

Lo anterior sugiere que cambios en las condiciones ambientales y pérdida de biodiversidad da lugar a un incremento de las incidencias virales puesto que acelera significativamente su evolución. (Roossinck y García-Arenal, 2015). Se especula que la baja diversidad genética del tomate facilita la presencia de una especie viral preponderante como aparentemente es el caso del PYMV sobre cultivares de tomate en Colombia (Vaca-vaca et al., 2011), el virus del rizado amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) en Pakistán (Czosnek, 2007), sin embargo los estudios de Sobrinho et al., (2014) sobre la variabilidad genética del virus del mosaico dorado del frijol (BGMV) y el virus de la mancha amarilla de macroptillium (MaYSV) sobre *Phaseolus vulgaris*, *P. lunatus* y *Macroptilium lathyroides* han concluido que la variabilidad del hospedero no afecta la variabilidad viral.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Metodología

Este trabajo de investigación fue desarrollado en los Laboratorio de Sanidad y Microbiología Agrícola, en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales y en el Invernadero de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira

2.2 Descripción de begomovirus utilizado en este trabajo

Los begomovirus utilizados en este trabajo son clonas virales obtenidas en trabajos previos realizados por el grupo de investigación IPMA: PYMV-Col componente A y B se obtuvo en el trabajo realizado por Betancur-Pérez, et al., (2012); y el virus del moteado de verbena (VeMV) componente B, el virus del mosaico dorado de *Rhynchosia* de Colombia (RhGMCV) componente A y el virus del mosaico dorado de croton (CohGMV) componente A, fueron aislados de arvenses asociadas al cultivo de tomate en el Suroriente del Valle del Cauca en el trabajo realizado por Jara-Tejada et al., (2016) (Tabla 3).

Clona viral	Fuente del aislado viral	Componente de DNA	Virus	Lugar de colecta	Referencia
AT 19	<i>Verbena sp</i>	B	VeMV	Florida	Manuscrito en preparación
AT 20	<i>Croton hirtus</i>	A	CohGMV	Florida	Vaca-Vaca et al., 2018
AT 35	<i>Rhynchosia mínima</i>	A	RhGMCV	Cerrito	Vaca-Vaca et al., 2019
PYMV*	Tomate	A-B	PYMV - Col	Tulúa	Betancur-Pérez et al., 2012
Mara*	Maracuya	B	PLDV	La Unión	Vaca-Vaca et al., 2016

Tabla 3. Clona virales obtenidas objeto de estudio para realizar combinaciones de componentes geminivirales. * Estas clonas serán utilizadas como controles positivos; la clona de PYMV utilizó como control positivo para este trabajo ya que proviene de plantas inoculas por biobalística.

2.3 Multiplicación de las clonas begomovirales (purificación de DNA plasmídico)

Las clonas begomovirales se encontraban almacenadas en glicerol a -20°C previamente identificadas, estas fueron activadas en LB sólido con ampicilina, de allí se seleccionó una colonia que fue transferida a LB líquido con ampicilina dejado en agitación por 24 horas, transcurrido este tiempo se realizó la extracción del DNA plasmídico, el cual se utilizó el kit de Plasmid Midi Kit (Qiagen ®) para obtener una alta concentración de DNA, siguiendo la metodología propuesta por el proveedor.

La concentración y la pureza del DNA plasmídico obtenido se visualizó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. El marcador de peso molecular usado fue 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas- Thermo Scientific). Las concentraciones de los diferentes componentes genómicos fue mayor de 70 ng (Figura 5).

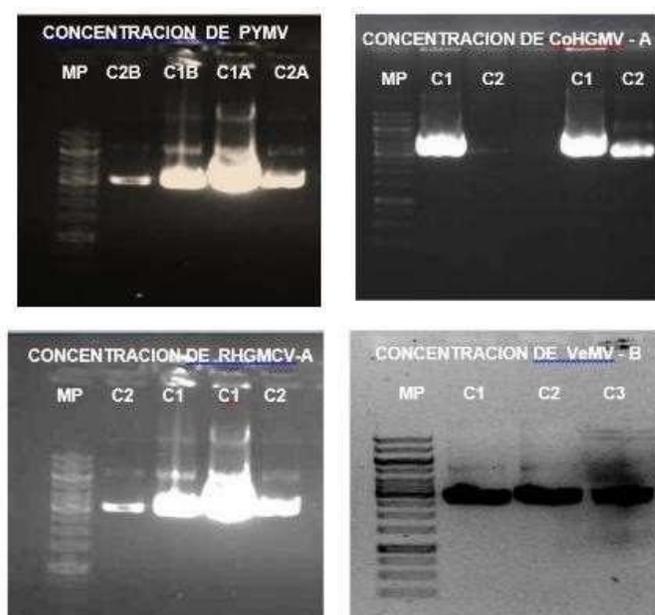


Figura 5. Concentración de DNA por clona, obtenidas después de la multiplicación, C1 corresponde a la concentración de 50 μl y C2 30 μl del producto final recuperado en 100 μl de TE-RNAasa.

2.4 Material vegetal empleado

2.4.1 Obtención de material vegetal de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. *xanthi*) para ensayo realizado *in vitro*

Se germinaron semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. *xanthi*) *in vitro*. Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2%, etanol al 70% y agua destilada estéril, todo este proceso se llevó a cabo en la cabina de flujo laminar, ya que el proceso de germinación se realizó *in vitro* en medio basal MS (Murashige and Skoog, 1962).

Se plantó una semilla por frasco, se llevaron al cuarto de crecimiento con condiciones controladas con un fotoperiodo 16 – 8 h de luz. Este proceso se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

2.4.2 Obtención de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. *Santa Calara*) para ensayo realizado en invernadero

Transcurridos 15 días de germinación y con cuatro hojas verdaderas las plántulas de tomate variedad Santa Clara fueron trasplantadas a materas con capacidad de 1 Kilo que previamente habían sido llenadas con suelo estéril, las plántulas se protegieron en jaulas con malla anti-trips ubicándolas en la casa de malla de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Una vez pasados 7 días de trasplante, se realizó una fertilización con 15-15-15 complejo N-P-K CENAGRO ® de manera líquida, para ello se utilizaron 30 gr de fertilizante en un litro de agua dejando en agitación media por 24 horas, una vez diluido completamente el fertilizante se adiciono a cada planta a 20ml de la solución; esta fue aplicada hacia el plato de planta con el fin de evitar cualquier daño por quema. Esta fertilización se hizo con base a el manejo convencional que se hace en campo en este cultivo, así se evitaba posibles falsos positivos cuando se presentaran los síntomas.

2.5 Diseño experimental

El experimento se realizó en condiciones *in vitro* y de invernadero; se realizó un diseño experimental Completamente al azar (CA), con 8 repeticiones *in vitro* para tabaco y 10 repeticiones en tomate para el ensayo en invernadero. La unidad experimental estará conformada por cada planta y los tratamientos (combinaciones) como se describen a en la tabla 4

Combinaciones	DNA -A	DNA-B	# de plantas inoculadas en tabaco	# de plantas inoculadas en tomate
1	PYMV	VeMV	8	10
2	RhGMCV	PYMV	8	10
3	RhGMCV	VeMV	8	10
4	CohGMV	PYMV	8	10
5	CohGMV	VeMV	8	10
Control positivo	PYMV	PYMV	8	10
Control negativo	-	-	8	5

Tabla 4. Combinaciones de los diferentes componentes virales a evaluar, incluido control positivo; con el número de repeticiones por tratamiento en tabaco y en tomate.

2.5.1 Variables a evaluar

Tanto para el ensayo "*in vitro*" como el ensayo de campo se evaluaron las mismas variables:

- ✓ Capacidad de transreplicación y transcomplementación entre componentes virales.
- ✓ Presencia de síntomas virales.
- ✓

La capacidad de transcomplementación y transreplicación se detectó mediante PCR, de los componentes A y B, de la parte apical y la parte bajera de cada planta inoculada transcurridos 20 y 45 días post inoculación (Figura 6).

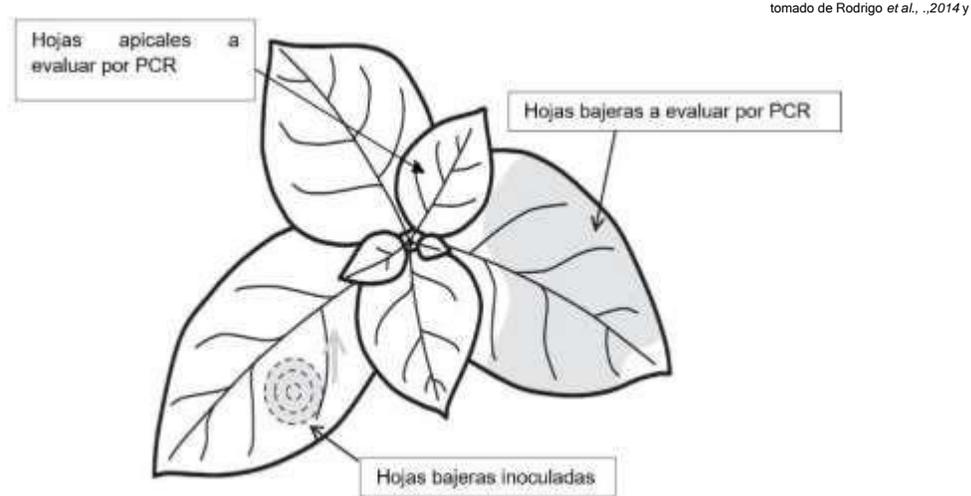


Figura 6. Hojas bajas que fueron inoculadas con los diferentes componentes virales a evaluar y las hojas apicales que serán evaluadas a fin de corroborar mediante PCR, la capacidad de transcomplementación y transreplicación de los componentes virales.

2.6 Inoculación por biobalística de baja presión de begomovirus

La inoculación de geminivirus se puede llevar a cabo de manera biológica ó mecánica, siendo la técnica de inoculación por biobalística el método mecánico de mejores resultados; ya que al utilizar esta técnica se puede garantizar la utilización de los virus de interés, es decir uno adosa a las partículas metálicas el componente A y B que del cual ya se obtuvo sugenoma y va a ser utilizado como modelo para estudiar el evento de infección en una plantaparticular. Este método se basa es acelerar las partículas las cuales son impulsadas a presión a manera de disparo permitiendo ingresar a tejido vegetal (hoja) no causando lesiones considerables en esta y permitiendo tener un mayor éxito en la penetración de las mismas, ya que por su tamaño es más fácil alcanzar las células del mesófilo.

En este trabajo se utilizó la técnica de biobalística de baja presión empleando la pistola manual Helios Gene Gun System (Biorad®) siguiendo el protocolo estandarizado en el grupo IPMA para inocular virus en plantas de tomate y tabaco (López-López. *et al.*, 2013).

2.6.1 Preparación de *microcarriers* de tungsteno con el DNA begomoviral

Microcarriers de tungsteno de 1.1 μm de diámetro fueron cubiertas de DNA viral (DNA A + DNA B de acuerdo al diseño experimental, ver tabla 4), siguiendo el protocolo reportado por el fabricante Biorad®. Aproximadamente se adicionó 2 μg de DNA viral por cartucho a preparar.

2.6.2 Preparación de cartuchos

Todo el procedimiento se realizó en la estación de preparación de cartuchos de Biorad® siguiendo el protocolo reportado por el fabricante. Este equipo se utiliza para recubrir la pared interna del tubo tefzel plástico con los microcarriers de tungsteno previamente preparados. Los cartuchos obtenidos se almacenaron a 4°C hasta el día del ensayo de inoculación por biobalística de las plantas de tomate y tabaco.

2.6.3 Inoculación de las diferentes combinaciones realizadas con los componentes virales A y B en plantas de tabaco germinadas *In vitro*

Transcurridos 60 días posteriores a la germinación *in vitro* de las semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. *xanthi*) se eligieron aquellas plantas que tenían 4 hojas verdaderas, que tuviesen mayor vigor, y la coloración de las hojas iguales. Se procedió a realizar la inoculación de las combinaciones virales (tabla 4) en la cabina de flujo laminar realizando dos disparos por planta a una presión de 220 psi (López-López et al., 2013). Posterior a la inoculación las plantas fueron regresadas al cuarto de crecimiento y se procedió a observar el desarrollo de síntomas hasta 45 dpi (días post inoculación). Acaecidos 20 dpi se realizó un muestreo al azar a 4 de plantas de tabaco inoculadas donde se cosecharon las hojas apicales (hojas nuevas) y hojas bajas. Como fue un ensayo destructivo transcurridos 45 dpi se cosecharon las 4 plantas restantes para su evaluación.

2.6.4 Inoculación de las diferentes combinaciones realizadas con los componentes virales A y B en plantas de tomate germinadas en casa de mallas

Para la inoculación de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Santa Clara) se tuvo en cuenta que estas presentaran desarrollo uniforme en color tamaño, aspecto fisiológico es decir que todas tuviesen de 5 a 6 hojas verdaderas para la inoculación de las combinaciones virales. Se realizó un bouquet con todas las hojas de la planta para asegurar que al realizar el disparo las partículas virales tengan mayor área de contacto con tejido vegetal (Figura 7). Se emplearon las condiciones de inoculación para tomate reportadas por López-López *et al.*, (2013). Posterior a la inoculación las plantas fueron regresadas al invernadero y se procedió a observar el desarrollo de síntomas hasta 45 dpi (días post inoculación). Se llevaron a cabo seguimientos visuales semanales para monitorear la aparición y desarrollo de síntomas con el fin de determinar la incidencia y severidad de los síntomas presentados. Acaecidos 20 dpi se realizó un muestreo al azar de 5 plantas de tomate inoculadas donde se cosecharon las hojas apicales (hojas nuevas) y hojas bajas. Como fue un ensayo destructivo transcurridos 45 dpi se cosecharon las 5 plantas restantes para su evaluación.



Figura 7. Inoculación con la pistola manual Helios Gene Gun System (BioRad, Hércules, CA, USA) a plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Santa Clara).

2.7 Evaluación de síntomas virales

La incidencia de síntomas fue medida como el porcentaje de plantas infectadas basado en los síntomas; la severidad de síntomas se midió usando una escala tomada de Jawdah et al., (1999). La escala de síntomas será:

- 1: no se observan síntomas
- 2: aparición de mosaicos abultamientos en las hojas
- 3: aparición de amarillamiento en las hojas, hojas deformada y más pequeñas que las normales.

2.8 Detección por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de componentes geminivirales inoculados en plantas de tomate y tabaco

La capacidad de transcomplementación y transreplicación se detectó mediante PCR, de los componentes A y B, de la parte apical y la parte bajera de cada planta inoculada transcurridos 20 y 45 días post inoculación (Figura 6). Es de aclarar que este ensayo fue destructivo y que el día de evaluación de la capacidad de transreplicación y transcomplementación entre componentes virales, se tomó la mitad al azar de cada repetición de cada tratamiento, ya que para hacer la detección de estos se requería cosechar las plantas y evaluar la parte apical y la parte bajera de cada planta.

Luego de ser cosechadas las plantas de tabaco y tomate, se maceraron en nitrógeno líquido las hojas apicales y aparte las hojas bajas de cada unidad experimental (cada planta), se preservó el polvillo en tubos eppendorf de 1.5 ml rotulándose y almacenándose a -20°C. Una vez procesadas las muestras se realizó la extracción del DNA genómico total se utilizó la estrategia por el grupo IPMA en el año 2015 que empleo algunas modificaciones del método propuesto por Dellaporta y colaboradores en 1983. Para determinar la calidad y cantidad del DNA purificado se llevó a cabo una estrategia en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

Se emplearon juegos de cebadores o iniciadores MP-82 y MP-16 (Umaharan, *et al.*, 1998), para específicamente llevar por PCR a cabo la detección de los componentes geminivirales A, el producto de esta amplificación con estos cebadores nos permitió obtener un fragmento entre 400 a 500 pb aproximadamente que abarca a su vez un fragmento el gen de la proteína de la cápside.

Iniciadores o cebadores universales fueron utilizados para llevar a cabo estrategias de PCR en plantas de tomate y tabaco, incluidas y las no inoculadas (control negativo). La detección de begomovirus con iniciadores universales se realizó en todas las plantas de tomate y tabaco, incluidas y las no inoculadas (control negativo), con el fin de hacer la posible detección de los begomovirus allí presentes

Fueron diseñados y sintetizados un par de primers AT19B-R (5'-CTT-CTC-CGC-TTC-CTT-CTT-3') / AT19B-F (5'-CGA-TTC-TCC-AGG-CCT-TAT-T-3'), específicos para la detección del DNA componente B del virus moteado de verbena (VeMV), los cuales amplifican un fragmento de 320pb. Estos primers se diseñaron utilizando el software CLC Main Workbench v7 (Qiagen^(R)) utilizando la secuencia del genoma completo del virus.

2.9 Análisis bioinformático de la región promotora de genes begomovirales

Se obtuvo la secuencia de nucleótidos de los genomas begomovirales utilizados en este trabajo de la base de datos GenBank: *Potato yellow mosaic virus* isolate Tulua/Valle del Cauca/2008 -PYMV-Col componente A (JQ045705.1) y B (JQ045706.1), *Rhynchosia golden mosaic Colombia virus* isolate AT35A -RhGMCV componente A (KX216480.1) y *Croton golden mosaic virus* isolate Florida/Valle/2014 -CohGMV componente A (KX156613.1) y *Verbena mottle virus* isolate Florida/Valle/2014 -VeMV componente B (KX156612.1). Estas secuencias fueron editadas en el programa Bioedit (Hall, 1999), donde se extrajo la secuencia de nucleótidos correspondiente a la región intergenica que incluye los promotores de los genes Rep y Cp, así como el elemento nonanucleótido conservado para los componentes A.

Para los componentes B se extrajo la secuencia de nucleótidos de la región promotora de los genes MP y NSP, incluido el elemento nonanucleótido conservado. Para identificar posibles elementos cis-regulatorios presentes en las secuencias de nucleótidos de los promotores de los begomovirus analizados, se realizó un análisis bioinformático para identificar los siguientes elementos: caja TATA, iteron, y elementos tardíos conservados (CLE) empleando el software CLC Main Workbench v7 (Qiagen^(R)) utilizando las secuencias previamente reportadas.

3 Resultados

3.1 Evaluación de trans complementación de componentes genómicos (DNA-A / DNA-B) de PYMV y begomovirus aislados de arvenses RhGMCV, CohGMV y VeMV inoculados por biobalística en plantas de tomate.

3.1.1 Evaluación de transcomplementación de componentes genómicos de PYMV y arvenses: PYMV-A y VeMV-B; CohGMV-A y PYMVA-B; CohGMV-A y VeMV-B inoculados por biobalística en plantas de tomate.

Para evaluar los eventos de transcomplementación, se realizaron PCR_s para detectar la presencia del componente A de los diferentes virus inoculados en las hojas nuevas (apicales) de plantas de tomate. Como se observa en la figura 8, a los 21 días post inoculación (dpi), se detectó la presencia de los componentes A de los virus inoculados en las combinaciones realizadas en las hojas nuevas (apicales) (Figura 8A); y a los 45 dpi (Figura 8C). Este resultado muestra que los virus inoculados, CohGMV-A y PYMV-A se movieron de las hojas bajas (inoculadas a los 0 dpi) a las hojas nuevas (apicales). Adicionalmente, se evaluó la presencia del componente B de VeMV y PYMV, encontrándose en todas las plantas evaluadas y confirmando este resultado (Figura 10 y 11).

En la figura 8A, se observa que transcurridos 21 dpi, la combinación PYMV AyB, presenta 4 positivos es decir en cuatro plantas de las cinco plantas inoculadas, el virus fue movido a las hojas superiores de la planta, y en la mayoría la concentración del título viral es alto, esto muestra que PYMV está bien adaptado a su hospedero natural en este caso tomate; en la figura 8B esta combinación es positiva en las cinco plantas inoculadas pero la quinta planta la concentración es poca, ello podría ser la explicación al porque en la parte apical de la planta no se evidenció el virus. Comparado con la combinación PYMV- A y VeMV-

A. Se inocularon los genomas A y B de manera independiente de cada begomovirus evaluado, mediante la técnica de biobalística de baja presión en plantas de tomate. Se tomaron hojas nuevas (apicales) y hojas inoculadas (bajeras) de tomate en dos tiempos, 21 días post inoculación (dpi) y 45 dpi, para evaluar la presencia del begomovirus inoculado mediante la técnica de PCR (ver Figura 7). **A, B.** Detección por PCR de un fragmento de 0,4 kb del genoma A inoculado en hojas apicales (A) y hojas bajeras (B) de tomate colectadas a los 21 dpi, que fueron inoculadas con las combinaciones: PYMV-A y B, PYMV-A y VeMV-B, CohGMV-A y VeMV-B, y CohGMV-A y PYMV-B. **M,** marcador de peso molecular Gene Ruler™ de 1Kb DNA Lader (Fermentas); **C-**, control negativo de PCR; **C+**, control positivo de PCR usando DNA plasmidico de PYMV-A; **Pt-**, plantas de tomate sin inocular; 1, 2, 3, 4, 5, plantas de tomate no inoculadas e inoculadas con las combinaciones arriba mencionadas. **C.** Detección por PCR de un fragmento de 0,4 kb del genoma A inoculado en hojas apicales (A) de tomate colectadas a los 45 dpi, que fueron inoculadas con las combinaciones: PYMV-A y B, PYMV-A y VeMV-B, CohGMV-A y VeMV-B, y CohGMV-A y PYMV-B. **M,** marcador de peso molecular Gene Ruler™ de 1Kb DNA Lader (Fermentas); **C-**, control negativo de PCR; **C+**, control positivo de PCR usando DNA plasmidico de PYMV-A; 6, 7, 8, 9, 10, plantas de tomate inoculadas con las combinaciones arriba mencionadas. El asterisco indica el tamaño esperado de amplificación de un fragmento de 0,4 kb.

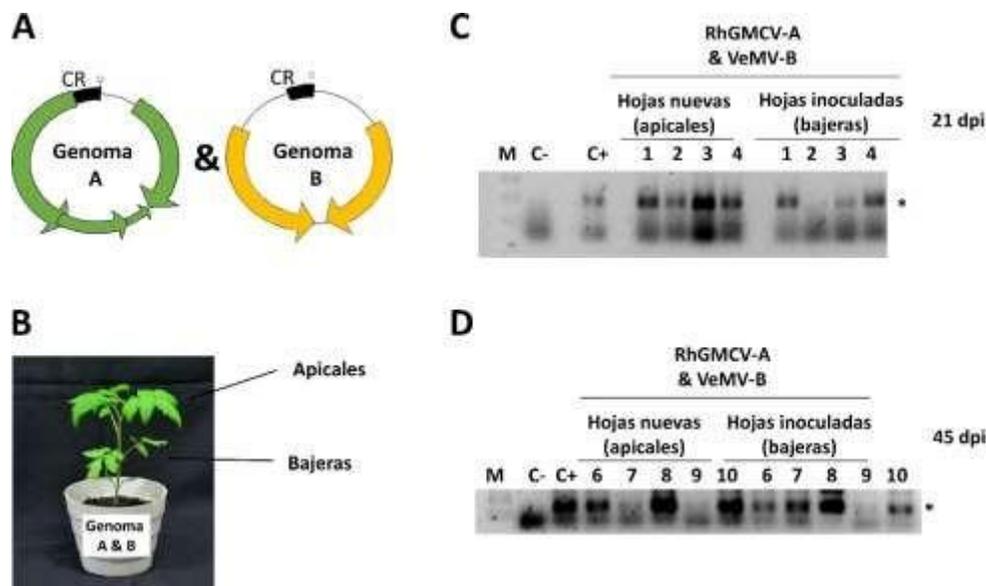
En la evaluación realizada a los 45dpi (Figura 8C), en la combinación CohGMV-A y VeMV-B se halló la presencia del virus en cuatro de cinco plantas inoculadas, la intensidad de las bandas fue más clara que las observadas en las plantas colectadas a los 21dpi, posiblemente se deba a factores de silenciamiento de la planta y factores ambientales que limitan la replicación del virus (Fu *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos en la combinación CohGMV-A y PYMV-B, es similar a los resultados obtenidos 21dpi, donde se evidencia la presencia del virus, en estas cinco plantas el virus fue detectado en cuatro con un poco de mayor intensidad. En la combinación PYMV-A y B solo se pudo evaluar en tres plantas porque las otras fueron contaminadas, en estas tres plantas se halló poca concentración del virus posiblemente por los factores de estrés ambiental que fueron sometidas estas plantas, es conocido que las altas temperaturas pueden tener efectos sobre el proceso infectivo del virus, disminuyendo en la replicación en las células, así como también pueden tener un efecto en la reducción de síntomas o no presentarlo a lo cual se le conoce como “enmascaramiento por calor” (Johnson, 1922; Hull, 2002). La combinación PYMV-A y VeMV-B, se detectó el virus en cuatro de las cinco plantas inoculadas.

Con el resultado obtenido mediante las PCR realizadas se corrobora que hubo transcomplementación de los diferentes componentes genómicos co-inoculados por biobalística en las hojas de las plantas de tomate tanto bajas como apicales.

3.1.2 Evaluación de transcomplementación de componentes genómicos de RhGMCV-A y VeMV-B inoculados por biobalística en plantas de tomate.

Para evaluar los eventos de transcomplementación, se realizó un PCR para detectar la presencia del componente A inoculado en las hojas nuevas (apicales) de plantas de tomate. Como se observa en la figura 9C, a los 21 días post inoculación (dpi), se detectó la presencia de RhGMCV-A en las hojas nuevas (apicales) en cuatro de cinco plantas inoculadas; y a los 45 dpi, se detectó en cuatro de cinco plantas (Figura 9D). Este resultado muestra que el virus inoculado, RhGMCV-A, se movió de las hojas bajas (inoculadas a los 0 dpi) a las hojas nuevas (apicales). Adicionalmente, se evaluó la presencia del componente B de VeMV, encontrándose en todas las plantas evaluadas (Figura 10 y 11).

Figura 9. Evaluación de trans complementación de componentes genómicos (DNA-A / DNA-B) de begomovirus aislados de arvenses en plantas de tomate, RhGMCV-A y VeMV-B. **A.** Se inocularon los genomas A y B de manera independiente de cada begomovirus evaluado, mediante la técnica de biobalística de baja presión en plantas de tomate. **B.** Se tomaron hojas nuevas apicales y hojas bajas de tomate en dos tiempos, 21 dpi y 45 dpi, para evaluar la presencia del begomovirus inoculados mediante la técnica de PCR. **C.** Detección por PCR de un fragmento de 0.4kb del genoma A inoculado, combinación RhGMCV-A y VeMV-B, en hojas apicales y bajas de tomate colectadas a los 21 dpi. M, marcador de peso molecular Gene Ruler TM de 1Kb DNA Lader (Fermentas); C-, control negativo de PCR; C+, control positivo de PCR usando DNA plasmidico de PYMV-A; 1, 2, 3, 4, 5, plantas de tomate inoculadas con la combinación RhGMCV-A y VeMV-B. **D.** Detección por PCR de un fragmento de 0.4kb del genoma A inoculado, combinación RhGMCV-A y VeMV-B, en hojas apicales y bajas de tomate colectadas a los 45 dpi. M, marcador de peso molecular Gene RulerTM de 1Kb DNA Lader (Fermentas); C-, control negativo de PCR; C+, control positivo de PCR usando DNA plasmidico de PYMV-A; 6, 7, 8, 9, 10, plantas de tomate inoculadas con la combinación RhGMCV-A y VeMV-B. El asterisco indica el tamaño esperado de amplificación de un fragmento de 0.4kb.



La combinación del virus RhGMCV-A y VeMV-B, mostró tanto en las hojas apicales como en las hojas bajas la presencia del virus detectado mediante PCR a los 21dpi, en este muestreo se dañó una planta por ello solo fueron evaluadas 4 plantas, las bandas de las hojas apicales son más intensas que las de las hojas bajas evidenciando el movimiento del virus a hojas jóvenes. La evaluación realizada a los 45 días se detecta la presencia del virus en 4 de 5 plantas evaluadas la planta 9 presenta una detección más leve que el resto de plantas evaluadas, esto evidencia nuevamente que el componente geminiviral de VeMV-B, fue capaz de transcomplementar el componente A de RhGMCV, para que este alcanzara nuevos tejidos de la planta.

3.1.3 Detección del componente genómicos B de PYMV y de VeMV inoculados por biobalística en plantas de tomate.

Para evaluar los eventos de transcomplementación, se realizó un PCR para detectar la presencia del componente B inoculado en las hojas nuevas (apicales) de plantas de tomate. Como se observa en la figura 10, a los 21 días post inoculación (dpi), no es posible detectar con los primers universales para el componente B de begomovirus al DNA-B inoculado (Figura 10). Únicamente, fue posible detectar con estos primers el componente B de PYMV, el cual amplifico un fragmento de 0,6 kb (Figura 10A).

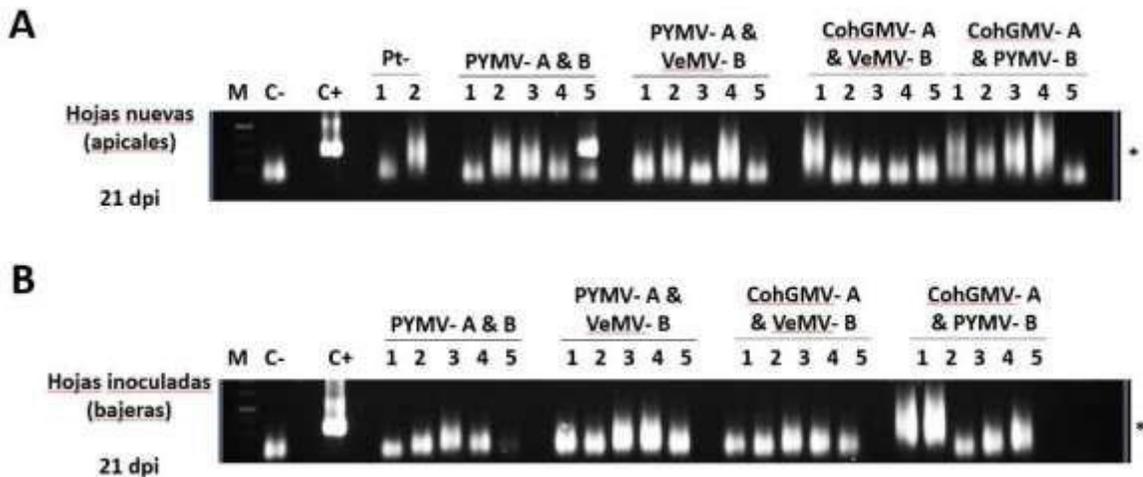


Figura 10. Detección del componente genómico B, en hojas apicales y bajas de plantas de tomate con 21 días de inoculación utilizando como cebador los fabricados por Rojas, et al., 1993

A. Detección por PCR de un fragmento de 0.6kb del genoma B de PYMV, inoculado en las combinaciones (PYMV-AyB), (PYMV-A y VeMV-B); (CohGMV-A y VeMV-B); (CohGMV-A y PYMV-B), en hojas apicales de tomate colectadas a los 21 dpi. M, marcador de peso molecular Gene Ruler TM de 1Kb DNA Lader (Fermentas); C-, control negativo de PCR; C+, control positivo de PCR usando DNA plasmidico de PYMV-B; 1, 2, 3, 4, 5, plantas de tomate inoculadas con la combinación PYMV-AyB. vacío 1, 2, 3, 4, 5, plantas de tomate inoculadas con la combinación PYMV-A y VeMV-B; vacío 1, 2, 3, 4, 5, plantas de tomate inoculadas con la combinación CohGMV-A y VeMV-B; 1, 2, 3, 4, 5, plantas de tomate inoculadas con la combinación CohGMV-A y PYMV-B **B.** Detección por PCR de un fragmento de 0,6 kb del genoma B inoculado en las hojas bajas de las combinaciones descritas anteriormente transcurridos 21dpi, el orden es el mismo descrito en la parte **A.**

En esta evaluación del componente “B” de PYMV fue detectado solo en la combinación de PYMV A&B, en la planta 5 de las hojas apicales a los 21 dpi.

Por lo anterior, se diseñaron primers específicos para detectar el componente B de VeMV. En la figura 11 se observan que en todas las combinaciones realizadas amplificó el fragmento esperado de 320 pb de VeMV-B, con mayor intensidad en la combinación de PYMV-A y VeMV-B, tanto en hojas apicales como bajas, mientras que RhGMCV-A y CohGMV-A, presenta menor intensidad en las bandas de las hojas apicales, mientras en las hojas bajas la combinación de CohGMV-A y VeMV-B, presenta mayor intensidad en las bandas obtenidas

3.2 Evaluación de síntomas en plantas de tomate que fueron inoculados por biobalística con diferentes combinaciones de componentes genómicos (DNA-A / DNA-B) de PYMV y begomovirus aislados de arvenses RhGMCV -A, CohGMV-A y VeMV-B.

Una vez transcurridos los 21dpi se evaluaron las 10 plantas inoculadas por cada combinación realizada, la combinación entre de PYMV-A y B presentó síntomas de abultamientos y hojas con menor desarrollo de lo normal en las hojas apicales, así como las combinaciones realizadas entre CohGMV-A y PYMV-B y VeMV-B, mostraron solo abultamientos en las hojas apicales más prominentes y la combinación de PYMV-A y VeMV-B, también presentó abultamientos; la segunda evaluación se realizó cuando las plantas tenían 45 dpi, y los síntomas en las combinaciones se mantuvieron en las cinco plantas restantes y otras plantas como en la combinación realizada entre PYMV-A y VeMV-B, las plantas ya no presentaban abultamientos lo que se conoce como fenotipo de recuperación (Tabla 5).

Combinación	Síntomas	% de plantas con síntomas transcurridos 21 dpi	% de plantas con síntomas transcurridos 45 dpi
PYMV-A y B (Control positivo)	Abultamientos	10 (1/10)*	20 (2/5)
RhGMCV-A y VeMV-B	Ninguno	20 (2/10)	90 (4/5)
RhGMCV-A y PYMV-B	Ninguno	30 (3/10)	0/5
CohGMV -A y PYMV-B	Abultamiento	0/10	0
CohGMV-A y VeMV-B	Abultamiento	10 (1/10*)	90/5(4/5)
PYMV-A y VeMV -B	Abultamiento	10(1/10*)	20(2/5)*
Mock control negativo	Ninguno	0/5	0/5

Tabla 5. Porcentaje de síntomas presentes en plantas de tomate en dos tiempos de evaluación. Los asteriscos fueron aquellas combinaciones donde se presentaron fenotipos de recuperación en las plantas.

Entre los síntomas observados en tomate se encuentran abultamientos de las hojas, deformaciones en algunas de estas y amarillamientos síntomas característicos de infecciones causadas por geminivirus figura 12B combinación PYMV A-y B. Las combinaciones CohGMV-A y VeMV-B, PYMV-B, figura 12C y D respectivamente presentaron síntomas fuertes de abultamientos en las hojas apicales durante las dos evaluaciones 21 dpi y 45 dpi. esto indica que sus componentes geminivirales A y B son homólogos y que podrían llegar a causar síntomas más severos dado el caso que llegasen a encontrarse en una planta susceptible. VeMV- B y PYMV-A, figura 12E se presentaron síntomas a los 21 dpi y a los 45 dpi las plantas ya no presentaban síntomas, al momento de evaluar el movimiento del virus a hojas apicales ver figuras 12 F-G se evidencio que en no todas las plantas inoculas había presencia de virus inoculado componente A, mientras que el componente B de VeMV se halló en todas las plantas muestreadas (figura 11).

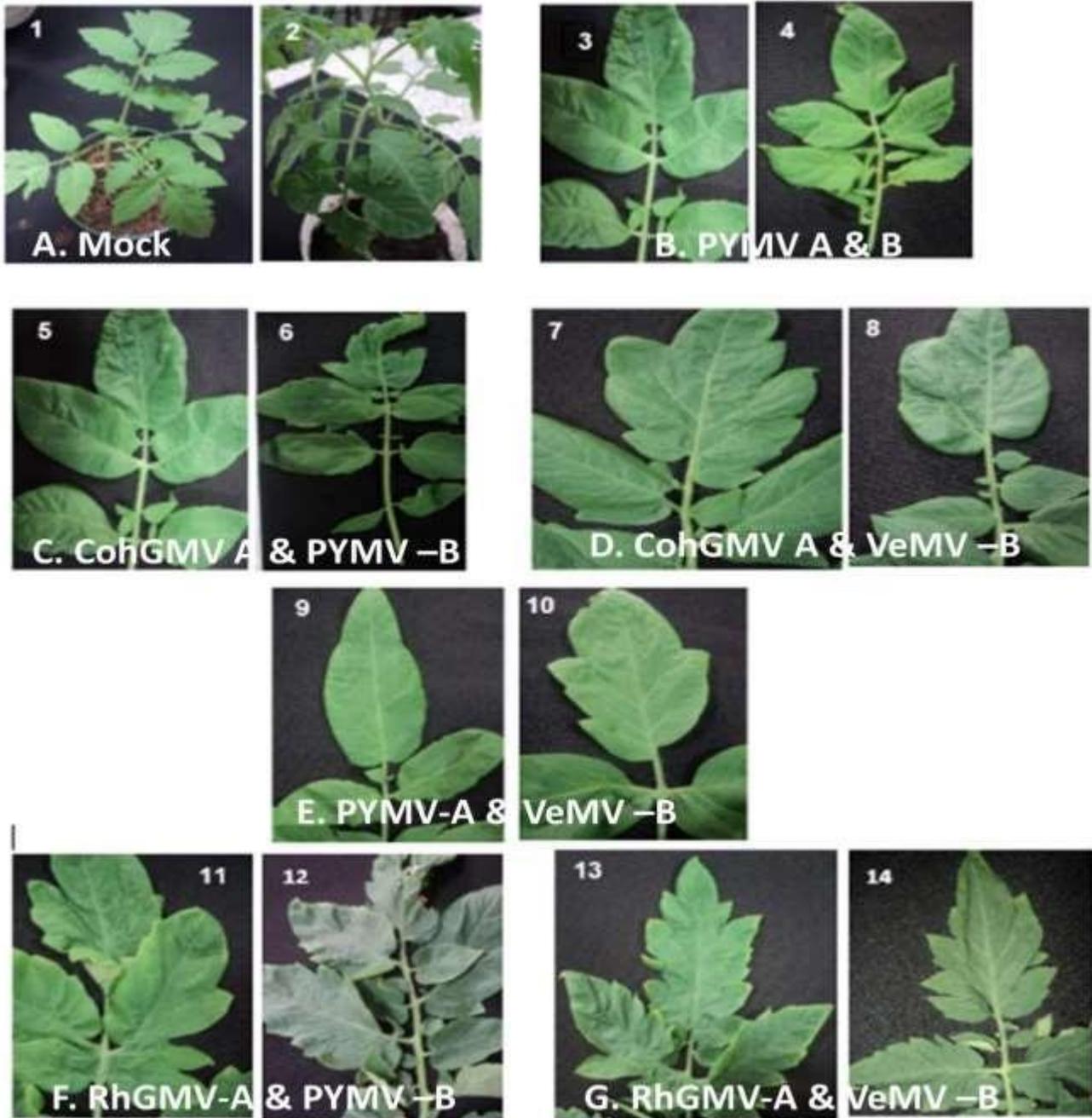


Figura 12. Hojas apicales colectadas de plantas de tomate inoculadas mediante la técnica de biobalística de baja presión con componentes genómicos (DNA-A / DNA-B) de PYMV y begomovirus aislados de arvenses en plantas de tomate, RhGMCV- A, CohGMV-A y VeMV-B después de 45 dpi.

3.3 Evaluación de trans complementación de componentes genómicos (DNA-A / DNA-B) de PYMV y begomovirus aislados de arvenses RhGMCV, CohGMV y VeMV inoculados por biobalística en plantas de tabaco.

Las combinaciones de PYMV-A y B; RhGMCV-A y PYMV-B; CohGMV-A y PYMV-B; CohGMV-A y VeMV-B y PYMV-A y VeMV-B, inoculadas en plantas de tabaco var. *Xanthi* mediante la técnica de biobalística fueron evaluadas transcurridos 21 y 45 dpi; en estas combinaciones no se detectaron los virus inoculados en los geles visualizados después de haber realizado PCR (datos no mostrados).

3.3.1 Evaluación de transcomplementación de componentes genómicos de RhGMCV-A y VeMV-B inoculados por biobalística en plantas de tabaco.

Para evaluar los eventos de transcomplementación, se realizó un PCR para detectar la presencia del componente A inoculado en las hojas nuevas (apicales) de plantas de tabaco. Como se observa en la figura 13, a los 21 días post inoculación (dpi), se detectó la presencia de RhGMCV-A en las hojas nuevas (apicales) en cuatro de cuatro plantas inoculadas; de igual manera se realizó un experimento de inocular solo RhGMCV-A en cinco plantas y tres de ellas se realizó PCR para la detección del virus. Se evidencio en el resultado que el virus inoculado de RhGMCV-A, se movió de las hojas bajas (inoculadas a los 0 dpi) a las hojas nuevas (apicales), tanto en la combinación realizada con VeMV-B, como en las plantas que solo tenían el componente A de RhGMCV-A, aunque la intensidad de las bandas obtenidas no es tan fuerte indica que posiblemente este virus se encuentre en proceso de adaptación a este nuevo hospedero (Figura 13C).

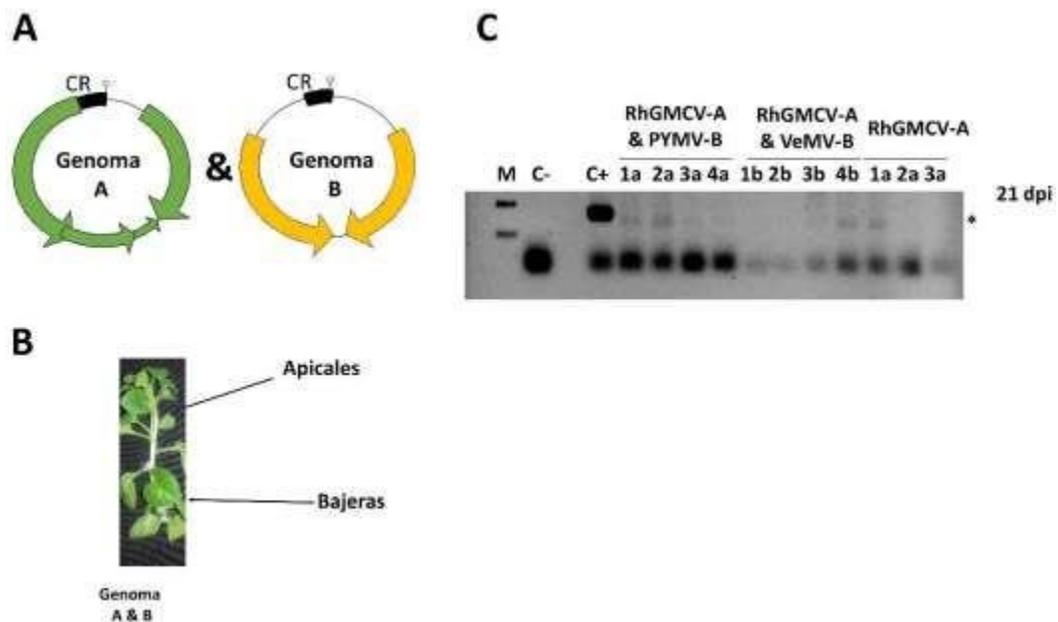


Figura 13. Evaluación de trans complementación de componentes genómicos (DNA-A / DNA-B) de begomovirus aislados de arvenses en plantas de tabaco, RhGMCV-A y VeMV-B. **A.** Se inocularon los genomas A y B de manera independiente de cada begomovirus evaluado, mediante la técnica de biobalística de baja presión en plantas de tabaco. **B.** Se tomaron hojas nuevas apicales y hojas bajas de tabaco transcurridos 21 dpi, para evaluar la presencia del begomovirus inoculados mediante la técnica de PCR. **C.** Detección por PCR de un fragmento de 0,4 kb del genoma A inoculado, combinación RhGMCV-A y VeMV-B, en hojas apicales y bajas de tabaco colectadas a los 21 dpi. M, marcador de peso molecular Gene Ruler TM de 1Kb DNA Lader (Fermentas); C-, control negativo de PCR; C+, control positivo de PCR usando DNA plasmidico de PYMV-A; 1a, 2a, 3a, 4a, hojas apicales 1b, 2b, 3b, 4b, hojas bajas de plantas de tabaco inoculadas con la combinación RhGMCV-A y VeMV-B. 1a, 2a, 3a, hojas apicales de tabaco inoculadas únicamente con el RhGMCV -A. El asterisco indica el tamaño esperado de amplificación de un fragmento de 0,4 kb.

Esta fue la única combinación donde se evidencio que hubo trasncomplementación de los componentes geminivirales evaluados a los 21 dpi.

3.3.2 Evaluación de síntomas en plantas de tabaco que fueron inoculados por biobalística con diferentes combinaciones de componentes genómicos (DNA-A / DNA-B) de PYMV y begomovirus aislados de arvenses RhGMCV -A, CohGMV-A y VeMV-B.

Una vez transcurridos los 21dpi se evaluaron las 8 plantas inoculadas por cada combinación realizada, la combinación entre de PYMV-A y B no presentaron síntomas posiblemente porque este virus no se encuentra adaptado a esta variedad de tabaco, así como en las combinaciones de RhGMCV-A y VeMV-B, y PYMV-B, CohGMV -A y PYMV-B y VeMV-B, como PYMV-A y VeMV -B no hubo presencia de síntomas. En la segunda evaluación transcurridos 45 dpi las combinaciones de CohGMV -A y PYMV-B y VeMV -B , y PYMV-A y VeMV -B, presentaron amarillamientos, posiblemente asociados a factores de luminosidad dentro del cuarto de crecimiento, ya que como se mencionó anteriormente no se detectó la presencia de virus en tabaco en estas combinaciones virales. Las combinaciones de PYMV-A y B, RhGMCV-A y VeMV-B, y PYMV-B no presentaron síntomas (Tabla 6) (Figura 14).

Combinación	Síntomas	% de plantas con síntomas transcurridos 21 dpi	% de plantas con síntomas transcurridos 45 dpi
PYMV-A y B (Control positivo)	Ninguno	0/8	0/8
RhGMCV-A y VeMV-B	Ninguno	0/8	0/8
RhGMCV-A y PYMV-B	Ninguno	0/8	0/8
CohGMV -A y PYMV-B	Amarillamiento*	0/8	4/8
CohGMV-A y VeMV-B	Amarillamiento*	0/8	4/8
VeMV-B y PYMV -A	Amarillamiento*	0/8	3/8

Tabla 6. Porcentaje de síntomas presentes en plantas de tabaco en dos tiempos de evaluación.

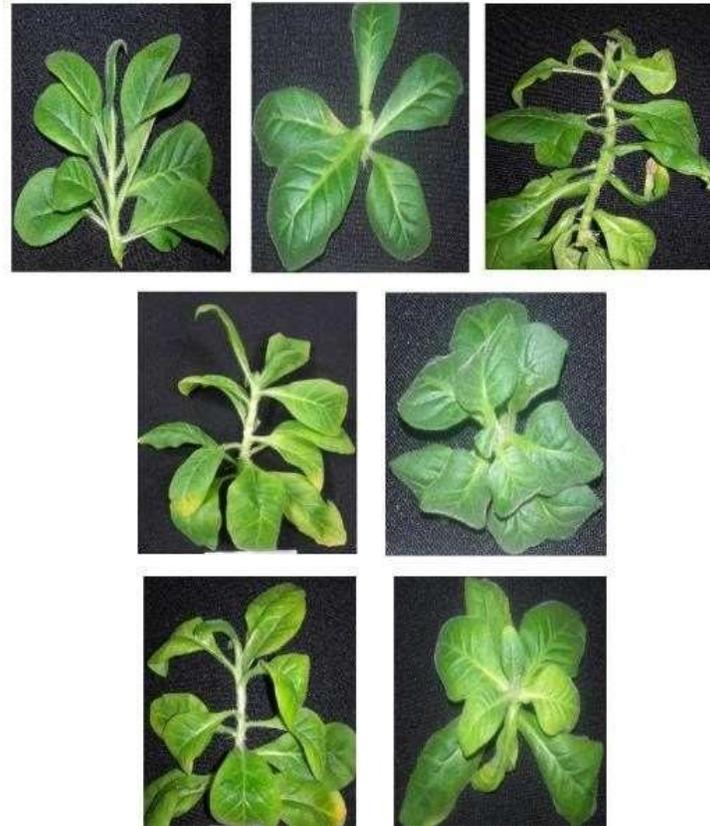


Figura 14. Plantas de tabaco inoculadas con diferentes combinaciones de componentes genómicos (DNA-A / DNA-B) de begomovirus transcurridos 45dpi. **1.** Control -, **2.** Control + (PYMV-AyB), **3.** PYMV- A y VeMV- B, **4.** RhGMCV- A y PYMV- B, **5.** RhGMCV- A y VeMV- B, **6.** CohGMV- A y VeMV B, **7.** CohGMV- A y PYMV- B.

3.4. Análisis bioinformático de elementos *cis* regulatorios implicados en la transcomplementación de componentes genómicos (DNA-A / DNA-B) de PYMV y begomovirus aislados de arvenses RhGMCV, CohGMV y VeMV

En la Figura 15 se observa el análisis bioinformático realizado a la región promotora de los genes AC1 (Rep) y AV1 (Cp) del componente A, y BC1 (MP) y BV1 (NSP) del componente B de los begomovirus utilizados en este trabajo de investigación



Figura 15. Representación esquemática de la Región intergénica de los componentes genómicos (DNA-A / DNA-B) de PYMV y begomovirus aislados de arvenses en plantas de tomate, RhGMCV-A, CohGMV-A y VeMV-B.

A continuación, se realiza una descripción de cada uno de los elementos *cis* regulatorios identificados en cada componente viral:

RhGMCV-A:

El componente genómico de RhGMCV-A posee dos elementos conservados tardíos (CLEs): el primero de ellos de secuencia directa GTGGICCC abarca las posiciones 32 a 39 del genoma, ubicado 124 nt arriba del codón de inicio de CP; el segundo de ellos de secuencia directa GTGGGGCCT se encuentra en las posiciones 116 a 123 del genoma viral a 47 nt del codón de inicio de CP. Los CLEs se han definido como elementos cis regulatorios implicados en los procesos de transactivación de CP y NSP (Argüello-Astorga *et al.*, 1994; Velten *et al.*, 2005). Por ello se considera que las secuencias octaméricas GTGGGCCC, TGGTCCAC y GTGGTCCC, sean posiblemente los blancos funcionales de TrAP para mediar los procesos de transactivación y transcomplementación.

También se identificaron seis iterones organizados de la siguiente manera: tres de secuencias TGGAGTCC se situaron de manera directa, antes del arreglo tallo asa y tercero después de este arreglo; los otros tres iterones invertidos presentaron la secuencia GGACTCCA orientados hacia Rep. Esta distribución de iterones corresponde con el clado del *Virus del encrespamiento de la hoja del squash* SqLCV el cual posee dicha distribución, este virus es predominante en la zona del Caribe y Centroamérica (Argüello-Astorga *et al.*, 1994).

VeMv-B:

Por su parte en el componente genómico B de VeMV, se identificó un CLE, localizado 355 nt río arriba del codón de inicio de BV1 (NSP) en las posiciones 61 a 68 (ver figura 15); también se identificaron en el promotor de BC1 (MP) la presencia de tres iterones: dos en sentido directo cuyas secuencias son GGGGGAAC y GGGGGGTAC, así como un tercer iterón en sentido invertido cuya secuencia es GTTCCCCC.

Con base en la orientación y número los iterones de VeMV, se asemejan a aquellos presentes en los begomovirus que pertenecen al Clado del *Virus del Abutilón* (AbMV); como también se han visualizado en los virus: Virus del mosaico amarillo de la papa (PYMV-CO), Virus de la distorsión de la hoja de maracuyá (PLDV-CO- KT899302) y Virus del mosaico enano del frijol (BDMV-CO).

PYMV A y B:

La región común de PYMV-A y B, cuenta con los elementos tardíos conservados (CLE), en el componente genómico A presento la secuencia TGGCCAC en la posición 141 del genoma viral.

En el promotor del gen BC1(MP) la presencia de cuatro iterones dos en sentido directo y dos en sentido invertido próximos a la estructura de tallo y asa, en relación con los elementos tardíos (CLEs), presentó un único motivo TGGACCAC en sentido invertido río arriba del codón de inicio de la transcripción de BV1 (NSP).

CohGMV-A:

En el componente genómico de CohGMV-A se hallaron tres iterones en relación con la proteína asociada a la replicación (Rep) presente en el componente A, uno en sentido directo próximo al sitio de inicio de transcripción de la proteína Rep y dos en sentido opuesto en relación a la estructura de tallo y asa, en cuanto a los CLEs se hallaron presentes en el gen de la proteína de la cápside (CP), un único CLE cercano al inicio de transcripción de esta proteína (CP). (ver figura 15)

4. Discusión

Evidencia de mecanismo de transcomplementación entre pseudorecombinantes de PYMV y begomovirus aislados de arvenses presentes en cultivos de tomate.

Los resultados obtenidos permitieron evidenciar la existencia de un fenómeno de transcomplementación a nivel de movimiento sistémico entre los diferentes pseudorecombinantes geminivirales evaluados, esto comprobado por PCR mediante la detección de cada componente A en hojas apicales nuevas, las cuáles eran diferentes de aquellas hojas en donde el pseudorecombinante geminiviral inicialmente había sido inoculados (ver figuras 8, 9 y 13). Evidencias en este sentido pudieron verse en varios casos particulares: en el caso de los pseudorecombinantes que fueron inoculados con el componente genómico A de RhGMCV y el componente genómicos B de PYMV-B o con el componente genómico B de VeMV (ver figura 9) pudo comprobarse que hubo trascomplementación a nivel de movimiento entre estos pseudorecombinantes. Es decir, los genes de movimiento presentes en PYMV-B y VeMV-B fueron capaces de movilizar el componente genómico A de RhGMCV, desde el sitio donde fueron inoculados mecánicamente (hojas bajas) hasta las hojas jóvenes nuevas próximas al meristemo apical, donde este RhGMCV-A fue finalmente detectado por PCR. Este resultado está demostrando que TrAP el producto del gen AC2 presente en RhGMCV-A fue capaz de

transactivar heterológamente la transcripción de los genes de movimiento presentes en los componentes genómicos B del begomovirus VeMV y PYMV.

En el caso de lo observado cuando CohGMV-A fue co-inoculado por biobalística en plantas de tomate junto con el componente B de PYMV o junto con el componente genómico B de VeMV, se pudo comprobar que hubo trascomplementación a nivel de movimiento entre estos dos pseudorecombinantes. Es decir, el producto del gen AC2 (TrAP) de CohGMV-A pudo reconocer los elementos regulatorios presentes en el promotor de los genes tardíos del componente B tanto de PYMV como VeMV (Ver figura 15). Algo semejante ocurrió cuando el componente genómico A de PYMV fue co-inoculado por biobalística en plantas de tomate junto con el componente genómico B de VeMV. En este caso también se pudo poner en evidencia un proceso de transcomplementación heteróloga a nivel de movimiento entre estos dos componentes genómicos pertenecientes a diferentes geminivirus. Resultados similares a los obtenidos en la presente investigación fueron obtenidos por Hung y Petty (2001) quienes comprobaron que los genes tardíos del virus BGMV pudieron ser transactivados heterológamente por una fuente de TrAP perteneciente no al BGMV sino al *tomato golden mosaic virus* (TGMV). Resultados similares obtuvo Gilbertson et al., (1993) en ensayos realizados en tabaco con pseudorecombinantes para los componentes A y B del *bean dwarf mosaic virus* (BDMV) y *tomato mottle virus* (ToMoV) quienes evidenciaron también transcomplementación a nivel de movimiento entre estos dos virus. Así mismo transcomplementación heteróloga a nivel de movimiento entre begomovirus; dos begomovirus que afectan al ají y al tomate en México, el *Pepper yellow huasteco virus* (PYHV) y el *pepper golden mosaic virus* (PepGMV) respectivamente, por Méndez-Lozano et al., (2003).

Todos estos resultados, tomados en conjunto confirman una vez más las observaciones de Sunter et al., (1994, 2003) en el sentido de que la función de transactivación de TrAP principalmente sobre los genes de expresión tardía (CP y NSP) es intercambiable entre geminivirus incluso así estén estos lejanamente relacionados a nivel filogenético.

El fenómeno de transactivación mediado por TrAP es un proceso finamente regulado en los geminivirus que permite controlar la transcripción de sus genes tardíos una vez que la transcripción de los genes tempranos del ciclo infeccioso viral ha culminado (Sunter y Bisaro, 1991; 1992). En general la transactivación geminiviral implica una proteína codificada por el gen AC2 (TrAP) la cual, bajo condiciones especiales y en un tiempo biológico particular,

dentro del ciclo infectivo, es producida y actúa en “*trans*” sobre los promotores de los genes tardíos del virus, favoreciendo la transcripción última de estos genes. Estos genes tardíos en el ciclo infectivo geminiviral bajo el control transcripcional de TrAP corresponden a los productos proteicos relacionados con la proteína de la cápside (CP), el gen de movimiento a larga distancia (BV1, NSP) vía floema, este último exclusivamente codificado por el componente B geminiviral (Sunter y Bisaro, 1997; 2003).

Esta propiedad de TrAP de actuar como una proteína transactivadora no específica de virus fue la que indujo a Arguello et al., (1994) a buscar elementos cis-regulatorios conservados los cuáles podrían estar presentes en los promotores de los genes tardíos de los begomovirus mediante estrategias bioinformáticas. Sus investigaciones condujeron a la identificación de los CLES (*Conserved Late Elements*) en estos promotores de estos genes tardíos, los cuáles son elementos cis-regulatorios que poseen el consenso (5'-GTGNCCN-3') los cuáles a su vez son el blanco de la acción en “*trans*” de la proteína transactivadora TrAP (Ruiz-Medrano et al., 1999). En el caso específico de la expresión del gen BV1 (NSP) que codifica para una proteína que media el movimiento de los begomovirus en la planta a larga distancia, su expresión es regulada positivamente por TrAP (Cantu-Iris et al., -2019).

En la figura 15 se representan el resultado del análisis bioinformático realizado con el objetivo de identificar los CLES presentes en los promotores de los genes de expresión tardía viral presentes en el componente genómico A y B begomoviral correspondientes a los genes CP y NSP respectivamente. Este análisis se efectuó a nivel de las secuencias de RhGMCV, PYMV, CohGMV y VeMV reportadas en Gen Bank.

En el caso de la combinación RhGMCV-A y VeMV-B, en la figura 15 se puede apreciar que el promotor del gen CP de RhGMCV-A y el promotor del Gen NSP de VeMV, poseen CLEs no sólo idénticos en secuencia sino todos en el mismo sentido directo (GTGGCCCC). Esta disposición y similitudes entre los CLEs presentes tanto en componente A de RhGMCV, así como en componente B de VeMV, le permito a TrAP de RhGMCV transactivar no solo sus propios CLEs sino además aquellos presentes en el componente B de VeMV, hecho que a su vez permitió mover el componente A de RhGMCV desde las hojas bajas donde se inoculo hasta las hojas apicales nuevas en donde se detectó por PCR varios días después de inoculado.

Como se observa en la figura 15, para el caso de la combinación RhGMCV -A y PYMV-B en el promotor de CP de RhGMCV-A hay dos CLEs en sentido directo mientras que en el promotor del gen BC1 (MP) de PYMV hay un solo CLE en sentido invertido (TGGACCAC). Si los comparamos con detalle vemos que este último CLE en sentido invertido presente en PYMV es complementario en secuencia a los otros dos CLEs presentes en el Promotor de CP de RhGMCV-A. Esto permitiría explicar la transcomplementación en movimiento que se observó en este pseudorecombinante a través del hecho de que el producto del gen AC2 (TrAP) de RhGMCV presente en el componente A no tuvo dificultades para transactivar los CLEs de PYMV ya que eran similares en secuencia. Hecho que permitió a la proteína de movimiento de PYMV mover el componente A de RhGMCV desde las hojas bajas donde se inoculo hasta las hojas apicales nuevas en donde se detectó por PCR varios días después.

En el caso de la combinación CohGMV- A y PYMV-B figura 15, el análisis bioinformático revela que tanto en el promotor del gen CP de CohGMV- A hay un CLE en sentido directo mientras que en el promotor del gen BV1 (NSP) de PYMV-B hay otro CLE en sentido invertido, siendo ambos elementos cis-regulatorios complementarios a nivel de secuencia entre sí (GTGGCCA, TGGACCAC). Esto permitiría explicar la transcomplementación en movimiento que se observó entre CohGMV A y PYMV-B a través del hecho de que el producto del gen AC2 (TrAP) de CohGMV A no tuvo dificultades para transactivar los CLEs presentes en PYMV-B ya que a pesar de diferir en sus orientaciones eran complementarios a nivel secuencia entre si.

Para el caso de la combinación CohGMV-A y VeMV- B figura 15 el análisis bioinformático muestra que tanto en el promotor del gen CP de CohGMV-A como en el promotor del gen BV1 (NSP) de VeMV- B se halla un CLE en cada promotor en sentido directo, ambos elementos cis-regulatorios idénticos a nivel de secuencia (GTGGCCA, GTGGCCC). Este hecho explica como TrAP de CohGMV -A pudo sin problema reconocer los CLEs presentes en el promotor de BV1 (NSP) de VeMV- B y transactivarlo permitiendo la transcomplementación a nivel de movimiento del componente A de CohGMV.

Asimismo, de la figura 15 se puede apreciar que en para la combinación PYMV-A y VeMV-B el análisis bioinformático revela que tanto en el promotor del gen CP de PYMV hay un CLE en sentido invertido mientras que en el promotor del gen BV1(NSP) de VeMV-B hay otro CLE en sentido directo, siendo complementarios a nivel de secuencia (TGGACCAC,

GTGGCCCC). Esto permitiría explicar la transcomplementación en movimiento que se observó en este pseudorecombinante a través del hecho de que el producto del gen AC2 (TrAP) de PYMV-A presente en el componente A no tuvo dificultades para transactivar los CLEs presentes en VeMV-B ya que a pesar de diferir en sus orientaciones eran complementarios a nivel de su secuencia

En el caso de los resultados bioinformáticos del análisis de secuencia en busca de los CLEs presentes en el componente A y B de los promotores tardíos de PYMV (ver figura 15) se logró identificar la presencia de dos CLEs invertidos en secuencia: uno localizado en el promotor de CP y el otro en el promotor de BV1(NSP). Las secuencias de estos CLEs son idénticas entre sí. Al pertenecer estos componentes genómicos A y B a PYMV era de esperarse que su TrAP sin problemas pudiera cumplir sin problema su papel como transactivador transcripcional, comprobado en este estudio a nivel de movimiento.

Es interesante resaltar que el fenómeno de transcomplementación simétrica a nivel de movimiento fue observada en todas y cada una de los pseudorecombinantes artificiales evaluados en este estudio. Así mismo los resultados de este estudio son similares a los obtenidos por Hou et al., (1996) y Frischmuth et al., (1993) quienes comprobaron que el begomovirus *African cassava mosaic virus* (ACMV) transcomplementaba a nivel de movimiento a otros begomovirus tales como el virus TGMV así como también al virus AbMV. También son similares a los obtenidos por Kanaka *et al.*, 2013 quienes demostraron la transcomplementación a nivel de movimiento entre dos geminivirus que limitan la producción de tomate en la india: el *tomato leaf curl virus New Delhi* (ToLCNDV) y el *tomato leaf curl Palampur virus* (ToLCPaLV).

Contrastan nuestros resultados con los de Méndez-Lozano et al., (2003) quienes estudiando los eventos de pseudorecombinación que se pudiesen dar entre los diferentes componentes genómicos de PHV y virus PepGMV comprobaron que en PHV era incapaz de mover sistémicamente a PepGMV cuando estos eran inoculados por biobalística en tomate y tabaco. Los estudios de Zhou et al., (2011) con BDMV demostraron que las proteínas MP (BC1) y NSP (BV1) forman complejos con cientos de proteínas del hospedero permitiendo el movimiento de este virus no solo célula a célula sino a larga distancia, empleando el floema para diseminarse por toda la planta. Basados en esta observación no sería descabellado hipotetizar que para los pseudorecombinantes evaluados en este trabajo de investigación las proteínas de sus respectivos componentes

B, con los cuáles se combinaron, pudieran interactuar con los mismos complejos proteicos presentes en cada uno de los hospederos evaluados (tomate y tabaco) hecho que facilito la transcomplementación a nivel de movimiento observada en cada una de las combinaciones aquí analizadas. Una pregunta que surge de estos resultados es si en condiciones naturales estos pseudorecombinantes podrían generar virus viables en un hospedero común y ser capaces de generar una infección sistémica. Esta inquietud seria materia de futuras investigaciones.

Evidencia de mecanismo de transreplicación entre pseudorecombinantes de PYMV y begomovirus aislados de arvenses presentes en cultivos de tomate

El establecimiento de pseudorecombinante viables entre dos begomovirus cuales quiera requiere el cumplimiento de dos condiciones: 1) La interacción y reconocimiento por parte de la proteína Rep (AC1) de una serie de elementos de secuencia repetidos de 6 a 10nt de longitud (Iterones) presentes en la región común (CR) así como la transreplicación del componente genético B por parte del componente A begomoviral. La segunda condición es la posibilidad de que este virus pseudorecombinante logre moverse a corta y larga distancia gracias a los genes de movimiento codificados en el componente B geminiviral. (Kanakala et al., 2013). Diferentes investigaciones sobre infecciones mixtas entre begomovirus se han podido evidenciar fenómenos de transreplicación. Estos procesos transreplicativos entre geminivirus fueron asociados a elementos *cis*-regulatorios presentes en la RC presente en la región intergénica begomoviral. Los estudios de Arguello et al., (1994) y posteriormente de Zhou Hanley-Bowdoin (1997) permitieron identificar una serie de elementos de secuencia llamados Iterones (AATTGGGGG) presentes en el promotor del gen de la proteína asociada a la replicación (Rep/ AC1). A partir de sus resultados se puede afirmar que entre 3 a 6 copias de estos iterones se encuentran en la región intergénica de todos los geminivirus y asumen una disposición linaje específica. Asimismo, estos iterones tienen un papel en la replicación geminiviral pues son reconocidos específicamente por la proteína Rep (AC1), convirtiendo a los iterones en elementos *cis*-regulatorios esenciales para la replicación geminiviral (Handley- Bowdoin *et al.*, 1999). La replicación del componente B geminiviral es facilitada por la proteína Rep codificada por el DNA A, y este proceso es mediado a su vez por el reconocimiento de los iterones presentes en la CR localizada en las regiones intergénicas

tanto del componente genómico B como del A begomoviral (Arguello-Astorga y Ruiz-Medrano, 2001; Handley-Bowdoin *et al.*, 1999). La habilidad con la cual la proteína Rep codificada por el componente A reconoce y se asocia a estos iterones en el componente B determina si es viable la pseudorecombinación (es decir el intercambio entre componentes genómicos A y B) entre begomovirus de diferentes especies (Harrison y Robinson, 1999). Es decir, virus pseudorecombinantes formados por combinaciones de componentes genómicos A y B de diferentes begomovirus son infecciosos solo si las secuencias de sus iterones presentes en sus regiones intergénicas son similares (Kanakala *et al.*, 2013). Recombinación y Pseudorecombinación durante las infecciones mixtas de begomovirus son los principales mecanismos que pueden conducir a la aparición o emergencia de nuevos virus; a este respecto solanáceas como el tomate se convierten en el hospedero ideal debido a la gran cantidad de begomovirus que lo infectan y que en el producen severas enfermedades (Vaca, Betacur y Lóez 2012).

En la figura 15 (*análisis de elementos cis regulatorios de begomovirus en estudio*) se esquematiza el resultado del análisis bioinformático en busca de los iterones presentes en la región común (RC) tanto del promotor del gen de la proteína asociada a la replicación Rep (AC1) como aquellos presentes en la RC del promotor de proteína de movimiento MP (BC1) del componente B de los begomovirus objeto de este estudio: PYMV, CohGMV, VeMV y RhGMCV. Como se puede apreciar en la Fig 16 en PYMV A nivel de sus componentes genómicos A presentan 4 iterones similares no solo a nivel de secuencia sino a nivel de su orientación: dos iterones en sentido directo (ATTGGGGG/ ActGGGGG) y otros dos en sentido opuesto (CCCCnAT); a nivel de su componente B esta disposición se conserva. Este hecho comprueba que estos dos componentes pertenecen a un mismo geminivirus, en este caso PYMV, permitiendo gracias a la similitud entre sus iterones que se verifique su efectiva transreplicación y transcomplementación entre sus dos componentes cumpliendo los postulados para ello propuestos por Arguello *et al.*, (1994). Este hecho se corrobora por el hecho que las plantas de tomate inoculadas por biobalística con esta combinación PYMV-A y PYMV-B pudo evidenciarse la presencia de síntomas tales como abultamientos, deformaciones de las hojas a los 21 dpi. En el caso de las plantas inoculadas con los pseudorecombinantes CohGMV-A y PYMV-B presentaron síntomas suaves tales como abultamientos a los 21 y 45 dpi. Este resultado podría explicarse por el hecho de la similitud que presentan los iterones presentes en el componente A de CohGMV con relación a los presentes en la región intergénica del

Componente B de PYMV (Ver fig 15). El componente genómico A de CohGMV presenta 3 iterones: dos en sentido directo (AATTGGAG) y otro en sentido invertido (CTCCAnT); por otra parte, en el componente genómico B de PYMV hay 4 iterones: dos iterones en sentido directo (ATTGGGGG/ AcTGGGGG) y otros dos en sentido opuesto (CCCCCnAT). La disposición y secuencia de los iterones presentes en tanto en el componente A de CohGMV como B de PYMV son similares salvo que este último componente presenta un iteron extra en sentido opuesto no presente en CohGMV- A. Sin embargo, este hecho parece que no fue óbice para que el replisoma de la planta previamente reclutado por la proteína Rep geminiviral pudiera reconocer el promotor de los genes tempranos e iniciar el ciclo infeccioso viral este último hecho es bastante factible si tenemos en cuenta lo publicado por Vaca-Vaca et al., (2017) en donde se estableció que CohGMV y PYMV están filogenéticamente muy relacionados lo que hipotéticamente haría viable fenómenos de pseudorecombinación entre ellos. La evidencia de síntomas suaves observados en plantas de tomate inoculadas con CohGMV -A y PYMB-B puede ser debida a que pese a que hubo transreplicación entre en estos dos componentes puede ser que no se alcanzó una alta tasa de moléculas del virus necesarias para generar una infección sistémica eficiente que condujera a ver síntomas más acentuados, lo que a su vez podría indicar que hasta ahora estos dos virus se están co-adaptando entre sí y que en un futuro, dadas las condiciones biológicas, podrían emerger como una nueva enfermedad Geminiviral en Colombia que limite la producción de tomate en Valle del Cauca.

En otra combinación del componente A de CohGMV, pero esta vez co-inoculado con el componente B de VeMV pudo evidenciarse en las plantas inoculadas presencia de síntomas fuertes tales como abultamientos deformaciones a los 21 dpi. El análisis bioinformático de estos componentes genómicos muestra que el componente genómico A de CohGMV presenta 3 iterones: dos en sentido directo (AATTGGAG) y otro en sentido invertido (CTCCAnT); el componente genómico B de VeMV tiene también 3 iterones similares en secuencia y orientación con aquellos que presenta el componente A de CohGMV. Estas similitudes a nivel de iterones permite explicar cómo eventos de transreplicación y transcomplementación a nivel de movimiento pudieron darse entre estos dos begomovirus, eventos que a su contribuyeron a la expresión de síntomas, aunque en este caso particular dichos síntomas con el tiempo fueron desapareciendo. Esta ausencia de síntomas con el paso del tiempo de inoculación puede ser asociada a la manifestación de un fenotipo de recuperación (FR) en las plantas inoculadas con este begomovirus

pseudorecombinante. Los fenotipos de recuperación en plantas post inoculación de virus están íntimamente asociados al fenómeno del silenciamiento de genes (siRNA) inducido por la formación de moléculas pequeñas de RNA de doble cadena (RNAds). En si es un sofisticado mecanismo de defensa a través del cual las plantas activan rutas específicas de degradación de estos RNAds virales como mecanismo de defensa en contra de la invasión de estos fitopatogenos (Baulcombe, 2007). Las respuestas de silenciamiento pueden ser propagadas vía floema por toda la planta hospedante, protegiéndola así de ataques posteriores por parte del mismo virus o de otros que tengan similitud a nivel de secuencia con el virus silenciado previamente (Baulcombe, 2004; Rodríguez-Negrete *et al.*, 2009). Los mecanismos de defensa basados en el silenciamiento de genes mediados por RNA pueden operar a través de dos mecanismos: inhibición de la transcripción viral o silenciamiento a nivel transcripcional (PTG) o a través de otra vía que implica la degradación de los transcritos conocida como silenciamiento postranscripcional (PTGS) (Voinnet, 2005). En el caso de los geminivirus estos pueden ser blanco del silenciamiento. Producción de siRNA así como PTGS han sido reportados tanto para geminivirus monopartitas como para los begomovirus (Chellapann *et al.*, 2004; Carrillo *et al.*, 2007). Se ha demostrado que hay una correlación muy significativa entre el FR, producción de siRNA así como el nivel de DNA viral y sus transcritos en plantas infectadas con geminivirus (Rodríguez-Negrete *et al.*, 2009), hecho que sugiere que el FR depende hasta cierto punto de la interacción específica que se da entre cada geminivirus y su planta hospedera (Patil *et al.*, 2020). Esto se ha visto en begomovirus como el PepGMV (virus del mosaico del chile) cuando infecta al ají; en este caso particular diversos estudios han demostrado que los mecanismos de PTGS de la planta operan activamente en contra de los transcritos de Rep, TrAP, REn y MP codificados por los genes begomovirales AC1, AC2, AC3 y BC1 respectivamente. Se cree que el silenciamiento eficiente de estos transcritos virales le permite a la planta de ají, desplegar un mecanismo de defensa efectivo que impida la propagación de la enfermedad, así como la manifestación de sintomatología viral alguna. (Méndez-Lozano *et al.*, 2001; 2003; Patil *et al.*, 2020). Fuertes indicios apuntan a que la severidad de la enfermedad begomoviral está asociada a la expresión de los genes de movimiento presentes en el componente genómico B: tanto la proteína NSP(BV1) como la proteína MP (BC1) son determinantes de patogenicidad y blancos a su vez de los mecanismos PTGS de defensa del hospedero tal y como lo han demostrado los resultados de estudios con modelos begomovirales tales como BDMV,

BGMV y TGMV (Gilbertson et al., 1993; Faria et al., 1994; Von Arnin y Stanley, 1992).

En este caso de la combinación RhGMCV-A y PYMV-B (ver figura 15) el análisis bioinformático permitió identificar la presencia de 6 iterones en el componente A de RhGMCV: 5 de estos iterones (tres en sentido invertido y dos en sentido directo) se encontraron hacia 5' de la estructura nonanucleotídica conservada (TAATATTAC). Mientras que el restante iterón (en sentido directo) fue identificado justo río abajo de esta secuencia conservada en el promotor de la proteína CP (AV1). Por su parte en el componente genómico B de PYMV hay 4 iterones: dos de ellos iterones en sentido directo (ATTGGGGG/ AcTGGGGG) y otros dos en sentido opuesto (CCCCnAT) y ubicados hacia el 5' en relación con la estructura nonanucleotídica conservada (TAATATTAC). Al comparar los iterones presentes entre tanto en RhGMCV -A como PYMV-B se puede observar que no son similares ni en disposición, ni en secuencia ni en orientación. No se observó sintomatología alguna ni en las plantas de tomate coinoculadas con RhGMCV-A y PYMV-B. En la fig 16 se esquematizan los iterones identificados para combinación RhGMCV-A y VeMV-B; como en esta imagen puede observarse los iterones de RhGMCV-A y los que presenta VeMV- B distan mucho de parecerse entre sí. Tomando como base las observaciones de Arguello et al., (1994) se puede afirmar que los pseudorecombinantes formados entre RhGMCV-A y PYMV-B así como con VeMV-B no se transreplican eficientemente entre sí, dada su marcada diferencia en cuanto a la secuencia de sus iterones como en su número, orientación y disposición.

A este argumento puede añadirse otro no menos importante y es que RhGMCV se agrupa en el mismo clado filogenético que forma el SLCV (Arguello 1994) el cuál se caracteriza a su vez único y por estar alejado de la gran mayoría de los begomovirus del hemisferio occidental. En la práctica esto significa que RhGMCV solo podría transreplicarse y generar infecciones viables con otros begomovirus siempre y cuando estos pertenezcan a su mismo clado o sea al grupo del SLCV. Aunado a este hecho está el antecedente de que, aunque PYMV y VeMV pertenecen al clado del abutilón y estos a su vez no se agrupan con ninguno de los begomovirus que pertenecen al clado del SLCV (Jara, López y Vaca 2016). Tal vez estos argumentos permitan explicar por qué en ninguna de las plantas de tomate o tabaco co-inoculadas con RhGMCV-A y PYMV-B / VeMV- B pudo evidenciarse sintomatología alguna. Es decir, no formaron pseudorecombinantes viables ni a nivel

replicativo ni a nivel de síntomas. Es pertinente tener en cuenta que los síntomas causados por una infección viral podrían ser en gran parte debidos a los efectos inhibitorios sobre los miRNA de los hospederos por parte de los supresores virales del silenciamiento. Es decir, la mayoría de los virus vegetales codifican proteínas que actúan como supresores de los mecanismos de silenciamiento antivirales de sus hospederos vegetales y muchos de estos supresores virales afectan directa o indirectamente los miRNAs vegetales; muchos de los miRNAs descritos a la fecha en plantas están involucrados en el desarrollo de las mismas (Dunoyer et al., 2004). Estas afirmaciones encuentran asidero en los resultados de los experimentos de Voinnet (2005) quien sobre expreso algunos de los supresores de silenciamiento virales (algunos de los cuáles interferían o actuaban sobre los miRNAs vegetales) en plantas transgénicas, las cuáles conforme se fueron desarrollando comenzaron a expresar fenotipos similares a los síntomas causados por enfermedades virales. A la fecha se han reportado en begomovirus diversos genes cuyos productos actúan como supresores del silenciamiento viral de sus hospederos (Bisaro, 2006). Los genes begomovirales y sus productos tales como AC1 (REp), AC2 (TrAP) y AC4 han demostrado actuar como factores de patogenicidad al comportarse como supresores activos de los mecanismos de defensa de sus hospederos mediados por RNA a nivel de iniciación, mantenimiento, así como a nivel de la diseminación sistémica en la planta de sus señales (Ramesh et al., 2017). Es así que se han reportado sinergismos entre geminivirus a este nivel: es decir plantas que se encuentran infectadas por dos o más geminivirus pueden presentar sintomatologías más severas debido a la acción cooperativa que puede darse entre sus supresores del silenciamiento, como ampliamente se ha documentado ocurre entre variantes del *African Cassava mosaic virus* (ACMV) junto con variantes del Sri-Lanka Cassava mosaic Virus (SLCMV) (Bisaro, 2006; Ramesh et al., 2017). Tomando estos antecedentes en consideración sería posible postular que para el caso de los pseudorecombinantes en este estudio que fueron inoculados en planta y no fue posible evidenciar en esta ultima el desarrollo de síntomas, esto sea debido en parte a que los mecanismos de contrasilenciamiento virales no se expresaron eficientemente para contrarrestar las medidas de defensa vegetales basadas en PTGS, hecho que culminó con el no desarrollo de síntomas visibles en las plantas inoculadas con los estos begomovirus.

¿Por qué no se evidenciaron síntomas en plantas de tabaco?

Después de haber realizado la extracción de DNA de las plantas de tabaco y realizar la detección de los virus por PCR se evidenció que en ninguna de las plantas de tabaco var. *xanthi* hubo síntomas en ninguna de las combinaciones de pseudorecombinates inoculados por biobalística. Exceptuando la combinación de RhGMV-A y VeMV-B, y esto pude explicarse desde varios puntos de vista:

- 1) *Begomovirus con tropismos de tejido diferentes*: una característica de todos los geminivirus es que poseen un tropismo de tejido. Esta cualidad puede definirse como el potencial que tiene un geminivirus de infectar ciertas células o tejidos vegetales gracias a la presencia de receptores específicos a productos del virus presente en las plantas. Por ejemplo, el virus del mosaico dorado de tomate (TGMV) preferentemente se encuentra en células del mesófilo mientras que el BGMV tiene tropismo por el tejido vascular (More et al., 2019; Quin y Petty, 2001). Morra y Petty (2000) estudiaron el tropismo de tejido de dos geminivirus el TGMV y el BGMV en tabaco (*Nicotiana benthamiana*). A través de sus experimentos se pudo comprobar que BGMV fue incapaz de infectar *Nicotiana benthamiana* mientras que TGMV por su parte si lo logro hecho que quedó evidenciado por la presencia de síntomas en las plantas de tabaco inoculadas con este begomovirus. Sin embargo, cuando TGMV y BGMV fueron coinoculados de manera simultánea en plantas de *Nicotiana benthamiana* pudo evidenciarse infección sistémica en las plantas de tabaco y la limitación a células del floema de BGMV (su tropismo de tejido) fue violada gracias a factores en “*trans*” facilitados por TGMV. Es decir, TGMV indujo factores virales o del propio hospedero que le permitieron a BGMV escapar del tejido vascular hacia células del mesófilo adyacentes e iniciar una infección sistémica en tabaco. Entre los factores virales que permitieron este escape Morra y Petty (2000) comprobaron que el producto de BV1 (NSP) de TGMV jugó un papel primordial para la invasión de BGMV desde el tejido vascular hacia las células del mesófilo adyacente a este y a partir de este último diseminarse por toda la planta de tabaco. A la fecha en que se presentan los resultados de la presente investigación no se conoce plenamente los tropismos de tejido que presentan PYMV, CohGMV o RhGMV, esto debido a que son begomovirus recientemente reportados y todo de ellos aún está por descubrirse. Fundamentados en este hecho no podríamos descartar que entre si cada uno de estos begomovirus tengan

tropismos diferentes, hecho que pudo ser uno de los causantes de la ausencia de síntomas en tabaco observados en este estudio.

- 2) *Limitaciones en tabaco para que AC2 (TrAP) transactive los genes de movimiento y se produzca así una infección sistémica:* la viabilidad de dos cualesquiera pseudorecombinantes geminivirales directamente implica que cualquiera de los factores trans-activadores (*trans-acting*) comprometidos tanto en la replicación como en el movimiento son intercambiables o pueden actuar cooperativamente entre los dos virus asociados en la pseudorecombinación. Los resultados de Hill et al., (1998) ilustran muy bien este principio. Estos investigadores efectuaron experimentos de pseudorecombinación entre dos begomovirus: el *Squash leaf curl virus* (SqLCV) y el *Cabbage leaf curl virus* (CLCV). Ellos observaron en protoplastos que al coinocular el componente genómico A de CLCV junto con el componente B de SqCLV estos se replicaban y causaban infección en *Nicotiana benthamiana*, un hospedero común a ambos. Sin embargo, si este mismo experimento se llevaba a cabo en *Arabidopsis thaliana* (un hospedero común de CLCV) ni replicación ni infección sistémica se evidenciaba. Estas observaciones indican que diferentes geminivirus con diferentes rangos de hospederos pueden tener orígenes de replicación similares que permitan que eventos de transreplicación sucedan estos hechos no son suficientes para que una enfermedad sistémica se establezca en el hospedero y esta última sea evidente por medio de síntomas. Es decir, TrAP (AC2) de CLVC en su papel de proteína transactivadora de los genes de movimiento (BV1) de SqCLV tuvo una actividad sub-óptima no tanto debida a las propias características de los virus sino a las propias condiciones biológicas e intrínsecas impuestas por *Arabidopsis thaliana*. Es decir, son los propios factores del hospedero los que restringen si la enfermedad begomoviral por pseudorecombinantes se verifica o no. Para el caso de los pseudorecombinantes evaluados en el presente estudio una situación similar puede haber sucedido. Es decir, en tabaco *xanthi* pueden no darse las condiciones óptimas que permitan la actividad transactivadora de TrAP sobre los genes de movimiento. Esto indicaría que para el caso de los pseudorecombinantes evaluados en tabaco la transcomplementación a nivel de movimiento es hospedero específico, ya que solo pudo evidenciarse en tomate, un hospedero al cual cada uno de los begomovirus evaluados parece bien adaptado. Como ejemplo de este caso tenemos a BGMV el cual está perfectamente adaptado a

frijol, pero muy pobremente adaptado a *Nicotiana benthamiana* (Petty et al., 1995)

En la combinación RhGMV- A y VeMV -B, se puede pensar que no es necesario de un componente B para movilizar el componente A de RhGMV- A, ya que en las plantas que se inóculo solo el componente A hubo movimiento a las hojas apicales, esto probablemente se pueda explicar ya que los iterones presentes en RhGMV se encuentran emparentados con el Clado del *Virus del encrespamiento de la hoja del squash* SqLCV que tiene arreglo de iterones del viejo mundo más uno adicional a la región palindrómica (Argüello-Astorga et al., , 1994) . Teniendo en cuenta que los geminivirus del viejo mundo son monopartitas y tienen en su componente A la proteína de movimiento V2 podría relacionarse con lo ocurrido en dicha combinación ya que fue la única en donde se evidencio movimiento.

5. Conclusiones

Este es el primer trabajo donde se evaluó la posibilidad de transcomplementación heteróloga entre el genoma del virus del mosaico amarillo de la papa (PYMV) y otros componentes genómicos pertenecientes a begomovirus aislados de arvenses (virus del mosaico dorado de Croton- CohGMV, virus del mosaico dorado de Rhynchosia de Colombia- RhGMCV, y virus moteado de Verbena- VeMV) que acompañan los cultivos de esta solanácea en Valle del Cauca.

Los ensayos en plantas de tomate evidenciaron que el componente genómico B de PYMV transcomplemento a nivel de movimiento a los componentes genómicos A pertenecientes a CohGMV y a RhGMCV. Mientras que el componente genómico A de PYMV transcomplemento a nivel a movimiento al componente B de VeMV. El análisis bioinformático de los promotores de los genes AR1 y BR1 presentes en el componente A y B, respectivamente, permitió identificar la presencia de elementos conservados tardíos (CLEs) similares entre los begomovirus evaluados, explicando los resultados experimentales obtenidos.

Se encontró evidencia de fenómenos de transreplicación en plantas de tomate cuando estas fueron co-bombardadas con mezclas de los componentes genómicos pertenecientes a: PYMV-A + VeMV-B; CohGMV-A + PYMV-B y RhGMCV-A + PYMV-B. Estos eventos se explican por la similitud entre los iterones presentes entre los componentes A y B de PYMV, CohGMV, RhGMCV y VeMV, los cuales fueron plenamente identificados mediante análisis bioinformáticos.

De los ensayos realizados en plantas de tabaco *xanthi nc*, únicamente aquellas co-bombardadas con la combinación RhGMCV-A + VeMV-B mostraron evidencia que podría indicar eventos de transcomplementación y transreplicación. Este resultado

indicaría que para la combinación RhGMCV-A + VeMV-B a futuro podría bien adaptarse y ser con el discurrir evolutivo un nuevo pseudorecombinante viable posible de estudiar tomando esta variedad de tabaco como modelo.

Estos resultados podrían indicar que a futuro podrían emerger nuevos pseudorecombinantes begomovirales a partir de la combinación de los componentes genómicos de PYMV, CohGMV, RhGMCV y VeMV, con probabilidad de mayor capacidad infectiva para el cultivo de tomate en Colombia

Bibliografía

- Accotto, G. P., Mullineaux, P. M., Brown, S. C., and Marie, D. (1993). Digitaria streak geminivirus replicative forms are abundant in Sphase nuclei of infected cells. *Virology* 195: 257-259
- Adams, M. J., E. J. Lefkowitz, A. M. Q. King, E.B. Cartens. 2013. Recently agreed changes to International Code of Virus Classification and Nomenclature. *Arch. Virol.* 158:2633-2639
- Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M., Harrach, B., Harrison, R. L., Knowles, N. J., ... y Davison, A. J. (2017). Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Archives of virology*, 162(8), 2505-2538.
- Aguilar, E., Gomez, B. G., y Lozano-Duran, R. (2020). Recent advances on the plant manipulation by geminiviruses. *Current Opinion in Plant Biology*, 56, 56-64.
- Alves-Júnior, M., Alfenas-Zerbini, P., Andrade, E. C., Esposito, D. A., Silva, F. N., da Cruz, A. C. F., ... y Zerbini, F. M. (2009). Synergism and negative interference during co-infection of tomato and *Nicotiana benthamiana* with two bipartite begomoviruses. *Virology*, 387(2), 257-266.
- Amthor JS. 1995. Terrestrial higher-plant response to increasing atmospheric [CO₂] in relation to the global carbon cycle. *Global Change Biology* 1, 243-274.
- Anderson, P.K., A.A. Cunningham, N.G. Patel, F.J. Morales, P.R. Epstein, P. Daszak. 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agro-technology drivers. *Trends Ecol. Evol.* 19:535-544.
- Andrade, O., Latorre, A., y Escaffi, O. (n.d.). Tomato Mosaic Virus Associated with Shoestring Symptom in Chilean Tomatoes.

- Apablaza, H. Gastón. 1999. Patología de cultivos. Epidemiología y control holístico. Primera Edición. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago. Chile. 347p
- Argüello-Astorga G, Herrera-Estrella L, y Rivera-Bustamante R (1994) Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Mol. Biol.* 26 (2): 553-556.
- Argüello-Astorga, G. R., Guevara-González, R. G., Herrera-Estrella, L. R., y Rivera-Bustamante, R. F. (1994). Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: A model for replication. *Virology*. 203:90-100
- Argüello-Astorga, G. R., y Ruiz-Medrano, R. (2001). An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Archives of virology*, 146(8), 1465-1485.
- Arguello-Astorga, G., L. Lopez-Ochoa, L. J. Kong, B. M. Orozco, S. B. Settlege, L. Hanley-Bowdoin. 2004. A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. *J Virol*. 78(9):4817-4826.
- Ascencio-Ibañez, J. T., Monsalve-Fonnegra, Z. I., Pruna-Camacho, M. B., Díaz-Plaza, R., y Francisco, R.-B. R. (1999). Los geminivirus. *Revista Mexicana de FITOPATOLOGIA*, 17(2), 113-127.
- Barreto, S. (2012). Estudio de plantas invasoras como fonte de begomovirus para o tomateiro.
- Basavaprabhu, L. Patil, Chakraborty, S., Czosnek, H., Fiallo-Olivé, E., Gilbertson, R. L., Legg, J., ... y Zerbini, F. M. (2020). Plant resistance to geminiviruses.
- Bass, H. W., Nagar, S., Hanley-Bowdoin, L., y Robertson, D. (2000). Chromosome condensation induced by geminivirus infection of mature plant cells. *Journal of Cell Science*, 113 (Pt 7, 1149-1160.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-363
- Baulcombe, D. (2007). Molecular biology: amplified silencing. *Science* 315:199-200
- Bernardo P., M. Golden, M. Akram, Naimuddin, N. Nadarajan, E. Fernandez, M. Granier, A. G. Rebelo, M. Peterschmitt. D.P. Martin, P. Roumagnac. 2013. Identification and characterisation of a highly divergent Geminivirus: evolutionary and taxonomic implications. *Virus Res.* 177: 35-45
- Bisaro, D. M. 2006. Silencing suppression by geminivirus proteins. *Viol.* 344(1):158-168
- Blanc S, Michalakakis Y. 2016. Manipulation of hosts and vectors by plant viruses and impact of the environment. *Current Opinion in Insect Science* 16, 36-43.

- Blanco-Valdes, Y. (2016). Review The role of weeds as a component of biodiversity in agroecosystems. *Cultivos Tropicales*, 37(October), 34-56.
- Bock KR .1982. Enfermedades geminivirus de cultivos tropicales. *Plant Dis.* 66: 266 - 70
- Böttcher, B., Unseld, S., Ceulemans, H., Russell, R. B., y Jeske, H. (2004). Geminate structures of African cassava mosaic virus. *Journal of virology*, 78(13), 6758-6765.
- Briddon, R. W., Bedford, I. D., Tsai, J. H., y 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.
- Briddon, R. W., Bull S. E., Amin, I., Idris A. M., Mansoor S., Bedford I. D., Dhawan, P., Rishi, N, Siwatch, S. S., Abdel-Salam, A. M., Brown, J. K., Zafar, Y., Markham, P.G. (2003). Diversity of DNA β , a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology*. 312: 106-121
- Briddon, R. W., Patil, B. L., Bagewadi, B., Nawaz-Ul-Rehman, M. S., y Fauquet, C. M. (2010). Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1).
- Brown J.K., K. Mills Lujan, A.M. Idris. 2001. Phylogenetic analysis of Melon chlorotic leaf curl virus from Guatemala: Another emergent species in the Squash leaf curl virus clade. *Virus Res.* 158:257-262.
- Brown, J. K., Idris, a M., Alteri, C., y Stenger, D. C. (2002). Emergence of a New Cucurbit-Infesting Begomovirus Species Capable of Forming Viable Reassortants with Related Viruses in the Squash leaf curl virus Cluster. *Phytopathology*, 92(7), 734-42.
- Brown JK, Bird J. 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the American and the Caribbean basin. *Plant Dis.* 76:220-25
- Brown, J. K., C. M. Fauquet, R. W. Briddon, M. Zerbini, E. Morions, J. Navas Castillo. 2012. Family Geminiviridae. En: King A.M.Q., M.J. Adams, E.B. Carstens, E.J. Lefkowitz (eds). *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*. Elsevier Academic Press. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London, UK. pp 351-373.
- Brown, J., Zerbini, F., Navas, J., Moriones, E., Ramos, R., Silva, J., ... Varsani, A. (2015). Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology*, 160(6), 1593-1619

- Canto T., M. A. Aranda, A. Fereres. 2009. Climate change effects on physiology and population processes of hosts and vectors that influence the spread of hemipteran-borne plant viruses. *Glob. Change Biol.* 15:1884-1894
- Cantú-Iris, M., Pastor-Palacios, G., Mauricio-Castillo, J. A., Bañuelos-Hernández, B., Avalos-Calleros, J. A., Juárez-Reyes, A., ... y 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
- Carrington, J. C., Kasschau, K. D., Mahajan, S. K., y Schaad, M. C. (1996). Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *The Plant Cell*, 8(10), 1669.,
- Carvajal-Yepes, M., Zambrano, L., Bueno, J. M., Raatz, B., y 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.
- Casco R. 2002. *Matthews Plant Virology*. Nueva York: Académica. 1001 pp.
- Castillo-Urquiza, G. P., Beserra, J. E. a, Bruckner, F. P., Lima, A. T. M., Varsani, A., Alfenas-Zerbini, P., y Murilo Zerbini, F. (2008). Six novel Begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology*, 153(10), 1985-1989.
- Cazzonelli, C. I., Burke, J., y Velten, J. (2005). Functional characterization of the geminiviral conserved late element (CLE) in uninfected tobacco. *Plant Molecular Biology*, 58(4), 465-81.
- Chakraborty, S., Vanitharani, R., Chattopadhyay, B., y 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), 818-28. <http://doi.org/10.1099/vir.0.82873-0>
- Chakraborty, S., P. K. Pandey, M. K. Banerjee, G. Kalloo, C. M. Fauquet. 2003. Tomato leaf curl Gujarat virus, a New Begomovirus Species Causing a Severe Leaf Curl Disease of Tomato in Varanasi, India. *Phytopathology*. 93(12):1485-95.
- Chellappan, P., Vanitharani, R., y Fauquet, C. M. (2004). Short interfering RNA accumulation correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences. *Journal of virology*, 78(14), 7465-7477.

- Czosnek, H. (Ed.). (2007). Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance. Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance.
- Díaz-Pendón, J. A., Sánchez-Campos, S., Fortes, I. M., y Moriones, E. (2019). Tomato yellow leaf curl sardinia virus, a begomovirus species evolving by mutation and recombination: A challenge for virus control. *Viruses*, 11(1), 45.
- Da Silva, S., Castillo-Urquiza, G., Hora Júnior, B., Assunção, I., Lima, G. S., Pio-Ribeiro, G., ... y Zerbini, F. M. (2011). High genetic variability and recombination in a Begomovirus population infecting the ubiquitous weed *Cleome affinis* in northeastern Brazil. *Archives of Virology*, 156(12), 2205-2213.
- Doebley, J., Stec, A., y Hubbard, L. (1997). The evolution of apical dominance in maize. *Nature*, 386(6624), 485-8.
- Domínguez-Durán, G., Rodríguez-Negrete, E. A., Morales-Aguilar, J. J., Camacho-Beltrán, E., Romero-Romero, J. L., Rivera-Acosta, M. A., Leyva-López, N. E., Arroyo-Becerra, A., y Méndez-Lozano, J. (2018). Molecular and biological characterization of Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV): An Eastern Hemisphere begomovirus introduced in the Western Hemisphere. *Crop Protection*, 51-55.
- Dry, I. B., Krake, L. R., Rigden, J. E., y Rezaian, M. A. (1997). A novel subviral agent associated with a geminivirus: the first report of a DNA satellite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(13), 7088-7093.
- Dunoyer, P., Lecellier, C. H., Parizotto, E. A., Himber, C., y Voinnet, O. (2004). RETRACTED: Probing the MicroRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *The Plant Cell*, 16(5), 1235-1250.
- Eagle, P. a, y Hanley-Bowdoin, L. (1997). cis elements that contribute to geminivirus transcriptional regulation and the efficiency of DNA replication. *Journal of Virology*, 71(9), 6947-6955.
- Erdmann J. B., Shepherd D. N., Martin D. P., Varsani A., Rybicli E. P., Jeske H. Replicative intermediates of maize streak virus found during leaf development. (2010). *J. Gen. Virol.* 91: 1077-81.
- Faria, J. C., R. L. Gilbertson, S. F. Hanson, F. J. Morales, P. Ahlquist, A. O. Loniello, D. P. Maxwell. 1994. Bean golden mosaic geminivirus type II isolates from the Dominican Republic and Guatemala: Nucleotide sequences, infectious pseudorecombinants, and phylogenetic relationships. *Phytopathology* 84:321-329.

- Fauquet C. M., R. W. Briddon, J.K.Brown, E. Moriones, J. Stanley, M. Zerbini, X. Zhou. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch Virol.* 153:783-821
- Fargette, D., Konate, G., Fauquet, C., Muller, E., Peterschmitt, M., y Thresh, J. M. (2006). Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 235-260.
- Fauquet, C., J.C. Thouvenel. 1977. Isolation of the rice yellow mottle virus in Ivory Coast. *Plant Dis. Rep.* 61: 443-446.
- Fondong, V. N. (2013). Geminivirus protein structure and function. *Molecular Plant Pathology*, 14(6), 635-649
- Fontenele, R. S., Lamas, N. S., Lacorte, C., Lacerda, A. L. M., Varsani, A., y Ribeiro, S. G. (2017). A novel geminivirus identified in tomato and cleome plants sampled in Brazil. *Virus Research*, 240, 175-179.
- Fontes, E. P., P. A. Eagle, P.S. Sipe, V. A. Luckow, L. Hanley-Bowdoin. 1994. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *J.Biol.Chem.* 269(11):8459-65.
- Frischmuth S, Frischmuth T, Latham JR, y Stanley J (1993a) Transcriptional analysis of the virion-sense genes of the geminivirus beet curly top virus. *Virology* 197 (1): 312-319.
- Frischmuth, T., Roberts, S., Von, A. A., and Stanley, J. 1993. Specificity of bipartite geminivirus movement proteins. *Virology* 196:666-673.
- Fu X, Ye L, Kang L, Ge F. 2010. Elevated CO₂ shifts the focus of tobacco plant defences from Cucumber mosaic virus to the green peach aphid. *Plant, Cell and Environment* 33, 2056-2064
- Fu X, Ye L, Kang L, Ge F. 2010. Elevated CO₂ shifts the focus of tobacco plant defences from Cucumber mosaic virus to the green peach aphid. *Plant, Cell and Environment* 33, 2056-2064
- Fuller, C. 1901. Maelie variegation. First report of the government entomologist 1899-1900. 17-19
- Gafni Y y Epel BL (2002) The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60 231-241
- García-Moreno, R. (2005). Desarrollo de un método molecular para la caracterización funcional rápida de promotores de geminivirus. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.
- Garrido-Ramírez, E. R., M. R. Sudarshana, R. L. Gilbertson. 2002. Bean golden yellow mosaic virus from Chiapas, Mexico: Characterization, Pseudorecombination with

- Other Bean-Infecting Geminiviruses and Germ Plasm Screening. *Phytopathology*. 90(11):1224-32.
- Gergerich, R. C., V. V. Dolja. 2006. Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01 URL: <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/viral/introduction/Pages/PlantViruses.aspx>. Consultado: 10/01/2020
- Gilbertson, R. L., Hidayat, S. H., Paplomatas, E. J., Rojas, M. R., Hou, Y. M., y Maxwell, D. P. (1993). Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses. *The Journal of General Virology*, 74 (Pt 1), 23-31.
- Gilbertson, R. L., Sudarshana, M., Jiang, H., Rojas, M. R., y Lucas, W. J. (2003). Limitations on geminivirus genome size imposed by plasmodesmata and virus- encoded movement protein: insights into DNA trafficking. *The Plant Cell*, 15(11), 2578-2591.
- Gutierrez, C. (2000). "Geminiviruses and the plant cell cycle." *Plant Mol Biol* 43(5-6): 763-772.
- Gutierrez, C. (2002). Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60(5), 219-230.
- Haible, D., Kober, S., y Jeske, H. (2006). Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of Virological Methods*, 135(1), 9-16.
- Hammond J, Lecoq H, Raccah B. 1999. Epidemiological risks from mixed virus infections and transgenic plants expressing viral genes. *Advances in Virus Research* 54, 189-314.
- Hanley-Bowdoin L., S. B. Settlege, B. M. Orozco, S. Nagar, D. Robertson. 1999. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18:71-106.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlege, S. B., y Robertson, D. (2004). Reprogramming plant gene expression: A prerequisite to geminivirus DNA replication. *Molecular Plant Pathology*.
- Hanley-Bowdoin, L., Bejarano, E. R., Robertson, D., y Mansoor, S. (2013). Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 777-788.

- Harrington R, Clark SJ, Welham SJ, Verrier PJ, Denholm CH, Hullé M, Maurice D, Rounsevell MD, Cocu N. 2007. Environmental change and the phenology of European aphids. *Global Change Biology* 13, 1550-1564.
- Harrison, B. D., y Robinson, D. J. (1999). Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (begomoviruses). *Annual review of phytopathology*, 37(1), 369-398.
- Hernández Barrera, J. R. (2020). IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE Cucurbit leaf crumple virus (CuLCrV); UN BEGOMOVIRUS BIPARTITA ASOCIADO AL MELÓN DE BAJA CALIFORNIA SUR (Master's thesis, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC).
- Hernández-Espinal LA, Enríquez-Verdugo I, Melgoza-Villagómez CM, Retes-Manjarrez JE, Velarde-Félix S, Linares-Flores PJ, et al., . Análisis filogenético y distribución de Begomovirus en el cultivo del Chile (*Capsicum annum* L.) en Sinaloa, México. *Rev Fitotec Mex.* 2018;41(2):149-157
- Hernández-Zepeda, C., Argüello-Astorga, G., Idris, A. M., Carnevali, G., Brown, J. K., y Moreno-Valenzuela, O. A. (2009). Molecular characterization and phylogenetic relationships of Desmodium leaf distortion virus (DeLDV): A new begomovirus infecting Desmodium glabrum in Yucatan, Mexico. *Virus Genes*, 39(3), 371-374.
- Hernández-Zepeda, C., Brown, J. K., Moreno-Valenzuela, O. A., Argüello-Astorga, G., Idris, A. M., Carnevali, G., y Rivera-Bustamante, R. F. (2010). Characterization of Rhynchosia yellow mosaic Yucatan virus, a new recombinant begomovirus associated with two fabaceous weeds in Yucatan, Mexico. *Archives of Virology*, 155(10), 1571-1579.
- Hernández-Zepeda, C., Idris, A. M., Carnevali, G., Brown, J., y Moreno-Valenzuela, O. A. (2007). Preliminary identification and coat protein gene phylogenetic relationships of begomoviruses associated with native flora and cultivated plants from the Yucatan Peninsula of Mexico. *Virus Genes*, 35(3), 825-833.
- Herrera-Vásquez, J. A., Alfaro-Fernández, A., Córdoba-Sellés, M., Cebrián, M. C., Font, M. I., y Jordá, Y. C. (2009). First Report of Tomato torrado virus Infecting Tomato in Single and Mixed Infections with Cucumber mosaic virus in Panama. *Plant Disease Journal*, 93, 198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/PDIS-93-2-0198A>
- Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V., y Revers, F. (2013). Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Frontiers in plant science*, 4, 154.

- Höfer, P., Engel, M., Jeske, H., y Frischmuth, T. (1997). Host range limitation of a pseudorecombinant virus produced by two distinct bipartite geminiviruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(8), 1019-1022.
- Hou, Y. M., and Gilbertson, R. L. (1996). Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *J. Virol.* 70: 5430-5436
- Hull, R. 2002. *Matthews' Plant Virology*. 4th Edition. Academic Press, San Diego, CA. 1056p.
- Hung, H. C., y Petty, I. T. (2001). Functional equivalence of late gene promoters in bean golden mosaic virus with those in tomato golden mosaic virus. *Journal of General Virology*, 82(3), 667-672.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2020. El Comité Internacional de Taxonomía de Virus; ICTV, se ocupa de la designación y denominación de taxones (nombre y clasificación) de los virus URL: <https://talk.ictvonline.org>
- Inoue-Nagata, A. K., Lima, M. F., y 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.
- Jara Tejada, F., López López, K., y Vaca Vaca, J. (2016). Diversidad de Begomovirus presentes en arvenses asociadas a cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L) en el Suroriente del Valle del Cauca. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira
- Jaramillo, J. E., y Tamayo, P. J. (2013). Enfermedades del tomate, berenjena en Colombia. Guía para su diagnóstico y manejo.
- Jeske H. (2009) Geminiviruses. In: de Villiers EM., Hausen H.. (eds) *TT Viruses. Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 331. Springer, Berlin, Heidelberg
- Jeske, H., Lütgemeier, M., y Preiß, W. (2001). DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *EMBO Journal*, 20(21), 6158-6167.
- Johne, R., Müller, H., Rector, A., van Ranst, M., y Stevens, H. (2009). Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends in Microbiology*, 17(5), 205-211.
- Johnson J. 1922. The relation of air temperature to the mosaic disease of potatoes and other plants. *Phytopathology* 12, 438-440.

- Jovel, J., Reski, G., Rothenstein, D., Ringel, M., Frischmuth, T., y Jeske, H. (2004). Sida micrantha mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from Abutilon mosaic virus. *Archives of Virology*, 149(4), 829-841. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0235-1>
- Juárez, M., Rabádan, M. P., Díaz-Martínez, L., Tayahi, M., Grande-Pérez, A., y Gómez, P. (2019). Natural hosts and genetic diversity of the emerging tomato leaf curl New Delhi virus in Spain. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB)
- Jyothsna, P., Haq, Q. M. I., Singh, P., Sumiya, K. V., Praveen, S., Rawat, R., ... y Malathi, V. G. (2013). Infection of tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV), a bipartite begomovirus with betasatellites, results in enhanced level of helper virus components and antagonistic interaction between DNA B and betasatellites. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(12), 5457-5471.
- Kanakala, S., Jyothsna, P., Shukla, R., Tiwari, N., Veer, B. S., Swarnalatha, P., ... y Malathi, V. G. (2013). Asymmetric synergism and heteroencapsidation between two bipartite begomoviruses, tomato leaf curl New Delhi virus and tomato leaf curl Palampur virus. *Virus research*, 174(1-2), 126-136.
- Kleinow, T., Nischang, M., Beck, A., Kratzer, U., Tanwir, F., Preiss, W., ... Jeske, H. (2009). Three C-terminal phosphorylation sites in the Abutilon mosaic virus movement protein affect symptom development and viral DNA accumulation. *Virology*, 390(1), 89-101.
- Kosugi, S., y Ohashi, Y. (2002). DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family. *Plant Journal*, 30(3), 337-348.
- Kumar, R. V. (2019). Classification, Taxonomy and Gene Function of Geminiviruses and Their Satellites. In *Geminiviruses* (pp. 1-16). Springer, Cham.
- La gestión de los geminivirus es un reto mundial debido a la amplia distribución de enfermedades económicamente importantes causadas por estos virus.
- Laufs, J., Jupin, I., David, C., Schumacher, S., Heyraud-Nitschke, F., and Gronenborn, B. (1995). Geminivirus replication: genetic and biochemical characterization of Rep protein function, a review. *Biochimie* 77: 765-773.
- Laufs, J., Schumacher, S., Geisler, N., Jupin, I., y Gronenborn, B. (1995). Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. *FEBS Letters*, 377(2), 258-262.
- Lazarowitz, S. G., y Shepherd, R. J. (1992). Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 11(4), 327-349.

- Lazarowitz, S. G., y Beachy, R. N. (1999). Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *The Plant Cell Online*, 11(4), 535-548.
- Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G., y Smith, D. B. (2018). Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D708-D717.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>
- Legg, J. P., Owor, B., Sseruwagi, P., y Ndunguru, J. (2006). Cassava mosaic virus disease in East and Central Africa: epidemiology and management of a regional pandemic. *Advances in virus research*, 67, 355-418.
- Legg, J., C. Fauquet. 2004. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. *Plant. Mol. Bio.* 56:585.
- Londoño, A., Riego-Ruiz, L., y Argüello-Astorga, G. R. (2010). DNA-binding specificity determinants of replication proteins encoded by eukaryotic ssDNA viruses are adjacent to widely separated RCR conserved motifs. *Archives of Virology*, 155(7), 1033-1046.
- López-López, K., Jara-Tejada, F., y Vaca-Vaca, J. C. (2014). Nuevos hospederos alternativos de Begomovirus identificados en el Valle del Cauca. *Revista Fitopatología Colombiana*, 38(September), 19-23.
- López-López, K., Morales-Eusse, J., y Vaca-Vaca, J. C. (2017). Caracterización molecular de un begomovirus que afecta *Capsicum* spp. en Colombia. Congreso de Fitopatología, 35. Termas de Chillán (Chile).
- López-López, K.; Rodríguez-Mora, D.; y Vaca-Vaca, J. (2013). Optimización de las condiciones de inoculación por biobalística de un Begomovirus en tomate y tabaco. *Rev. Col. Biot.* 15(2), 8 - 17.
- Lough, T., Lucas, W.J. 2006. Integrative plant biology: Role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annual Review of Plant Biology*. 57:203-232.
- Lozano, G., Trenado, H., Fiallo, E., Chirinos, D., Geraud, F., Briddon, R., y Navas, J. (2016). Characterization of Non-coding DNA Satellites Associated with Sweepviruses (Genus Begomovirus, Geminiviridae) – Definition of a Distinct Class of Begomovirus-Associated Satellites. *Frontiers in Microbiology*, 7(February), 1-13

- Lucas W. J. 2006. Plant viral movement proteins: agents for cell to-cell trafficking of viral genomes. *Virology*. 344 (1): 169-184
- Madsen E. 1973. Effect of CO₂-concentration on the morphological, histological and cytological changes in tomato plants. *Acta Agriculturae Scandinavica* 23, 241-246.
- Martínez, A., Karine, A., Morales, G., y Vallejo Cabrera, F. A. (2008). Caracterización molecular de un Begomovirus del tomate en el Valle del Cauca, Colombia, y búsqueda de fuentes de resistencia para el mejoramiento de la variedad Unapal Maravilla. *Acta Agronómica*, 57(3), 167-173.
- Marwal A., A. K. Sahu, R. K. Gaur. 2014. Chapter 7 – Transmission and host interaction of Geminivirus in weeds. En: Gaur, R.K., T. Hohn. P. Sharma(eds). *Plant Virus- Host Interaction*. Academic Press. First edition. USA. pp 143-161
- Méndez-Lozano, J., Torres-Pacheco, I., Fauquet, C. M., y Rivera-Bustamante, R. F. (2003). Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: Pepper huasteco virus and Pepper golden mosaic virus. *Phytopathology*, 93(3), 270-277.
- Méndez-Lozano, J., R.F.Rivera-Bustamante,C.M.Fauquet, and R. De la Torre- Almaraz. 2001. *Pepper golden mosaic virus* are geminivirus affecting tomatillo (*Physalis ixocarpa*) crops in Mexico. *Plant Dis.*85:1291.
- Moffat, A.S.1999. PLANT PATHOLOGY: Geminiviruses Emerge as Serious Crop Threat. *Science*. 286(5446):1835-1835.
- Morales, F. J., Muñoz, C., Castaño, M., y Velasco, A. C. (2000). Geminivirus transmitidos por mosca blanca en Colombia. *Fitopatología colombiana*, 24(1-2), 95-98.
- Morales, Francisco y Anderson, P. (2001). The emergence and dissemination of white y-transmitted geminiviruses in Latin America Brief Review. *Archives of Virology*, 415-441.
- More, P., Agarwal, P., y Agarwal, P. K. (2019). Geminiviruses: Molecular biodiversity and global distribution in *Jatropha*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 108, 101439
- Morra, M. R., y Petty, I. T. (2000). Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *The Plant Cell*, 12(11), 2259-2270.
- Murashige T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol.Plant.*15 473-497
- Nakhla MK, Maxwell DP. 1998. Epidemiology and management of tomato leaf curl disease. In *Plant Virus Disease Control*, ed. A Hadidi, RK Khetarpal, H Koganezawa, pp. 565-83. St. Paul: APS Press

- Navas-Castillo J., Fiallo-Olive E., Sanchez-Campos S. (2011). Enfermedades de virus emergentes transmitidas por moscas blancas. *Annu Rev. Phytopathol.* 49 219- 248. 10.1146 / annurev-phyto-072910-095235
- Nawaz-ul-Rehman, M. S., y Fauquet, C. M. (2009). Evolution of geminiviruses and their satellites. *FEBS Letters*, 583(12), 1825-32.
- NCBI. (2019). National Center for Biotechnology Information. Retrieved May 30, 2019, from GenBank website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Noueiry, A. O., J. L. William, R. L. Gilbertson. 1994. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*. 76(5):925-932
- Obregón, V. 2017. Guía para la identificación de las enfermedades de las cucurbitáceas. Ediciones INTA. Primera Edición. Corrientes, Argentina 35p.
- Owor, B., Legg, J. P., Okao-Okuja, G., Obonyo, R., y Ogenga-Latigo, M. W. (2004). The effect of cassava mosaic geminiviruses on symptom severity, growth and root yield of a cassava mosaic virus disease-susceptible cultivar in Uganda. *Annals of applied biology*, 145(3), 331-337.
- Padidam, M., Sawyer, S., y Fauquet, C. M. (1999). Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*, 265(2), 218-225.
- Petty, I.T.D., Miller, C.G., Meade-Hash, T.J., and Schaffer, R. L. 1995 Complementable host adaptation defects in bipartite geminivirus. *Virology* 212:263-267
- Pita, J. S., Fondong, V. N., Sangaré, A., Kokora, R. N. N., y Fauquet, C. M. (2001). Genomic and biological diversity of the African cassava geminiviruses. *Euphytica*, 120(1), 115-125.
- Pradhan, B., Tien, V. Van, Dey, N., y Mukherjee, S. K. (2017). Molecular Biology of Geminivirus DNA Replication. *Viral Replication*, 2-31.
- Pradhan, B., Van Tien, V., Dey, N., y y Mukherjee, S. K. (2017). Molecular Biology of Geminivirus DNA Replication. *Avid Science*, (May). Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/316456253>
- Preiss, W., H. Jeske. 2003. Multitasking in replication is common among geminiviruses. *J.Virol.* 77(5):2972-80.
- Prior SA, Runion GB, Marble SC, Rogers HH, Gilliam CH, Torbert HA. 2011. A review of elevated atmospheric CO₂ effects on plant growth and water relations: implications for horticulture. *HortScience* 46, 158-162

- Prior SA, Runion GB, Marble SC, Rogers HH, Gilliam CH, Torbert HA. 2011. A review of elevated atmospheric CO₂ effects on plant growth and water relations: implications for horticulture. *HortScience* 46, 158-162.
- Raghavan, V., Malik, P. S., Choudhury, N. R. y Mukherjee, S. K. 2004. The DNA-A Component of a Plant Geminivirus (Indian Mung Bean Yellow Mosaic Virus) Replicates in Budding Yeast Cells. *J. Virol.* 78:2405-2413
- Ramos, P. L., Guevara-González, R. G., Peral, R., Ascencio-Ibañez, J. T., Polston, J. E., Argüello-Astorga, G. R., ... Rivera-Bustamante, R. F. (2003). Tomato mottle Taino virus pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: Implications for the delimitation of cis- and trans-acting replication specificity determinants. *Archives of Virology*, 148(9), 1697-1712.
- Ramesh, S. V., Sahu, P. P., Prasad, M., Praveen, S., y Pappu, H. R. (2017). Geminiviruses and plant hosts: a closer examination of the molecular Arms race. *Viruses*, 9(9), 256.
- Rentería-Canett, I., Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R., y Rivera-Bustamante, R. F. (2011). Geminivirus mixed infection on pepper plants: synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology journal*, 8(1), 104
- Rentería-Canett, I., Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R., y Rivera-Bustamante, R. F. (2011). Geminivirus mixed infection on pepper plants: synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology journal*, 8(1), 104.
- Rodríguez, I., Morales, H., Bueno, J. M., y Cardona, C. (2005). El biotipo B de Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae) adquiere mayor importancia en el valle del Cauca. *Revista Colombiana de Entomología*, 31(1), 21-28.
- Rodríguez-Negrete, E. A., Carrillo-Tripp, J., y Rivera-Bustamante, R. F. (2009). RNA silencing against geminivirus: complementary action of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. *Journal of virology*, 83(3), 1332-1340.
- Rojas, M. R., Hagen, C., Lucas, W. J., y Gilbertson, R. L. (2005). Exploiting Chinks in the Plant's Armor: Evolution and Emergence of Geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 361-394.
- Roossinck, M. J., y García-Arenal, F. (2015). Ecosystem simplification, biodiversity loss and plant virus emergence. *Current Opinion in Virology*, 10, 56-62.
- Roye, M. E., McLaughlin, W. a, Nakhla, M. K., y Maxwell, D. P. (1997). Genetic diversity among geminiviruses associated with the weed species *Sida* spp., *Macroptilium*

- lathyroides, and *Wissadula amplissima* from Jamaica. *Plant Disease*, 81(11), 1251-1258
- Ruiz-Medrano R, Guevara-Gonzalez RG, Arguello-Astorga GR, Monsalve-Fonnegra Z, Herrera-Estrella LR, y Rivera-Bustamante RF (1999) Identification of a sequence element involved in AC2-mediated transactivation of the pepper huasteco virus coat protein gene. *Virology* 253 (2): 162-169.
- Rybicki E. P., G. Pietersen. 1999. *Plant Virus Disease Problems in The Developing World*. *Adv. Virus Res* 53: 127-175
- Saenz, A. I., Fraile, A., Garcia-Arenal, F., Zhou, X., Robinson, D. J., Khalid, S., y Harrison, B. D. (2000). Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *Journal of General Virology*, 81(7), 1839-1849
- Salati R, Nahkla MK, Rojas MR, Guzman P, Jaquez J, et al., . 2002. Tomato yellow leaf curl virus in the Dominican Republic: characterization of an infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. *Phytopathology* 92:487-96
- Salazar, L., y Hincapié, E. (2011). Las arvenses y su manejo en los cafetales. In *Sistema de Producción del Café en Colombia* (Vol. 5, p. 30).
- Sánchez-Campos, S., Díaz, J. A., Monci, F., Bejarano, E. R., Reina, J., Navas-Castillo, J., Moriones, E. (2002). High Genetic Stability of the Begomovirus *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* in Southern Spain Over an 8-Year Period. *Phytopathology*, 92(8), 842-849
- Sanderfoot, A. A., S. G. Lazarowitz. 1996. Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends Cell Biol.* 6(9):353-8.
- Saunders, K., Bedford, I. D., Tetsukazu, Y. and Stanley, J. 2003. Aetiology: The earliest recorded plant virus disease. *Nature* 422: 831.
- Schnippenkoetter, W. H., Martin, D. P., Hughes, F. L., Fyvie, M., Willment, J. A., James, D., ... Rybicki, E. P. (2001). The relative infectivities and genomic characterisation of three distinct mastreviruses from South Africa. *Archives of Virology*, 146(6), 1075-1088.

- Seal, S. E., F. vandenBosch, M.J. Jeger. 2006. Factors Influencing Begomovirus Evolution and Their Increasing Global Significance: Implications for Sustainable Control. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(1), 23-46
- Shimada-Beltrán, H., y Rivera-Bustamante, R. F. (2007). Early and late gene expression in pepper huasteco yellow vein virus. *Journal of General Virology*, 88(11), 3145- 3153.
- Shukla, N., Verma, S., Babu, G., y Saxena, S. (2017). Strategy for Generic Resistance Against Begomoviruses Through RNAi. In *Begomoviruses: Occurrence and Management in Asia and Africa* (pp. 137-156). Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2017. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5984-1>
- Silva, S. J. C., Castillo-Urquiza, G. P., Hora-Júnior, B. T., Assunção, I. P., Lima, G. S. a, Pio-Ribeiro, G., ... Zerbini, F. M. (2012). Species diversity, phylogeny and genetic variability of Begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. *Plant Pathology*, 61(3), 457-467.
- Singhal, P., Nabi, S.U., Yadav, M.K. *et al.*, . Mixed infection of plant viruses: diagnostics, interactions and impact on host. *J Plant Dis Prot* (2020)
- Singh, A. K., Chattopadhyay, B., y Chakraborty, S. (2012). Biology and interactions of two distinct monopartite begomoviruses and betasatellites associated with radish leaf curl disease in India. *Virology journal*, 9(1), 43.
- Smith, H. A., Seijo, T. E., Vallad, G. E., Peres, N. A., y Druffel, K. L. (2015). Evaluating weeds as hosts of tomato yellow leaf curl virus. *Environmental Entomology*, 44(4), 1101-1107.
- Sobrinho, R. R., Xavier, C. a. D., Pereira, H. M. D. B., Lima, G. S. D. a., Assuncao, I. P., Mizubuti, E. S. G., ... Zerbini, F. M. (2014). Contrasting genetic structure between two Begomoviruses infecting the same leguminous hosts. *Journal of General Virology*, 95(Pt_11), 2540-2552.
- Solórzano-Morales, Á., Castro-Vásquez, R., Barboza-Vargas, N., Hernández-Jiménez, E., Hammond, R. W., y Ramírez-Fonseca, P. (2017). Detección de crinivirus y begomovirus en plántulas de tomate y arvenses asociadas a semilleros Crinivirus and begomovirus detection in tomato plantlets and weeds associated to nurseries. *Agron Mesoam.*, 28(2), 477-488.
- Soto MJ, Gilbertson RL. 2003. Distribution and rate of movement of the curtovirus Beet mild curly top virus (Family Geminiviridae) in the beet leafhopper.

- Stenger DC, McMahon CL. 1997. Genotypic diversity of beet curly top virus populations in the western United States. *Phytopathology* 87:737-44
- Stewart, C., Kon, T., Rojas, M., Graham, A., Martin, D., Gilbertson, R., y Roye, M. (2014). Mixed infection of *Sidajamaicensis* in Jamaica reveals the presence of three recombinant Begomovirus DNA A components. *Archives of Virology*, 2509-2512.
- Sun Y, Guo H, Ge F, Michael J, Ryalls W. 2016. Plant - Aphid interactions under elevated CO₂: some cues from aphid feeding behavior. *Frontiers in Plant Science* 7, 1-10.
- Sun Y, Guo H, Ge F, Michael J, Ryalls W. 2016. Plant -Aphid interactions under elevated CO₂: some cues from aphid feeding behavior. *Frontiers in Plant Science* 7, 1-10
- Sunter G y Bisaro DM (1991) Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. *Virology*180 (1): 416-419.
- Sunter G y Bisaro DM (1992) Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell*4 (10): 1321-1331.
- Sunter G y Bisaro DM (2003) Identification of a minimal sequence required for activation of the tomato golden mosaic virus coat protein promoter in protoplasts. *Virology*305 (2): 452-462.
- Sunter G, Stenger DC, y Bisaro DM (1994) Heterologous complementation by geminivirus AL2 and AL3 genes. *Virology*203 (2): 203-210.
- Syller, J. (2012). Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular Plant Pathology*, 13(2), 204-216.
- Teng N, Wang J, Chen T, Wu X, Wang Y, Lin J. 2006. Elevated CO₂ induces physiological, biochemical and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *The New Phytologist* 172, 92-103
- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, A., Brown, J.K., Becerra-Flora, A., and Rivera-Bustamante, R.F. (1996). Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the southern United States. *Phytopathology*. 86: 1186-1192.
- Umaharan, P., Padidam, M., Phelps, R. H., Beachy, R. N., y Fauquet, C. M. (1998). Distribution and diversity of Geminiviruses in Trinidad and Tobago. *Phytopathology*, 88(12), 1262-1268.
- Vaca-Vaca, J. C., Betancur-Pérez, J. F., y 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.

- Vaca-Vaca, J. C., Carrasco-Lozano, E. C., y López-López, K. (2017). Molecular identification of a new begomovirus infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) in Colombia. *Archives of Virology*, 162(2), 573-576..
- Vaca-Vaca, J. C., Corredor-Saenz, V., Jara-Tejada, F., Betancourt-Andrade, D., y López-López, K. (2019). Nuevos hospederos alternativos de begomovirus asociados al cultivo de ají en el Valle del Cauca. *Acta Agronómica*, 68(1), 56-60. <https://doi.org/10.15446/acag.v68n1.77487>
- Vaca-Vaca, J. C., Jara-Tejada, F., y López-López, K. (2018). Croton golden mosaic virus: a new bipartite begomovirus isolated from *Croton hirtus* in Colombia. *Archives of virology*, 163(11), 3199-3202.
- Vaca-Vaca, J. C., Morales-Euse, J., Rivera-Toro, D. M., y López-López, K. (2019). Primer reporte de begomovirus infectando cultivos de ají (*Capsicum* spp.) en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 24(3), 452-462.
- Vaca-Vaca, J. C., Otavo-Fiscal, D., y López-López, K. (2011). Identificación de arvenses como hospederos naturales de Begomovirus en el Valle del Cauca, Colombia. *Revista Fitopatología Colombiana*, 35, 69-72.
- Vaca-Vaca, J. C., Pulido-Rendón, A. J., y López-López, K. (2015). Optimization of low pressure biobalistics conditions for analysis of transient expression of heterologous gene in tobacco leaves tobacco cultivated in vitro. *Acta Agronómica*, 64(2), 146-155.
- Vaca-Vaca, J. C., Morales-Euse, J., y López-López, K. (2015). Detección de Begomovirus en arvenses asociadas al cultivo de tomate en Fusagasuga, Cundinamarca.
- Voinnet, O. (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics*, 6(3), 206-220.
- Voinnet, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 136(4), 669-687.
- Warburg, O. 1984. Die kulturpflanzen usambaras. *Mitt. Deutsh. Schutzgeb.* 7:131-99.
- Vuorinen, A. L., Kelloniemi, J., y Valkonen, J. P. (2011). Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants?. *Plant science*, 181(4), 355-363.
- Von Arnim, A., y Stanley, J. (1992). Determinants of tomato golden mosaic virus symptom development located on DNA B. *Virology*, 186(1), 286-293.
- Wege, C. 2007. Movement and localization of tomato yellow leaf curl viruses in the infected plant. In *Tomato yellow curl virus disease*. Springer Netherlands. Pp185-206

- Wu H., M. Li, N. Hong, B. Peng, Q. Gu. 2020. Molecular and biological characterization of melon-infecting squash leaf curl China virus in China. *J. Integr. Agric.* 19(2): 570-577
- Wyant, P., Gotthardt, D., Schäfer, B., Krenz, B. y, y Jeske, H. (2011). The genomes of four novel Begomoviruses and a new *Sida micrantha* mosaic virus strain from Bolivian weeds. *Archives of Virology*, 156(2), 347-352.
- Wolf, S., C.M. Deom, R. Beachy, and W.J. Lucas. 1991. Plasmodesmatal function is probed using transgenic tobacco plants that express a virus movement protein. *The Plant Cell* 3: 593-604.
- Yang, X., W. Guo, F. Li, G. Sunter, X. Zhou. 2019. Geminivirus - Associated Betasatellites: Exploiting Chinks in the Antiviral Arsenal of Plants. *Trends Plant Sci.* 24(6):519-529
- Zerbini, F. M., Briddon, R. W., Idris, A., Martin, D. P., Moriones, E., Navas-Castillo, J., ... Varsani, A. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Geminiviridae. *Journal of General Virology*, 98(2), 131-133.
- Zhang, W., Olson, N. H., Baker, T. S., Faulkner, L., Agbandje-McKenna, M., Boulton, M. I., ... McKenna, R. (2001). Structure of the maize streak virus geminate particle. *Virology*, 279(2), 471-477.
- Zhou, Y.-C., Garrido-Ramirez, E. R., Sudarshana, M. R., Yendluri, S., y Gilbertson, R. L. (2007). The N-terminus of the *Begomovirus* nuclear shuttle protein (BV1) determines virulence or avirulence in *Phaseolus vulgaris*
- Zhou, Y., Rojas, M. R., Park, M. R., Seo, Y. S., Lucas, W. J., y Gilbertson, R. L. (2011). Histone H3 interacts and colocalizes with the nuclear shuttle protein and the movement protein of a geminivirus. *Journal of virology*, 85(22), 11821-11832.