



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE  
*Cucurbit leaf crumple virus* (CuLCrV); UN BEGOMOVIRUS  
BIPARTITA ASOCIADO AL MELÓN DE BAJA CALIFORNIA  
SUR.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Biotecnología )

P r e s e n t a

**Jesús Ricardo Hernández Barrera**

La Paz, Baja California Sur, marzo de 2020.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:00 horas del día 10 del mes de marzo del 2020, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Cucurbit leaf crumple virus* (CuLCrV); UN BEGOMOVIRUS BIPARTITA ASOCIADO AL MELÓN DE BAJA CALIFORNIA SUR."**

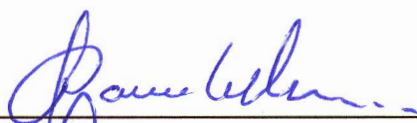
Presentada por el alumno:

**JESÚS RICARDO HERNÁNDEZ BARRERA**

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **BIOTECNOLOGÍA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

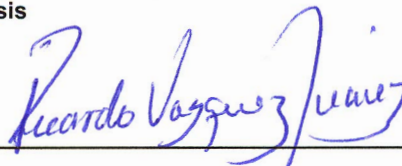
LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Ramón Jaime Holguín Peña  
Director de Tesis



Dra. Diana Medina Hernandez  
Co-Tutora



Dr. Ricardo Vazquez Juarez  
Co-Tutor



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos.

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dr. Ramón Jaime Holguín Peña  
Director de Tesis  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.

Dra. Diana Medina Hernández  
Co-Tutora de Tesis  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.

Dr. Ricardo Vázquez Juárez  
Co-Tutor de Tesis  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.

### **Comité Revisor de Tesis**

Dr. Ramón Jaime Holguín Peña  
Dra. Diana Medina Hernández  
Dr. Ricardo Vázquez Juárez

### **Jurado de Examen**

Dr. Ramón Jaime Holguín Peña  
Dra. Diana Medina Hernández  
Dr. Ricardo Vázquez Juárez

### **Suplente**

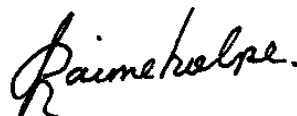
Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega

## Resumen

El melón (*Cucumis melo* L.), perteneciente a la familia de las cucurbitáceas, es un cultivo con un importante valor comercial, ocupando Baja California Sur (BCS), el décimo lugar nacional en su producción. Lo anterior, se ve afectado por diversas enfermedades en el cultivo, de tipo viral. En el ejido de El Pescadero, BCS, se han observado síntomas de clorosis, rugosidad y enchinamiento de hojas, presuntivamente relacionados a una infección begomoviral en hojas de melón. En el presente trabajo se identificó al agente causal de la enfermedad presentada en el melón; *Cucurbit leaf crumple virus* (CuLCrV). Además, se realizó la caracterización molecular del virus para dilucidar posibles relaciones filogenéticas y de recombinación con otros begomovirus de BCS. La secuencia completa del componente A del CuLCrV aislado en BCS (CuLCrV-BCS), obtuvo el mayor porcentaje de identidad nucleotídica (>92%) con el CuLCrV de Arizona, USA (AF256200.4). De acuerdo a lo anterior, y con base en los criterios de identidad del ICTV (>91% y <94%); CuLCrV-BCS, podría ser considerada una nueva variante del CuLCrV. Los marcos de lectura abierto (ORF's), de los cinco genes identificados y tipificados para CuLCrV-BCS (AV1, AC1, AC2, AC3 y AC4), correspondieron correctamente a la organización genética típica de un begomovirus bipartita. Se identificaron 21 sitios únicos de corte enzimático para CuLCrV-BCS, con algunos específicos (*SspI*, *Apal*, *Clal* Y *Sall*) relacionados con los ORF's. El análisis filogenético confirmó que el CuLCrV es el ancestro más cercano del CuLCrV-BCS, pero también mostró una estrecha relación filogeográfica con él *Squash leaf curl virus* (SLCuV) (MF187211); un begomovirus reportado previamente en BCS, México. Con el análisis de recombinación se identificó una homología genómica en la región conformada entre los 800 y 1800 pb del genoma A del CuLCrV-BCS, y los ORF's AC2 y AC3 del SLCuV (MF187211). Los resultados obtenidos de esta investigación contribuyen en la generación del primer reporte de infección por CuLCrV en BCS.

**Palabras clave:** recombinación, begomovirus bipartita, primer reporte, ORF's, CuLCrV-BCS

V.o.B.o.



---

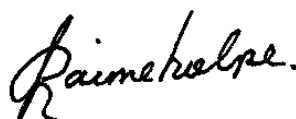
Dr. Ramón Jaime Holguín Peña  
Director de tesis

## Summary

Melon (*Cucumis melo* L.), belonging to the cucurbit family, is a crop with an important commercial value, occupying Baja California Sur (BCS), the tenth national place in production. However, one of the main diseases that affect the crop is viral type diseases. In the El Pescadero area, symptoms of chlorosis, leaf curl and crumpling have been observed and presumably related to begomoviral infections in melon leaves. In the present work, the causal agent of the disease in infected crop plants was identified as *Cucurbit leaf crumple virus* (CuLCrV). Moreover, a molecular characterization was performed to elucidate possible phylogenetic and recombination relationships of CuLCrV with other BCS bipartite begomoviruses. The complete sequence of component A of CuLCrV isolated in BCS (CuLCrV-BCS), had the highest percentage of nucleotide identity (>92%) with the CuLCrV from Arizona, USA (AF256200.4). According to the above, and based on the ICTV identity criteria (>91% and <94%); CuLCrV-BCS, could be considered a new variant of CuLCrV. The open reading frames (ORFs) of the five genes identified and typed for CuLCrV-BCS (AV1, AC1, AC2, AC3 and AC4), corresponded to the typical gene organization of bipartite begomovirus. Twenty-one unique enzymatic cleavage sites were identified for CuLCrV-BCS, with some specific (*SspI*, *Apal*, *ClaI* and *Sall*) related to the ORFs. Phylogenetic analysis confirmed that CuLCrV is the closest ancestor of CuLCrV-BCS, although with close phylogeographic relationship to *Squash leaf curl virus* (SLCuV) (MF187211); a begomovirus previously reported in BCS, Mexico. With the recombination analysis and genomic homology was identified in the region formed between 800 and 1800 bp of the CuLCrV-BCS genome A, and the SLCuV AC2 and AC3 ORFs (MF187211). The results obtained from this research contribute to the generation of the first report of CuLCrV infection in BCS.

**Key words:** recombination, bipartite begomovirus, ORFs, CuLCrV-BCS

V.o.B.o.



---

Dr. Ramón Jaime Holguín Peña  
Director de tesis

## Dedicatoria

Al G.:A.:D.:U.:

A mi madre; Adelaida Barrera Meza, por siempre apoyarme en mis metas y nunca dejarme caer, de todo corazón, GRACIAS infinitas.

A mi abuelita; mi nana Adelaida Meza Murillo, por siempre creer en mí y tenerme en sus oraciones.

*“Si así fue, así pudo ser; si así fuera, así podría ser; pero como no es, no es. Es cuestión de lógica.”*

**-Lewis Carroll**

## **Agradecimientos**

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR), por haber sido la institución receptora de mis estudios de posgrado y por facilitarme el acceso y uso de sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo brindado al otorgarme la beca No. 634737.

A mi comité tutorial comprendido por el Dr. Ramón Jaime Holguín Peña, la Dra. Diana Medina Hernández y el Dr. Ricardo Vázquez Juárez por su tiempo, paciencia, apoyo y consejo para que este trabajo se cumpliera de la mejor manera. Mi más sincero agradecimiento a cada uno de ellos.

Al Laboratorio de Fitopatología del CIBNOR, y a su personal técnico comprendido por el M. en D. Martín Guadalupe de Jesús Aguilar García y la Hidrobiol. María Sofía Ramos Galván, quienes en todo momento me brindaron su apoyo y momentos de alegría en el quehacer del laboratorio. Al Laboratorio de Genómica y Bioinformática, y a su técnico responsable, la M. en C. Gabriela Mendoza Carrión, por abrirme sus puertas para el uso de sus equipos en todo momento que fue requerido.

Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal, por las facilidades brindadas en el uso de sus instalaciones y anexos, en especial al M. en C. Mario Arce Montoya, por sus consejos, apoyo, regaños y su amistad.

A mis amigos del Laboratorio de Fitopatología, del CIBNOR: Omar Aranda López, Diana Rojas Sánchez, Myela Vargas Salinas, Tomas Rivas García, Jorge Alberto Alejandro Rosas, los camaradas cubanos; Julio y Juan, al compañero Saúl Carmona Hernández (D.E.P.), y a todas y todos los usuarios que compartieron conmigo un poco de su alegría, conocimiento y ratos amenos.

A la Biol. Patricia Hinojosa Baltazar, del Laboratorio de Fisiología Comparada, por todas las facilidades brindadas durante mi investigación en las visitas a su laboratorio.

Al staff de Posgrado: Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Leticia González Rubio Rivera, Lic. Claudia Elizabeth Olachea León, Adriana Teresa Franzoni García, Lic. José Manuel Melero Astorga y la Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro, por la atención, asesorías, apoyo y facilidades brindadas en sus oficinas. Un especial y sincero agradecimiento al Lic. Horacio Sandoval Gómez y a Tania Verónica Núñez Valdez, por todo el apoyo y paciencia brindados durante mi estancia en el CIBNOR, pues fueron los “rostros de posgrado” que más tuvieron que soportar mis dudas, peticiones de auxilio y de más, en dicha área.

Al personal de la Biblioteca del CIBNOR, Lic. Ana María Talamantes Cota, Lic. María Esther Ojeda Castro, Susana Luna García, Elizabeth Guadalupe Sánchez Vázquez, por todo el apoyo brindado cuando tuve dudas sobre préstamos de libros, búsqueda de artículos científicos y a su amabilidad al atender.

A todas y todos mis compañeros de generación de posgrado por brindarme su amistad, consejos, conocimiento y ratos de diversión, dentro y fuera del CIBNOR. A todas las personas que me brindaron una mano amiga, sin importar la medida en la que lo hayan hecho, les digo: ¡sin ustedes, esto no sería posible!, gracias.



## CONTENIDO

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Lista de figuras</b> .....	x
<b>Lista de tablas</b> .....	xi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Importancia del melón como cultivo de interés agronómico.....	1
1.2 Los virus, importantes fitopatógenos.....	2
1.3 Contexto regional.....	3
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 Geminivirus, importancia y características generales.....	3
2.1.1 Importancia general.....	3
2.1.2 Síntomas de la enfermedad.....	4
2.1.3 Morfología genómica y taxonomía.....	4
2.1.4 Especies en la familia <i>Geminiviridae</i> .....	5
2.2 Begomovirus.....	5
2.2.1 Características básicas.....	5
2.2.2 Organización genómica.....	6
2.2.2.1 Componente A, ORF's begomovirus bipartita.....	7
2.2.2.2 Componente B, ORF's begomovirus bipartita.....	8
2.2.2.3 ORF's begomovirus monopartita.....	8
2.2.2.4 Satélites.....	9
2.2.3 Replicación.....	10
2.2.4 Pseudorecombinación y recombinación.....	11

2.2.4.1 Pseudorecombinación .....	12
2.2.4.2 Recombinación .....	12
2.2.5 Begomovirus en BCS.....	13
2.3 CuLCrV, características generales del begomovirus y de la enfermedad que desarrolla en cultivos de cucurbitáceas .....	14
2.3.1 Primera identificación y características básicas.....	14
2.3.2 Síntomas de la enfermedad generada por CuLCrV .....	15
2.4 Eventos de infección por CuLCrV reportados .....	16
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>17</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
5.1 Objetivo general .....	17
5.2 Objetivos específicos .....	17
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
6.1 Zona de estudio, colecta y manejo de muestras .....	18
6.1.1 Extracción de ADN genómico total de plantas de melón .....	18
6.1.2 Evaluación de la integridad del ADNg y visualización de los productos obtenidos .....	19
6.2 Detección del virus causante de la enfermedad que ocasiona un amarillamiento y enchinamiento de las hojas del melón .....	20
6.2.1 Detección de begomovirus en plantas de melón .....	20
6.2.2 Alineamiento del genoma viral de plantas que resultaron positivas a infección begomoviral .....	21
6.3 Identificación molecular del CuLCrV .....	21
6.3.1 Amplificación por círculo rodante del CuLCrV.....	21
6.3.2 Detección del genoma A y B del CuLCrV .....	22
6.3.3 Alineamiento e identificación del genoma A y B del CuLCrV.....	23
6.4 Caracterización molecular del CuLCrV .....	24

6.4.1 Identificación de los ORF's del genoma A del CuLCrV .....	24
6.4.2 Análisis comparativo de la identidad nucleotídica del CuLCrV-BCS, por componentes .....	24
6.4.3 Ensamble de sitios únicos del corte del CuLCrV-BCS.....	24
6.4.4 Análisis filogenético del CuLCrV-BCS .....	24
6.5 Identificación de eventos de recombinación.....	26
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
7.1 Zona de estudio .....	27
7.1.1 Síntomas identificados para selección de muestras a estudiar .....	28
7.2 Detección del virus causante de síntomas característicos de una infección begomoviral en cucurbitáceas.....	29
7.2.1 Detección de la presencia de begomovirus .....	29
7.2.2 Ensamble del genoma viral de plantas de melón que resultaron positivas a una infección begomoviral .....	30
7.2.3 Amplificación por círculo rodante del CuLCrV.....	30
7.2.4 Detección de los genomas A y B del CuLCrV en melón .....	31
7.3 Identificación molecular del genoma A completo e identificación parcial del genoma B del CuLCrV en melón.....	32
7.3.1 Alineamiento del genoma A y B del CuLCrV .....	32
7.3.2 Identificación del genoma A completo del CuLCrV en melón .....	33
7.3.3 Identificación parcial del genoma B del CuLCrV en melón .....	33
7.4 Caracterización molecular del CuLCrV-BCS.....	33
7.4.1 Mapeo e identificación de los ORF's del CuLCrV-BCS .....	33
7.4.2 Ensamble de sitios de corte enzimático para el CuLCrV-BCS.....	35
7.4.3 Comparación de la identidad nucleotídica CuLCrV-BCS, genoma A, por componentes .....	36
7.4.4 Distancias genéticas, dendrograma.....	38
7.5 Identificación de eventos de recombinación.....	39
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>40</b>
8.1 Identificación molecular del CuLCrV-BCS.....	40
8.2 Caracterización molecular.....	41

8.2.1 Identificación de los ORF's .....	41
8.2.2 identificación de los sitios únicos de corte enzimático .....	41
8.2.3 Análisis filogenético .....	42
8.3 Evaluación de eventos de recombinación .....	42
8.4 CuLCrV, el begomovirus causante de la enfermedad del amarillamiento de las hojas del melón en BCS.....	44
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>45</b>
<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>46</b>
<b>11. ANEXOS</b> .....	<b>59</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Organización genómica básica de los begomovirus.....	9
<b>Figura 2.</b> Hojas de calabacín ( <i>Cucurbita pepo</i> L.) con presencia de síntomas por infección con CuLCrV.....	16
<b>Figura 3.</b> Ubicación geográfica del área de estudio.....	27
<b>Figura 4.</b> Hojas de melón muestreadas en el ejido de El Pescadero, BCS, con síntomas cualitativos, asociados a una infección begomoviral.....	28
<b>Figura 5.</b> Fragmentos obtenidos por PCR, usando los oligonucleótidos universales para detección de las proteínas CP (AV494 y AC1048) e IR (PAL1v1978 y PAR1c496) de un begomovirus.....	29
<b>Figura 6.</b> Fragmentos obtenidos por ACR.....	30
<b>Figura 7.</b> Detección de fragmentos representativos a los genomas completos A y B, del CuLCrV.....	31
<b>Figura 8.</b> Productos de PCR obtenidos mediante el uso de los pares de oligonucleótidos SLCVA2295F-Xho-SLCV-R (etiqueta XF) y SLCVA2314R-Xho-SLCV-F (etiqueta XR).....	32
<b>Figura 9.</b> Organización genómica del CuLCrV-BCS, genoma A.....	34
<b>Figura 10.</b> Mapa de análisis de restricción enzimática.....	35
<b>Figura 11.</b> Análisis filogenético del CuLCrV-BCS, con respecto al genoma A de begomovirus con relación genética y geográfica, por el método de máxima verosimilitud.....	38
<b>Figura 12.</b> Análisis BootScan para identificación de eventos de recombinación.....	39

## Lista de tablas

<b>Tabla I.</b> Oligonucleótidos degenerados utilizados para detección inicial de diversas especies de begomovirus.....	21
<b>Tabla II.</b> Oligonucleótidos específicos utilizados para la detección del CuLCrV.....	22
<b>Tabla III.</b> Secuencias nucleotídicas altamente relacionadas a la secuencia de ensamble a identificar. ....	23
<b>Tabla IV.</b> Secuencias nucleotídicas utilizadas para la elaboración de un dendrograma comparativo de genomas A de begomovirus relacionados a CuLCrV-BCS.....	25
<b>Tabla V.</b> Comparación de porcentajes de identidad nucleotídica del CuLCrV-BCS con respecto al genoma A de otros begomovirus.....	36

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Importancia del melón como cultivo de interés agronómico

La planta de melón (*Cucumis melo* L.), es un organismo herbáceo y rastrero, perteneciente a la familia de las cucurbitáceas (*Cucurbitaceae*); donde también se encuentran las calabazas, los calabacines, el pepino, la sandía, el chayote y otras más, es originaria de África y Asia, y a pesar de no contarse con la ubicación precisa de plantas silvestres representativas, se cree que los inicios del cultivo del melón se dieron aproximadamente desde el año 2400 a. C. (Zapata *et al.*, 1989).

El melón tiene el tercer lugar de importancia; en el grupo de las cucurbitáceas, por la superficie de siembra que ocupa a nivel mundial (CONABIO, 2015). La producción anual global de melón es de aproximadamente 26 millones de toneladas (t); y al ser uno de los frutos con mayor demanda y valor comercial en China, este es el principal país productor al tener el 51% de la producción global total (Espinoza *et al.*, 2011; Soriano Martín *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2011).

En México el cultivo de melón es muy importante en dos sentidos, primero por la superficie de siembra invertida para la generación de divisas; pues genera aproximadamente 90 millones de dólares en producción, y el segundo, como un generador de empleos en el área de cosecha (Pacheco *et al.*, 2011). Hasta el año 2017, México tuvo un registro de producción anual de aproximadamente 605,134 t (SAGARHPA, 2018). A nivel nacional, la zona donde es mayor la producción de melón es la Comarca Lagunera; comprendida por una porción los estados de Coahuila y Durango, donde se desarrolla una producción anual de 115,000 t (SAGARPA, 2008). En Baja California Sur (BCS), la producción anual para el 2017 fue de 6,095 t, ocupando con ello el décimo sitio nacional en producción, donde la ciudad de La Paz; su cabecera municipal, fue el principal productor con 5,100 t, continuando el municipio de Comondú con 758 t y quedando en tercer lugar el municipio de Los Cabos con 236 t (SIAP, 2017).

## 1.2 Los virus, importantes fitopatógenos

El cultivo agrícola de frutos y hortalizas, día con día enfrenta nuevos retos de producción que se ven mermados por diferentes problemas entorno al ambiente donde se desarrollan (Canto *et al.*, 2009). De los anteriores, uno de los más importantes a los que se afrontan, son las enfermedades a consecuencia de un agente fitopatógeno (que incluyen a las bacterias, hongos y a los virus); es decir, aquel que genera un desajuste en el desarrollo normal del cultivo (Apablaza, 1999; Obregón, 2017). En este contexto; de acuerdo a los resultados reportados por Anderson *et al.* (2004), 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 del genoma viral para infectar al huésped; y segundo, por la abundancia y distribución de los vectores de disseminación.

Los virus son entes compuestos por ácidos nucleicos; tanto los hay de ácido desoxirribonucleico (ADN), como de los hay de ácido ribonucleico (ARN). Para ambos tipos de virus, existe una membrana o capa proteica que resguarda dicho material genético conocida como cápside, y que, en el caso específico de los virus de ARN, pueden presentarse sin ella, siendo conocidos como viroides; los cuales, hasta la fecha únicamente se han identificado en infecciones en plantas (Hull, 2002). Es importante decir que los virus solo se propagan en células vivas, de forma parasitaria y obligada, desarrollando en el huésped deficiencias fisiológicas (enfermedades) que tienden a confundirse con otros desordenes metabólicos del organismo en cuestión, y en el caso específico de los virus de plantas, tienden a ser los responsables de considerables pérdidas en la calidad, cantidad y valor comercial de los cultivos agrícolas, a nivel mundial (Brown *et al.*, 2011; Gergerich y Dolja, 2006).

Dentro del grupo de los virus de ADN que cada vez afectan a más cultivos vegetales de alto valor económico, se encuentran los begomovirus (género, *Begomovirus*) (Adams *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2020).



### **1.3 Contexto regional**

En BCS; Holguín *et al.* (2003), publicaron el primer reporte de infecciones begomovirales; aun sin caracterizar para ese entonces, que marcaron un inicio en la identificación y caracterización de infecciones de este tipo, en cultivos agrícolas de la familia de las solanáceas (*Solanaceae*) en dicha región. En años posteriores, se han documentado nuevas infecciones begomovirales; sencillas y mixtas, donde el caso más reciente es el del *Squash leaf curl virus* (SLCuV) en cultivos de cucurbitáceas (Medina-Hernández *et al.*, 2019; Vargas-Salinas *et al.*, 2019).

Con base en lo anterior, el presente trabajo busca identificar al fitopatógeno causante de síntomas presuntivamente relacionados a una infección begomoviral, en cultivos de melón de BCS, para su posterior caracterización molecular.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Geminivirus, importancia y características generales**

#### **2.1.1 Importancia general**

El primer reporte de aparición de síntomas relacionados a una muy probable infección por geminivirus data del siglo XIX, reportándose inicialmente en plantas del continente africano (Fuller, 1901; Warburg, 1894). Para inicios del año de 1990, a los geminivirus no se les consideraba un peligro potencial, por la poca información que se tenía de ellos y sus localizaciones de identificación tan remotas; e incluso, por un tiempo parecieron ser un posible modelo de estudio para evaluar el comportamiento de ciertos genes en las plantas huésped, sin embargo, rápidamente esta percepción cambio radicalmente 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 (*Geminiviridae*) forman parte de una de las familias víricas más abundantes en el mundo vegetal, por el número de virus aislados en plantas (monocotiledóneas y dicotiledóneas) (Fauquet *et al.*, 2008). Además, se les atribuye una considerable cantidad de casos de infección en cultivos agrícolas de amplio valor económico alrededor del mundo, que han mermado en gran medida las cosechas de los mismos, y generando con ello, un foco 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; Rybicki y Pietersen, 1999).

### **2.1.2 Síntomas de la enfermedad**

En una planta huésped con infección geminiviral, se pueden observar los siguientes síntomas de manera general: una reducción de crecimiento; tanto de la planta como del producto (fruto u hortaliza), un claro amarillamiento foliar y un típico enroscamiento o rizado de las hojas (Marwal *et al.*, 2014).

### **2.1.3 Morfología genómica y taxonomía**

La partícula infectiva completa de un geminivirus; o virión, está conformada por una estructura icosaédrica doble (gemela, pero no completamente simétrica), también conocida como partícula geminada. La anterior, tiene una medida aproximada; en nanómetros (nm), de 22-38 nm, con una cubierta compuesta por 110 subunidades morfológicas de proteínas; ordenadas en 22 capsómeros, que en su interior contienen la información genética del virus (genoma), la cual está integrada por una única cadena de ADN monocatenario (de cadena sencilla; ADNcs) circular de aproximadamente 2.5 kilobases (kb); en el caso de geminivirus de un solo componente (monopartitas), o bien por dos cadenas de ADNcs, con un tamaño de  $\approx$  5.2 a 5.6 kb, para geminivirus de dos componentes (bipartitas) (Hamilton *et al.*, 1983; Zerbini *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2001). Por esto último, los

geminivirus están organizados en el grupo II; con base en la clasificación de virus de Baltimore, el cual únicamente comprende virus de ADNcs (Baltimore, 1971).

#### **2.1.4 Especies en la familia *Geminiviridae***

La familia *Geminiviridae* se clasifica taxonómicamente con base al rango de infección (hospederos), los componentes de su genoma (mono o bipartita), posibles relaciones entre secuencias y a su vector de propagación (membrácidos, cicadélidos, áfidos y aleuródidos); delimitándose en la actualidad en nueve géneros: *Begomovirus*, *Becurtovirus*, *Capuavirus*, *Curtovirus*, *Grablovirus*, *Eragovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* y *Turncurtovirus*, de los cuales se derivaron; hasta el año 2019, más de 440 especies, y la cuenta se prevé siga creciendo (Brown *et al.*, 2012; Domínguez-Durán *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2019).

El género *Begomovirus*, es el que cobra mayor importancia económica, por la cantidad de cultivos agrícolas dicotiledóneos de importancia comercial afectados y por ser el género con el mayor número de especies que coexisten dentro de la familia *Geminiviridae* (Rojas *et al.*, 2005).

### **2.2 Begomovirus**

#### **2.2.1 Características básicas**

En el género *Begomovirus*; cuyo nombre se deriva de la especie *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) (Faria *et al.*, 1994; Garrido-Ramírez *et al.*, 2002), se encuentran los únicos virus de plantas cuyo genoma de ADNcs, puede estar compuesto por una estructura monopartita, o bien de forma bipartita, dentro de la familia *Geminiviridae* (Brown *et al.*, 2015); previamente descrita, y en la cual se presentan un total de 596 especies reportadas por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés), hasta el año 2020, en su base de datos.

Su vector de propagación es el insecto cosmopolita, *Bemisia tabaci* (Gennadius); coloquialmente conocida como mosquita blanca, un aleuródido (Hemíptera: Aleyrodidae), que pertenece a un complejo de especies morfológicamente indescritibles (críptico) (Castillo *et al.*, 2011; Costa, 1965; De Barro *et al.*, 2011; Gilbertson *et al.*, 2015; Gutierrez *et al.*, 2013; Lian-Sheng *et al.*, 2006). La infección es únicamente mediante el vector; es decir, circulativa y no propagativa (Bedford *et al.*, 1994; Brown y Czosnek, 2002; Ghanim *et al.*, 2007), desarrollando en el organismo huésped síntomas típicos de una infección geminiviral, entre los que destacan un moteado y amarillamiento foliar, enroscado; rizado o enchinamiento de las hojas, además de importantes retrasos en el desarrollo de las plantas y sus productos (Agrios, 2005; Chang *et al.*, 2010). Por lo anterior, los begomovirus se consideran una de las amenazas más importantes para los cultivos agrícolas de amplia cuantía comercial en todo el orbe, pero en especial en regiones tropicales y subtropicales, donde generalmente se cultivan todo tipo de solanáceas y cucurbitáceas, entre muchas otras, cuya importancia agroalimentaria es muy valorada (Kumar *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2001).

### **2.2.2 Organización genómica**

Los begomovirus bipartitas; estructurados en dos componentes de ADNcs circular, tienen la denominación de ADN-A (componente A) y ADN-B (componente B); respectivamente, donde cada componente tiene un tamaño de  $\approx$  2.6 kb a 2.8 kb, para constituir un genoma total de  $\approx$  5.2 a 5.6 kb (ICTV, 2020; Lozano *et al.*, 2016; Rybicki y Pietersen, 1999). El componente A, contiene toda la maquinaria genética para crear viriones infectivos dentro del huésped, sin embargo, carece de los componentes de movimiento que le facilitarían propagarse en el organismo huésped, los cuales son aportados por el componente B. En el caso, de los begomovirus monopartitas, toda su maquinaria vírica se encuentra en un solo componente de ADNcs de un tamaño variable de entre  $\approx$  2.7 kb a 3.0 kb (Lazarowitz, 1992).

Para ambos tipos de begomovirus; mono o bipartita, existe una región intergénica (IR, por sus siglas en inglés), de  $\approx$  300 nucleótidos (nt), que separa a las unidades de transcripción o marcos de lectura abierto (ORF's, por sus siglas en inglés). En la región IR, se resguarda una secuencia nucleotídica conservada; TAATATT/AC, la cual está presente en todas las especies de la familia *Geminiviridae* (Laufs *et al.*, 1995). Igualmente, en la IR, se localiza una secuencia de 30 nt que; dependiendo de ciertas condiciones termodinámicas, forma una horquilla basta en los nucleótidos G y C en el tallo, mientras que en el asa se conforma por una secuencia conservada de A y T, que contempla al sitio del inicio de la replicación (ori) (Fig. 1) (Seal *et al.*, 2006). Específicamente, en los begomovirus bipartitas, existe la presencia de una región común (CR, por sus siglas en inglés), que comprende una secuencia de 200 nt, la cual es idéntica únicamente entre los componentes A y B, de cada especie begomoviral (Fig. 1a) (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

### **2.2.2.1 Componente A, ORF's begomovirus bipartita**

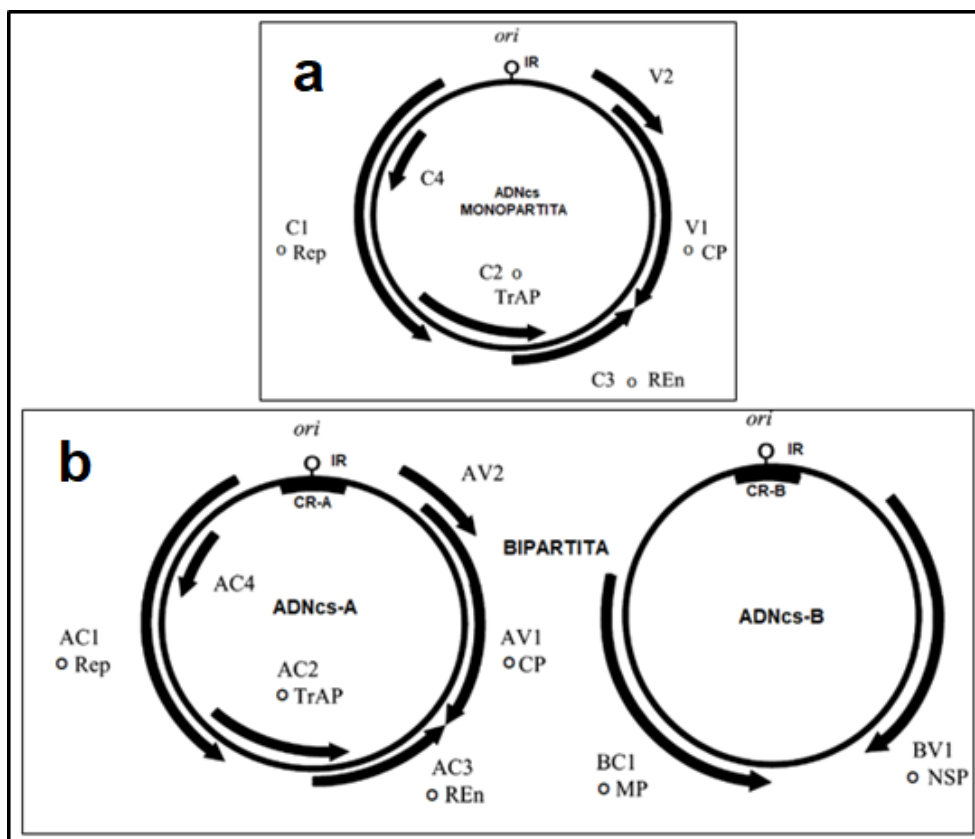
En el caso de los begomovirus bipartita, el componente A, presenta de cinco a seis ORF's con sentido bidireccional; donde cuatro son en sentido complementario (C) y uno o dos, en sentido del virión (V). Los primeros; C, están conformados por los genes AC1 (codificante de la proteína Rep; elemental para la replicación viral), AC2 (codificante de la proteína TrAP; responsable de la iniciación de la transcripción), AC3 (codificante de la proteína REn; cuya acción es potencializar la acción de Rep) y AC4 (codificante para una proteína involucrada directamente con la eficiencia de infección o patogenicidad) (Arguello-Astorga *et al.*, 2004; Bisaro, 2006; Fontes *et al.*, 1994). Los ORF's V, son representados por el gen AV1 (codificante de la proteína CP; vital para una transmisión viral exitosa del vector al huésped, pues es la encargada de la estructuración de la cápside) (Briddon *et al.*, 1990; Sunter *et al.*, 1990). En algunos casos, existe la presencia del gen AV2 en begomovirus bipartitas, la cual está involucrada en procesos del movimiento viral (Sanderfoot y Lazarowitz, 1996) (Fig. 1b).

### **2.2.2.2 Componente B, ORF's begomovirus bipartita**

El componente B es el encargado del éxito en una infección begomoviral sistémica; en el caso de los begomovirus bipartitas, y se estructura por dos ORF's. El gen BC1, que codifica para la proteína del movimiento begomoviral en las células huésped (MP, por sus siglas en inglés) y el gen BV1; que codifica para la proteína de lanzadera nuclear (NSP, por sus siglas en inglés), la cual es el vínculo de transporte entre el núcleo y el exterior; citoplasma celular, del componente viral (Noueiry *et al.*, 1994) (Fig. 1b).

### **2.2.2.3 ORF's begomovirus monopartita**

Los ORF's en el caso de un begomovirus monopartita, son prácticamente los mismos que los descritos para el componente A de un begomovirus bipartita, con la diferencia de que, en este caso, los genes de movilidad; BC1 y BV1, del componente B de un begomovirus bipartita, se encuentran englobados en el gen V2 del begomovirus monopartita (Briddon *et al.*, 2003) (Fig. 1a).



**Figura 1.** Organización genómica básica de los begomovirus. Donde a) representa el sentido de los ORF's, de un genoma begomoviral monopartita, b) representa el sentido de los ORF's, de un genoma begomoviral bipartita. Modificado de Seal *et al.*, 2006.

#### 2.2.2.4 Satélites

Existen también dos componentes auxiliares asociados a los begomovirus monopartitas; aunque muy esporádicamente también a begomovirus bipartitas, conocidos como satélites y cuya estructura es de ADNcs y de un tamaño aproximado de 1.4 kb, teniendo una denominación actual de alfa satélites y betas satélites (Bridson y Stanley, 2006; Romay *et al.*, 2010). Su asociación es del tipo promiscua, puesto que se les ha identificado en asociaciones con múltiples begomovirus en un mismo huésped, durante infecciones begomovirales mixtas (Saunders *et al.*, 2008).

Los primeros, alfa satélites, poseen los genes necesarios para su replicación, pero de forma muy similar al componente A de un begomovirus bipartita, carece de lo necesario para su desplazamiento en el huésped, por lo que generalmente se le ha identificado en una asociación parasitaria a begomovirus monopartitas, para el uso de sus genes de movilidad durante los procesos de replicación de ambos componentes (Nawaz-ul-Rehman *et al.*, 2012). Por otra parte, los beta satélites, son totalmente dependientes al organismo auxiliador, aunque por esto mismo; durante los procesos de replicación, tienden a ser más probables los eventos de recombinación entre este componente con su auxiliador (Zhou, 2013).

Su función, no es completamente clara, sin embargo, se tienen registros de su papel como potencializadores de infecciones begomovirales, estando involucrados en procesos de supresión de las defensas del huésped, mediante mecanismos de silenciamiento génico, además de jugar un papel coadyuvante en la mejora de la replicación viral y, por ende, desarrollando síntomas de infección en el huésped más agresivos a los reportados en su ausencia (Yang *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2003).

### **2.2.3 Replicación**

Los begomovirus ingresan a la planta huésped al ser transportados por su vector; *B. tabaci*, el cual los inocula en el floema de la planta durante su alimentación (Ghanim y Czosnek, 2000; Tiwari *et al.*, 2013). Luego, mediante interacciones proteínicas entre la cápside del virión y el citoplasma huésped, el virus se introduce al núcleo de la célula infectada; previamente que se separó de su cápside protectora, ingresando únicamente el ADNcs viral, dando comienzo a su multiplicación mediante el uso de la maquinaria enzimática del huésped; que incluye el uso de ADN polimerasa, ARN polimerasa II e histonas (Rana *et al.*, 2012). Con lo anterior, el virus puede prepararse para su replicación al convertirse en ADN de cadena doble (ADNcd), con el cual se forman trece nucleosomas para dar inicio a la transcripción del virus (Gutierrez, 2000).



La síntesis de las proteínas virales inicia partiendo con la proteína Rep, la cual da lugar a un proceso de duplicación de los cromosomas virales en la célula huésped, que induce la replicación de un nuevo ADN viral (Hamilton *et al.*, 1983; Preiss y Jeske, 2003). En este último proceso, también se activa la síntesis de la proteína REn, para potencializar el proceso de replicación en conjunto con la proteína Rep. Después de un tiempo Rep se une a su ORF de origen, en su región promotora, bloqueando con ello su transcripción. Con ello, se activan en cadena las proteínas TrAP, CP y NSP, respectivamente. Donde la primera; TrAP, moviliza la transcripción de CP, y esta a su vez, se da a la tarea de encapsular a los nuevos virus de ADNcs para formar nuevos viriones, mientras que NSP se encargará del traslado del ADNcs nuevo del núcleo al citoplasma celular, donde en conjunto con la proteína MP, redirigirá al virus en toda la planta huésped; es decir, desarrollará una infección sistémica (Hanley-Bowdoin, 1999; Shung y Sunter, 2007; Pooggin, 2013).

La replicación begomoviral puede llevarse a cabo de dos formas; la primera, es conocida como la replicación por círculo rodante (ACR, por sus siglas en inglés), es un tipo de replicación que inicia partiendo del ADNcd recién sintetizado, específicamente en la región IR, luego la proteína Rep da inicio a la activación de la hidrólisis y ligación de la secuencia TAATATT/AC, dando lugar a la formación de ADN lineal que sirve como molde para la síntesis de una nueva cadena (Jeske, 2001). La segunda forma se conoce como replicación dependiente de recombinación (RDR), se presenta al iniciarse la replicación begomoviral, donde moldes de ADNcs viral; incompletos, interactúan con ADNcd virales cerrados; en sitios homólogos, esto genera un proceso de recombinación homóloga que origina un tipo de horquilla-bucle, que sirve como modelo para la generación de nuevo ADN viral (Preiss y Jeske, 2003).

#### **2.2.4 Pseudorecombinación y recombinación**

Los virus se multiplican dentro del núcleo de las células de las plantas a las que infectan con el uso de su maquinaria de replicación; que incluye a diversas

proteínas y enzimas, por lo que la generación de variaciones genéticas en el ADNcs de los begomovirus es altamente probable, traduciéndose en posibles pseudorecombinaciones y recombinaciones. Aunado a lo anterior, también se debe tomar en cuenta a la creciente propagación de los begomovirus por la amplia distribución de su cosmopolita vector; *B. tabaci*, pues se ha documentado la relación directa entre estos últimos, con los cada vez más frecuentes reportes de infecciones begomovirales mixtas que, sin duda, enriquecen el material genético con el que se pueden generar nuevas recombinaciones por homología en el huésped al que infectan (Gutierrez *et al.*, 2004; Rybicki, 2000).

#### **2.2.4.1 Pseudorecombinación**

Se habla de una pseudorecombinación cuando se presenta una interacción del material genético; entre los componentes A y B de un begomovirus bipartita (en la mayoría de las veces), que se traduce en un intercambio intercromosómico. En este tipo de recombinación las proteínas que juegan el papel más importante; hasta donde se ha reportado, son REn y TrAP, además de unas entidades o zonas de la IR, poco estudiadas, conocidas como iterones (Stanley, 1985; Ramos, 2003).

Un caso muy particular de pseudorecombinación fue reportado por Chakraborty *et al.* (2003), donde se describe la evolución de un begomovirus mono partita a bipartita, por un presuntivo evento de recombinación entre su único ADNcs con el componente B, previamente alojado en la planta huésped.

#### **2.2.4.2 Recombinación**

La recombinación y la evolución begomoviral en definitiva son temas que siempre irán de la mano ya que, sin la primera, la gran diversidad de especies dentro del género *Begomovirus* que actualmente existe, no sería posible (Padidam *et al.*, 1999). Solo para hacer una breve contextualización, basta con comparar el número de especies begomovirales reportado por Zerbini *et al.* (2017), donde se documentó la existencia de poco más de 360 especies begomovirales, pero actualmente; en el año 2020, el ICTV tiene un registro con más de 590 especies

begomovirales. Lo anterior tiene base en la siguiente concepción, una recombinación se presenta cuando un fragmento nucleotídico de un begomovirus; y durante el proceso de su replicación, se une al ADNcs de otro de diferente especie o, dicho en otras palabras, la recombinación begomoviral se da cuando existe un intercambio extracromosómico (Preiss y Jeske, 2003; Seal *et al.*, 2006).

Como ejemplo de una recombinación entre los componentes A de dos begomovirus de diferente especie, Zhou *et al.* (1997), reportó la aparición de una nueva especie begomoviral en Uganda (África), producto de la recombinación entre el *African cassava mosaic virus* (ACMV) y el *East African cassava mosaic virus* (EACMV). Esto último, también aplica en el caso de los componentes  $\beta$  o beta satélites; partículas muy poco estudiadas en los begomovirus, que sirven como coadyuvantes en la replicación de los begomovirus monopartitas (Briddon *et al.*, 2001), tal y como previamente han reportado Saunders *et al.* (2001), en sus estudios en la identificación de recombinaciones entre begomovirus bipartitas y beta satélites.

### **2.2.5 Begomovirus en BCS**

Como previamente se ha descrito, las infecciones begomovirales se pueden localizar en cualquier zona donde su vector; *B. tabaci*, se encuentre y BCS no es la excepción, pues a la fecha se tienen identificados y publicados por lo menos dos casos de infecciones begomovirales sencillas en diferentes cultivos de la región, el primero fue atribuido al *Tomato chino La Paz virus* (ToChLPV) (Holguín-Peña *et al.*, 2003), y el segundo a el *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) (Holguín-Peña *et al.*, 2004). Infectado a plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y chile (*Capsicum annuum* L.).

Igualmente se han versado; por lo menos, tres casos de infecciones mixtas begomovirales en BCS, donde: el primer caso fue documentado por Cárdenas-Conejo *et al.* (2010), reportando una coinfección en plantas de chile por parte del *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y el ToChLPV. El segundo incidente, fue el

publicado por Lebsky *et al.* (2011), donde se asoció una enfermedad en plantas de tomate y chile, a una coinfección entre un fitopatógeno ajeno a la familia *Geminiviridae*, conocido como fitoplasma (*Candidatus Phytoplasma*), y un begomovirus. El tercer y más actual, es el reportado por Vargas-Salinas *et al.* (2017), donde al igual que el anterior, se documentó que la causa de una enfermedad particular en cultivos de calabacita (*Cucurbita pepo* L.), se atribuía una coinfección entre un fitoplasma y el SLCuV.

### **2.3 CuLCrV, características generales del begomovirus y de la enfermedad que desarrolla en cultivos de cucurbitáceas**

#### **2.3.1 Primera identificación y características básicas**

El virus de la hoja arrugada de cucurbitáceas, *Cucurbit leaf crumple virus* (CuLCrV), es un begomovirus bipartito que se encontró por primera vez en 1998 en el Imperial Valley; California, Estados Unidos de América (USA, por sus siglas en inglés), específicamente en cultivos de sandía (*Citrullus lunatus* L.) y posteriormente; en el verano de 1999, en cultivos de melón (Guzmán *et al.*, 2000).

Cuando fue secuenciado por primera vez, se le relacionó directamente con el *Tomato severe leaf curl virus* (ToSLCV) y el SLCuV, sin embargo, durante el análisis de identificación molecular; que incluía una comparación de la secuencia nucleotídica y un posterior análisis filogenético con respecto a otros begomovirus típicos de esa región, se demostró que si bien existía cierta correlación y parentesco, la secuencia correspondía a un nuevo begomovirus; con base en los criterios ICTV de aquel tiempo y los actuales (Brown *et al.*, 2015), el cual fue nombrado por Guzmán *et al.* (2000) como el CuLCrV.

El CuLCrV, fue catalogado presuntivamente como un recombinante o un pseudorecombinante del SLCuV; desde su primer descubrimiento, pero hasta ese momento no se obtuvieron datos contundentes para asegurar esto último (Brown *et al.*, 2002), ya que para ese entonces solo fue posible una identificación parcial del nuevo begomovirus, pues se carecía de un análisis más profundo sobre

características moleculares y filogenéticas que dieran sustento al nuevo hallazgo. No fue, hasta el año 2008, con base en los resultados reportados por Hagen *et al.* (2008a, 2008b), que se logró caracterizar a CuLCrV, como un begomovirus bipartita. Donde se reportó que la secuencia nucleotídica para su componente A era de 2,632 nt; con cinco ORF'S, mientras que el tamaño para su componente B fue de 2,600 nt; con dos ORF's. El cual al igual que los demás begomovirus de la familia *Geminiviridae*, presentó la secuencia conservada TAATATT/AC en la región IR.

Es importante mencionar que con base en lo publicado por Brown *et al.* (2002), se tiene un antecedente de identificación de un begomovirus en el estado de Arizona, E.U.A.; prácticamente similar a CuLCrV, el cual fue nombrado como *Cucurbit leaf curl virus* (CuLCV). CuLCV, fue caracterizado en dos componentes; A y B, donde A presento un tamaño de 2632 pares de bases (pb), mientras que B, presento una secuencia de 2601 pb. Actualmente este virus es reconocido por el ICTV como un aislado del CuLCrV; es decir, el mismo virus.

### **2.3.2 Síntomas de la enfermedad generada por CuLCrV**

Los síntomas de infección a causa del CuLCrV dependen del huésped al que infecta y del tiempo de vida del mismo al momento de la infección, aunque generalmente las cucurbitáceas son las más susceptibles a desarrollar síntomas, los cuales incluyen un retraso en el crecimiento de hojas y frutos, y deformación, clorosis, engrosamiento y rugosidad de las hojas, además de un moteado suave; tanto en hoja como en fruto, con variaciones de colores entre verde claro y amarillo (Fig. 2) (Hagen *et al.*, 2008a).



**Figura 2.** Hojas de calabacín (*Cucurbita pepo* L.) con presencia de síntomas por infección con CuLCrV. Se observa una corrugación de las hojas y un suave moteado en su coloración (Webb *et al.*, 2008).

#### **2.4 Eventos de infección por CuLCrV reportados**

Desde 1998; cuando se detectó por primera vez la presencia del CuLCrV, hasta la fecha, únicamente se han reportado casos de infección por CuLCrV en América del norte, donde los países afectados han sido USA (California, Arizona, Texas, Florida y Georgia) y México (Coahuila) (Hagen *et al.*, 2008a; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Los anteriores, han sido principalmente en cultivos de calabazas, sandía, melón (cucurbitáceas), pero también se han documentado casos de infección en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.); una leguminosa, en el condado de Hendry (Florida, USA) en diciembre de 2007 y febrero de 2008 (Akad *et al.*, 2008). Este último reporte, nos da una idea de la plasticidad genómica del CuLCrV para adaptarse a nuevos huéspedes; y no exclusivamente a cucurbitáceas, por posibles eventos de recombinación, como lo documentan los resultados publicados por Domínguez-Durán *et al.* (2018), al inferir en una posible pseudorecombinación del CuLCrV con del SLCuV.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

En BCS, se ha detectado la presencia de síntomas presuntamente relacionados a una infección begomoviral en hojas de melón, entre los que destacan una evidente clorosis, rugosidad y enchinamiento de sus hojas, además de existir la presencia de mosquita blanca en dicho cultivo. La sospecha anterior es con base en el historial de infecciones begomovirales previamente reportadas en el estado, por ende, surge la necesidad de esclarecer si dicha afección corresponde propiamente a una infección begomoviral previamente reportada, o una nueva, pues una vez identificado y caracterizado el virus, nos podrá brindar información importante sobre su estructura genómica para identificar un posible origen y relación de recombinación con begomovirus reportados en BCS; o fuera del estado, que ampliaría los registros de infecciones en la región, para futuras identificaciones tempranas del patógeno.

### **4. HIPÓTESIS**

La enfermedad que ocasiona un amarillamiento y enchinamiento de las hojas del melón es causada por un agente begomoviral, debido a los síntomas observados y a la presencia del vector; *B. tabaci*, en cultivos de melón de BCS. Por ende, una vez identificado el fitopatógeno, se dilucidarán sus características genómicas para inferir sobre sus posibles ancestros, su posición filogenética con otros begomovirus en BCS; e identificar con ello, un posible evento de recombinación.

### **5. OBJETIVOS**

#### **5.1 Objetivo general**

Identificar y caracterizar molecularmente al virus responsable del amarillamiento y enchinamiento de las hojas de melón en muestras de BCS.

#### **5.2 Objetivos específicos**

Objetivo 1. Identificar molecularmente al virus causante del amarillamiento y enchinamiento de las hojas de melón en muestras de BCS.

Objetivo 2. Caracterizar el genoma del virus identificado con herramientas de la biología molecular y de la bioinformática.

Objetivo 3. Evaluar un posible evento de recombinación entre el begomovirus identificado y begomovirus relacionados al mismo; geográfica y genéticamente.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Zona de estudio, colecta y manejo de muestras**

Las muestras se recolectaron en la zona sur del estado de BCS, el 23 de junio del 2015, en un campo de cultivo comercial de melón establecido a campo abierto en El Pescadero; un pequeño ejido en el municipio de La Paz, ubicado en las coordenadas geográficas 23°22'40.83"N, 110°11'12.20"O.

Se tomaron muestras de plantas de melón que mostraron los síntomas característicos a una infección begomoviral en cucurbitáceas, aunado a la presencia de mosquita blanca en sus alrededores. Los criterios de selección de muestras se basaron en la detección de síntomas como: amarillamiento de hojas, retraso generalizado del crecimiento, deformación de las hojas, rugosidad foliar y malformación de frutos. Se obtuvieron muestras de hojas de las plantas de melón que cumplían con el criterio anterior; además de muestras de plantas asintomáticas o sanas, principalmente de hojas próximas al meristemo apical, se recolectaron 30 muestras. Cada muestra fue colocada en un tubo Eppendorf de 2 mL con etanol al 70%, debidamente etiquetado. Los tubos se trasladaron al laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.(CIBNOR) en una hielera, para almacenarse a 4°C y procesarse posteriormente.

#### **6.1.1 Extracción de ADN genómico total de plantas de melón**

Se realizó la extracción de ADN genómico (ADNg) del tejido de plantas de melón sintomáticas y asintomáticas colectadas, por medio del método CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) diseñado por Doyle (1991), y modificado por Monsanto



Biotechnology Regulatory Sciences (2004), con sus respectivos ajustes indicados a continuación. Es importante aclarar que el siguiente procedimiento fue para cada una de las muestras colectadas, usando material previamente esterilizado.

Se colocaron aproximadamente 50 mg de tejido vegetal de interés en un mortero y se pulverizaron con ayuda de nitrógeno líquido. Lo anterior se transfirió a un tubo eppendorf. Se añadieron 500  $\mu$ L de buffer CTAB (10 g CTAB, 50 mL de Tris HCl 1 M pH 8.0, 20 mL EDTA 0.05 M pH 8.0, 140 mL NaCl 5 M y 290 mL H<sub>2</sub>O), 10  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, USA) y 1.5  $\mu$ L de Proteinasa K (Thermo Scientific, USA). Se agitó e incubó la muestra en agua a 55°C por una hora. Luego se añadieron 1.5  $\mu$ L de ARNasas (Thermo Scientific, USA), se agitaron e incubaron a 37°C por quince minutos. Se añadieron 500  $\mu$ L de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1 (Sigma-Aldrich, USA). Se centrifugo la muestra a 12,000 RCF (fuerza centrífuga relativa) por siete minutos y se transfirió la fase acuosa o sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo, al que se le añadieron 0.08 vol. de acetato de amonio 7.5 M y 0.58 vol. de isopropanol a 20°C, se agitó e incubo a -20 °C toda la noche. Luego; el tubo con su contenido, se centrifugo por tres minutos a 12,000 RCF, se descartó el sobrenadante, y se lavó la pastilla obtenida con 700  $\mu$ L de etanol al 70%, se centrifugó por un minuto a 12,000 RCF, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet por quince minutos. Para finalizar se resuspendió la pastilla en 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada estéril y se almacenó a -20°C.

### **6.1.2 Evaluación de la integridad del ADNg y visualización de los productos obtenidos**

Para medir la concentración del ADNg y su pureza, se llevó a cabo la cuantificación de los productos obtenidos con el uso de un espectrofotómetro, NanoDrop One (Thermo Fisher, USA). Por otro lado, para la visualización del ADNg obtenido; como para la visualización de posteriores productos obtenidos a partir del mismo, se usó la técnica de electroforesis unidireccional; con ayuda de una cámara de electroforesis y su respectiva fuente de poder (Bio-Rad, USA), en

una matriz de agarosa al 1% (Sigma-Aldrich, USA); bajo las siguientes condiciones de corrida: 70 volts, por una hora en una solución amortiguadora TAE 1X (Tris-HCl). Para lo anterior, los productos a visualizarse previamente se tiñeron con el intercalante de ácidos nucleicos SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher, USA); con base en las instrucciones del fabricante, como marcador de peso molecular se usó 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher, USA). Por último, para documentar la técnica de electroforesis se usó un foto-documentador BioDoc-It (UVP, USA).

## **6.2 Detección del virus causante de la enfermedad que ocasiona un amarillamiento y enchinamiento de las hojas del melón**

### **6.2.1 Detección de begomovirus en plantas de melón**

Se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, punto final o convencional (PCR, por sus siglas en inglés); usando el ADN<sub>g</sub> obtenido de las plantas muestreadas, usando los pares de oligonucleótidos degenerados o de amplio espectro, diseñados por Rojas *et al.* (1993): PAL1v1978- PAR1c496 y los primers AV494-AC1048, diseñados por Wyatt y Brown (1996), (Tabla I). El primer par amplifica una región conservada en diferentes begomovirus que codifican para la proteína IR, amplificando un fragmento de 1.4 kb para begomovirus monopartitas o un fragmento de 1.1 kb en el caso de ser un begomovirus bipartita. La detección de la proteína CP, se llevó a cabo usando a los oligonucleótidos AV494 y AC1048 (Tabla I); alineados a la región conservada del gen que codifica esta proteína, amplificando un fragmento de 550 pb. Los productos obtenidos se enviaron a secuenciar por el método de Sanger (GENEWIZ, USA).

**Tabla I.** Oligonucleótidos degenerados utilizados para detección inicial de diversas especies de begomovirus.

Oligonucleótidos	Región del genoma a amplificar	Fragmento esperado en pb	Temperatura de alineación en °C	Referencia
PAR1c496	CR y AC1	≈1100	55	Rojas <i>et al.</i> , 1993
PAL1v1978				
AC1048	AV1	≈550	60	Wyatt y Brown, 1996
AV494				

### 6.2.2 Alineamiento del genoma viral de plantas que resultaron positivas a infección begomoviral

Después de obtener los resultados de la secuenciación de los productos de PCR con los oligonucleótidos degenerados, estos se depuraron (limpieza y selección de secuencias sin perturbaciones) mediante el software informático MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016), posteriormente se analizaron mediante un análisis de alineamiento local (BLAST, por sus siglas en inglés) (Lobo, 2008) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés).

## 6.3 Identificación molecular del CuLCrV

### 6.3.1 Amplificación por círculo rodante del CuLCrV

Las muestras que se identificaron como positivas a una infección begomoviral; específicamente aquellas con alto porcentaje de identidad para CuLCrV, fueron seleccionadas, para que partiendo del ADNg de estas últimas se realizara la técnica de ACR, con base en las instrucciones del fabricante, usando el kit comercial TempliPhi GE Healthcare (Merck, Alemania) que utiliza la ADN

polimerasa del bacteriófago Phi29 para amplificar exponencialmente ADN circular; correspondiente en nuestro caso al ADN de un begomovirus.

### 6.3.2 Detección del genoma A y B del CuLCrV

Partiendo del producto de ACR obtenido y usando oligonucleótidos específicos para CuLCrV; diseñados por Hagen *et al.* (2008), para la identificación del genoma A y genoma B, se realizó la detección de los fragmentos correspondientes mediante el uso de la técnica de PCR con los cebadores CuLCrVA-*EcoRI*-V y CuLCrVA-*EcoRI*-C; para el genoma A, y CuLCrVB-*ApaI*-V y CuLCrVB-*ApaI*-C para el genoma B (Tabla II). El tamaño del fragmento esperado para cada componente o genoma es de aproximadamente 2.6 kb. Lo anterior, usando como templado, los productos de ACR previamente sintetizados. Además, para complementar lo anterior; es decir, tener fragmentos de PCR que ayuden a la caracterización completa del CuLCrV, también se usaron los primers SLCVA2295F-*Xho*-SLCV-R y SLCVA2314R-*Xho*-SLCV-F (Lapidot *et al.*, 2014); cebadores diseñados para la identificación de regiones parciales de las proteínas Rep, REn y TrAP. Los productos obtenidos se enviaron a secuenciar.

**Tabla II.** Oligonucleótidos específicos utilizados para la detección del CuLCrV.

Oligonucleótidos	Región del genoma a amplificar	Fragmento esperado en pb	Temperatura de alineación en °C	Referencia
CuLCrVA- <i>EcoRI</i> -V CuLCrVA- <i>EcoRI</i> -C	Genoma A, CuLCrV	≈2600	51	Hagen <i>et al.</i> , 2008
CuLCrVB- <i>ApaI</i> -V CuLCrVB- <i>ApaI</i> -C	Genoma B, CuLCrV	≈2600	51	
SLCVA2295F <i>Xho</i> -SLCVR	Complementario a AC1, AC3	≈1500	55	Lapidot <i>et al.</i> , 2014
SLCVA2314R <i>Xho</i> -SLCVF	Complementario a AC2, AV1	≈1300	55	

### 6.3.3 Alineamiento e identificación del genoma A y B del CuLCrV

Todas las secuencias obtenidas del proceso de secuenciación fueron depuradas (limpiadas); es decir, se eliminaron regiones de mala calidad, secuencias transponibles, y se confirmaron; cuando era posible, los nucleótidos identificados con base en su electroferograma. Posteriormente, se procedió a la alineación de las secuencias; tanto de la cadena sentido, como de la cadena anti sentido, para obtener una secuencia consenso; es decir, realizar el correcto alineamiento de las secuencias para proceder a su ensamblaje. En nuestro caso, usando como secuencia de referencia a la secuencia del CuLCrV; aislado en Arizona (USA), para ambos genomas; A y B (Número de acceso GenBank: AF256200.4 y AF327559.1, respectivamente), el cual fue el que mayor porcentaje de identidad presentó con nuestra secuencia en análisis preliminares, empleando el software bioinformático MEGA 7 y para la comparación de secuencias se realizó un análisis por BLAST.

Posterior a lo anterior, sólo se procedió a trabajar con la secuencia completa de ADN-A obtenida, la cual se alineo con dos aislados con mayor relación nucleotídica obtenida al CuLCrV aislado en BCS (Tabla III) utilizando el algoritmo Clustal W implementado en MEGA7.

La identificación del virus se realizó con base en la secuencia de ADN-A, comparando porcentajes de identidad nucleotídica, siguiendo los criterios de demarcación para nuevas especies o variantes del ICTV (Brown *et al.*, 2015).

**Tabla III.** Secuencias nucleotídicas altamente relacionadas a la secuencia de ensamble a identificar. Con Datos proporcionados por el ICTV.

Aislados del CuLCrV con mayor identidad	Número de acceso GenBank ADN-A
<i>Cucurbit leaf crumple virus</i> - Arizona	AF256200.4
<i>Cucurbit leaf crumple virus</i> - California	AF224760.2

## **6.4 Caracterización molecular del CuLCrV**

### **6.4.1 Identificación de los ORF's del genoma A del CuLCrV**

Para ensamblar el genoma A del CuLCrV identificado; que a partir de ahora será denominado CuLCrV-BCS, e identificar sus ORF's, se utilizó el software bioinformático Geneious; versión R10.2.6. Los ORF's identificados se confirmaron con el uso de la plataforma virtual del NCBI, ORFfinder.

### **6.4.2 Análisis comparativo de la identidad nucleotídica del CuLCrV-BCS, por componentes**

Ya identificados los ORF's del CuLCrV-BCS, estos se compararon con los de otros begomovirus indicados en la Tabla IV, con la finalidad de identificar similitud nucleotídica, o bien, divergencias que pudieran relacionarse con posibles eventos de recombinación.

### **6.4.3 Ensamble de sitios únicos del corte del CuLCrV-BCS**

Una vez que la secuencia consenso; obtenida tras su proceso de ensamblaje final, fue completada y comparada con los virus de mayor identidad representativa; con base en los datos del GenBank, e identificados los ORF's del CuLCrV-BCS, se procedió a generar un mapa gráfico, donde se indicaron los sitios de cortes únicos para el ADN del componente A, con ayuda del software de plásmidos ApE, v2.0.55 (Wayne-Davis, 2019).

### **6.4.4 Análisis filogenético del CuLCrV-BCS**

Se llevó a cabo el análisis de distancias genéticas con la secuencia del CuLCrV-BCS obtenida, con respecto a las secuencias con las que presentó mayor similitud; con base en el análisis BLAST previamente realizado, además también se comparó a CuLCrV-BCS con la secuencia de otros begomovirus que afectan a cucurbitáceas y solanáceas y, con las secuencias de otros begomovirus reportados en el estado de BCS (Tabla IV).

El análisis se realizó mediante un alineamiento múltiple de las secuencias completas del genoma A de cada uno de los aislados indicados en la Tabla IV, con ayuda algoritmo Clustal W, y posteriormente se realizó un análisis de evolución nucleotídica; árbol filogenético o dendrograma, con el software bioinformático MEGA, por medio del método estadístico de máxima verosimilitud.

**Tabla IV.** Secuencias nucleotídicas utilizadas para la elaboración de un dendrograma comparativo de genomas A de begomovirus relacionados a CuLCrV-BCS. Datos proporcionados por el ICTV.

<b>Begomovirus</b>	<b>Acrónimo</b>	<b>Numero de acceso, GenBank</b>
<i>Cucurbit leaf crumple virus</i>	CuLCrV	AF256200
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i>	EuYMV	JX415191
<i>Abutilon mosaic virus</i>	AbMV	X15983
<i>Bean calico mosaic virus</i>	BChV	AF110189
<i>Bean leaf crumple virus</i>	BLCrV	KX857725
<i>Bean yellow mosaic Mexico virus</i>	BYMMxV	FJ944023
<i>Cabbage leaf curl virus</i>	CabLCV	U65529
<i>Tomato chino La Paz virus</i>	ToChLPV	AY339618
<i>Cotton leaf crumple virus</i>	CLCrV	AF480940
<i>Pepper golden mosaic virus</i>	PepGMV	U57457
<i>Squash leaf curl virus, [MX-BCS-La Paz-16]</i>	SLCuV	MF187211
<i>Squash mild leaf curl virus</i>	SMLCuV	AF421552
<i>Melon chlorotic leaf curl virus</i>	MCLCuV	AY064391
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	TYLCV	AJ489258

### **6.5 Identificación de eventos de recombinación**

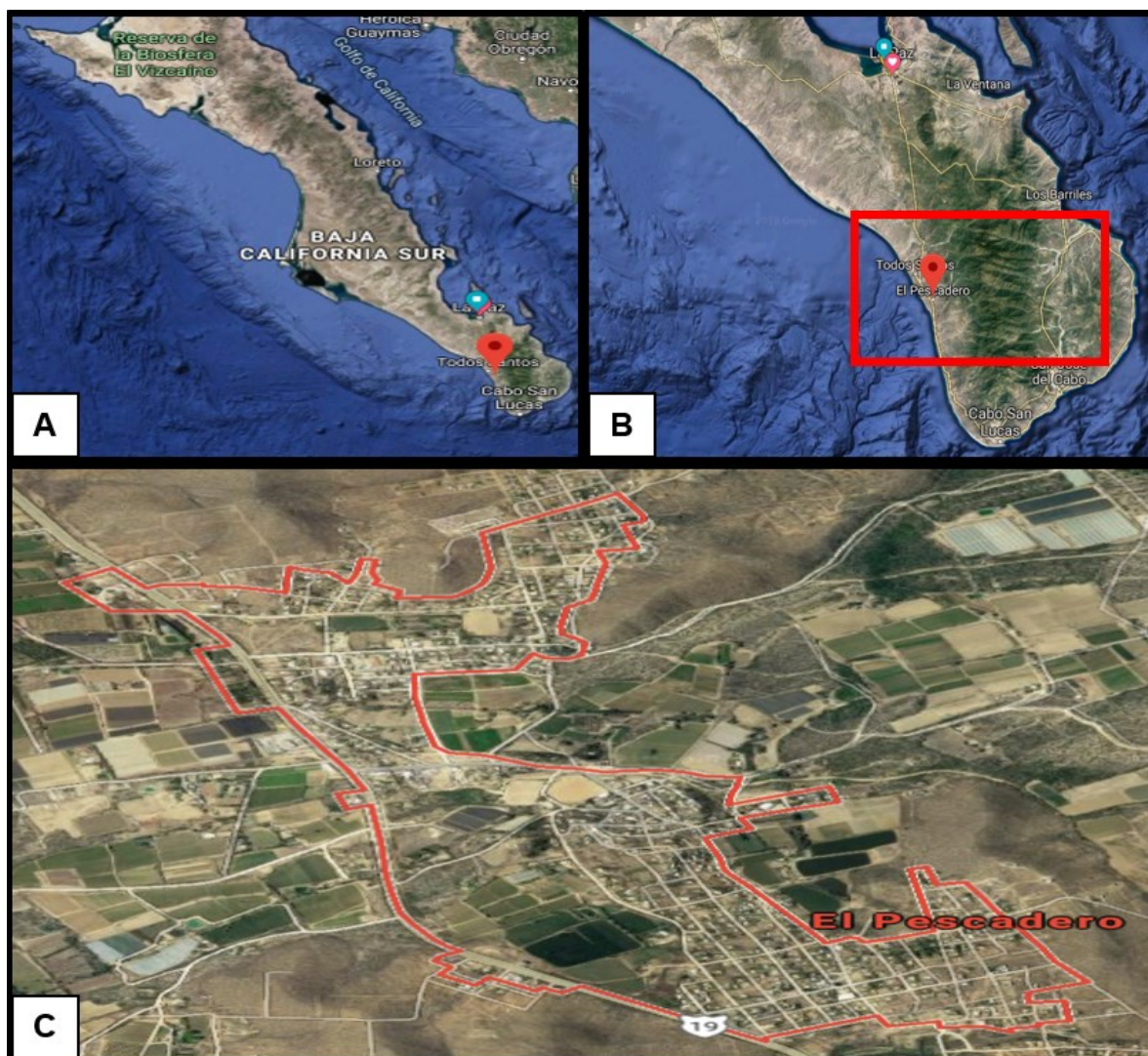
Para identificar posibles eventos de recombinación de nuestra secuencia ensamblada, se utilizó la información de las secuencias de la Tabla IV. Lo anterior con el uso del software RDP4 (Martin *et al.*, 2015); usando específicamente el algoritmo BootScan, que permite diferenciar entre una recombinación y/o la reorganización del segmento del genoma evaluado.



## 7. RESULTADOS

### 7.1 Zona de estudio

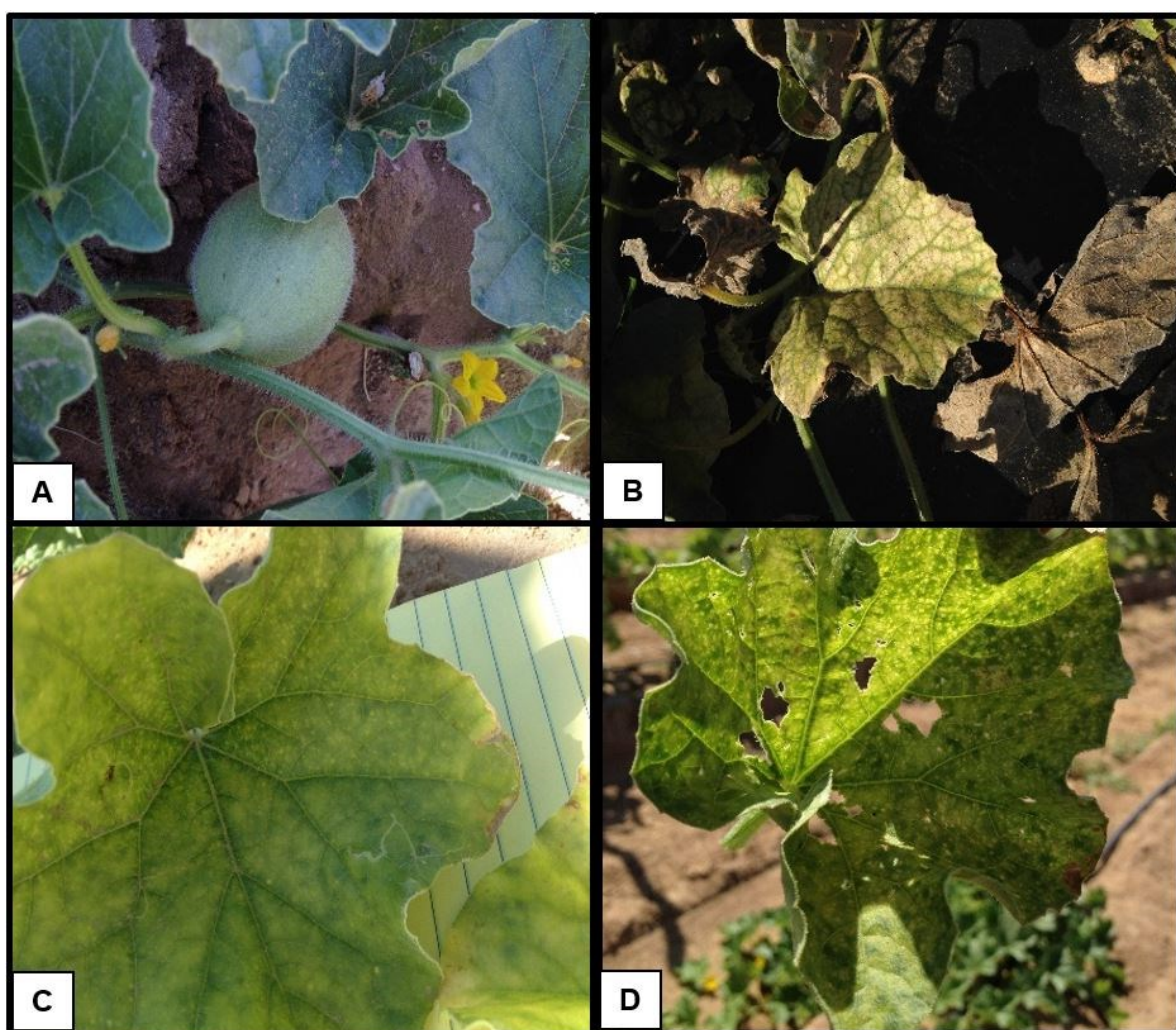
La colecta de muestras para la identificación del agente causal de síntomas presuntamente relacionados a una infección begomoviral en hojas de melón, se llevó a cabo en un campo de cultivo a cielo abierto, en el poblado de El Pescadero, La Paz, BCS (Fig. 3).



**Figura 3.** Ubicación geográfica del área de estudio. Donde, A) Representa al estado de BCS, México, B) Muestra la ubicación los ejidos de Todo Santos y El Pescadero, del municipio de La Paz, BCS y C) Delimita la zona de cultivo del ejido de El Pescadero, ubicado en las coordenadas geográficas  $23^{\circ}22'40.83''N$ ,  $110^{\circ}11'12.20''O$ . Imágenes proporcionadas por Google Maps.

### 7.1.1 Síntomas identificados para selección de muestras a estudiar

Mediante un análisis visual (cualitativo), se identificaron en las hojas de un cultivo de melón del ejido de El Pescadero, BCS, síntomas característicos de una infección begomoviral (Fig. 4), donde los cuadrantes B, C y D coinciden en mostrar un moteado amarillo generalizado. El cuadrante D muestra deformación y enchinamiento de la hoja, mientras que en el cuadrante B se muestra clorosis avanzada. El cuadrante A, sirve como control de hojas teóricamente sanas de la planta del melón.

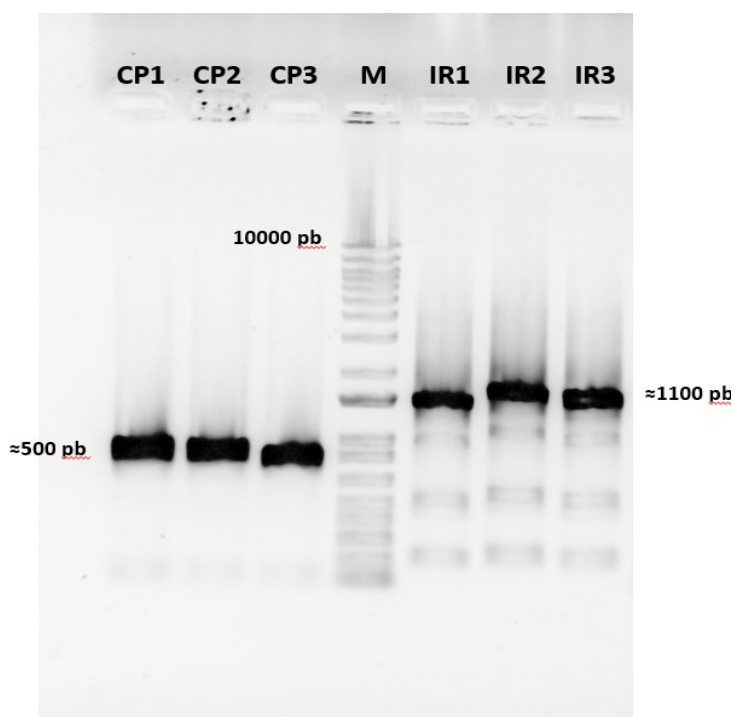


**Figura 4.** Hojas de melón muestreadas en el ejido de El Pescadero, BCS, con síntomas cualitativos, asociados a una infección begomoviral (Cortesía de Máyla Vargas).

## 7.2 Detección del virus causante de síntomas característicos de una infección begomoviral en cucurbitáceas

### 7.2.1 Detección de la presencia de begomovirus

Al ADNg extraído de las hojas de plantas de melón con síntomas presumibles de una infección begomoviral, se le realizó una PCR correspondiente para la detección preliminar de una infección begomoviral con los oligonucleótidos de las proteínas CP e IR, obteniéndose amplificaciones de aproximadamente 550 pb y 1100 pb; respectivamente, como se observa Fig. 5.



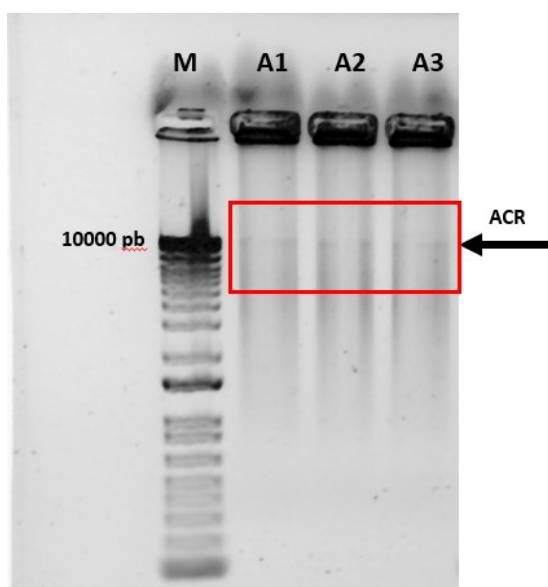
**Figura 5.** Fragmentos obtenidos por PCR, usando los oligonucleótidos universales para detección de las proteínas CP (AV494 y AC1048) e IR (PAL1v1978 y PAR1c496) de un begomovirus. Donde M representa al marcador de peso molecular; en pares de bases (pb), y los carriles CP e IR; más su numeral, corresponden a las proteínas antes mencionados y al número de muestra evaluada respectivamente.

### 7.2.2 Ensamble del genoma viral de plantas de melón que resultaron positivas a una infección begomoviral

Con las secuencias nucleotídicas obtenidas de los fragmentos correspondientes a las proteínas CP e IR por análisis de secuenciación; depuradas y analizadas, se detectó que las regiones previamente mencionadas tenían un alto porcentaje de identidad (> 95 %) con el begomovirus bipartita CuLCrV.

### 7.2.3 Amplificación por círculo rodante del CuLCrV

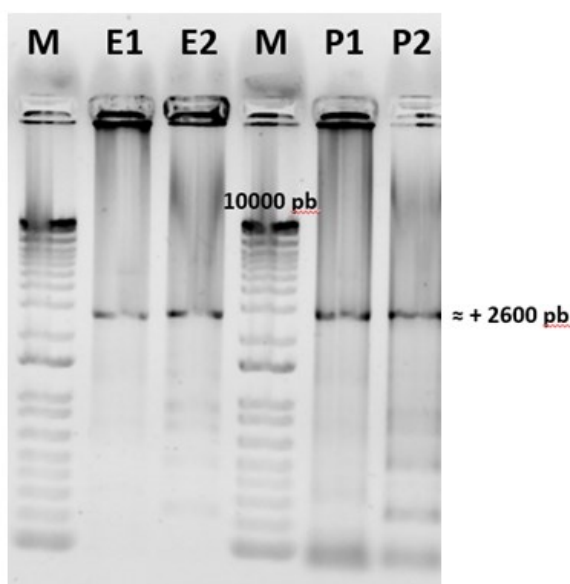
Los productos obtenidos por el uso de la técnica de ACR; partiendo de las muestras de ADNg positivas en la detección de begomovirus, son mostrados en la Fig. 6.



**Figura 6.** Fragmentos obtenidos por ACR. Donde M representa al marcador de peso molecular; en pares de bases (pb), y los carriles A1, A2 y A3 corresponden a presuntivos genomas begomovirales completos y al número de muestra evaluada respectivamente.

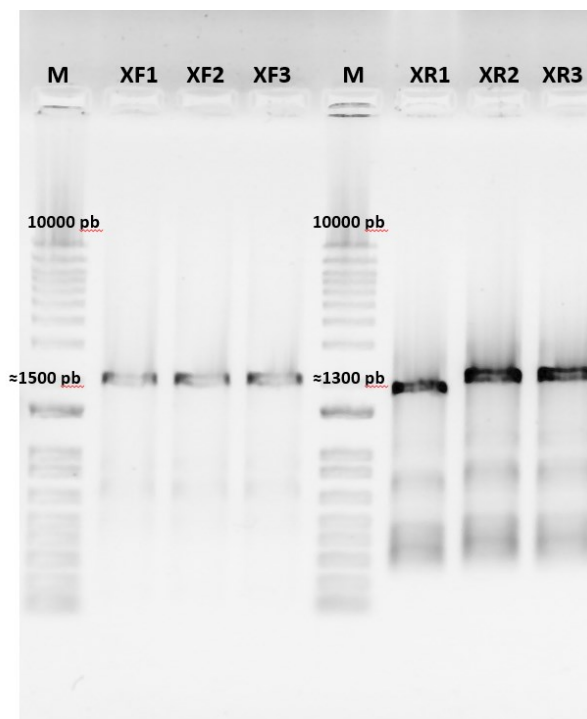
#### 7.2.4 Detección de los genomas A y B del CuLCrV en melón

Se muestran los productos de PCR de los genomas completos; A y B del CuLCrV, a partir de los productos de ACR obtenidos anteriormente. Observándose los fragmentos de las secuencias correspondientes, cuyo tamaño aproximado fue de 2.6 kb para cada uno, como se puede ver en la Fig. 7.



**Figura 7.** Detección de fragmentos representativos a los genomas completos A y B, del CuLCrV. Donde M representa al marcador de peso molecular; en pb, los carriles con la letra E; y su respectivo numeral, corresponden a una amplificación del genoma A, y los carriles con la letra P; y su respectivo numeral, corresponden a una amplificación del Genoma B.

También se muestran los productos de la amplificación por PCR para la identificación de regiones parciales de las proteínas Rep, REn y TrAP, del begomovirus SLCuV, que también son homologas a otros begomovirus como el CuLCrV (Fig. 8), para con ello obtener mediante el resultado de la secuenciación Sanger los fragmentos que nos permitieron el ensamble completo del genoma A del CuLCrV en melón de BCS.



**Figura 8.** Productos de PCR obtenidos mediante el uso de los pares de oligonucleótidos SLCVA2295F-*Xho*-SLCV-R (etiqueta XF) y SLCVA2314R-*Xho*-SLCV-F (etiqueta XR). Donde M representa al marcador de peso molecular; en pb.

### 7.3 Identificación molecular del genoma A completo e identificación parcial del genoma B del CuLCrV en melón

#### 7.3.1 Alineamiento del genoma A y B del CuLCrV

Todas las secuencias nucleotídicas obtenidas como resultado de la secuenciación; con oligonucleótidos de las proteínas CP e IR, como los posteriores; genomas completos y parciales, fueron depuradas y ensambladas, como se describe en la metodología, dando como resultado una secuencia de 2650 nt, correspondiente al genoma A del CuLCrV; denominado CuLCrV-BCS (Anexo A).

Para el caso del genoma B del CuLCrV, únicamente se logró obtener una secuencia depurada de 887 nt (Anexo B).

### **7.3.2 Identificación del genoma A completo del CuLCrV en melón**

Posterior al alineamiento del genoma A del CuLCrV, se identificó que el mayor porcentaje de identidad nucleotídica de la secuencia ensamblada; CuLCrV-BCS, fue exactamente del 92.28%, tanto con el CuLCrV; aislado en California (USA), como con el CuLCrV; aislado en Arizona (USA), seguido por un porcentaje de identidad variable de entre un 87.54% y un 87.17% con diferentes aislados del SLCuV.

Con estos resultados, y con base en los criterios del ICTV (Brown *et al.*, 2015), la secuencia obtenida e identificada en el presente trabajo: CuLCrV-BCS, al poseer un porcentaje de identidad >91% y <94% con respecto al CuLCrV; aislado en Arizona (USA), se identifica y clasifica como una variante del mismo.

### **7.3.3 Identificación parcial del genoma B del CuLCrV en melón**

Como puede observarse en la Fig. 8, con base en los oligonucleótidos para la amplificación completa del genoma B del CuLCrV, se obtuvo un fragmento correspondiente al tamaño esperado para el genoma B de  $\approx 2600$  pb (Hagen *et al.*, 2008a). Sin embargo, con la secuencia recibida; tras haberse realizado una secuenciación de la misma, únicamente nos permitió depurar y ensamblar 887 nt del genoma B, la cual presentó un porcentaje de identidad del 92.33% con respecto a su similar el CuLCrV; aislado en Arizona (USA), componente B.

## **7.4 Caracterización molecular del CuLCrV-BCS**

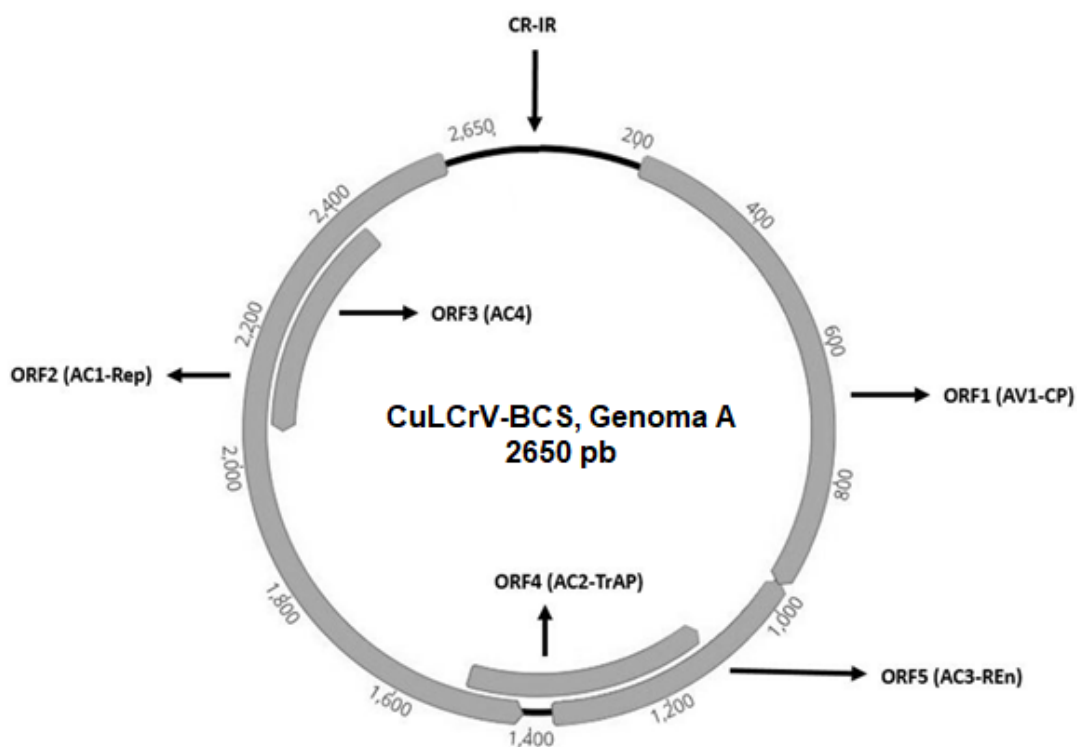
Es importante aclarar que para fines de una caracterización molecular de los virus pertenecientes a la familia *Geminiviridae*; y específicamente en el caso de los virus bipartitas, únicamente se requiere de la identificación del genoma completo del componente A. Lo anterior bajo los criterios del ICTV (Brown *et al.*, 2015).

### **7.4.1 Mapeo e identificación de los ORF's del CuLCrV-BCS**

Partiendo de la secuencia nucleotídica ensamblada para CuLCrV-BCS; de 2650 pb, se procedió a su análisis y mapeo (diagrama circular del genoma) mediante la

herramienta Find ORF's del software bioinformático Geneious; versión R10.2.6, identificándose cinco ORF's; lo anterior fue confirmado por medio de la plataforma bioinformática ORFfinder, del NCBI (Fig. 9).

Los ORF's identificados presentaron las siguientes longitudes nucleotídicas por componentes: AV1: 750 nt; entre los nucleótidos 217 al 966, sentido río arriba. AC1: 1161 nt; entre los nucleótidos 1410 al 2570, sentido río abajo. AC4: participa en conjunto a AC1, con 366 nt; entre los nucleótidos 2051 al 2416, sentido río abajo. AC2: 396 nt; entre los nucleótidos 1108 al 1503, sentido río abajo. AC3: 405 nt; entre los nucleótidos 963 al 1367, sentido río abajo. Además, también se realizó la identificación de la CR y la IR, del genoma A del CuLCrV-BCS. Todo anterior se muestra en la Fig. 9.

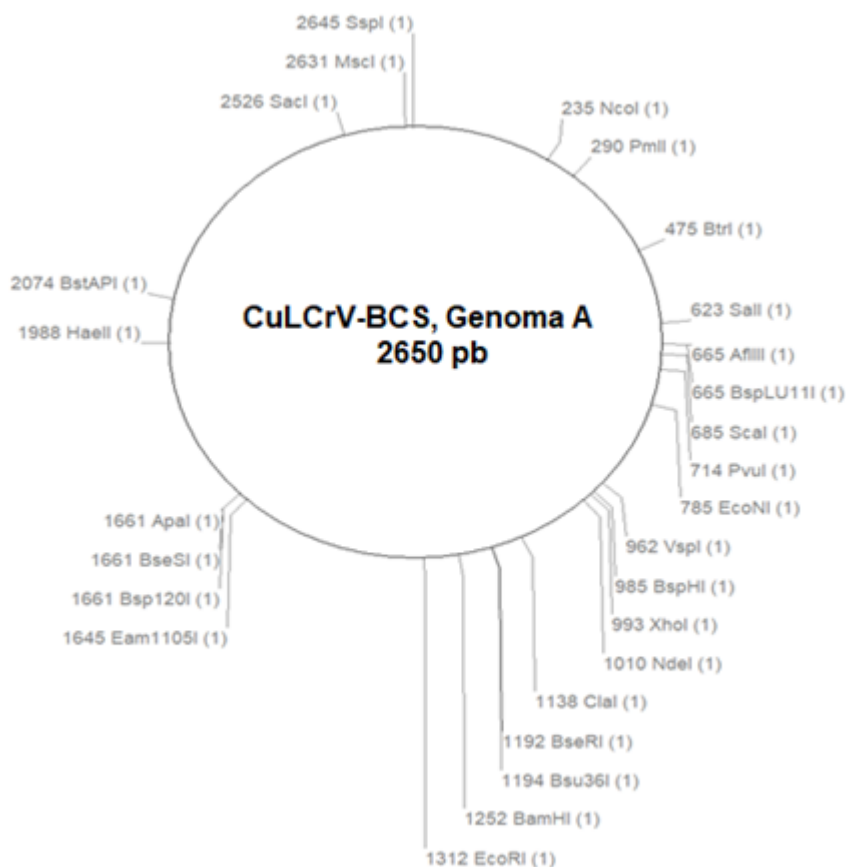


**Figura 9.** Organización genómica del CuLCrV-BCS, genoma A. Se muestran la localización de sus cinco ORF's; y su dirección, la ubicación de la CR y la IR. Los anteriores, identificados mediante análisis bioinformáticos y el uso del software Geneious; versión R10.2.6.



### 7.4.2 Ensamble de sitios de corte enzimático para el CuLCrV-BCS

Mediante el programa bioinformático ApE, y con el uso de la secuencia nucleotídica del CuLCrV-BCS, genoma A, se identificaron los sitios de corte enzimáticos para el mismo, Fig. 10. En dicha figura se muestran los sitios de corte, identificándose 27 en total; y 21 sitios de corte únicos, indicándose la enzima recomendada para ello y el sitio (en pb) donde se realizaría dicho corte.



**Figura 10.** Mapa de análisis de restricción enzimática. Se indican los sitios de cortes enzimáticos únicos para el CuLCrV-BCS, genoma A. El programa para su elaboración fue ApE, v2.0.55.

### 7.4.3 Comparación de la identidad nucleotídica CuLCrV-BCS, genoma A, por componentes

Se realizó una comparación nucleotídica del CuLCrV-BCS y de sus ORF'S con respecto al genoma A de otros begomovirus reportados previamente con identidad nucleotídica similar a CuLCrV (Hagen *et al.*, 2008a; Brown *et al.*, 2002), también se comparó contra begomovirus previamente reportados en BCS, tal y como puede observarse en la Tabla V. Lo anterior fue por medio de la plataforma de análisis de BLAST. Es importante aclarar que los begomovirus comparados se encuentran disponibles tanto en la base de datos del NCBI como en la del ICTV.

**Tabla V.** Comparación de porcentajes de identidad nucleotídica del CuLCrV-BCS con respecto al genoma A de otros begomovirus.

Begomovirus	Numero de acceso, GenBank, ADN-A	ADN-A	AV1	AC1	AC2	AC3	AC4
CuLCrV	AF256200	<b>92.28%</b>	<b>98.00%</b>	<b>93.76%</b>	80.92%	83.01%	<b>98%</b>
AbMV	X15983	77.38%	79.76%	77.62%	73.30%	77.69%	SD
EuYMV	JX415191	81.03%	83.27%	80.41%	81.36%	81.80%	SD
BChV	AF110189	81.08%	83.33%	80.49%	81.54%	80.70%	83.38%
BLCrV	KX857725	81.05%	82.96%	82.68%	81.98%	81.70%	87.36%
BYMMxV	FJ944023	77.47%	80.69%	76.30%	79.84%	78.45%	SD
CabLCV	U65529	79.69%	83.47%	84.48%	78.39%	78.05%	84.97%
ToChLPV	AY339618	77.33%	76.72%	79.43%	76.38%	79.45%	SD
CLCrV	AF480940	76.24%	79.39%	76.43%	73.01%	75.44%	SD
PepGMV	U57457	77.58%	82.93%	76.56%	78.03%	78.30%	SD
SLCuV	MF187211	86.95%	86.02%	88.97%	<b>99.49%</b>	<b>97.78%</b>	86.81%

SMLCuV	AF421552	84.47%	<b>88.62%</b>	86.87%	85.39%	87.75%	<b>91.26%</b>
MCLCuV	AY064391	82.16%	84.40%	81.61%	88.41%	90.37%	85.25%
TYLCV	AJ489258	68.23%	72.46%	73.77%	77.03%	82.61%	SD

---

SD: Sin datos en NCBI o la comparación no es significativa.

Con base en los datos mostrados en la Tabla V, CuLCrV-BCS presento una mayor identidad nucleotídica con respecto a su similar CuLCrV, aislado en Arizona (USA), obteniendo un porcentaje de identidad del 92.28%. Del anterior, sigue un porcentaje de identidad del 86.95% con el SLCuV; [MX-BCS-La Paz-16]. Por ende, y con base en los criterios del ICTV (Brown *et al.*, 2015) a, CuLCrV-BCS se le consideraría como una muy probable variante del CuLCrV.

La comparación nucleotídica también se realizó de manera particular con cada ORF del componente A, de un begomovirus bipartita relacionado al CuLCrV; con base en la literatura (Brown *et al.*, 2002; Hagen *et al.*, 2008b), tomando en cuenta también a begomovirus reportados en BCS; donde únicamente el begomovirus monopartita comparado fue el TYLCV (Tabla V).

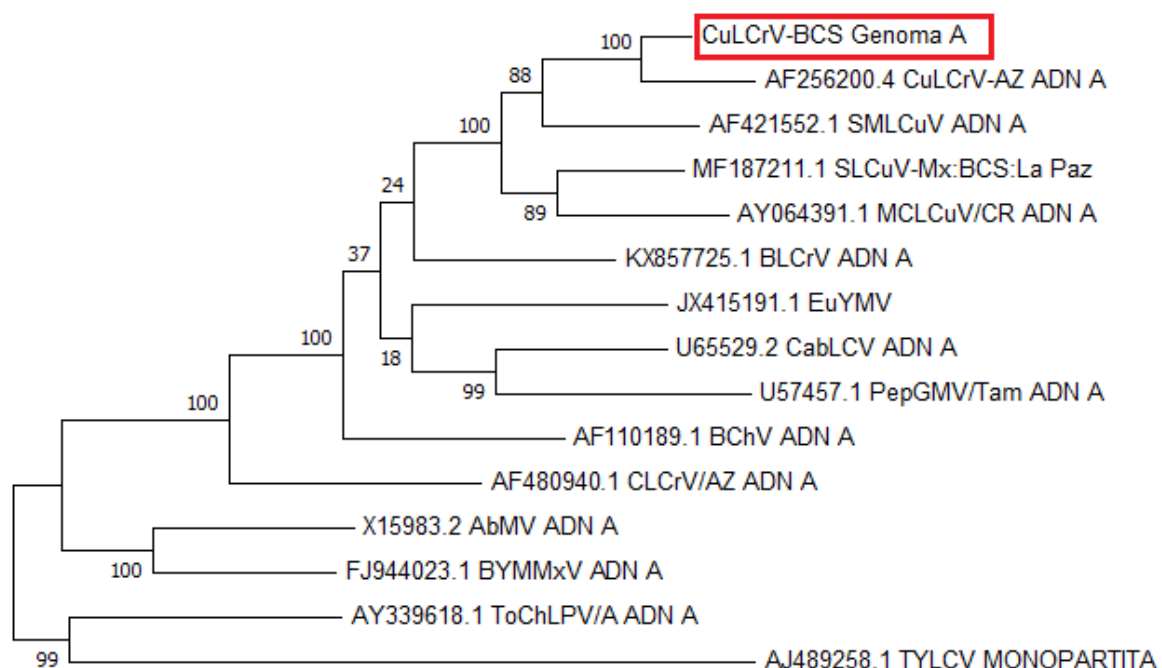
Se identificó que en las regiones AV1, AC1 y AC4, CuLCrV-BCS tiene el mayor porcentaje de identidad; 98.00%, 93.76% y 98% respectivamente, con CuLCrV. Sin embargo, para los componentes AC2 y AC3, el mayor porcentaje de identidad nucleotídica fue con el SLCuV, un begomovirus caracterizado en BCS (Medina *et al.*, 2019) y que afecta a las mismas cosechas (cucurbitáceas) que CuLCrV-BCS. Seguido de lo anterior, también destacan los altos porcentajes de identidad con el SMLCuV y con el MCLCuV; específicamente en los componentes AC2 y AC3, con porcentajes de identidad que varían del 85.39% al 90.37%.

Con base en los datos de la Tabla V, la mayor divergencia en la identidad nucleotídica del CuLCrV-BCS se encontró con el TYLCV, con un porcentaje de

identidad del 68.23%. Seguido del ToChLPV, con un porcentaje de identidad del 77.33% para la comparación entre genomas A.

#### 7.4.4 Distancias genéticas, dendrograma

Partiendo de los aislados begomovirales indicados en la Tabla IV y la Tabla V, se procedió al diseño y construcción de un árbol filogenético con las secuencias completas del genoma A de cada virus; aclarando que únicamente el TYLCV, es un begomovirus monopartita. El resultado se muestra en la Fig. 11.

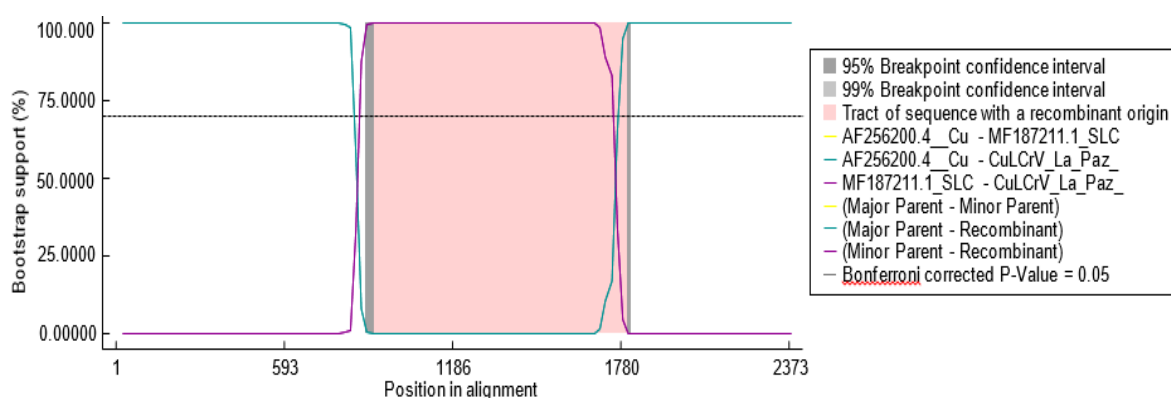


**Figura 11.** Análisis filogenético del CuLcRv-BCS, con respecto al genoma A de begomovirus con relación genética y geográfica, por el método de máxima verosimilitud. La historia evolutiva fue inferida con base en el modelo estadístico Kimura dos parámetros y bajo un criterio de 1000 repeticiones (bootstraps, en inglés). Lo anterior usando la paquetería de análisis de evolución nucleotídica de MEGA 7.

En la Fig. 11, se puede observar un clado con un vínculo directo entre el CuLCrV-BCS con el CuLCrV, seguido por una relación secundaria y terciaria, con el SMLCuV, el SLCuV y el MLCuV, respectivamente. Por otro lado, la mayor divergencia se muestra con los begomovirus ToChLPV y el TYLCV. Mientras que los begomovirus CabLCV y PepGMV, no guardan ninguna relación evolutiva aparente con el CuLCrV-BCS. Esta información muestra una relación directa con los datos de la Tabla V.

### 7.5 Identificación de eventos de recombinación

Se evaluó un posible evento de recombinación, usando las secuencias nucleotídicas del genoma A de begomovirus emparentados con CuLCrV-BCS; ya sea por estudios previos o por relación geográfica, indicados en la Tabla V. Lo anterior visible en la Fig. 12.



**Figura 12.** Análisis BootScan para identificación de eventos de recombinación. Se muestra la conjugación de los virus CuLCrV y SLCuV, como parientes del CuLCrV-BCS. El programa corrió a 1000 bootstraps.

Con base en lo anterior, se identificó al CuLCrV-BCS como un posible recombinante en la región genómica conformada aproximadamente entre los 800 y 1800 pb del genoma A, con respecto a SLCuV, lo cual tiene relación directa con

los datos plasmados en la Tabla V, donde se nos indica que los componentes AC2 Y AC3 del CuLCrV-BCS tienen una alta identidad con el primero. Además, con el análisis proporcionado por el análisis con el software RDP4, se identificó al CuLCrV, como el virus con mayor parentesco genético del CuLCrV-BCS, mientras que el subsecuente parentesco fue con SLCuV. Dicha información presenta una relación directa con lo mostrado en el árbol filogénico mostrado en la Fig. 11.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Identificación molecular del CuLCrV-BCS

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación, se identificó al *Cucurbit leaf curl virus* (CuLCV) como el agente causal de los síntomas relacionados a una infección begomoviral en hojas de melón; entre los que destacan amarillamiento, retraso generalizado del crecimiento, deformación de la hoja o reducción de ésta, esterilidad de flores y malformación de frutos (Webb *et al.*, 2007). La identificación fue realizada de acuerdo a los criterios del ICTV (Brown *et al.*, 2015), que para la determinación de especies nos indica que el aislamiento de La Paz, BCS; CuLCrV-BCS, podría ser una variante, al tener un 92.3% de identidad nucleotídica con el CuLCrV. Lo anterior, con base en los criterios de identificación taxonómica para begomovirus del ICTV, donde delimitan dentro de una especie a secuencias que tengan un porcentaje de identidad nucleotídica >91% y declaran como variante de la especie, a la que este dentro de un rango entre el 91 y 94 % (Brown *et al.*, 2015). Las variantes reportadas para esta especie; CuLCrV, son referidas solamente para en las regiones geográficas de Arizona y California; de USA (Brown *et al.*, 2002; Hagen *et al.*, 2008a). Las secuencias ensambladas para la obtención del genoma A de CuLCrV-BCS, determinó que el tamaño de 2650pb, es similar; en un 99.3%, al CuLCrV. Con respecto al genoma B de CuLCrV-BCS, únicamente se tiene una secuencia parcial de ≈900 pb alineada con respecto a su similar, variando en aproximadamente 1700 pb con el CuLCrV-ADN B; AF327559.1 (Hagen *et al.*, 2008a). Por otro lado,

los alineamientos en BLAST de las secuencias nucleotídicas del genoma A de CuLCrV-BCS, nos indicó que los posteriores porcentajes de identidad; en un rango entre el 86 y el 87.6%, correspondían a diferentes aislados del SLCuV; otro begomovirus bipartita detectado en la misma región geográfica en calabacita (Vargas-Salinas, 2017, 2019).

## **8.2 Caracterización molecular**

### **8.2.1 Identificación de los ORF's**

En la Fig. 9, se pueden observar los cinco ORF's (AV1, AC1, AC2, AC3 Y AC4) del genoma A identificados y delimitados en el genoma de CuLCrV-BCS, los cuales corresponden a la organización genómica reportada para CuLCrV y otros begomovirus bipartitas (Rojas *et al.*, 1993; Guzmán *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2002). La comparación nucleotídica de cada uno de los ORF's (Tabla V), nos indica que el mayor porcentaje de identidad observado en AV1 (98%), AC1 (93.8%) y AC4 (98%) fue con CuLCrV, seguido; en orden descendente, por otros begomovirus bipartitas relacionados (Brown *et al.*, 2002; Webb *et al.*, 2008; Hagen *et al.*, 2008a; McCreight *et al.*, 2008; Akad *et al.*, 2008; Adkins *et al.*, 2009). Al explorar la identidad nucleotídica de los ORF's AC2 (99.5%) y AC3 (97.7%), correspondientes a las regiones de amplificación proteínica TrAP y REn; respectivamente, estos presentaron mayor similitud con el componente A del SLCuV-[MX-BCS-La Paz-16], begomovirus identificado y caracterizado en BCS (Medina *et al.*, 2019; Vargas-Salinas, 2017, 2019).

### **8.2.2 identificación de los sitios únicos de corte enzimático**

La identificación de los sitios de corte enzimático del CuLCrV-BCS; visible en la Fig. 10, nos indica la predicción de 27 enzimas específicas para cada uno de ellos, sin mencionar que su acomodo prácticamente nos señala al menos un sitio específico de corte para los cinco ORF's presentes en el virus (AV1, AC1, AC2, AC3 Y AC4), así como para su CR. Únicamente seis de las enzimas indicadas en la Fig. 10, corresponden a sitios de corte idénticos entre ellas, dejando con ello, 21

sitios de corte único por el CuLCrV-BCS. De estos últimos, destaca el sitio de corte en el nucleótido 2645; mediado por la enzima *SspI*, pues al realizar su digestión en la IR del CuLCrV-BCS, permite realizar estrategias efectivas y eficientes para el desarrollo de clonas infectivas (Sambrook y Russell, 2001) de este virus, que permitirán efectuar estudios posteriores; incluida la caracterización biológica de una infección begomoviral inducida por CuLCrV-BCS.

### **8.2.3 Análisis filogenético**

Los análisis filogenéticos de los componentes A del CuLCrV y otros begomovirus bipartitas, nos indica que este pertenece a un clado bien definido donde están las variantes del CuLCrV de California (Hagen et al., 2008) y de Arizona (Brown et al., 2002) (Fig. 11). Los clados observados en el análisis filogenético coinciden con las agrupaciones formadas por análisis en BLAST, y en las comparaciones nucleotídicas (Tabla V). Se observó que el CuLCrV-BCS, tiene una relación filogenética secundaria y terciaria con el SMLCuV (Brown et al., 2002), el SLCuV- [MX-BCS-La Paz-16] (Medina et al., 2019) y el MLCuV (Brown et al., 2001). En la Fig. 11 se muestra que el aislamiento del PepGMV; también detectado en la región de BCS, es filogenéticamente más lejano del CuLCrV-BCS. Destaca también observar que los begomovirus ToChLPV, PepGMV (Holguín et al., 2003) y TYLCV (Cárdenas-Conejo et al., 2010); que previamente fueron reportados en BCS, no guardan relación filogenética directa con el CuLCrV-BCS. Por el contrario, SLCuV- [MX-BCS-La Paz-16] también identificado en BCS (Medina et al., 2019; Vargas-Salinas, 2017, 2019), presenta una relación filogenética más cercana con CuLCrV-BCS (Tabla V).

### **8.3 Evaluación de eventos de recombinación**

Está documentado que la recombinación entre los miembros de la familia *Geminiviridae* se ha presentado como una respuesta en la formación de genomas más sofisticados acordes al entorno en el que se presentan (Hagen et al., 2008a; Hanley-Bowdoin et al., 1999). Brown et al. (2002), encontraron que AC2 y AC3 del CuLCrV; aislado en Arizona (USA), tenían una mayor identidad nucleotídica con



un asilado del SLCuV, por lo que podría ser un indicativo de un presuntivo evento de recombinación. En el presente trabajo, se observó que CuLCrV-BCS presenta eventos de recombinación (Fig. 11) con el CuLCrV; aislado en Arizona (AF256200), y el SLCuV; aislado en BCS (MF187211). Siendo el primero de los anteriores el ancestro más cercano y el segundo, el presuntivo aportador de secuencias de recombinación (Tabla V). La recombinación identificada fue aproximadamente entre los 800 y 1800 pb del genoma A de CuLCrV-BCS y en los ORF's AC2 y AC3 del SLCuV (MF187211) (Fig. 9 y Fig. 12). Los datos de recombinación coinciden a la agrupación de las secuencias nucleotídicas, donde se muestra (Tabla V) que los ORF's AC2 y AC3 del CuLCrV-BCS tienen un mayor porcentaje de identidad con respecto al SLCuV aislado en BCS (MF187211) que con el ancestro directo; CuLCrV (AF256200) (Fig. 11 y Fig. 12). Lo anterior fue descrito previamente, cuando se buscaban las primeras evidencias de la presencia del CuLCrV en Arizona, pues se identificó en un análisis de posibles recombinaciones, que los ORF's AC2 Y AC3 del CuLCrV (AF256200) presentaban una identidad nucleotídica muy significativa con el SLCuV (M38183), sugiriendo que CuLCrV podría ser un recombinante híbrido formado por un posible evento de divergencia de algún ancestro común, que fue iniciado posiblemente por un tipo de presión de selección (Brown *et al.*, 2002). Para el CuLCrV; aislado en California, también se tiene registrado, con base en lo publicado por Idris *et al.* (2008), un posible caso de pseudorecombinación entre CuLCrV y SLCuV, pero sin evidencia suficiente para su confirmación. Sin embargo, con los resultados de esta investigación; por medio del software bioinformático RDP4 (Martin *et al.*, 2015), podemos inferir sobre la presencia-ausencia de los eventos recombinantes. De hecho, Hagen *et al.* (2008) retoman lo descrito por Brown *et al.* (2002), donde mencionan posibles eventos de recombinación entre el SLCuV y CuLCrV, y mencionan que también el SMLCuV juega un papel en dicho evento para el surgimiento del CuLCrV; aislado en California (Hou *et al.*, 1996). El fundamento teórico de que los eventos de recombinación puedan ser más evidentes en los ORF's AC2 y AC3, es porque en estas regiones se codifican a las proteínas TrAP

y REn; respectivamente (Bisaro, 2006; Fontes et al., 1994). TrAP es la proteína activadora de la transcripción del virus, y la encargada de la transactivación de la región AV1, actuando como supresora del silenciamiento génico; es decir, como un mecanismo que potencializa la infección y facilita los posibles eventos de recombinación (Sunter y Bisaro, 1997; Voinnet *et al.*, 1999; Ala-Poikela *et al.*, 2005; Díaz-Pendón *et al.*, 2019). Por otro lado, REn, es una proteína que potencializa la replicación (coadyuvante de la proteína Rep), que al participar en la regulación del incremento de la replicación viral; por ende, se encuentra ampliamente involucrada con eventos de recombinación del tipo RDR (Nagar *et al.*, 1995; Settlage et al., 1996; Selth *et al.*, 2005; Rentería-Canett *et al.*, 2011).

#### **8.4 CuLCrV, el begomovirus causante de la enfermedad del amarillamiento de las hojas del melón en BCS**

El CuLCrV aislado de La Paz, BCS (CuLCrV-BCS), es el agente causal de la presencia de síntomas relacionados a una infección begomoviral en hojas de melón; destacando una severa clorosis intervenal (mosaicos) y rugosidad de las hojas en el cultivo, causando pérdidas en el rendimiento y la calidad. El CuLCV es un begomovirus bipartita que se identificó por primera vez en USA (Brown et al., 2002; Webb *et al.*, 2007, Hagen et al., 2008; Gadhav *et al.*, 2018). Este virus ya ha sido detectado en México en el área agrícola de Culiacán (Lugo-Melchor *et al.*, 2011) y Coahuila (Torres-Trujillo *et al.*, 2017). Este es el primer reporte de la presencia del CuLCrV en BCS. Finalmente, la tipificación de los síntomas en este hospedero y la caracterización genómica son importantes para explorar otras áreas de estudio relacionadas a las ciencias agrícolas como son; la agroecología, la filogeografía y la fitopatología.

## 9. CONCLUSIONES

- Se identificó al *Cucurbit leaf crumple virus* (CuLCrV) como el agente causal de los síntomas de una infección begomoviral en melón y se presenta como el primer reporte del virus en BCS.
- Se estableció a CuLCrV como una variante nueva, asignada como CuLCuV-BCS.
- Se caracterizó molecularmente el CuLCrV-BCS, con una organización genómica típica de un begomovirus bipartita con cinco ORF's en el componente DNA-A e identificándose varios sitios únicos de corte enzimáticos.
- Se dilucido el parentesco y relación filogenética del CuLCrV-BCS con otros CuLCrV reportados en USA y el SLCuV reportado en BCS, México.
- Se identificó al CuLCrV-BCS como un posible recombinante conformado por el CuLCrV de Arizona, USA y el SLCuV de BCS, México.

### Perspectivas

Para poder integrar y complementar esta investigación, es recomendable lo siguiente:

- Concluir con la caracterización molecular completa del DNA-B, del CuLCrV-BCS.
- Completar la caracterización biológica del CuLCrV-BCS, referente a los datos de patometría (incidencia, severidad, prevalencia), agronomía (pérdidas, distribución).
- Buscar nuevos patrones de recombinación o pseudorecombinación entre los begomovirus identificados en BCS, tanto por la incidencia de infecciones mixtas begomovirales, como por la presencia de satélites coadyuvantes de los mismos.

- Realizar más estudios sobre las relaciones biológicas con otros virus detectados en la región (PepGMV, ToChLPV, ToSLCV, TYLCV, SLCuV) para entender las relaciones filogenéticas, filogeográficas y evolutivas

## 10. LITERATURA CITADA

- Adams, M. J., E. J. Lefkowitz, A. M. Q. King, E. B. Carstens. 2013. Recently agreed changes to the International Code of Virus Classification and Nomenclature. *Arch. Virol.* 158:2633-2639.
- Adkins, S., J. E. Polston, W. W. Turechek. 2009. Cucurbit leaf crumple virus Identified in Common Bean in Florida. *Plant Dis.* 3(3):320.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press. Fifth edition. London, UK. 952p.
- Akad, F., S. Webb, T. W. Nyoike, O. E. Liburd, W. Turechek, S. Adkins, J. E. Polston. 2008. Detection of Cucurbit leaf crumple virus in Florida Cucurbits. *Plant Dis.* 92(4):648.
- Ala-Poikela, M., E. Svensson, A. Rojas, T. Horko, L. Paulin, J. Valkonen, A. Kvarnheden. 2005. Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. *Plant Pathol.* 54: 448-459.
- 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 agrotechnology drivers. *Trends Ecol. Evol.* 19:535-544.
- Apablaza H., Gastón. 1999. *Patología de cultivos. Epidemiología y control holístico*. Primera Edición. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago. Chile. 347p.
- Arguello-Astorga, G., L. Lopez-Ochoa, L. J. Kong, B. M. Orozco, S. B. Settlage, L. Hanley-Bowdoin. 2004. A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. *J Virol.* 78(9):4817-4826.

- Baltimore, D. 1971. Expression of animal virus genomes. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 1971: 35(3):235-241.
- Bedford, I. D., R. W. Briddon, J. K. Brown, R. C. Rosell, P. G. Markham. 1994. Geminivirus-transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Ann Appl Biol.* 125:311-325.
- 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.
- Briddon, R. W., M. S. Pinner, J. Stanley, P. G. Markham. 1990. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Viol.* 177(1):85-94.
- Briddon, R. W., S. Mansoor, I. D. Bedford, M. S. Pinner, K. Saunders, J. Stanley, Y. Zafar, K. Malik, P. G. Markham. 2001. Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease. *Viol.* 285:234-243.
- Briddon, R. W., S. E. Bull, I. Amin, A. M. Idris, S. Mansoor, I. D. Bedford, P. Dhawan, N. Rishi, S. S. Siwatch, A. M. Abdel-Salam, J. K. Brown, Y. Zafar, P. G. Markham. 2003. Diversity of DNA- $\beta$ , satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Viol.* 312: 106-121.
- Brown, J. K., A. M. Idris, C. Alteri, D. C. Stenger. 2002. Emergence of a New Cucurbit-Infecting Begomovirus Species Capable of Forming Viable Reassortants with Related Viruses in the Squash leaf curl virus Cluster. *Phytopathology.* 92(7):734-42.
- Brown, J. K., H. Czosnek. 2002. Whitefly transmission of plant viruses. *Adv Bot Res.* 36:65-76.
- Briddon, R. W, J. Stanley. 2006. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Viol.* 2006. 344(1):198-210.

- Brown J. K., K. Mills Lujan, A. M. Idris. 2011. 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., C. M. Fauquet, R. W. Briddon, M. Zerbini, E. Moriones, 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. K., F. M. Zerbini, J. Navas-Castillo, E. Moriones, R. Ramos-Sobrinho, J. C. F. Silva, E. Fiallo-Olivé, R. W. Briddon, C. Hernandez-Zepeda, A. Idris, V. G. Malathi, D. P. Martin, R. Rivera-Bustamante, S. Ueda, A. Varsani. 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch Virol.* 160:1593-1619.
- 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.
- Cárdenas-Conejo, Y., G. Arguello-Astorga, A. Poghosyan, J. Hernández-González, V. Lebsky, R. J. Holguín-Peña, S. Vega-Peña. 2010. First report of *Tomato yellow leaf curl virus* co-infecting pepper with *Tomato chino La Paz virus* in Baja California Sur, México. *Plant Disease*, 94(10):1266.
- Castillo, N. J., E. Fiallo-Olive, S. Sanchez-Campos. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49:219-248.
- 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.
- Chang, H. H., H. M. Ku, W. S. Tsai, R. C. Chien, F. J. Jan. 2010. Identification and characterization of a mechanical transmissible begomovirus causing leaf curl on oriental melón. *Eur. J. Plant. Pathol.* 127:219-228.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2015. Sistema de información de Organismos Vivos modificados (SIOVM).

URL:[http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20912\\_sg7.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20912_sg7.pdf)  
. Consultado: 1/05/19.

- Costa, A. S. 1965. The whitefly-transmitted viruses of bean in Sao Paulo, Brazil. *FAO Plant Prot. Bull.* 13:121-130.
- De Barro, P. J., S. S. Liu, L. M. Boykin, A.B. Dinsdale. 2011. *Bemisia tabaci*: A Statement of Species Status. *Annu. Rev. Entomol.* 56(1) 1-19.
- Díaz-Pendón, J. A., S. Sánchez-Campos, I. M. Fortes, E. Moriones. 2019. Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus, a Begomovirus Species Evolving by Mutation and Recombination: A Challenge for Virus Control. *Viruses.* 11(1): 45. <https://doi.org/10.3390/v11010045>
- Domínguez-Durán, G., E. A. Rodríguez-Negrete, J. J. Morales-Aguilar, E. Camacho-Beltrán, J. L. Romero-Romero, M. A. Rivera-Acosta, N. E. Leyva-López, A. Arroyo-Becerra, J. Méndez-Lozano. 2018. Molecular and biological characterization of Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV): An Eastern Hemisphere begomovirus introduced in the Western Hemisphere. *Crop Prot.* 103:51-55.
- Doyle J. 1991. DNA Protocols for Plants. En: Hewitt, G. M., A. W. B. Johnston, J. P. W. Young (ed.). *Molecular Techniques in Taxonomy.* NATO ASI Series (Series H: Cell Biology), Springer. First edition. Heidelberg, Alemania. pp 283-293.
- Espinoza Arellano J. J., M. Lozada Cota, S. Leyva Nájera. 2011. Posibilidades y restricciones para la exportación de Melón Cantaloupe producido en el municipio de Mapimí, Dgo., México al mercado de los Estados Unidos. *Revista Mexicana de Agronegocios.* 28:593-604.
- 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., J. C. Thouvenel. 1977. Isolation of the rice yellow mottle virus in Ivory Coast. *Plant Dis. Rep.* 61:443-446.

- 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.
- 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.
- Fredricks, D. N., D. A. Relman. 1996. Sequence-based identification of microbial pathogens: A reconsideration of Koch's postulates. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:18-33.
- Fuller, C. 1901. Mealie variegation. First report of the government entomologist 1899–1900. 17-19.
- Gadhave, K. R., B. Dutta, T. Coolong, A. N. Sparks, S. Adkins, R. Srinivasan. 2018. First Report of Cucurbit yellow stunting disorder virus in Cucurbits in Georgia, United States. *Plant Health Prog.* 19(1):9-10.
- 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.
- GenBank, Base de datos de secuencias genéticas. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Consultado: 12/10/2019.
- Geneious; versión R10.2.6. Software bioinformático para identificación y diseño de ORF's. URL: <https://www.geneious.com>. Consultado: 14/09/19.
- 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.
- Ghanim, M., H. Czosnek, 2000. Tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV-Is) is transmitted among whiteflies (*Bemisia tabaci*) in a sex-related manner. *J Virol.* 74(10):4738-45.



- Ghanim, M., I. Sobol, M. Ghanim, H. Czosnek. 2007. Horizontal transmission of begomoviruses between *Bemisia tabaci* biotypes. *Arthropod. Plant Interact.* 1:195-204.
- Gilbertson R. L., O. Batuman, C.G. Webster, S. Adkins. 2015. Role of the Insect Supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the Emergence and Global Spread of Plant Viruses. *Annu. Rev. Virol.* 2(1):67-93.
- Google Maps, Visualizador satelital, para ubicaciones. URL: <https://www.google.com.mx/maps/preview>. Consultado: 16/08/2019.
- Gutierrez, C. 2000. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO J.* 19(5):792-799.
- Gutierrez, C., E. Ramírez-Parra, M. M. Castellano, A. P. Sanz-Burgos, A. Luque, R. Missich, R. 2004. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Vet. Microbiol.* 98: 111–119.
- Gutierrez, S., Y. Michalakis, M. Munster, S. Blanc. 2013. Plant feeding by insect vectors can affect life cycle, population genetics and evolution of plant viruses. *Funct. Ecol.* 27:610-622.
- Guzmán, P., M. R. Sudarshana, Y. S. Seo, M.R. Rojas, E. Natwick, T. Turini, K. Mayberry, R. L. Gilbertson. 2000. A new bipartite geminivirus (Begomovirus) causing leaf curl and crumpling in cucurbits in the Imperial Valley of California. *Plant Dis.* 84:488.
- Hagen, C., M. R. Rojas, M. R. Sudarshana, B. Xoconostle-Cazares, E. T. Natwick, T. A. Turini, R. L. Gilbertson. 2008a. Biology and Molecular Characterization of Cucurbit leaf crumple virus, an Emergent Cucurbit-Infecting Begomovirus in the Imperial Valley of California. *Plant Dis.* 92(5):781-793.
- Hagen, C., M. R. Rojas, T. Kon, R. L. Gilbertson. 2008b. Recovery from Cucurbit leaf crumple virus (Family *Geminiviridae*, Genus *Begomovirus*) Infection Is an Adaptive Antiviral Response Associated with Changes in Viral Small RNAs. *Phytopathology.* 98(9):1029-37.
- Hanley-Bowdoin L., S. B. Settlage, 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.

- Hamilton, W. D., D. M. Bisaro, R. H. Coutts, K. W. Buck. 1983. Demonstration of the bipartite nature of the genome of a single-stranded DNA plant virus by infection with the cloned DNA components. *Nucleic acids research*, 11(21):7387-7396.
- Holguín-Peña, R. J., R. Vázquez-Juárez, H. Mejía-Ruíz, J. A. Garzón-Tiznado, R. F. Rivera-Bustamante. 2003. Geminivirus en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y Rango de Hospedantes en Baja California Sur, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(1): 107-116.
- Holguín-Peña, R. J., R. Vázquez-Juárez, R. F. Rivera-Bustamante. 2004. Rango de hospedantes, incidencia y filogenia del virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) en Baja California Sur, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(2): 206-215.
- Hou Y. M., E. J. Paplomatas, R. L. Gilbertson. 1998. Host adaptation and replication properties of two bipartite Geminiviruses and their pseudorecombinants. *Mol. Plant. Microbe. In.* 11:208-217.
- Hull, R. 2002. *Matthews' Plant Virology*. 4th Edition. Academic Press, San Diego, CA. 1056p.
- 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/> Consultado 10/01/2020.
- Jeske, H., M. Lütgemeier, W. Preiss. 2001. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *EMBO J.* 20(21):6158-67.
- Kumar, C. Y., V. Hallan, A. A. Zaidi. 2011. Chilli leaf curl Palampur virus is a distinct begomovirus species associated with a betasatellite. *Plant Pathol.* 60:1040-1047.
- Kumar, S., G. Stecher, K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7):1870-4.

- Lapidot, M., D. Gelbart, A. Gal-On, N. Sela, G. Anfoka, F. H. Ahmed, A. K. El-Attar. 2014. Frequent migration of introduced cucurbit-infecting begomoviruses among Middle Eastern countries. *Virology* 11(1): 181.
- Laufs, J., W. Traut, F. Heyraud, V. Matzeit, S. G. Rogers, J. Schell, B. Gronenborn. 1995. In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92(9):3879-3883.
- Lazarowitz, S. G. 1992. Geminiviruses: genome structure and gene function. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 11:327-349.
- Lebsky, V., J. Hernández-González, G. Arguello-Astorga, Y. Cárdenas-Conejo, A. Poghosyan. 2011. Detection of phytoplasmas in mixed infection with begomoviruses: a case study of tomato and pepper in Mexico. *Bulletin of Insectology*, 64:55-56.
- Legg, J., C. Fauquet. 2004. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. *Plant. Mol. Biol.* 56: 585.
- Lian-Sheng, Z., J. Tong, X. Jing, L. Shu-Sheng, Z. You-Jun. 2006. SCAR molecular markers of the B biotype and two non-B populations of the whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Chin. J. Agric. Biotechnol.* 3(3):189-194.
- Lobo, I. 2008. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). *Nat. Educ.* 1(1):215.
- Lozano, G., H. P. Trenado, E. Fiallo-Olivé, D. Chirinos, F. Geraud-Pouey, R. W. Briddon, J. Navas-Castillo. 2016. Characterization of Non-coding DNA Satellites Associated with Sweepviruses (Genus Begomovirus, *Geminiviridae*) - Definition of a Distinct Class of Begomovirus-Associated Satellites. *Front. Microbiol.* 7:162.
- Lugo-Melchor, O.Y., R. Guzmán Uriarte, R. S. García Estrada, J. León Félix. 2011. Geminivirus Transmitidos por Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*) en Tomate, en el Valle Agrícola de Culiacán, Sinaloa. *Revista mexicana de fitopatología*, 29(2), 109-118.

- Martin, D. P., B. Murrell, M. Golden, A. Khoosal, B. Muhire. 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes, *Virus Evol.* 1(1):vev003.
- 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.
- McCreight, J. D., H. Liu, T. A. Turini. 2008. Genetic Resistance to Cucurbit Leaf Crumple Virus in Melon. *HortScience*. 43(1):122-126.
- Medina-Hernández, D., M. G. Caamal-Chan, M. Vargas-Salinas, A. Loera-Muro, A. Barraza, R. J. Holguín-Peña. 2019. Molecular characterization and phylogenetic analysis of a Squash leaf curl virus isolate from Baja California Sur, Mexico. *Peer J*. 7:e6774.
- Moffat, A. S. 1999. PLANT PATHOLOGY: Geminiviruses Emerge as Serious Crop Threat. *Science*. 286(5446):1835-1835.
- MONSANTO. 2004. Procedimiento recomendado para extracción de ADN en tejido vegetal. Monsanto Company. URL: <https://monsanto.com/>. Consultado: 20/04/19.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). Centro Nacional de Información Biotecnológica. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Consultado: 4/09/2019.
- Nawaz-ul-Rehman, M. S., R. W. Briddon, C. M. Fauquet. 2012. A melting pot of Old World begomoviruses and their satellites infecting a collection of *Gossypium* species in Pakistan. *PLoS One* 7:e40050.
- 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.
- Pacheco Ortiz, N., M. A. Inzunza Ibarra, J. G. Arreola Ávila, O. Esquivel Arriaga, G. García Herrera, R. Trejo Calzada. 2011. Efecto de la coloración del acolchado

- plástico y riego por cintilla sobre la producción de melón (*Cucumis melo* L). Revista Chapingo Serie Zonas Áridas (RChSZA). 10(1):11-17.
- Padidam, M., S. Sawyer, C. M. Fauquet. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*. 265(2):218-25.
- Pooggin, M.M. 2013. How can plant DNA viruses evade siRNA-directed DNA methylation and silencing? *Int. J. Mol. Sci.* 14(8):15233-59.
- Preiss, W., H. Jeske. 2003. Multitasking in replication is common among geminiviruses. *J. Virology*. 77(5):2972-80.
- Ramos, P. L., R. G. Guevara-González, R. Peral, J. T. Ascencio-Ibáñez, J. E. Polston, G. R. Arguello-Astorga, J. C. Vega-Arreguin, R. F. Rivera Bustamante. 2003. Tomato mottle Taino virus pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: Implications for the delimitation of cis- and trans-acting replication specificity determinants. *Arch. Virology*. 148: 1697-1712.
- Rana, V. S., S. T. Singh, N.G. Priya, J. Kumar, R. Rajagopal. 2012. *Arsenophonus GroEL* interacts with CLCuV and is localized in midgut and salivary gland of whitefly *B. tabaci*. *PLoS One*. 7(8):e42168.
- Rentería-Canett, I., B. Xoconostle-Cázares, R. Ruiz-Medrano, R. F. Rivera-Bustamante. 2011. Geminivirus mixed infection on pepper plants: Synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology*. 8(1): 104.
- Rojas, M. R., R. L. Gilbertson, D. R. Russell, D. P. Maxwell. 1993. Use of Degenerate Primers in the Polymerase Chain Reaction to Detect Whitefly-Transmitted Geminiviruses. *Plant Dis.* 77(4):340-347.
- Rojas, M. R., C. Hagen, W. J. Lucas, R.L. Gilbertson. 2005. Exploiting Chinks in the Plant's Armor: Evolution and Emergence of Geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:(1) 361-394.
- Romay, G., D. Chirinos, F. Geraud-Pouey, C. Desbiez. 2010. Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. *Arch Virology*. 155(11):1843-7.
- Rybicki E. P., G. Pietersen. 1999. Plant Virus Disease Problems in The Developing World. *Adv. Virus Res.* 53:127-175.

- Rybicki, E. P., R. W. Briddon, J.K. Brown, C. M. Fauquet, D.P. Maxwell, B.D. Harrison, P.G. Markham, D.M. Bisaro, D. Robinson, J. Stanley. 2000. Family *Geminiviridae*. En: van Regenmortel, M.H.V., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop (ed.). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Academic Press, Inc. First edition. San Diego, Calif. pp 285-297.
- Sambrook, J. F., D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Third edition. New York, USA. 2100p.
- 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., I. D. Bedford, J. Stanley. 2001. Pathogenicity of a natural recombinant associated with ageratum yellow vein disease: Implications for begomovirus evolution and disease aetiology. Virol. 282: 38-47.
- Saunders, K., R. W. Briddon, J. Stanley. 2008. Replication promiscuity of DNA-beta satellites associated with monopartite begomoviruses; deletion mutagenesis of the Ageratum yellow vein virus DNA-beta satellite localizes sequences involved in replication. J Gen Virol. 89(12):3165-72.
- Sunter, G., D. M. Bisaro. 1997. Regulation of a geminivirus coat protein promoter by AL2 protein (TrAP): Evidence for activation and derepression mechanisms. Virol. 232, 269–280.
- 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.
- Secretaría de Agricultura Ganadería Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2008. Delegación Federal en la Comarca Lagunera. Anuarios Estadísticos 1980-2007.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Recursos Hidráulicos, Pesca (SAGARHPA). 2018. Producción de melón, Sonora. URL: <http://oiapes.sagarhpa.sonora.gob.mx/notas/econo/melon.pdf>. Consultado: 12/06/19.

- Servicio de Información Agro-alimentaria y pesquera (SIAP). 2017. Producción Agrícola Cíclicos y Perenes. Modalidad Riego y temporal en Melón. URL: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>. Consultado: 12/06/19.
- Shung C. Y., G. Sunter. 2007. AL1-dependent repression of transcription enhances expression of *Tomato golden mosaic virus* AL2 and AL3. *Virology*. 364:112-122.
- Soriano Martín, M. L., A. Porras Piedra, A. Porras Soriano. 2006. Use of microwaves in the prevention of *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis infection during the commercial production of melon plantlets. *Crop Prot.* 25:52-57.
- Stanley, J., R. Townsend, and S. J. Curson. 1985. Pseudorecombinants between cloned DNAs of two isolates of cassava latent virus. *J. Gen. Virol.* 66:1055-1061.
- Sunter, G., M. D. Hartitz, S. G. Hormuzdi, C. L. Brough, D. M. Bisaro. 1990. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology*. 79(1):69-77.
- Tiwari, S. P., S. Nema, M. N. Khare. 2013. Whitefly- a strong transmitter of plaviruses. *Sci. J Plant Pathol*, 1(2) :102-120.
- Torres-Pacheco, I., J. A. Garzón-Tiznado, J. K. Brown, A. Becerra-Flora, R. F. Rivera-Bustamante. 1996. Detection and distribution of geminiviruses in México and the Southern United States. *Phytopathology* 86:1186-1192.
- Torres-Trujillo, P. B., O. G. Alvarado-Gómez, M. G. Estrada-Hernández, M. C. Ojeda-Zacarías, V. Ávila-Rodríguez, U. Nava-Camberos, R. González-Garza. 2017. Identificación de Biotipos del Complejo Bemisia tabaci L. y sus Begomovirus Asociados, en Coahuila y Durango, México. *Southwest. Entomol*, 42(2):523-530.
- Vargas-Salinas, M. 2017. Caracterización molecular de begomovirus y fitoplasmas asociados a una infección mixta en calabacita *Cucurbita pepo* L. en B.C.S., México. Tesis (Maestría en Ciencias). La Paz, B.C.S., México. CIBNOR. 100 p.

- Vargas-Salinas, M., D. Medina-Hernández, O. Aranda-López, R. Hernández-Barrera, R.J. Holguín-Peña. 2019. Occurrence and geographic distribution of Squash leaf curl virus in the Baja California Peninsula, Mexico, CAN. J. PLANT. PATHOL. DOI: 10.1080/07060661.2019.1631215.
- Voinnet, O., Y. M. Pinto, D. C. Baulcombe. 1999. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 14147–14152.
- Warburg, O. 1894. Die kulturpflanzen usambaras. Mitt. Deutsch. Schutzgeb. 7:131-99.
- Wayne-Davis, M. 2019. ApE, A plasmid Editor. URL: <https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>. Consultado: 20/08/2019.
- Webb, S., O. E. Liburd, T. W. Nyoike, F. Akad, J. E. Polston. 2008. Whitefly-Transmitted *Cucurbit Leaf Crumple Virus* in Florida. Entomol Nematol. 91: ENY-477.
- 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.
- Wyatt, S. D., J. K. Brown. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. Phytopathology. 86:1288-1293.
- Yang, X., Y. Xie, P. Raja, S. Li, J. N. Wolf, Q. Shen, D. M. Bisaro, X. Zhou. 2011. Suppression of methylation-mediated transcriptional gene silencing by  $\beta$ C1-SAHH protein interaction during geminivirus-betasatellite infection. PLoS Pathog. 7(10):e1002329.
- 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.
- Zapata Nicolás, M., P. Cabrera Fernández, S. Bañón Arias, P. Roth Martínez. 1989. El melón. Editorial Mundi-Prensa. First edition. Madrid, España. 174p.



- Zerbini, F. M., R. W. Briddon, A. Idris, D. P. Martin, E. Moriones, J. Navas-Castillo, R. Rivera-Bustamante, P. Roumagnac, A. Varsani. ICTV Report Consortium. 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Geminiviridae*, J. Gen. Virol. 98:131-133.
- Zhang W., N. H. Olson, T. S. Baker, L. Faulkner, M. Agbandje-Mckenna, M. I. Boulton, J. W. Davies, R. McKenna. 2001. Structure of the Maize streak virus geminate particle. Virol. 279:471-477.
- Zhao, Q., C. Dong, X. Yang, X. Mei, W. Ran, Q. Shen, Y. Xu. 2011. Biocontrol of Fusarium wilt disease for *Cucumis melo* melon using bio-organic fertilizer. Appl. Soil Ecol. 47(1):67-75.
- Zhou, X., Y. Liu, L. Calvert, D. Munoz, G. W. Otim-Nape, D. J. Robinson, B. D. Harrison. 1997. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. J. Gen. Virol. 78: 2101-2111.
- Zhou, X, Y. Xie, X. Tao, Z. Zhang, Z. Li, C. M. Fauquet. 2003. Characterization of DNAbeta associated with begomoviruses in China and evidence for co-evolution with their cognate viral DNA-A. J Gen Virol. 84(1):237-47.
- Zhou, X. 2013. Advances in understanding begomovirus satellites. Annu. Rev. Phytopathol. 51:357-381.

## 11. ANEXOS

**Anexo A.** Secuencia nucleotídica completa del CuLCrV-BCS, genoma A, resaltando al nanonucleótido TAATATT/AC, característico de los begomovirus.

```
>ACCGGATGGCCGCAAATTTTTGGTGTCTCTCGGCCCAAGGCCCGGCCCAA
ATCCCCGGCCCATGATTCAACCACAACCTTTACTCTTTTGGACCACGTAAAAGA
ATACGCACCAACCAAGTTGCTTCTGACAAGTCTACATATTTATGCTTTCTTGAC
TAAGTCGTGGTCCTTTATCTATAAATGATAATGACAATTTAGGACACTTTAACT
CAAAATGCCGAAGCGCGATGCCCCATGGCGTTCATTGACGGGGACCTCAAAG
GTTTCCCGCTCTGCTAACTATTCTCCACGTGGAGGTCCTAAATTGGACAAGGC
CGCTGTGTGGGTCAACCGGCCCATGTACCGGAAGCCCAGGATCTATCGGAC
ATTTAAGAGTCCCGATGTACCCAAGGGTTGTGAAGGGCCGTGTAAGGTCCAG
TCTTTCGAGCAGCGGCATGATATATCTCATGTTGGGAAGGTGATTTGCATATC
TGACGTGACTCGTGGTAACGGTATTACTCATCGCGTTGGGAAACGTTTTTTGTG
```

TTAAGTCTGTATATATTTTAGGGAAGATATGGATGGACGAAAACATCAAGTTGA  
AGAACCACACTAACAGTGTTATATTCTGGTTGGTAAGGGACCGTCGACCGTAT  
AGTTCTCCTATGGATTTTCGGCCAAGTGTTCAACATGTTTCGACAACGAGCCTAG  
TACTGCAACCGTTAAGAACGATCTCCGCGATCGTTTTCAAGTGATGCACAGGT  
TCTATGCCAAGGTCACTGGGGGTCAATATGCGAGCAACGAGCAAGCCTTAGT  
TAGGCGATTTTGAAGGTCAACAACCACGTAGTCTACAACCACCAGGAAGCA  
GGGAAATACGAAAATCATACTGAGAACGCTTTGTTATTGTATATGGCATGTAC  
ACATGCCTCTAACCCCGTGTATGCGACATTGAAAATTCGGATCTATTTTTATGA  
TTCGATAACAAATTAATAAATTTTGAATTTTATTTTCATGATTCTCGAGTACATAA  
TTTACATATGAACGGTCTGTTGCCCAAGATACAGCTCGTATAACGTTATTGAG  
ACCAATAACTCCTAACCTATCTAAGTACAACATAACTAAGTGCCTAAATCTATT  
CAAATATGTCGTCCCAGAAGCTCGAATCGATTCCGTCCAGATTTGGAAGTTCA  
GGAACGCTTTGTGAAGATTTAGTGCTCTCCTCAGGTTGTGGTTGAACCGGATT  
TGAATGTGGTATATCCTTGTGTGCGTGTAGAGTGGATCCTCCACGTTGTACAT  
CTTGAAATAAAGGGGATTTGGAACCTCCCAAATAAAAACGGAATTCTCTGCCT  
GATGCACAGTGATGTCGTCCCATGTGCGTAAATCCATTACCATCTTTGGCGCA  
GTTTATATGTATGTATATGGAACAGCCACAGTCTAAGTCGATTCTTCGACGAC  
GAACAGCTCTTTTTTTAGCAATCCTGTGCTGTGCTTTGATAGAGGGGACCTTC  
GAGGAAGATGAATTTGGCATTTTTTTTTCAGTCCACTCTCGTAGTGCCGAGTTC  
TCGGCTTTGTGCGAGGAAATCTTTATAACTGGACCCCTCTCCAGGATTGCACAG  
CACGATTGATGGGATTCCACCTTTAATTTGAACCGGCTTTCCATATTTACAGTT  
GACTGCCAGTCCCTTTGGGCCCAATCAATTCCTTCCAGTGCTTTAGCTTTA  
GGTAATGCGGAGCGACGTCATCAATGACGTTATACTTGACGTCATTTGAGAAA  
ACCCTAGAATTGAAATCAAGATGGCCGCTCAAGTAATTATGTGGGCCTAACGA  
CCTAGCCACATTGTCTTGCCCGTTCTTGAACCACCTTCTATGATTATACTTCT  
AGCTCGCATTGGCCGCGCAGCGGCATCCCTCCCAAATAATCATCAGCCCAT  
TCCTGTAACTCTTCTGGAACGAGAGTGAACGATGACAACGGAATGGACATG  
CCCACGTTTCAGGGGGCTGATGAAAGAGGCGCTCGATGTTAGCCTTTATGTT  
ATGATAATTCACAATAAACGTTTTTGGATCACCGATTTTTATAATGTCGAGAGC  
CTCTCCCGCACTTCTGCGTTGATGGCGTTGTGATAGACGTCGTCCTTGCTA  
GATTTTGTACCCCCAGAGACCTTGTATTTCCCGGACTCACAATAATCACCTTCT  
TTGGTGATGTAATTCCTGACGGCGTTGGCGTCTTTGGCTGCTTGAACATTTGG  
GTGAAAACCTGGCAGACCTTCTCGGGTGAGCAAGGTCGAAAAATCTAGCATCC  
TTGATGTTACATTTACCGGATAATTGAATGAGGCAGTGTAAGTGCGGGGAACCC  
GTCGGAATGTTCTCTCTTTCGCACTCTGATATACGTCGGTTTGACGATTGACC  
AGTTAAGATGCTGAAGCATCTCAATAGCTTCATCTTTAGGAATGTCGCACTGA  
GGATATGTTAAGAAAATGTTCTTGGCTGATATACGAAAGGAATTAGGGTTCCG  
TGGCATATTTGTAAATAAGAGCCAGGACACCAGCGGGAGCTCTCCACAAAAC  
CTATTGTTTGTGGTGTCTTGGTGTCCCATTTATATCTCAAGGCTAAAATTCTCT  
ACCCAGGACACCAGTGAGGACACCAGGGGCAAATTTGGCCATCCGCAATAAT  
**ATT**

**Anexo B.** Secuencia nucleotídica parcial del CuLCrV-BCS, genoma B.

```
>AAGGAGGAACCAAATTTGCGGCCATCCGGTAATATTATTGCGGATGGCCAA
TTTTGCCCTGGTGTCTCACTGGTGTCTGGTAGAGAATTTTAGCCTTGAGA
TATAAATGGGACACCAGGACACCACAAACAATAGGTTTTGTAGAGAGCTCCCG
CTGGTGTCTGGCTCTTATTTACAAATATGCCACTGAAACCCTAATTTTCGCATC
CCCTTCGCCAATCGGCTATAAATGAATTACTCATAGTTCCATGAAATCAACGA
CGATTTACAGGCGAGATATGTCGACGACGTTAGCTGCGGCACCAAACGCATT
TAATTACATAGAATCGCGACGGGATGAGTACCGGCTATCTCATGACCTGACAG
AAATTGTCCTCCAGTTTCCGTGACGACTTCGCAAATAACTGCGAAACTGAGT
CGTAGTTGTATGAAGATAGACCACTGTGTCATAGAATACAGGCAACAAGTTCC
AATTAACGCCTCAGGAACGGTGATAGTGGAGATCCACGACAAACGCATGACG
GACGACGAATCGTTACAAGCGTCATGGACATTTCCGATCAGATGCAATATAGA
TCTCCACTACTTCTCTGCGTCATTCTTCTCGCTTAAAGACCCGATTCTTGAA
GTTATACTACAAAGTGTCAGATGCAAACGTTTCATCAAATGACGCATTTTCGCAA
AATTCAAAGGCAAGCTAAAGCTGTCGTCGGCGAAACACTCCGGTTGATATCC
CCTTCCCGGGCACCGACGGTGAAATTGTTGTGGAAGCAATTCTGCGAAAAAG
ACGTTTGATTTCTGGGCACGGGGTTACGGCAGGGGGAAAAAAAATGGGTCA
ATCCCATCCCTATCAAATCCGGTCCTCAAGGGTCCCAATTGA
```